

TESIS DOCTORAL

**Caracterización De Variantes Genómicas.
Aplicación De Nuevas Tecnologías Al
Estudio Del Retraso Mental**

IRENE MADRIGAL BAJO

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de Medicina

Programa Biopatología en Medicina

Bienio 2003-2005

Tutor: Dr. Vives Corrons (Dep. de Medicina)

Memoria presentada por

Irene Madrigal Bajo

para optar al título de

Doctora en Biología por la Universidad de Barcelona

Trabajo realizado en el Servicio de Bioquímica y Genética Molecular,
Sección de Genética Molecular bajo la dirección de las Dras. Celia Badenas Orquín
y Montserrat Milà Recasens

Barcelona febrero de 2008

Dra. Celia Badenas Orquín

Dra. Montserrat Milà Recasens

Irene Madrigal Bajo

"Això serà el que tu vulguis que sigui...."

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (PI041126) y por la Fundación Ramón Areces (U-2006-FRARECES-O)

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todos los que habéis contribuido en la realización de esta tesis, no sólo con vuestra aportación científica sino también con la personal. Sois muchos los que a lo largo de estos años habéis colaborado con vuestro granito de arena. Gracias a todos.

En primer lloc m'agradaria agrair a les meves directores de tesis, la Dra. Montse Milà i la Dra. Cèlia Badenas per donar-me la oportunitat de realitzar aquest projecte. Gràcies pel vostre recolzament, la vostra confiança i per ajudar-me a arribar fins aquí.

Als companys del “camarote”: a la Laia i el Joan Anton pel dia a dia, per la seva col·laboració, pels bons moments, que han sigut molts..., a la Montse pels nostres esmorzars, a l'Alba per les nostres cervesetes, a Loli y Reme por su ayuda en el laboratorio, al Jordi pel seu caràcter...A tots els que heu col·laborat perquè la feina sigui més fàcil i en alguns moments més divertida.

A la gent del Centre de Regulació Genòmica de Barcelona (CRG), sense els quals tot això no seria el que és. Especialment al Dr. Xavier Estivill amb qui vam iniciar aquest projecte, per la seva confiança i els seus ànims. Al Lluís Armengol per la seva inestimable ajuda i la seva bona disposició. A l'Eva i el Manel per introduir-me en el món dels microarrays i per la seva dedicació.

A mis “compis” de la UAB por ser desde siempre más amigos que compañeros, especialmente a Mar y a Cristina, mi experta en estadística y maquetadora oficial.

A Ainhoa por sus ánimos y a Carolina, por nuestras interminables conversaciones telefónicas.

A mis padres y a Mónica, por su apoyo, comprensión, interés...y en definitiva por estar siempre ahí.

ÍNDICE

Listado de Publicaciones.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 El retraso mental de origen genético.....	15
1.1.1 <i>Etiología del Retraso Mental de Origen Genético.....</i>	15
1.1.1.1 <i>Factores cromosómicos.....</i>	16
1.1.1.2 <i>Alteraciones cromosómicas crípticas.....</i>	17
1.1.1.2.1 <i>Variaciones en número de copia</i>	17
1.1.1.2.2 <i>Origen de las variaciones en número de copia.....</i>	19
1.1.1.2.3 <i>CNVs involucradas en desórdenes genéticos.....</i>	21
1.1.1.3 <i>Factores monogénicos responsables de RM.....</i>	23
1.1.2 <i>Retraso Mental Ligado al Cromosoma X.....</i>	26
1.1.2.1 <i>Retraso mental sindrómico y no sindrómico.....</i>	26
1.1.2.2 <i>Principales funciones moleculares y biológicas de los genes implicados en XLMR.....</i>	28
1.1.3 <i>Diagnóstico genético del RM.....</i>	36
1.1.3.1 <i>RM sindrómico.....</i>	36
1.1.3.2 <i>RM inespecífico.....</i>	37
1.2 Técnicas de estudio del RM.....	38
1.2.1 <i>Técnicas convencionales.....</i>	38
1.2.1.1 <i>Hibridación in situ Fluorescente.....</i>	38
1.2.1.2 <i>Hibridación Genómica Comparada (CGH).....</i>	39
1.2.2 <i>Nuevas tecnologías aplicadas a la detección de reordenamientos crípticos.....</i>	39
1.2.2.1 <i>Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA).....</i>	40
1.2.2.2 <i>Array CGH (aCGH): array de BACs y array de oligonucleótidos.....</i>	41
2. OBJETIVOS.....	45
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
3.1 Construcción del array de CGH.....	51
3.1.1 <i>Extracción de DNA de BACs.....</i>	51

3.1.2 Amplificación por DOP-PCR.....	51
3.1.3 Determinación de la concentración.....	53
3.1.3.1 Curva de standards de DNA.....	53
3.1.3.2 Cálculo de la concentración.....	54
3.1.4 Espotado y bloqueo de los vidrios.....	54
3.1.5 Marcaje e Hibridación de las muestras.....	55
3.1.6 Lectura de los arrays y análisis de los resultados.....	57
3.1.7 Validación del array del cromosoma X.....	57
3.2 Diseño de sondas locus específicas de MLPA.....	58
4. PUBLICACIONES.....	61
4.1 Artículo I.....	63
4.2 Artículo II.....	71
4.3 Artículo III.....	107
4.4 Artículo IV.....	115
4.5 Artículo V.....	121
5. DISCUSIÓN.....	129
5.1 Evaluación de las nuevas tecnologías aplicadas al estudio del XLMR.....	133
5.1.1 Multiplex Ligation Probe Amplification.....	134
5.1.2 aCGH del cromosoma X.....	135
6. CONCLUSIONES.....	141
7. BIBLIOGRAFÍA.....	145

Listado de publicaciones

La tesis presentada se basa en las siguientes publicaciones:

- I. **Madrigal I**, Rodriguez-Revenga L, Badenas C, Sanchez A, Martinez F, Fernandez I, Fernandez-Buriel M, Mila M. MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation. *Genet Med.* 2007; 9(2):117-22 (Factor de Impacto: 3,427)
- II. **Madrigal I**, Rodriguez-Revenga L, Armengol L, Gonzalez E, Rodriguez B, Badenas C, Sanchez A, Martinez F, Guitart M, Fernandez I, Arranz JA, Tejada MI, Perez-Jurado LA, Estivill X, Mila M. X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation. *BMC Genomics.* 2007; 8(1):443 (Factor de Impacto: 4,029)
- III. Rodriguez-Revenga L, **Madrigal I**, Alkhalidi LS, Armengol L, Gonzalez E, Badenas C, Estivill X, Mila M. Contiguous deletion of the NDP, MAOA, MAOB, and EFHC2 genes in a patient with Norrie disease, severe psychomotor retardation and myoclonic epilepsy. *Am J Med Genet A.* 2007; 143(9):916-20. (Factor de Impacto: 2,063)
- IV. Arranz JA, **Madrigal I**, Riudor E, Armengol L, Mila M. Complete deletion of ornithine transcarbamylase gene confirmed by CGH array of X chromosome. *J Inher Metab Dis.* 2007; 30 (5):813. (Factor de Impacto: 1,574)
- V. **Madrigal I**, Rodriguez-Revenga L, Badenas C, Sanchez A, Mila M. Deletion of the OPHN1 gene detected by aCGH. *J Intel Dis Res* (Published article online: 29-Oct-2007 doi: 10.1111/j.1365-2788.2007.00997.x) (Factor de Impacto: 1,068)

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El retraso mental de origen genético

El retraso mental (RM) se define como una discapacidad intelectual que se manifiesta antes de los 18 años de edad, caracterizada por un funcionamiento intelectual significativamente inferior a la media, que coexiste con limitaciones asociadas en dos o más de las siguientes habilidades adaptativas: comunicación, cuidado personal, vida en el hogar, habilidades sociales, uso de servicios de la comunidad, autogobierno, salud y seguridad, habilidades académicas funcionales, ocio y trabajo (Luckasson et al, 1992). La Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE) establece que existe un retraso mental cuando el CI en un individuo joven es igual o inferior a 70. El coeficiente de inteligencia (CI) es un test cognitivo estandarizado que permite establecer una clasificación de los distintos grados de retraso mental. Se considera un retraso mental leve cuando los valores de CI se sitúan en el rango de 50-70, retraso mental moderado con un CI entre 35-49, retraso mental grave con un CI entre 20-34 y finalmente retraso mental profundo cuando el CI es inferior a 20. En la población general la incidencia del retraso mental está estimada entre un 1-3% para los casos de retraso mental leve a moderado y 0,5% para los casos de retraso mental grave a profundo (McLaren y Bryson 1987).

1.1.1 Etiología del Retraso Mental de Origen Genético

El estudio del retraso mental es uno de los campos más complejos de la genética humana debido a la alta heterogeneidad que presenta. A pesar del gran número de estudios que existen, más de un 50% de los casos tiene una etiología desconocida. Se sabe que alrededor de un 15% están causados por factores ambientales tales como la malnutrición durante el embarazo, infecciones, asfixia neonatal o el síndrome de alcohólico fetal, mientras que un 30% de los casos son de origen genético (Chelly y Mandel, 2001). Este último grupo engloba las anomalías cromosómicas, los reordenamientos crípticos, los factores

monogénicos y los multifactoriales. La tabla 1 muestra una clasificación etiológica más detallada del retraso mental.

Tabla 1. Clasificación etiológica del Retraso Mental

Etiología del RM
Factores Ambientales
Intoxicación materna (alcohol, drogas, etc)
Nacimiento Prematuro
Infección fetal
Trauma pre o post natal, asfixia neonatal, etc
Infecciones post-natales
Factores Genéticos
Alteraciones cromosómicas
Numéricas
Estructurales
Alteraciones cromosómicas crípticas
Reordenamientos subteloméricos
Reordenamientos crípticos intersticiales
Factores monogénicos
Mutaciones puntuales
Defectos de impronta genética
Desórdenes metabólicos
Multifactorial

1.1.1.1 Factores cromosómicos

Las anomalías cromosómicas numéricas o estructurales detectadas por citogenética convencional son responsables de aproximadamente un 10% de los casos de RM leve y un 40% del RM grave (Shevell *et al.*, 2003). Entre las alteraciones numéricas más frecuentes encontramos las trisomías 13, 18 y 21 y las anomalías en los cromosomas sexuales. Gracias a la implantación del diagnóstico prenatal, la incidencia de estas anomalías ha descendido notablemente en los últimos años. Respecto a las anomalías estructurales, el efecto fenotípico de las mismas depende no sólo del tamaño de la alteración sino de la región y de la función de los genes implicados.

1.1.1.2 Alteraciones cromosómicas crípticas

El desarrollo de tecnologías cada vez más sensibles para el análisis de todo el genoma se traduce en un incremento en la detección de reordenamientos crípticos, pequeñas deleciones o duplicaciones submicroscópicas no detectables por citogenética convencional (<3-5 Mb). Diversos estudios ya han demostrado que este tipo de anomalías son una causa importante de retraso mental, presentando una incidencia del 10-20% (Shaw-Smith *et al.*, 2004; Schoumans *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2006). Entre las alteraciones más comunes encontramos los reordenamientos subteloméricos responsables de un 5-7% de RM (Flint *et al.*, 1995, de Vries *et al.*, 2001, Rodríguez-Revenga *et al.*, 2004) o las deleciones submicroscópicas intersticiales, que dan lugar a síndromes microdelecionales y/o síndromes de genes contiguos como el síndrome de William-Beuren (Ewart *et al.*, 1993).

1.1.1.2.1 Variaciones en número de copia

Recientemente se ha descubierto que el genoma humano es genéticamente más variable de lo esperado. Estas variaciones existen en el genoma a diferentes niveles: desde cambios de una sola base hasta cambios que abarcan cientos o miles de kb (Tabla 2). Hasta la fecha se consideraba que los SNPs (*Single Nucleotide Polimorphisms*) eran la fuente de variación genética más importante del genoma humano. Sin embargo, estudios recientes han identificado en la población general gran cantidad de cambios numéricos submicroscópicos de fragmentos de DNA que varían desde 1kb a varias Mb en tamaño (Iafrate *et al.*, 2004; Sebat *et al.*, 2004). Estos cambios que incluyen deleciones, inserciones y duplicaciones con una frecuencia en la población superior al 1%, son conocidos como variaciones en número de copia (CNVs). Las CNVs representan una de las principales fuentes de variación genómica con cerca de 1.500 regiones variables descritas, abarcando aproximadamente el 12% del genoma y miles de genes por lo que parecen tener un papel importante en la evolución del genoma humano (Redon *et al.*, 2006).

Tabla 2. Clasificación de la variación genética en el genoma humano

Tipo	Definición	Frecuencia en el genoma humano
Single nucleotide polimorphism (SNP)	Substituciones de una base presentes en >1% en una población determinada	~10 millones de SNPs
Variante deleción/inserción (InDel)	Deleción o inserción de un segmento de DNA	~1 millón de polimorfismos de inserción/deleción >1 bp
Microsatélite	Repeticiones múltiples de 1–6 pb	>1 millón microsatélites
Minisatélite y número de repeticiones en tándem (VNTRs)	Secuencias polimórficas de 20–50 copias de repeticiones de 6–100 pb	~150.000 minisatélites
Variación en número de copia (CNV)	Cambios numéricos >1 kb, presentes en >1% en una población determinada	La frecuencia de CNVs es todavía desconocida. Se estima que abarcan aproximadamente 12% del genoma
Inversión	Reordenamientos que causan que un segmento de DNA esté presente en orientación inversa	Frecuencia estimada de inversiones microscópicamente visibles es de 0,12–0,7% (pericéntricas) y 0,1–0,5% (paracéntricas); se desconoce la frecuencia de inversiones submicroscópicas
Traslocación	Reordenamiento en el que un segmento de DNA está localizado en un cromosoma diferente al de origen	1/500 recién nacidos es heterocigoto para un traslocación recíproca y 1/1.000 para una traslocación Robertsoniana
Reordenamientos desequilibrados	Reordenamientos que dan lugar a una ganancia o pérdida de DNA	1/1.500 recién nacidos

De hecho se especula que la proporción de nucleótidos involucrados en CNVs es aproximadamente igual o incluso superior al número de nucleótidos afectados por SNPs (Freeman *et al.*, 2006). Las CNVs pueden contribuir de diferentes formas a enfermedades genéticas humanas, por ejemplo pueden causar la disrupción directa de uno o varios genes mediante reordenamientos cromosómicos, a veces tienen un efecto directo en la alteración

de la dosis o la expresión génica o pueden desenmascarar alelos recesivos o polimorfismos funcionales (Buckland *et al.*, 2003; Feuk *et al.*, 2006).

1.1.1.2.2 Origen de las variaciones en número de copia

En un estudio reciente, Redon *et al.*, 2006 investigaron los mecanismos de formación de diversas CNVs. De las 1447 regiones estudiadas, aproximadamente el 24% estaban asociadas a duplicaciones segmentarias (DSs) o *low copy repeats* (LCRs). Sabemos que alrededor de un 5% del genoma consiste en regiones duplicadas que comparten al menos un 90% de identidad (Lander *et al.*, 2001). Las duplicaciones pueden ocurrir dentro de un mismo cromosoma, lo que se conoce como duplicaciones segmentarias intracromosómicas, o entre cromosomas distintos, conocidas como duplicaciones segmentarias intercromosómicas. El primer tipo, las DSs intracromosómicas, fueron inicialmente descritas como regiones genómicas inestables asociadas a síndromes de microdelección y microduplicación. Un gran número de puntos de rotura de reordenamientos recurrentes mapan dentro o muy cerca de DSs. El segundo tipo de DSs, las intercromosómicas, son los que se producen entre secuencias homólogas que se localizan en cromosomas distintos. Muchas de estas DSs mapan dentro de las regiones teloméricas, en las que ya se habían descrito regiones ricas en elementos repetitivos (Eichler *et al.*, 1998). La probabilidad de que una CNV esté asociada a una duplicación segmentaria es mayor en el caso de duplicaciones intracromosómicas que intercromosómicas y se correlaciona con el aumento de semejanza entre las copias duplicadas. De hecho el proceso de recombinación homóloga no alélica (NAHR) se da principalmente entre duplicaciones segmentarias intracromosómicas con un grado de semejanza entre las copias del 97 al 100% (Redon *et al.*, 2006). La presencia de DSs que comparten un alto nivel de identidad en la secuencia podría promover alteraciones estructurales mediante recombinación homóloga originando procesos de traslocación, delección, inversión o duplicación (Figura 1). Cuando la región implicada contiene genes sensibles a dosis o genes imprintados, estos reordenamientos pueden dar lugar a síndromes genéticos específicos

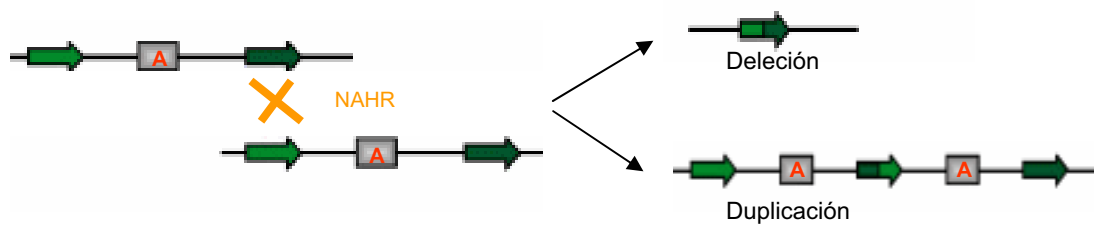


Figura 1. NAHR entre secuencias repetitivas homólogas o LCRs. En raras ocasiones, durante la meiosis se producen errores en el alineamiento entre LCR, lo que puede resultar en un entrecruzamiento erróneo que da lugar a deleciones, duplicación (LCRs orientados en el mismo sentido) o inversiones (LCRs inversamente orientados). Los reordenamientos generados por NAHR no son necesariamente patogénicos, pueden contribuir a variaciones estructurales o numéricas polimórficas, como por ejemplo el caso de las variaciones en número de copia del gen de las opsinas, proteínas implicadas en la recepción de los colores.

Existe otro tipo de elementos que pueden promover la NAHR, como por ejemplo las secuencias *Alu*. Las secuencias *Alu* son pequeños transposones de poco más de 300 pares de bases de longitud y en el genoma humano existen cerca de un millón de estas secuencias. Se ha propuesto que las *Alu* pueden ser una fuente importante de variabilidad evolutiva de los genomas. Su inserción provoca en la mayoría de los casos mutaciones que son causas de enfermedades. Los mecanismos mutacionales de las secuencias *Alu* pueden variar desde la disrupción de un gen, alteración de la expresión génica, alteración de un sitio de *splicing* o pueden promover procesos de recombinación homóloga no alélica dando lugar a duplicaciones y/o deleciones (Deininger y Batzer, 1999).

Los procesos de NAHR son habitualmente el mecanismo responsable de los reordenamientos cuyos puntos de rotura mapan en regiones ricas en LCR o DS, sin embargo no todos los casos de reordenamientos genómicos pueden ser explicados por la NAHR mediada por LCRs o secuencias *Alu*. Otros mecanismos como la recombinación no homóloga por unión de extremos (NHEJ) se han observado particularmente en reordenamientos con puntos de rotura dispersos (Shaw y Lupski, 2004). La NHEJ utiliza dos secuencias no homólogas como substrato para la recombinación, siendo el mecanismo habitual de reparación de roturas en la doble hélice del DNA (Roth *et al.*, 1985).

1.1.1.2.3 CNVs involucradas en desórdenes genéticos

Como ya se ha mencionado anteriormente, las regiones flanqueadas por DSs son susceptibles de sufrir reordenamientos mediante NAHR y representan puntos calientes de inestabilidad genómica propensos a variación en número de copia. Este es el mecanismo responsable de la mayoría de desórdenes genéticos (Tabla 3). Los procesos de NAHR generan duplicaciones y deleciones recíprocas, por lo que para la mayoría de regiones en las que se han identificado microdeleciones, existe la microduplicación correspondiente. En teoría estas duplicaciones deberían ocurrir con la misma frecuencia que ocurren las deleciones. Sin embargo hasta la fecha se han caracterizado relativamente pocos casos de microduplicaciones, debido fundamentalmente a las dificultades técnicas para detectar este tipo de reordenamientos. El síndrome de Williams (7q11.23), el velocardiofacial (22q11.2), o el síndrome de Smith-Magenis (17p11.2) son algunos ejemplos de síndromes microdelecionales mediados por procesos de NAHR (Inoue *et al.*, 2002; Bayes *et al.*, 2003). Para cada una de estas microdeleciones se ha identificado una microduplicación recíproca (Robinson *et al.*, 1998; Potocki *et al.*, 2000; Ensenauer *et al.*, 2003; Somerville *et al.*, 2005). Merecen una atención especial dentro de este apartado los reordenamientos que afectan a las regiones subteloméricas. Los telómeros de los todos los cromosomas son regiones bastante complejas que presentan una estructura rica en duplicaciones segmentarias, por lo que son propensos a sufrir reordenamientos por recombinación (Moyzis *et al.*, 1988). Las regiones subteloméricas son ricas en genes por lo que los reordenamientos subteloméricos tienen más probabilidad de presentar consecuencias fenotípicas que los reordenamientos que afectan otras zonas del genoma. De hecho actualmente sabemos que entre un 5-7% de los casos de RM inespecífico son debido a reordenamientos subteloméricos (Knight *et al.*, 2000).

Tabla 3. Principales regiones implicadas en síndromes de microdelección/duplicación

Región	Reordenamiento	Síndrome	Genes implicados
Intersticial 4p16.3	Delección, SGC	Wolf-Hirschhorn	<i>ZNF141, FLJ20265, LETM1, WHSC1</i>
5p15.3	Delección, SGC	Cri du Chat	<i>TERT, LOC133957, PDCD6, CRR9</i>
5q35.3	Delección	Sotos	<i>NSD1</i>
7q11.23	Delección, SGC Duplicación	Williams Duplicación 7q11.23	<i>ELN, LIMK1, GTF2IRD1*</i>
8q24.11-24.13	Delección, SGC	Langer-Giedion	<i>TRPS1, EXT1</i>
11p13	Delección	Wagr	<i>PAX6</i>
15q12	Delección, SGC	Prader-Willi / Angelman	<i>CYFIP1, MKRN3, NDN, SNRPN, UBE3A</i>
16p13.3	Delección	Rubinstein-Taybi	<i>CREBBP</i>
17p11.2	Delección, SGC	Smith-Magenis	<i>RAI1, LRRC48, LLGL1</i>
17p13.3	Duplicación, SGC Delección	Potocki-Lupski Miller-Dieker	<i>PAFAH1B1</i>
17q11.2	Delección	NF1	<i>NF1</i>
22q11.21	Delección, SGC	DiGeorge	<i>IL17R, BID, CLDN5, GP1BB, SNAP29</i>
22q13	Delección	Phelan-Mcdermid	<i>ARSA, RABL2B</i>
Xq28	Duplicación SGC	Microduplicación MECP2	<i>MECP2, LICAM*</i>
Subtelomérica 1p36	Delección, SGC	Microdelección 1p36	<i>TNFRSF4, GABRD, TNFRSF1, CAB45, SCNN1D, GNB1*</i>
3q29	Delección	Microdelección 3q29	<i>KIAA0226, BDH, DLG1</i>
9q34	Delección SGC	Microdelección 9q34	<i>DPP7, GRIN1, SSNA1, ZMYNAD19, MRPL41, CACNA1B</i>

SGC: síndrome de genes contiguos, * principales genes implicados en el fenotipo

1.1.1.3 Factores monogénicos responsables de RM

Actualmente la base de datos “Online Mendelian Inheritance in Man” (OMIM) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) contempla más de 1.400 condiciones sindrómicas y/o desórdenes neurológicos asociados a retraso mental que están causados por alteraciones en un único gen. En los últimos años, las estrategias de clonación posicional han permitido la identificación de muchos de estos genes. Sin embargo nuestro conocimiento de las causas monogénicas de RM es todavía limitado, principalmente en los autosomas. Identificar los genes responsables en aquellos casos en los que el RM es el único signo evidente resulta todavía un reto para la genética. La mayoría de los genes implicados en RM están involucrados en vías moleculares importantes para las funciones neuronales, especialmente aquellas vías relacionadas con la función cognitiva. En muchos casos el RM es parte de un síndrome que comprende alteraciones cerebrales tales como microcefalia, heterotopia neuronal, agenesia del cuerpo calloso etc., donde el RM es, probablemente, causa secundaria de estas alteraciones (RM sindrómico), y los genes responsables en estos casos son componentes esenciales para el correcto desarrollo del sistema nervioso central. Por el contrario, en los casos en los que el RM está presente con una estructura cerebral aparentemente normal, las alteraciones que afecten al funcionamiento de las células neuronales o su conectividad son seguramente el origen del RM (RM inespecífico). La tabla 4 muestra una lista de los principales genes autosómicos implicados en RM.

Gran cantidad de genes responsables de RM mapan en el cromosoma X, por lo que dedicaremos un apartado especial al RM ligado al cromosoma X (XLMR). Probablemente esta sobrerrepresentación es debida no sólo a la cantidad de genes en este cromosoma relacionados con las habilidades cognitivas sino también a la facilidad que comporta la identificación de genes responsables de RM ligados al X, respecto a genes autosómicos.

Dentro de la clasificación de RM monogénico se sitúan los síndromes causados por la desregulación de genes o regiones imprintadas, tales como la región 15q11-q13 asociada a los síndromes de Prader-Willi (SPW) y Angelman (SA). En el genoma humano se han identificado aproximadamente 80 genes sometidos a *imprinting* (Morison *et al.*, 2004). La

impronta genómica se refiere a la expresión preferencial o exclusiva de un gen en función de su origen parental (Moore *et al.*, 1991). Las alteraciones genéticas que originan el SPW (deleciones, disomía uniparental y defectos de *imprinting*) tienen como consecuencia común una falta de expresión de varios genes de origen paterno, mientras que las anomalías genéticas asociadas al SA (deleciones, disomía uniparental, defectos de *imprinting* y mutaciones puntuales) ocasionan la falta de expresión del gen *UBE3A* materno.

Por último, debemos tener en cuenta los errores congénitos del metabolismo, que son alteraciones bioquímicas causadas por mutaciones en genes que codifican enzimas de diversas vías metabólicas. En algunos casos estas alteraciones llevan a una intoxicación por acumulación de compuestos tóxicos. Las manifestaciones clínicas de afectación neurológica suelen ser tardías pero irreversibles, por lo que en muchas ocasiones estas enfermedades están incluidas dentro de los programas de cribado neonatal para su diagnóstico precoz. Este es el caso, por ejemplo, de la fenilcetonuria.

Tabla 4. Algunos genes autosómicos responsables de RM monogénico

Gen/ Proceso	Locus	Síndrome/Fenotipo
<i>Procesos de neurogénesis</i>		
<i>ASPM</i>	1q31	Microcefalia vera
<i>CENPJ</i>	13q12.2	Microcefalia vera
<i>MCPHI</i>	8p22-pter	Microcefalia vera
<i>Factores de transcripción y cascadas de señales</i>		
<i>CBP</i>	16p13.3	Síndrome de Rubinstein-Taybi
<i>DNMT3B</i>	20q11.2	Síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales (ICF)
<i>EP300</i>	22q13.1	Síndrome de Rubinstein-Taybi
<i>GTF2I /GTF2IRD1</i>	7q11.23	Síndrome de Williams
<i>NF1</i>	17q11	Neurofibromatosis tipo I
<i>Migración neuronal</i>		
<i>FCMD (Fukutin)</i>	9p31	Distrofia muscular congénita de Fukayama
<i>LIS1</i>	17p13.3	Síndrome de Miller Dieker
<i>POMT1</i>	9q34	Síndrome de Walker-Warburg
<i>POMT2</i>	14q24.3	Síndrome de Walker-Warburg
<i>POMGnT1</i>	1p34	Trastorno ojo-músculo-cerebro
<i>RELN</i>	7q22	Lisencefalia
<i>VLDLR</i>	9p24	Lisencefalia
<i>Diferenciación neuronal</i>		
<i>UBE3A</i>	15q11	Angelman

Modificado de Chelly *et al.*, 2006

1.1.2 Retraso Mental Ligado al Cromosoma X

El retraso mental ligado a cromosoma X (XLMR) requiere un apartado especial dentro de la etiología del RM. Los primeros trabajos sobre la incidencia del RM en la población general indican que el RM es significativamente más frecuente en varones que en mujeres, especialmente en el RM de rango leve a moderado (IQ entre 35 y 70) (Penrose *et al.*, 1938). Esta observación y la descripción de numerosas familias afectadas de RM con un patrón de herencia ligado al cromosoma X, evidencian que existe una gran cantidad de genes en este cromosoma involucrados en la etiología del RM. Los efectos de mutaciones en estos genes son evidentes en los varones hemizigotos, los cuales no pueden compensar el efecto de dosis causado por la mutación. El cromosoma X contiene aproximadamente 1.100 genes, de los cuales 800 codifican para proteínas. Aunque esto sólo equivale a un 4% de los genes codificantes de todo el genoma, cerca del 40% de estos genes se expresan en el cerebro y están involucrados en las habilidades cognitivas del ser humano, lo que les convierte en candidatos potenciales de enfermedades neurológicas ligadas a cromosoma X (Turner y Partington, 1991). De hecho, actualmente hay descritos alrededor de 300 genes del cromosoma X relacionados con distintas condiciones sindrómicas de RM, lo que representa un 10% de las enfermedades genéticas con herencia mendeliana (Ross *et al.*, 2005) (Figura 2).

1.1.2.1 Retraso mental sindrómico y no sindrómico

Convencionalmente las formas genéticas de XLMR se subdividen en dos grandes categorías: el RM sindrómico y el no sindrómico o inespecífico. La forma sindrómica se presenta asociada a unas características clínicas, físicas y/o neurológicas reconocibles, mientras que en la forma no sindrómica el RM se presenta como la única manifestación clínica. Aunque esta clasificación resulta muy útil en el diagnóstico clínico, estudios recientes de correlación fenotipo/genotipo están indicando que algunas formas catalogadas como RM inespecífico corresponden en realidad a RM sindrómico, por lo que la barrera entre las formas sindrómicas y no sindrómicas resulta a veces confusa (Frints *et al.*, 2002). De hecho, en

algunos casos los genes que causan XLMR sindrónico pueden causar también XLMR no sindrónico como sucede con los genes *ARX*, *ATRX*, *FGD1*, *MECP2* y *RSK2* (Castellví-Bel y Mila, 2001; Frints *et al.*, 2002; Inlow y Restifo, 2004). Actualmente hay descritas aproximadamente 140 formas sindrónicas de XLMR, para las que casi la mitad se ha podido identificar las mutaciones responsables. Por el contrario solo en 24 de las 82 familias con RM inespecífico se ha podido aislar el gen responsable (Ropers, 2006).

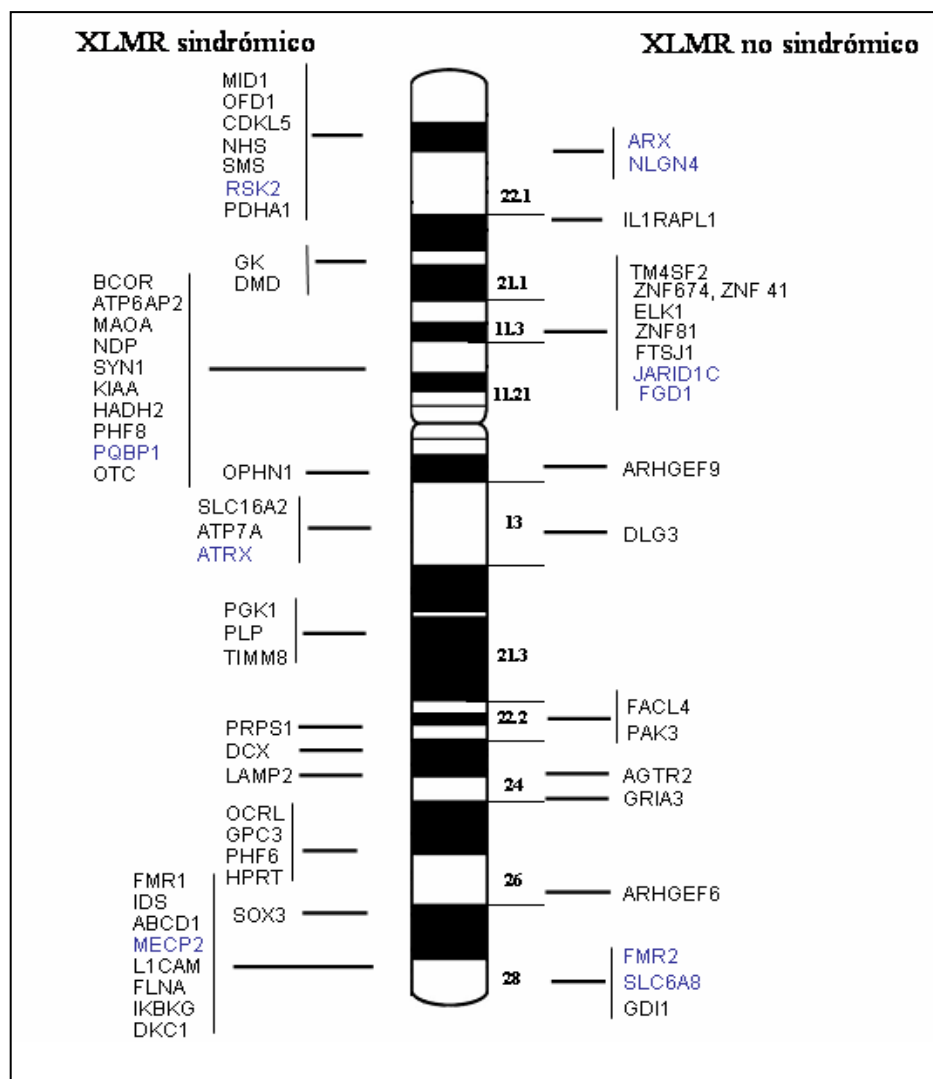


Figura 2. Principales genes implicados en XLMR sindrónico y no sindrónico. En azul se muestran los genes implicados en ambas formas.

1.1.2.2 Principales funciones moleculares y biológicas de los genes implicados en XLMR

Como ya se ha comentado anteriormente, el cromosoma X presenta una elevada proporción de genes asociados a las habilidades cognitivas y el desarrollo intelectual. Los genes implicados en XLMR codifican para proteínas que intervienen en diversos procesos neuronales, entre ellos factores de transcripción, receptores, canales de transporte, proteínas de unión al DNA o RNA, reguladores y/o efectores de las vías de las RhoGTPase, etc. (Tabla 5). A pesar de esta aparente diversidad, la mayoría de estos genes están involucrados en las mismas vías biológicas que intervienen en los mecanismos fisiopatológicos del RM. Por ello, Chelly y colaboradores (2006) proponen prestar una especial atención a aquellos genes que intervienen en las funciones neuronales básicas. En esta clasificación distinguiremos dos categorías funcionales:

- A) Control de la transcripción y remodelación de la cromatina: factores de transcripción, proteínas involucradas en cascadas de señalización o en la remodelación de la cromatina.

- B) Estructura y función sináptica, migración neuronal: regulación del citoesqueleto de actina y los microtúbulos, reguladores o efectores de las vías RhoGTPasas (vías de señalización), proteínas transmembrana, etc.

Tabla 5. Principales genes implicados en retraso mental ligado al cromosoma X.

Gen/ Proceso biológico	Locus	Síndrome/Fenotipo	Función
<i>Procesos de sinapsis</i>			
<i>ARHGEF6</i>	Xq28	XLMR, autismo	Activación de Raccdc42 mediada por integrinas, estimulación del crecimiento de las neuritas
<i>DLG3</i>	Xq13.1	XLMR	Regulación de la acumulaciones de receptores post-sinápticos
<i>FGD1</i>	Xp11.2	XLMR	Rho-GEF, estimulación del crecimiento de las neuritas
<i>FMRI</i>	Xq27	X Frágil	Proteína de unión al mRNA, factor de transcripción
<i>GDI1</i>	Xq28	XLMR	Regulación en el sinaptosoma del “pool” de Rab4 y Rab5, posible papel en endocitosis
<i>IL1RAPL</i>	Xp22.1	XLMR	Regulación de la exocitosis, modulador de la liberación de neurotransmisor
<i>NDP</i>	Xp11.4	Síndrome de Norrie	Interacción entre células neuroectodérmicas
<i>NLGN4</i>	Xp22.3	XLMR	Proteína de membrana post-sináptica, inducción de las estructuras pre-sinápticas
<i>OPHN1</i>	Xq12	RM con hipoplasia cerebelar	Activación de las Rho-GTPasas, mediador indirecto de la morfogénesis de las espinas dendríticas
<i>PAK3</i>	Xq21.3	XLMR	Regulación del citoesqueleto de actina, estimulación del crecimiento de las neuritas
<i>TM4SF2</i>	Xq11	XLMR	Modulación de la señalización mediada por integrinas, formación de las sinapsis
<i>Factores de transcripción, cascadas de señales</i>			
<i>ARX</i>	Xp22.1	Lisencefalia ligada a X con genitales ambiguos (XLAG), S. West, S. Partintong, XLMR	Factor de transcripción proliferación neuronal, diferenciación de las neuronas GABAérgicas

Gen/ Proceso biológico	Locus	Síndrome/Fenotipo	Función
<i>CDKL5</i>	Xp22.2	Síndrome de Rett-like	Interacción con MECP2, potencial implicación en la remodelación de la cromatina
<i>FMR2</i>	Xq28	XLMR	Regulación de la transcripción, implicado en formación de la memoria a largo plazo
<i>JARID1C</i>	Xp11.2	XLMR	Remodelación de la cromatina
<i>MECP2</i>	Xq28	Síndrome de Rett	Represor transcripcional, interviene en mecanismo de “splicing”
<i>PHF6</i>	Xq26	Síndrome de Börjesson-Forssman-Lehmann	Factor de transcripción
<i>PHF8</i>	Xp11.2	RM con hendidura palatina	Papel potencial en transcripción
<i>RPS6KA3</i>	Xp22.2	Síndrome de Coffin-Lowry	Fosforilación de CREB, implicado en formación de la memoria a largo plazo
<i>SOX3</i>	Xq27	RM, deficiencia de hormona del crecimiento	Factor de transcripción
<i>XNP</i>	Xq13	XLMR	Remodelación de la cromatina, regulación de la expresión génica
<i>ZNF41</i>	Xp11.2	XLMR	Regulador de la transcripción, remodelación de la cromatina
<i>Migración neuronal</i>			
<i>DCX</i>	Xq22.3	Lisencefalia tipo I	Proteína asociada a los microtúbulos
<i>FLNA</i>	Xq28	Heterotopia nodular periventricular	Regula la reorganización de los filamentos de actina
<i>LICAM</i>	Xq28	CRASH (hipoplasia cuerpo caloso, RM, afasia, paraplejia espástica, hidrocefalia).	Glicoproteína axonal

Gen/ Proceso biológico	Locus	Síndrome/Fenotipo	Función
<i>Vías de señalización</i>			
<i>AGTR2</i>	Xq24	XLMR	Receptor de la angiotensina, interviene en diversas vías de señalización
<i>Otros genes</i>			
<i>DKDC1</i>	Xq28	Disqueratosis congénita	Procesamiento y modificación de rRNA
<i>FACL4A</i>	Xq22.3	XLMR	Reciclaje y síntesis de membrana
<i>FTSJ1</i>	Xq11.2	XLMR	Modificación de los tRNAs y regulador de la traducción
<i>MID1</i>	Xp11.4	Síndrome de Optiz tipo I	Formación de estructuras de anclaje a los microtúbulos
<i>OCRL1</i>	Xq25	Síndrome de Lowe	Interacciona con proteínas RhoGAP
<i>PQPBI</i>	Xq11.2	XLMR	Regulador de la transcripción y el splicing de mRNA
<i>SLC6A8</i>	Xq28	XLMR	Transportador de creatina, mantenimiento del "pool" de (fosfo)creatina en el cerebro
<i>SLC16A12</i>	Xq13.2	RM, hormonas tiroideas alteradas	Transportador de monosacárido
<i>SMS</i>	Xp22.1	Síndrome de Snyder-Robinson	Metabolismo poliaminas
<i>UPF3B</i>	Xq24	XLMR	Regulación de la transcripción. Mecanismo degradación de mRNA sin sentido.

Modificado de Chelly *et al.*, 2006

A) Control de la transcripción y remodelación de la cromatina

Las mutaciones en genes que codifican factores y cofactores de transcripción, miembros de las cascadas de traducción de señales o proteínas de remodelación de la cromatina son una de las principales causas de XLMR monogénico (Tabla 5). Una de las cascadas de señalización-transcripción implicadas en desórdenes cognitivos más estudiadas es la vía de las Ras/MAPK (Ras-Mitogen-Activated Protein Kinase). Las proteínas MAPK son una familia de quinasas ampliamente conservadas que son activadas en la respuesta celular frente a una gran variedad de estímulos extracelulares (Garrington y Johnson, 1999). Las cascadas Ras/MAPK están involucradas en rutas de señalización tan importantes como la apoptosis o la diferenciación celular. Concretamente en neuronas Ras/MAPK forma parte de los mecanismos necesarios para la estabilidad y consolidación de la memoria y la plasticidad neuronal (Miyamoto, 2006). La importancia de la vía de señalización de las MAPK y su implicación en el RM está ampliamente demostrada por la implicación de varios componentes de estas cascadas en desórdenes que cursan con RM. A modo de ejemplo tenemos la proteína codificada por el gen *RPS6KA3* (ribosomal protein S6 serine/ threonine kinase, alias *RSK2*) responsable del síndrome de Coffin-Lowry (Trivier *et al.*, 1996). El gen *RPS6KA3* pertenece a una familia de quinasas serina/treonina (*RSK1*, *RSK2*, *RSK3*, *RSK4*) que intervienen en la vía de activación de Ras/MAPK. Estas proteínas son directamente fosforiladas y activadas por las quinasas ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases) en respuesta a factores de crecimiento, hormonas peptídicas etc. (Chen *et al.*, 1991; Sturgill *et al.*, 1991). Estas proteínas son las encargadas, una vez activadas, de fosforilar substratos nucleares como las histonas o diversos factores de transcripción (c-Fos, c-Jun, Nur77, SRF y CREB) e interaccionan a su vez con la proteína *CBP*, que es un co-activador transcripcional (Xing *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 1996). En concreto, *RPS6KA3* está directamente implicada en la fosforilación del factor de transcripción CREB (*cAMP response element binding protein*). La expresión génica y la síntesis de proteínas mediadas por CREB juegan un papel importante tanto en el aprendizaje como en la memoria en humanos (Harum *et al.*, 2001). Otros ejemplos de genes implicados en alteraciones de la vía MAPK responsables de

diversas formas de RM son los genes autosómicos *NF1* y *CBP*. Mutaciones en *NF1* y *CBP* son responsables de los síndromes de neurofibromatosis y el síndrome de Rubinstein–Taybi, respectivamente.

B) Estructura y función sináptica, migración neuronal

La sinapsis es un proceso que se produce en lugares especializados (terminales sinápticos) y cuya función es mediar la comunicación entre dos neuronas. Estructuralmente están formadas por un terminal pre-sináptico (axón) y una región post-sináptica (dendrita). La formación y mantenimiento de las sinapsis requiere la activación coordinada tanto de moléculas estructurales como de moléculas que intervienen en vías de señalización (Nakayama y Luo, 2000; Rao y Craig, 2000; Sheng y Kim, 2002). La localización pre y post sináptica de varias proteínas codificadas por genes implicados en RM sugiere que los defectos en la sinaptogénesis, especialmente en la etapa post-natal de aprendizaje y desarrollo de las funciones intelectuales, son probablemente los principales procesos celulares que contribuyen al deterioro cognitivo. Un claro ejemplo de la importancia de la sinapsis en la fisiopatología del retraso mental es el gen *FMRI*. Las alteraciones morfológicas y funcionales de las sinapsis en el córtex cerebral, cerebelo e hipocampo son las causas principales que contribuyen al déficit cognitivo en pacientes con síndrome de X frágil. La proteína FMRP, codificada por el gen *FMRI*, presenta tres dominios de unión a RNA. Esta proteína se une a un número elevado de mRNAs, un 4% de los cuales se expresan en tejido cerebral fetal (Veneri *et al.*, 2004). Estudios *in vitro* han demostrado que los niveles de FMRP se incrementan en respuesta a la activación de neurotransmisores, demostrando su implicación en la maduración y/o formación de las sinapsis (Weiler *et al.*, 1997; Greenough *et al.*, 2001).

Las alteraciones en la organización del citoesqueleto de actina de los terminales sinápticos de las dendritas y los axones, dan lugar a una disminución de la conectividad neuronal y a un deterioro de la función cognitiva ya que la regulación y plasticidad de las sinapsis son factores esenciales para la correcta actividad neuronal (Newey *et al.*, 2005). El citoesqueleto

de actina es fundamental para muchas funciones celulares como el mantenimiento de la forma, la división, adhesión, traducción de señales y orientación y ramificación tanto de los axones como de las dendritas, etc. De hecho, la formación de lamelipodios es dependiente del citoesqueleto y es esencial para las primeras etapas de movilidad del cono de crecimiento axonal (Dent y Gertler, 2003). La estructura y función sináptica está regulada por vías de señalización, siendo una de las principales la vía de las Rho-GTPasas, implicadas en la dinámica del citoesqueleto de actina. Estas proteínas juegan un papel relevante en varios aspectos de la morfogénesis neuronal y sináptica. La implicación de las Rho-GTPasa en la fisiopatología del RM está demostrada por la identificación de varios genes que codifican reguladores y/o efectores de estas proteínas (Figura 3, Tabla 4) (Ramakers 2002). Algunos ejemplos son el gen *OPHN1*, que codifica para una proteína Rho-GAP (GTPase-activating protein) que estimula la actividad GTPasa de RhoA, RAC1 y cdc42 (Billuart *et al.*, 1998), el gen *PAK3* que codifica una quinasa serina/treonina que ejerce de mediador de entre las proteínas Rac y Cdc42 y el citoesqueleto de actina y la expresión génica (Allen *et al.*, 1998) o el gen *ARHGEF6* que codifica un factor de intercambio de nucleótidos guanina para Rac1 y Cdc4 (Kutsche *et al.*, 2000).

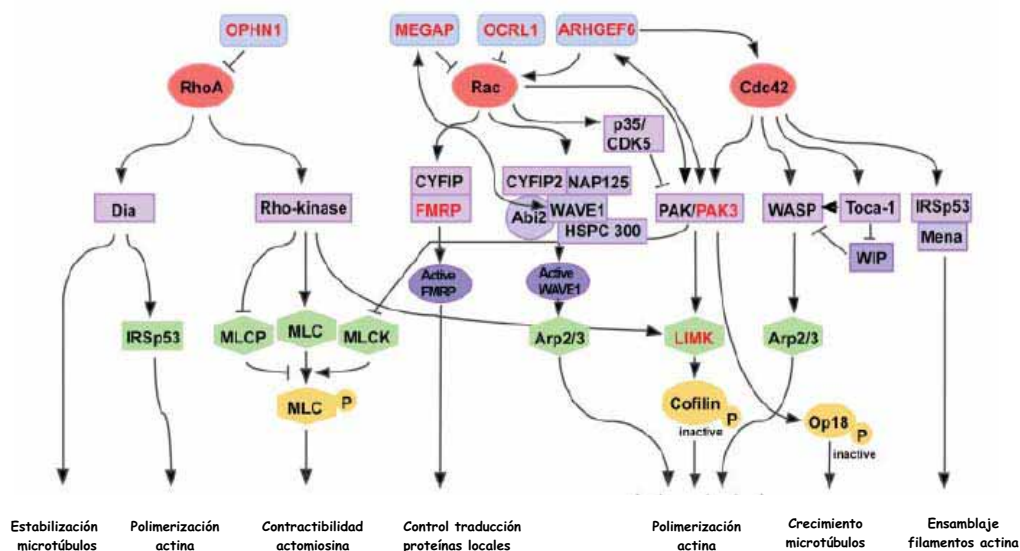


Figura 3. Regulación de los filamentos de actina a través de la vía de señalización de las Rho-GTPasas. Errores en diferentes proteínas Rho (señaladas en rojo) son responsables de diferentes formas de RM síndrónico y no síndrónico (tabla 4). Modificado de Newey *et al.*, 2005

Otra proteína que interviene en el mantenimiento de los filamentos de actina en los terminales sinápticos es la filamina, que está codificada por el gen *FLNA*. La filamina es una proteína de unión a la actina que forma una unión entre las proteínas de la membrana plasmática y el citoesqueleto. También interacciona con las integrinas y los complejos receptores transmembrana, actuando como anclaje de estas proteínas al citoesqueleto de actina. Las funciones conocidas de la filamina y el patrón de expresión de *FLNA* son consistentes con un papel en la locomoción de las neuronas migratorias. Mutaciones en la filamina son responsables del síndrome FG o síndrome de Opitz-Kaveggia, un síndrome raro que causa XLMR asociado a enfermedad cardíaca congénita, atresia anal, hernia inguinal, criptorquidismo y otras anomalías (Unger *et al.*, 2007).

Las proteínas transmembrana *NLGN4* y *IL1RAPL1*, y la proteína soluble *GDII* son otro tipo de proteínas responsables de RM y que están implicadas en la formación de terminales sinápticos. El gen *NLGN4* codifica una proteína de la superficie celular neuronal que actúa como ligando para las beta-neurexinas y está involucrada en la formación y remodelación de las sinapsis del SNC. Se han descrito mutaciones en este gen implicadas en autismo y síndrome de Asperger. La proteína codificada por el gen *IL1RAPL1* pertenece a la familia de los receptores de la interleukina 1. A nivel post-natal se expresa principalmente en las estructuras cerebrales implicadas en sistema de memoria del hipocampo, lo que sugiere un papel especializado en los procesos fisiopatológicos responsables de la memoria y el aprendizaje. Hay reportadas deleciones y mutaciones de este gen en pacientes con XLMR. Por último, el gen *GDII* (inhibidor de disociación de GDP) codifica una proteína que regula la reacción de intercambio GTP de la familia de proteínas Rab, una familia de proteínas de unión a GTP que pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras, implicadas en el tráfico vesículas de moléculas entre orgánulos celulares. Se han descrito diversas mutaciones en este gen implicadas en XLMR (D'Adamo *et al.*, 1998).

1.1.3. Diagnóstico genético del RM

El diagnóstico del RM presenta ciertas dificultades debido a su elevada heterogeneidad. El primer paso es la exploración clínica minuciosa enfocada a la detección de anomalías mayores y menores, y la obtención de datos sobre antecedentes personales y familiares. En función de los datos clínicos obtenidos, el protocolo de estudio dependerá de si existe sospecha diagnóstica clara de un síndrome que curse con RM o si por el contrario nos encontramos frente a un caso de RM inespecífico (Mila *et al.*, 2006).

1.1.3.1 RM sindrómico

A) Ante la sospecha de una cromosomopatía se realizará un cariotipo con una resolución mínima de 550 bandas.

B) Cuando se sospeche de un síndrome microdelecional (ej. Síndrome de Williams) se aplicarán las técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH), que permitirá la detección de alteraciones estructurales o numéricas menores de 500 Kb o la hibridación genómica comparada (CGH) para la detección de desequilibrios numéricos a nivel de todo el genoma con una resolución de 3-5Mb.

C) Cuando se sospeche de un síndrome causado por genes sometidos a *imprinting* (ej. Síndrome de Angelman) se realizarán estudios de metilación (que nos permitirá conocer qué genes están activos o inactivos) y/o estudios de disomía uniparental con marcadores microsatélites distribuidos a lo largo del cromosoma implicado.

D) En el caso de una sospecha de un síndrome monogénico (ej. Síndrome de Rett: gen *MECP2* o síndrome de Coffin-Lowry: gen *RPS6KA3*) se realizará el estudio mutacional del gen correspondiente mediante diferentes técnicas de búsqueda de mutaciones como *Single Strand Conformation Polimorfism* (SSCPs), *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGEs), *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (DHPLC), o secuenciación directa de todo el gen.

1.1.3.2 RM inespecífico

En los casos en los que la evaluación clínica no permita un diagnóstico claro, el protocolo establecido incluye el estudio de:

A) Cariotipo (>550 bandas). El estudio del cariotipo es un paso rutinario, a pesar de que en los casos de RM no sindrómico prácticamente no hay cromosomopatías detectables mediante citogenética convencional.

B) Estudio molecular de la expansión CGG del gen *FMRI* (Síndrome X frágil). Este estudio está establecido en el protocolo de estudio de RM debido no solo a que constituye la causa de retraso mental hereditario más común entre los varones (30% de los casos de XLMR) sino también a que es un estudio directo, fácil y barato.

C) Estudio de las regiones subteloméricas. Aproximadamente un 6-10% de los casos de RM inespecífico son debidos a reordenamientos en regiones subteloméricas. En los últimos años se han descrito nuevos síndromes de reordenamientos subteloméricos que cursan con RM y facies dismórficas (Knight *et al.*, 2000; De Vries *et al.*, 2003; Rodríguez- Revenga *et al.*, 2004). Aunque las sondas de FISH subteloméricas han sido hasta ahora el método más usado para la detección de reordenamientos subteloméricos, la técnica de *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA) se presenta actualmente como el método más eficiente para la detección de este tipo de reordenamientos.

1.2 Técnicas de estudio del RM

Desde el descubrimiento de las bandas G en los años 70, el análisis del cariotipo ha sido la principal herramienta para el diagnóstico de alteraciones cromosómicas en RM, tanto de aneuploidías totales o parciales como de reordenamientos (traslocaciones, microduplicaciones y microdeleciones). La citogenética convencional tiene una resolución de 6-10 Mb, por lo que la identificación de alteraciones submicroscópicas requiere de técnicas más sensibles. La aplicación de nuevas tecnologías de citogenética molecular como el FISH o la CGH ha permitido superar en parte esta limitación.

1.2.1 Técnicas convencionales

1.2.1.1 Hibridación *in situ* Fluorescente

La técnica de FISH, desarrollada en los años 80 (Pinkel *et al.*, 1986), supuso un gran avance para la detección y/o confirmación de anomalías cromosómicas que están más allá del poder de resolución de la citogenética convencional. Esta técnica se basa en el marcaje de sondas de DNA con fluorescencia que posteriormente se hibridarán al DNA de la muestra en el sitio diana (Figura 3). La sensibilidad de la técnica (80-100kb) es muy superior a la citogenética convencional por lo que gran número de síndromes microdelecionales son directamente diagnosticados por FISH. Los BAC (Bacterial Artificial Chromosome), PAC (P1-derived Artificial Chromosome) y YAC (Yeast Artificial Chromosome), son un tipo de “vectores de alta capacidad” usados para clonar fragmentos de DNA de aproximadamente 100 a 300 kb. El marcaje de clones, ya sean BACs, PACs o YACs, se ha convertido en una valiosa herramienta tanto para la caracterización detallada de puntos de rotura a lo largo del genoma humano y la identificación de genes responsables de desordenes genéticos en base a su localización cromosómica (clonación posicional), como para la construcción de bibliotecas genómicas, como en el Proyecto Genoma Humano.

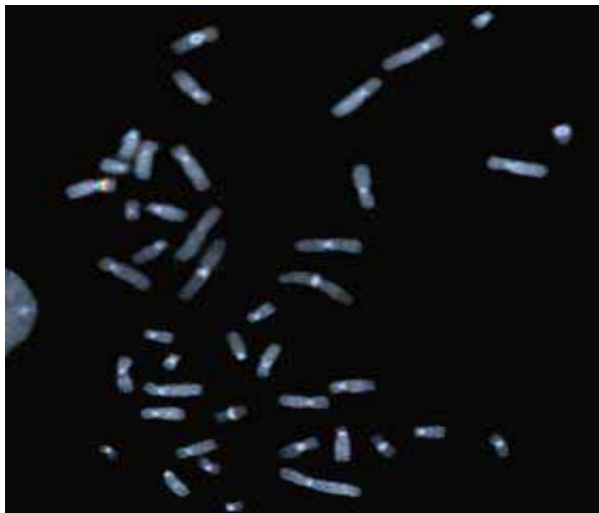


Figura 3. Hibridación *in situ* dual sobre una preparación cromosómica de un paciente varón. Las señales verde y roja corresponden a sondas amplificadas y marcadas a partir de BACs de la región Xp11.4.

Una de las desventajas que presenta la hibridación *in situ* es que es necesario conocer la región que se quiere estudiar. Son estudios dirigidos a la confirmación de una sospecha diagnóstica de síndromes microdelecionales/microduplicacionales y/o confirmación de resultados obtenidos mediante otras técnicas como el MLPA o los arrays de CGH (aCGH).

1.2.1.2 Hibridación Genómica Comparada (CGH)

La CGH es una técnica surgida en los años 90 que permite la detección de desequilibrios cromosómicos abordando todos los cromosomas en un sólo experimento (Kallionemi *et al.*, 1992), lo que constituyó un gran avance sobre las técnicas citogenéticas y moleculares utilizadas hasta el momento para el diagnóstico. La CGH se basa en un proceso de hibridación competitiva en base al cual el DNA a estudiar es marcado con un fluorocromo específico (verde), y el DNA control es marcado con otro fluorocromo distinto (rojo); estos DNA se combinan y son hibridados en cromosomas humanos sin anomalías. El análisis posterior se realiza mediante un programa informático que cuantifica la fluorescencia roja y verde a lo largo de los cromosomas, estableciendo un perfil del ratio de fluorescencia verde/rojo para cada cromosoma. Ratios entre un valor de 0,75 y 1,25 indican una cantidad relativa de DNA equivalente entre el DNA problema y el DNA control, ratios superiores a 1,25 o inferiores a 0,75 indican una ganancia o pérdida en el DNA problema, respectivamente. Las principales limitaciones de la CGH son la resolución, ya que no detecta reordenamientos cromosómicos inferiores a 5-10Mb y tampoco permite detectar alteraciones cromosómicas equilibradas. Además se trata de una técnica laboriosa con la que no se obtienen resultados hasta pasadas 72 horas.

1.2.2 Nuevas tecnologías aplicadas a la detección de reordenamientos crípticos

El desarrollo de nuevas tecnologías cada vez más sensibles está permitiendo la detección de reordenamientos crípticos que muchas veces no pueden ser detectados con las técnicas de citogenética convencional. En el campo del RM, la aplicación de estas nuevas tecnologías,

como los *arrays* de CGH o el MLPA, está permitiendo la identificación y caracterización de alteraciones cromosómicas desequilibradas que resultan en variaciones en número de copia.

1.2.2.1 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

La técnica del MLPA se ha convertido en una valiosa herramienta para la detección de reordenamientos crípticos. El MLPA se basa en la detección simultánea del número de copias de una secuencia diana mediante la hibridación genómica del DNA con una mezcla de sondas específicas (Schouten *et al.*, 2002). Cada sonda está constituida por un oligonucleótido sintético y un fragmento derivado del bacteriófago M13 (figura 4). Cada uno de estos segmentos presenta secuencia una secuencia complementaria a la secuencia diana y una secuencia de *primers* que común para todas las sondas (*primers* X e Y). El fragmento derivado del bacteriófago presenta además una secuencia comodín que varía en tamaño para cada sonda que nos permitirá diferenciar los productos amplificados por el tamaño. Cuando ambas partes de la sonda hibridan de forma específica sobre el DNA problema, se produce la ligación entre ambos fragmentos de la sonda y la posterior amplificación de esta secuencia. Las sondas que no hayan hibridado o no se hayan ligado no serán amplificadas. La cantidad relativa de producto amplificado se corresponde con el número de copias de la secuencia diana. Los productos amplificados son identificados y cuantificados mediante electroforesis capilar (Figura 4).

En el campo del retraso mental, la aplicación del MLPA ha sido de especial utilidad para el estudio de reordenamientos subteloméricos, responsables del 5-7% de los casos de RM inespecífico. El gran número de estudios surgidos en los últimos años, ponen de manifiesto que esta tecnología es altamente eficiente para el análisis a gran escala de desequilibrios subteloméricos en pacientes con RM (Koolen *et al.*, 2004; Rooms *et al.*, 2005; Montfort *et al.*, 2006). Actualmente en el mercado existen sondas para el estudio tanto de regiones implicadas en RM (ex. regiones subteloméricas, diversas regiones del cromosoma X) como para síndromes concretos (ej. Síndrome de Williams o Síndrome de Rett).

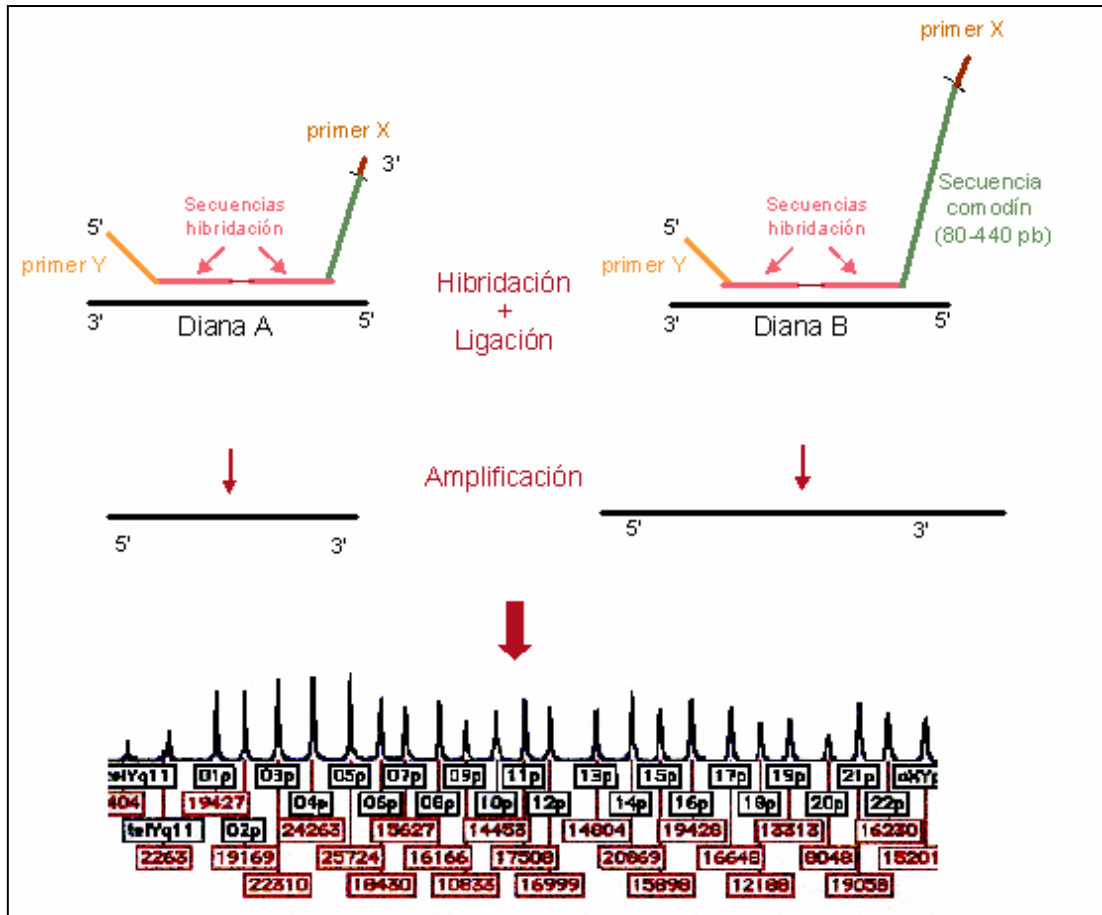


Figura 4. Esquema de la reacción de MLPA. Los productos de amplificación tienen una medida única para cada secuencia diana.

Por otro lado el diseño de sondas de MLPA *locus* específicas es relativamente sencillo, por lo que es posible diseñar estudios de regiones específicas. El diseño de sondas de MLPA constituye una herramienta rápida para el estudio de reordenamientos en regiones específicas del genoma. Una de las desventajas de esta tecnología es sin embargo, que no permite detectar alteraciones cromosómicas equilibradas y que el análisis queda limitado a las regiones para las que se han diseñado las sondas.

1.2.2.2 Array CGH (aCGH): array de BACs y array de oligonucleótidos

Hasta la fecha, la técnica más empleada para la detección de cambios en el número de copia de DNA a lo largo de todo el genoma ha sido la CGH. La aparición de la CGH supuso una enorme ventaja frente a las técnicas de citogenética convencional. Sin embargo, tiene un

poder de resolución similar al de la citogenética de alta resolución, permitiendo sólo detectar pérdidas o ganancias superiores a 5-10Mb. La aparición de los aCGH, con un mayor poder de resolución (<1Mb), ha permitido la detección de reordenamientos crípticos desequilibrados a lo largo de todo el genoma no detectables con las técnicas convencionales. El aCGH es una técnica que combina la tecnología de los *microarrays* con la CGH, en la que la hibridación se realiza sobre secuencias de DNA conocidas fijadas en un soporte sólido, generalmente un soporte de cristal (Figura 5). En función del tipo de material que se fija en el soporte, disponemos de diferentes tipos de *arrays*. En los aCGH de BACs, los segmentos fijados son fragmentos de DNA, de localización física conocida, de aproximadamente 100-150kb, clonados en forma de BAC o PAC. El aCGH es actualmente -el método más usado para el *screening* a gran escala de variaciones en número de copia. Comparado con el cariotipo convencional, el aCGH proporciona no sólo una mayor resolución sino también permite mapear directamente las alteraciones detectadas a una secuencia genómica conocida.. Su resolución está determinada por el tamaño y la densidad de secuencias fijados en el soporte. Los *arrays* “*tiling path*” tienen una resolución de aproximadamente 1 clon cada 100kb, por lo que la cobertura de la región a estudiar es total. Los aCGH permiten además un diseño diferente para cada experimento, por lo que muchos laboratorios realizan estudios con aCGH usando clones de regiones genómicas seleccionadas. En retraso mental es común el uso de *arrays* diseñados específicamente para la detección de síndromes microdelecionales o microduplicacionales (Locke *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2004) y detección de reordenamientos subteloméricos (Veltman *et al.*, 2002).

Otro tipo de *arrays* habitualmente usados para la detección de CNVs son los de oligonucleótidos (Lucito *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004), en los que el material fijado son oligonucleótidos sintéticos de un tamaño de 25 a 80 bases. Debido al menor tamaño de las sondas, los *arrays* de oligonucleótidos permiten una densidad mucho mayor. Así, un *array* de 1cm² puede llegar a contener hasta 100.000 oligonucleótidos, lo que proporciona un poder de resolución muy elevado (<50kb).

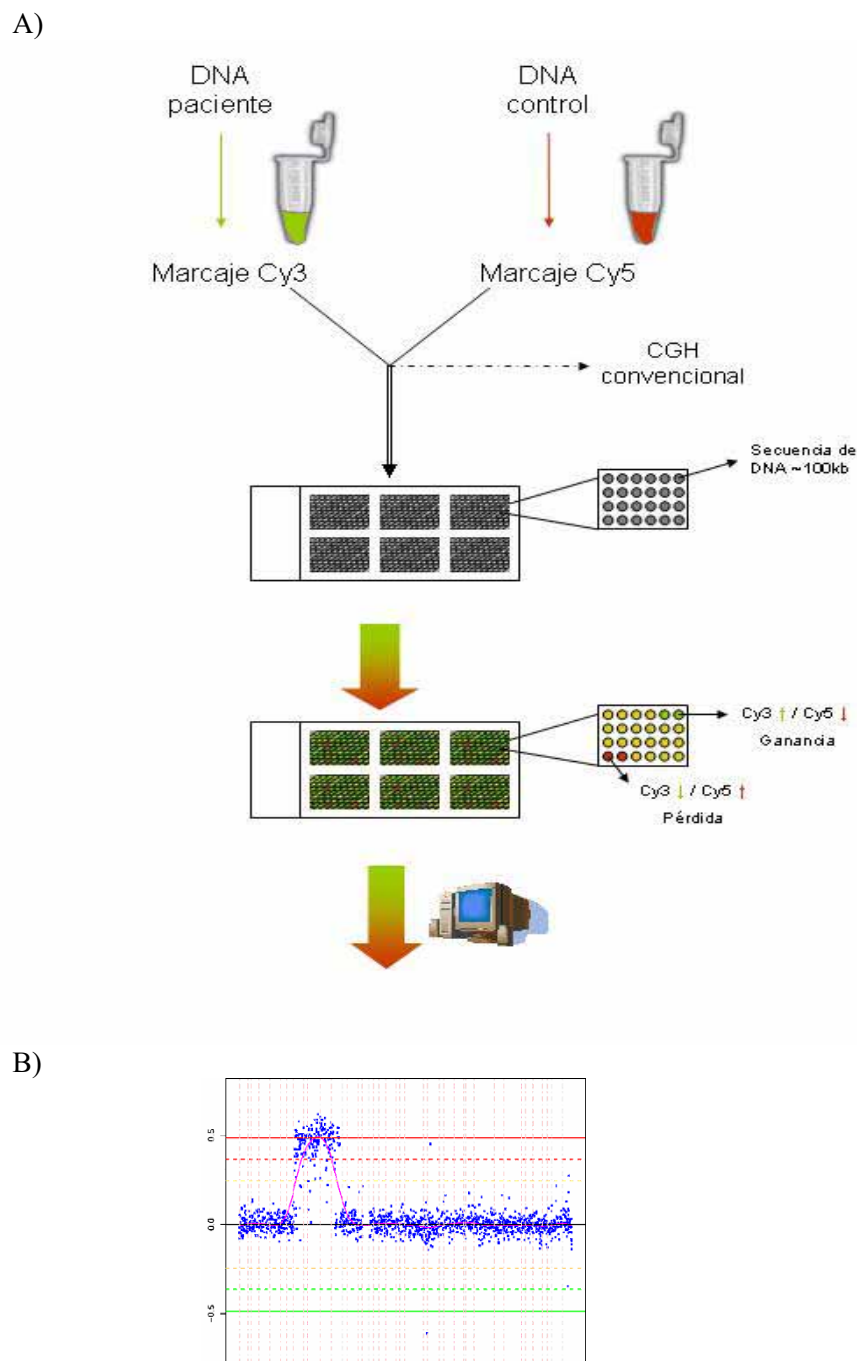


Figura 5. Esquema de la tecnología del aCGH. A) En los aCGH la hibridación de las muestras control y problema se realiza sobre secuencias de DNA conocidas fijadas en un soporte sólido. Además cada experimento se realiza por duplicado cambiando los fluorocromos (*dye swap*). De esta forma si en el primer experimento se marca la muestra en verde y el control en rojo, en el segundo experimento se invierten los colores. B) En el perfil del aCGH cada punto representa la media transformada y normalizada del \log_2 del ratio de la intensidad de la muestra frente al control. Este ratio se obtiene de un número de puntos independientes replicados en el *array* (el número de réplicas depende del diseño). Los desequilibrios genómicos se determinan en base al \log_2 de los ratios Cy5/Cy3 de cada clon.

Los progresos recientes en las tecnologías de diagnóstico genético están permitiendo la detección de alteraciones cromosómicas submicroscópicas a nivel de todo el genoma, mejorando de forma significativa el diagnóstico en los pacientes afectados de RM.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es la caracterización de variantes genómicas responsables de RM y la aplicación de diferentes metodologías al diagnóstico del RM de origen genético.

Los objetivos concretos son:

1. Evaluar la eficiencia de las nuevas tecnologías para la detección de reordenamientos crípticos en pacientes con RM: aCGH del cromosoma X y MLPA.
2. Diseño y construcción de un array específico del cromosoma X que consta de una batería de 1.600 clones representando la secuencia de todo el cromosoma X a intervalos de aproximadamente 100kb.
3. Establecer una relación fenotipo/genotipo en aquellos pacientes portadores de reordenamientos en este cromosoma.
4. Identificación de nuevos genes involucrados en la patología del RM.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Construcción del array de CGH

El diseño, la construcción del *array* y la hibridación de las muestras se han realizado en el laboratorio de microarrays del Centro de Regulación Genómica de Barcelona (CRG, Barcelona). El aCGH del cromosoma X consta de aproximadamente 1.600 BAC genómicos derivados del cromosoma X, más 3 clones específicos de *Drosophila* (control negativo). La selección de clones se hizo a través de la base de datos de la *University of California Santa Cruz* (<http://genome.ucsc.edu/>). El conjunto de clones utilizados para la construcción de este *array* deriva de la librería humana de 32k suministrada por el *Children Hospital Oakland Research Institute* (<http://bacpac.chori.org/home.htm>). Cada *array* contiene cuadruplicados de los 1,600 clones, con una densidad de 1 clon cada 100 kb, lo que representa una resolución teórica de 100 kb.

3.1.1 Extracción de DNA de BACs

La extracción de DNA se realiza a partir de 1,5 ml de cultivo mediante el kit Montage BAC96 Miniprep (Millipore, Billerica, MA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.1.2 Amplificación por DOP-PCR

Para la amplificación del DNA extraído se ha seguido el protocolo descrito por Fiegler y col. (2003).

Material:

- 10x polimerasa Buffer sin MgCl₂ (Biotools)
- Taq polimerasa 5 U/μl (Biotools)
- 50mM MgCl₂ (Biotools)
- dNTPs 100mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Roche). Se prepara una mezcla de los 4 a una concentración final de 10mM.
- primers a una concentración de 100μM

DOP1: 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NCT AGA A-3'

DOP2: 5' - CCG ACT CGA GNN NNN NTA GGA G-3'

DOP3: 5' - CCG ACT CGA GNN NNN NTT CTA G-3'

DOP4: 5' - GGA AAC AGC CCG ACT CGA G-3' (5' amino modificado)

La amplificación consta de dos reacciones:

1. DOP-PCR R1

En un volumen final total de 50µl se prepara:

10xPol Buffer	5µl (1x final)
MgCl ₂ 50mM	2µl (2mM final)
dNTPs 10mM	1µl (0.2mM final)
Primer DOP1	1µl (2µM final)
Primer DOP2	1µl (2µM final)
Primer DOP3	1µl (2µM final)
Taq polimerasa 5U/µl	1µl (2.5 U final)
BAC DNA	2µl

Las condiciones de PCR son las siguientes:

- 1) 3 min 94°C
- 2) 1 min 30 seg 94°C
- 3) 2 min 30 seg 30°C
- 4) Δ a 0,1°C/seg de 30°C a 72°
- 5) 3 min a 72°C
- 6) Ir al paso 2, 9 veces más
- 7) 1 min a 94°C
- 8) 1 min 30 seg 62°C
- 9) 2 min 72°C
- 10) Ir al paso 7, 29 veces más
- 11) 8 min 72°C
- 12) 15° C, Final

Se carga 1/10 parte de la reacción en un gel de agarosa al 1%. Se debe ver un *smear* entre 0,3-3kb, específico para cada muestra.

2. DOP PCR R2

Se prepara una mezcla de reacción para un volumen final de 60µl:

10xPol Buffer	6µl (1x final)
MgCl ₂ 50mM	3µl (2,5mM final)
dNTPs 10mM	1,5µl (0.25mM final)
Primer DOP4	1µl (0.6µM final)
Taq polimerasa 5U/µl	1µl (5U final)
DNA (DOP PCR R1)	2µl

Las condiciones de PCR son las siguientes:

- 1) 3 min 94°C
- 2) 1 min 94°C
- 3) 1 min 30 seg 60°C
- 4) 7 min a 72°C
- 5) Ir al paso 2, 34 veces más
- 6) 10 min 72°
- 7) 15°C
- 8) Final

Se cargan entre 3-5µl en un gel de agarosa al 0,7%. Debe observarse un *smear* de bandas entre 0,3-3kb.

La purificación de los productos de PCR se realiza con las placas Montage PCR96 (Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.3 Determinación de la concentración

Preparar una dilución del reactivo de cuantificación* en DMSO, 1:200 en 1xTE (10xTE, Invitrogene).

* Reactivo de cuantificación (PicoGreen ds DNA Quantification kit, Molecular Probes)

PicoGreen	50µl
TE 1X	9,95ml

3.1.3.1 *Curva de standards de DNA*

- 1) Realizar una dilución del standard DNA BAC purificado de 100µg/µl.
- 2) Diluir primero 1:100, obteniendo una concentración de 1000ng/ml.

- 3) Para una sola muestra de esta dilución, añadir 2 μl de DNA a 198 μl de 1xTE.
- 4) A partir de esta dilución, se obtienen las concentraciones de DNA entre 400-25ng/mL.

3.1.3.2 Cálculo de la concentración

- 1) En los 8 pocillos de la primera fila de una placa de 96 se pipetea 100 μl de cada una de las diluciones estándar: 1000, 500, 250, 100, 50, 20, 10 y 4 ng/ml, respectivamente.
- 2) En el primer pocillo de la segunda fila se pipetea 100 μl de TE (blanco).
- 3) En el resto de pocillos se añade pipetea una dilución 1:20 de las muestras a analizar (2 μl de muestra en 38 μl de 1xTE) y 100 μl de la dilución 1:200 (en 1xTE) del reactivo de cuantificación.
- 4) Mezclar a temperatura ambiente durante 10 minutos en el agitador de placas, protegido de la luz con un cubre de aluminio.
- 5) Medir en el fluorímetro de placas (Spectra max, Gemini XPS).

3.1.4 Espoteado y bloqueo de los vidrios (protocolo del Grupo del Dr. Lauro Sumoy, CRG)

Los productos purificados y cuantificados son secados en un *speed-vacuum*, disueltos a 400 ng/ μl en 50% DMSO y espoteados en los vidrios por cuadruplicado usando el VersArray ChipWriterTM Pro System (Bio-Rad). Antes de poder ser utilizados, los vidrios deben ser bloqueados.

1. Materiales:

- portaobjetos espoteados y con el DNA fijado
- H₂O milliQ autoclavada
- BSA (albúmina sérica bovina)
- 20x SSC (filtrado)
- 10% SDS (filtrado)
- filtros de 0,22 μm de poro

- cestillos para portaobjetos

2. Preparación de la solución de bloqueo:

1) Preparar 250 ml de solución con BSA al 1%, 6xSSC, 0.5% SDS en agua mQ.

20xSSC 75 ml

10% SDS 12.5 ml

BSA (98% en polvo) 2.5 g

agua miliQ 162.5 ml

2) Filtrar la solución por filtros de 0,22 μ m de poro.

3) Poner la solución en una cubeta de prelavados y calentamos a 42°C.

4) Añadir 12 portaobjetos como máximo y dejamos 1h a 42°, con agitación.

5) Realizar 4 lavados con agua mQ.

6) Centrifugar 5 min a 1500 rpm a RT para secarlos.

3.1.5 Marcaje e Hibridación de las muestras

La hibridación de las muestras se realizó siguiendo el protocolo del kit Bioprime (BioPrime Array CGH Genomic Labeling System, Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA) modificado para aCGH (Fiegler *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Para cada hibridación se marcan 400 ng de DNA del paciente y DNA control mediante *random priming*. En todos los casos se utilizó el sistema de marcaje reverso para minimizar el efecto artefactos específicos de marcaje.

1. Materiales:

- kit Bioprime (Invitrogen)
- dCTP-Cy3 y dCTP-Cy5 1 mM (Amersham Biosciences)
- DNA genómico purificado
- 10x dNTP mix (dATP, dTTP y dGTP a 2 mM, dCTP a 1,2 mM)
- Columnas para limpiar la reacción (Qiaquick PCR purification kit)

2. Procedimiento:

1) Para cada muestra de DNA genómico se prepara un tubo de 0,2 ml para PCR

donde se mezclan:

- 400 ng de DNA genómico a estudiar
- 20 μ l de 2,5x Primer Mix del kit
- Ajustamos el volumen hasta 42 μ l y H₂O mQ autoclavada

2) Dejar 10 min a 99°C en el termociclador. Hacemos un *spin* y dejamos los tubos en hielo.

3) En el tubo se añade:

- 5 μ l de 10x dNTP mix
- 2 μ l de dCTP-Cy3 o dCTP-Cy5 1 mM (según la muestra)
- 1 μ l Klenow (40 U/ μ l) del kit

4) Dejar O/N a 37° (aprox. 18 horas).

5) Limpiar las muestras de nucleótidos no incorporados con el kit “*Qiaquick PCR purification*” (Qiagen), siguiendo las instrucciones del proveedor.

6) Medir la absorbancia a 532 y 650 de las muestras con el espectrofotómetro (ND100, NanoDrop Technologies) para determinar la cantidad de fluorocromo incorporado.

En este punto se pueden guardar las muestras a -20°C hasta un periodo de tres meses o seguir con la precipitación de la sonda y la posterior hibridación.

Precipitación de las sondas

- 1) En un eppendorf añadir 50 μ l de muestra marcada con Cy3, 50 μ l de muestra marcada con Cy5, 100 μ g de Cot-1 DNA (1 μ g/ μ l)(Roche Diagnostics)
- 2) 20 μ l de NaCl pH 5.2 y 500 μ l de etanol 100% frío
- 3) Mezclar los tubos por inversión e incubar 1h a -20°C
- 4) Centrifugar durante 30 min. a 13.200rpm a 4°C
- 5) Descartar el sobrenadante y dejar secar el *pellet*

Hibridación

- 1) Resuspender los *pellets* en 70 μ l de solución de hibridación
- 2) Hacer un *spin* y dejar 20 min a 72°C y 2 h a 45°C
- 3) Hacer un *spin*, añadir los 70 μ l de muestra sobre un cubre de vidrio de 24x60mm y colocarlo sobre la zona del porta donde están los *spots*.
- 4) Poner el porta en una cámara de Corning y añadir 20 μ l de agua mQ en cada pocillo.
- 5) Cerrar las cámaras y dejar 40 h a 45°C en un horno de hibridación.

Lavados

- 1) 1x con 50% formamida, 2xSSC y 0.1% SDS durante 20 min, a 45°C con agitación
- 2) 2x con 0.2x SSC, 10 min, a temperatura ambiente con agitación
- 3) 1x con H₂O miliQ, 10 min, a temperatura ambiente con agitación
- 4) Centrifugar a 1.500 rpm, 5 min a temperatura ambiente
- 5) Escanear y cuantificar el *array*

3.1.6 Lectura de los arrays y análisis de los resultados

Los vidrios se escanean con el sistema Agilent G2565BA MicroArrayScanner (Agilent Inc., Palo Alto, CA) y las imágenes adquiridas se analizan mediante el software GenePix Pro 6.0 (Axon, Molecular Devices). Los datos extraídos son filtrados y normalizados (normalización Lowess) mediante el software Bacanal (Lozano y col., sin publicar). Se calcula el ratio log₂ y la Desviación Standard (SD) para cada clon para cada hibridación. Los desequilibrios genómicos se determinan en base al log₂ de los ratios Cy5/Cy3 de las cuatro réplicas de cada clon, considerándose que existe una ganancia o una pérdida cuando al menos dos clones consecutivos exceden el rango +0.2 o -0.2, respectivamente.

3.1.7 Validación del array del cromosoma X

Con el fin de validar la especificidad y sensibilidad del *array* para detectar variaciones en número de copia, se analizaron cuatro muestras de DNA de pacientes portadores de

alteraciones del cromosoma X caracterizadas mediante citogenética convencional: 46,XX,dupXq22-q26; 46,XX,dupXq28; 46,XX, delXq27-qter; 46,XX, dupXp11-p21. De la misma forma, se realizaron hibridaciones de una misma muestra contra si misma para detectar aquellos clones que excluiremos del análisis. Los criterios seguidos para considerar que un clon era problemático son:

- 1) clones con valores absolutos de \log_2 ratio >0.2 en las hibridaciones de una muestra contra sí misma son considerados falsos positivos
- 2) clones con valores de SD superiores a 2 veces la desviación de las desviaciones en diferentes hibridaciones
- 3) clones que muestran valores de \log_2 ratios normales dentro de una alteración conocida son considerados falsos negativos

3.2 Diseño de sondas locus específicas de MLPA

La confirmación y caracterización de las CNVs encontradas mediante el aCGH se ha realizado mediante sondas locus específicas de MLPA. El diseño de las sondas se ha realizado consultando la base de datos de la *University of California Santa Cruz* (<http://genome.ucsc.edu/>).

Protocolo para el diseño de las sondas

- 1) A la hora de escoger la secuencia diana, es importante evitar la presencia de polimorfismos en esta región ya que pueden afectar a la unión de la sonda con la secuencia diana dando lugar a falsos positivos.
- 2) Cada sonda diseñada debe consistir en dos segmentos, S1 y S2, que son dos secuencias adyacentes y complementarias a las secuencia diana a estudiar.
- 3) Cada segmento puede tener un tamaño entre un mínimo de 21 pb y un máximo de 80 pb.
- 4) La diferencia mínima entre dos sondas debe ser de 4pb. Este rango nos permite discriminar las secuencias por tamaño.

5) El extremo 5' de S1 de cada sonda es totalmente complementario a un primer F (marcado con FAM o HEX) que se utiliza para amplificar las secuencias.

6) El extremo 5' de S2 de cada sonda presenta una modificación fosfato necesaria para la ligación de ambos segmentos de la sonda (S1 y S2).

7) El extremo 3' de S2 de cada sonda es totalmente complementario a un primer R que se utiliza para amplificar las secuencias.

Para preparar la mezcla de sondas se diluyen 0,8µl de cada sonda (1µM) en 1XTE, hasta un volumen final de 200µl.

Protocolo

1. Diluir el DNA (20-500ng DNA) en H₂O, hasta un volumen final de 5µl.
2. Desnaturalizar 5 minutos a 98 °C, dejar enfriar hasta 25 °C.
3. Añadir 1.5µl de SALSA Probe-mix (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) y 1.5µl de la mezcla de sondas que hemos preparado.
4. Mezclar con cuidado. Calentar 1 min. 95°C, e incubar 16 h. a 60°C.
5. Transcurrido el tiempo de incubación, bajar la temperatura del termociclador a 54°C y añadir 32µl de Ligase-65 mix (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).
6. Dejar incubar 15 min. a 54°C
7. Tras el periodo de incubación se realiza la PCR. Se mezclan 4µl de 10 X SALSA PCR buffer (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), 26µl de H₂O y 10µl de la reacción de ligación. Cuando el termociclador está a 60°C, se añaden 10µl de *Taq* polimerasa a la mezcla anterior. Las condiciones de la PCR son:

35 ciclos: 30 segundos a 95°C;

30 segundos a 60°C

60 segundos 72°C,

extensión final: 20 min. a 72°C.

8. La separación de los productos amplificados se realiza en un analizador de fragmentos ABI 310 y los datos se analizan mediante el software *GeneMapper* (Applied Biosystems, CA, USA).

4. PUBLICACIONES

Justificación del estudio 1

MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation. Genet Med. 2007; 9(2):117-22

El estudio genético del RM constituye uno de los campos más complejos de la genética humana; el avance en la identificación y caracterización de los factores genéticos responsables de RM se ve limitado por la heterogeneidad tanto clínica como molecular de esta patología. El hecho de que cada gen sea responsable de RM en un número reducido de familias, existiendo más familias sin diagnosticar que familias con alteraciones genéticas identificadas, hace más difícil la identificación de estos genes. Hasta ahora la mayoría de las mutaciones identificadas en genes responsables de RM son mutaciones no sinótimas y deleciones, posiblemente debido a la falta de técnicas lo suficientemente eficaces para la detección de otro tipo de reordenamientos. La técnica de MLPA permite la detección de alteraciones en el número de copia mediante la amplificación de sondas adyacentes que identifican una secuencia diana. Actualmente esta técnica es ampliamente utilizada debido a su alta relación efectividad/coste y a que puede ser utilizada en cualquier laboratorio de biología molecular. De la misma forma, en los casos en que se sospecha un XLMR, se incluye el screening de reordenamientos en el cromosoma X mediante un MLPA específico de este cromosoma. La puesta a punto del MLPA ha permitido incluir el screening de regiones subteloméricas por MLPA en los protocolos de estudio de RM, de tal forma que ahora este estudio se realiza ante todo RM que tenga un cariotipo normal y una vez descartado el síndrome del cromosoma X frágil.

Los objetivos específicos de estos estudios fueron:

1. Evaluar la técnica de MLPA para la detección de reordenamientos crípticos en pacientes con XLMR.
2. Determinar la incidencia de microdeleciones y microduplicaciones en una población de individuos con XLMR mediante MLPA.

Justificación del estudio 2

X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation. BMC Genomics. 2007; 8(1):443

El estudio de reorganizaciones submicroscópicas requiere de técnicas más sensibles a la citogenética convencional. Las limitaciones de la citogenética convencional fueron en parte superadas gracias a la aparición de la Hibridación Genómica Comparada (CGH) y la hibridación “in situ” fluorescente (FISH). Sin embargo la principal limitación de la CGH es su resolución ya que no detecta reordenamientos cromosómicos menores a 3Mb y del FISH es que se requiere conocer la región que queremos estudiar. Los arrays de CGH permiten detectar reordenamientos cromosómicos desequilibrados de <1 Mb.

Los objetivos específicos de estos estudios fueron:

1. Diseño y construcción de un *array* específico del cromosoma X que constará de una batería de aproximadamente 1600 clones representando la secuencia de todo el cromosoma X a intervalos de aproximadamente 100 kb.
2. Determinar la incidencia de microdeleciones y microduplicaciones en una población de individuos con XLMR mediante el *array* de CGH del cromosoma X.

Justificación de los estudios 3, 4 y 5

Contiguous deletion of the NDP, MAOA, MAOB, and EFHC2 genes in a patient with Norrie disease, severe psychomotor retardation and myoclonic epilepsy. Am J Med Genet A. 2007; 143(9):916-20. (Factor de Impacto: 2,063)

Complete deletion of ornithine transcarbamylase gene confirmed by CGH array of X chromosome. J Inherit Metab Dis. 2007; 30 (5):813

Deletion of the OPHN1 gene detected by aCGH. J Intel Dis Res (Published article online: 29-Oct-2007 doi: 10.1111/j.1365-2788.2007.00997.x)

Una aplicación básica de los aCGH es la caracterización de síndromes microduplicaciones/microdelecionales conocidos, lo que es de gran importancia clínica no solo para el consejo genético, especialmente en mujeres portadoras, sino también para el establecimiento temprano de un tratamiento. Además gracias a ellos podemos caracterizar de forma precisa la región implicada y establecer correlaciones fenotipo/genotipo.

Los objetivos específicos de estos estudios fueron:

1. Caracterización molecular de alteraciones previamente descritas en los pacientes con XLMR.
2. Establecer una correlación fenotipo/genotipo en estos pacientes.

4.1. Artículo I

MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation.

Madrigal *et al.*
Genet Med. 2007; 9(2):117-22

MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation

Irene Madrigal, BS^{1,2}, Laia Rodríguez-Revenga, PhD^{1,2}, Celia Badenas, PhD^{1,2}, Aurora Sánchez, PhD, MD^{1,2}, Francisco Martínez, PhD³, Isabel Fernández, PhD⁴, Miguel Fernández-Buriel, PhD⁵, and M. Milà, PhD^{1,2}

Purpose: Routine protocols for the study of mental retardation include karyotype, analysis for fragile X syndrome, and subtelomeric rearrangements. Nevertheless, detection of cryptic rearrangements requires more sensitive techniques. Mutation screening in all known genes responsible for X-linked mental retardation is not feasible, and linkage analysis is sometimes limited. Multiplex ligation probe amplification is a recently developed technique based on the amplification of specific probes that allows relative quantification of 40 to 46 different target DNA sequences in a single reaction. **Methods:** In the present study, we assessed multiplex ligation probe amplification for the detection of microduplications/microdeletions in 80 male patients with suspicion of X-linked mental retardation. **Results:** We detected four copy number aberrations (5%): three duplications (*GDI1*, *RPS6KA3*, and *ARHGEF6*) and one deletion (*OPHN1*). All these changes were confirmed by other molecular techniques, and patients were clinically re-evaluated. **Conclusions:** We strongly recommend the use of multiplex ligation probe amplification as a first screening method for the detection of copy number aberrations in patients with mental retardation because of its cost-effectiveness. *Genet Med* 2007;9(2):117–122.

Key Words: MLPA, X-linked mental retardation, microduplications, microdeletions

INTRODUCTION

The molecular basis of X-linked mental retardation (XLMR) is poorly understood because of the high genetic heterogeneity of this disorder. Genes causing XLMR are thought to contribute to the specific development of human cognitive abilities. Many of these genes are conserved among vertebrates, suggesting they are engaged in basic cellular mechanisms, such as cytoskeleton organization (*PAK3*, *OPHN1*, *ARHGEF6*, *DCX*, *IL1RAPL1*, *TM4SF2*), chromatin remodeling (*FMR2*, *MECP2*, *RSK2*, *ATRX*), or signaling cascades (*GDI1*, *PAK3*, *OPHN1*, *ARHGEF6*).^{1,2} Mutations in most of them cause nonsyndromic mental retardation, although several are also associated with a specific syndrome.³ The search for nonspecific XLMR genes remains expensive, and findings are limited by the small number of families found to harbor mutations in the same X-linked gene. Therefore, a large number of these XLMR

families remain undiagnosed in most genetics services. Routine protocols for the study of XLMR include karyotype and analysis for fragile X syndrome, which is responsible for 15% to 20% of all patients with XLMR. Thus, the genetics etiology of more than 50% of patients with mild to moderate mental retardation (MR) and 20% of patients with severe MR remains still unknown. Furthermore, detection of cryptic rearrangements requires more sensitive techniques than conventional cytogenetics. Classical polymerase chain reaction (PCR) is widely used in the study of genetic alterations, but it is not sensitive enough to detect small deletions or duplications. Recently developed technologies such as multiplex ligation probe amplification (MLPA) have become effective tools for the detection of these aberrations.⁴ MLPA is based in the relative quantification of specific DNA sequences by the hybridization of genomic DNA with a mixture of probes.⁵ This methodology allows the study of copy number changes in 40 to 46 different sequences in a single experiment. In this study, we assessed the use of MLPA in the detection of microrearrangements in patients with XLMR.

PATIENTS AND METHODS

Patients

A total of 80 unrelated male patients belonging to families from GIRMOGEN (Spanish Network for Mental Retardation Study) that met criteria for XLMR (more than one affected male family member in several generations or more than three

From the ¹Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic; ²Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona; ³Unidad de Genética, Hospital Universitario La Fe, Valencia; ⁴Instituto de Biología y Genética Molecular, Universidad de Valladolid; ⁵Unidad de Investigación, Hospital de Mérida, Badajoz, Spain.

M. Milà, Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic, C/ Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: mmila@clinic.ub.es

The authors declare no conflict of interest.

Submitted for publication September 13, 2006.

Revised November 27, 2006.

Accepted for publication December 7, 2006.

DOI: 10.1097/GIM.0b013e318031206e

affected brothers) were included in this study. Previous studies showed normal karyotype and no *FMR1* expansions, and subtelomeric rearrangements were ruled out using MLPA for subtelomeric regions.

Methods

MLPA assay

MLPA was performed according to manufacturer's recommendations (Salsa P106, MRC, Holland). The P106 kit contains a specific probe mixture with 43 probes for 14 known genes responsible for XLMR (*PQBP1*, *TM4SF2*, *ARX*, *IL1RAPL1*, *RPS6KA3*, *OPHN1*, *FACL4*, *DCX*, *PAK3*, *ARHGEF6*, *FMR1*, *FMR2*, *GDII*, and *SCL6A8*). Electrophoresis was performed using the ABI 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) with Rox 500 size standard and GeneMapper software v3.0 (Applied Biosystems). GeneMapper data were exported to an Excel file to perform the analysis. Normalization of MLPA data was always required to avoid quantitative differences of measured values among samples because of variations in experimental conditions. This normalization was achieved by dividing the signal value of each probe by the sum of the signal values of all probes for each sample. Previous analysis of 20 samples from normal male subjects and 20 samples from normal female subjects allowed for normal cut-off levels to be established. A normal copy number should generate a normalized signal value of 1. For men, a deletion in a locus should result in the suppression of signal because they only have one X chromosome, whereas amplification results in an increment greater than 30%. For women, a reduction of relative signal greater than 30% was considered a deletion, and an increment in signal strength greater than 30% was considered a duplication because no control sample exceeded these values.

Assessment of MLPA sensitivity

To test the sensitivity of MLPA, we designed an experiment in which we screened a series of sample dilutions (80%, 50%, and 30%) of DNA from a 1p36 deletion carrier for subtelomeric copy number changes with Salsa PO36B (MRC, Holland).

Confirmatory studies

All MLPA findings were confirmed by other molecular techniques. The deletion affecting exons 21 and 22 of the *OPHN1* gene was confirmed by PCR using specific primers: 21F (5'-TTAT-CATTAATCTTCCCTCTTGG-3'), 21R (5'-AAGTAGTTAGG-GTCAGCTCTGG-3'), 22F (5'-AAGTTGGCCCAGGTAAGTCT-3'), and 22R (5'-GTGATCCTGAAAGCATTCCT-3').

Duplication of the *RPS6KA3* gene was confirmed by using a tiling-path X-chromosome CGH array consisting of approximately 1600 genomic BAC clones derived from the X chromosome (unpublished data). Thresholds for copy numbers were established by log ratios, >0.2 for gains and ≤ 0.2 for losses. *ARHGEF6* duplication was confirmed by fluorescence in situ hybridization (FISH) in interphase nuclei using BAC clones mapping on Xq26.3 (RP11-431K12, RP11-812C12, RP11-378N15). In the case of *GDII* duplication, we investigated its

effect on mRNA expression. Total RNA of the patient and other affected male family members was extracted from whole blood. Expression of the *GDII* gene was analyzed by real time RT-PCR using TaqMan probes (Applied Biosystems). Quantification was performed against a control amplicon of the GUSB mRNA (Applied Biosystems). Furthermore, we investigated the possible duplication of the near *MECP2*, *FLNA*, and *EMD* genes using a specific MLPA for *MECP2* (SALSA P015C; MRC) and probes for *FLNA* and *EMD* genes.

In all cases, segregation of alterations with phenotypes was confirmed by studying other members of the families.

RESULTS

Of the 80 patients, 4 (5%) analyzed using MLPA showed evidence of a cryptic aberration: three duplications (affecting *RPS6KA3*, *GDII*, and *ARHGEF6* genes) and one deletion (affecting *OPHN1* gene). Pedigrees of these families are shown in Figure 1.

DNA copy numbers for each studied sequence were reflected by ratios between normalized peak areas and the corresponding mean of normalized peak areas of the female or male reference data set. Altered ratios for patients harboring duplications and deletions are depicted in Figure 2.

Family 1

The three probes for the *RPS6KA3* gene were duplicated in the patient (Fig. 1A, II.1) and two affected male family members (Fig. 1A, I.5 and II.3). As expected, two women (Fig. 1A, I.2 and I.4) were diagnosed as carriers. An X-chromosome CGH array confirmed a duplication of 1Mb in Xp22.12, affecting four genes (*CXorf23*, *FLJ14503*, *EIF1AX*, and *RPS6KA3*) (data not shown). All affected male family members presented nonspecific mental retardation and robust build, and two were dyslexic.

Family 2

MLPA identified a duplication in the two probes of the *GDII* gene in the patient (Fig. 1B, II.2) and two affected uncles (Fig. 1B, I.3, I.4). As expected, the patient's mother (Fig. 1B, I.2) was diagnosed as a carrier. Expression of *GDII* was analyzed at the mRNA level, and significant differences were detected between affected male subjects and male controls with a significantly higher mRNA expression in patients carrying the duplication (from 2.8- to 5-fold compared with controls). Specifically designed MLPA showed duplication of *FLNA* and *EMD* genes, but no alterations were detected in the *MECP2* gene. All affected male subjects presented moderate MR, a peculiar face with dysmorphic features, and microcephaly.

Family 3

MLPA analysis showed a deletion affecting exon 21 of the *OPHN1* gene in four affected male subjects (Fig. 1C, II.1, II.4, II.6, and II.8). Using PCR, we confirmed a deletion spanning exons 21 and 22. Two women in the family (Fig. 1C, I.2 and II.7) could be diagnosed as carriers (Fig. 3). This deletion does not result in a truncated protein but includes the domain of

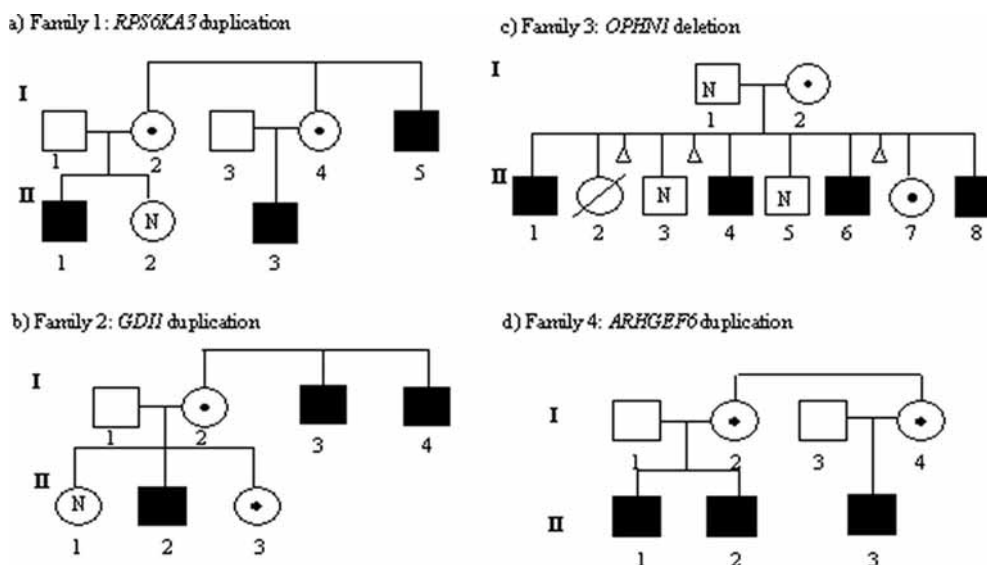


Fig. 1. Pedigrees of Families 1, 2, 3, and 4. Affected individuals are represented with *black symbols*. Carrier women are shown with a *black dot* inside their symbol. The N inside symbols refers to non-affected individuals after molecular study. Empty symbols correspond to non-studied individuals.

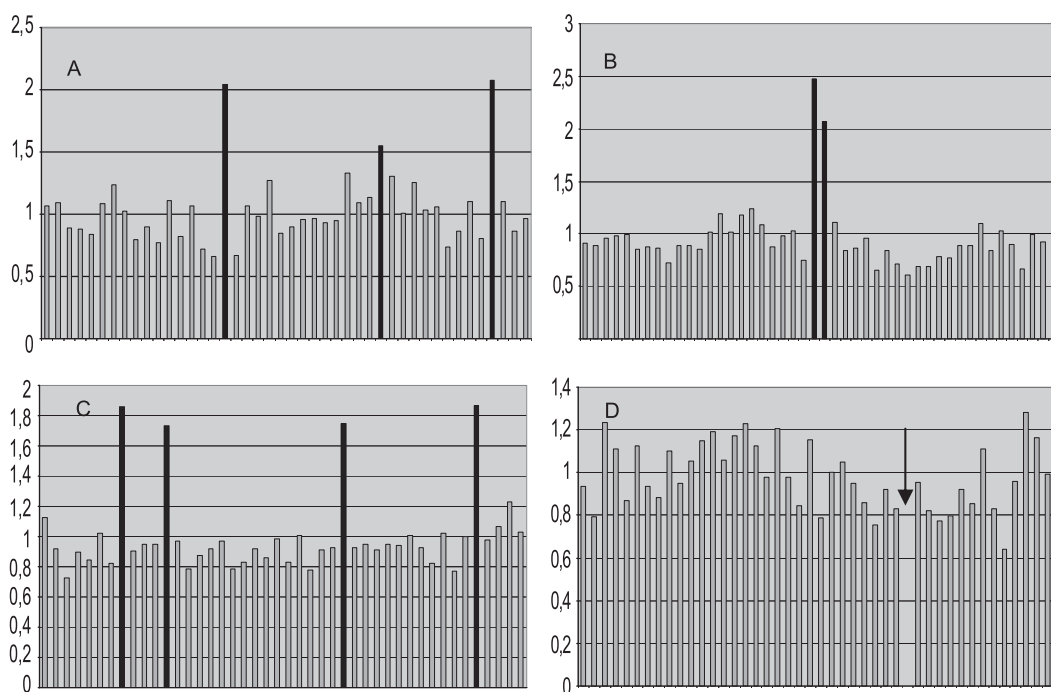


Fig. 2. Relative peak area for each probe measured in Patient II.1 of Family 1 (A), Patient II.2 in Family 2 (B), Patient II.1 in Family 4 (C), and Patient II.1 in Family 3 (D). X-axis, 46 tested probes (for a complete list of probes, see www.mrc-holland.com). Y-axis, Normalized ratios. Bars that exceed the limit of 1.30 in A–C correspond to probes for *RPS6KA3*, *GDII*, and *ARHGEF6* genes, respectively. In D, the lack of one peak is evidence of the *OPHN1* deletion (*black arrow*).

interaction with actin, located in the carboxyl-terminal end of the protein. All affected male subjects share a conspicuous phenotype of severe MR showing strabismus, synophrys, prominent nose, and a broad high nasal root. The magnetic resonance imaging scan of two of the affected male subjects evidenced cerebellar hypoplasia and a Dandy-Walker variant malformation.

Family 4

MLPA showed duplication of the four probes of the *ARHGEF6* gene in the patient (Fig. 1D, II.1) and his brother (Fig. 1D, II.2).

Two women in the family (Fig. 1D, I.2 and I.4) were diagnosed as carriers. FISH in interphase confirmed duplication of clones RP11-812C12, RP11-378N15, and RP11-431K12 located in the region (Fig. 4). Both affected patients had moderate MR and displayed dysmorphic features.

Assessment of multiplex ligation probe amplification sensitivity

In the series of DNA dilutions using material from an individual with a known 1p36 deletion, MLPA was able to detect

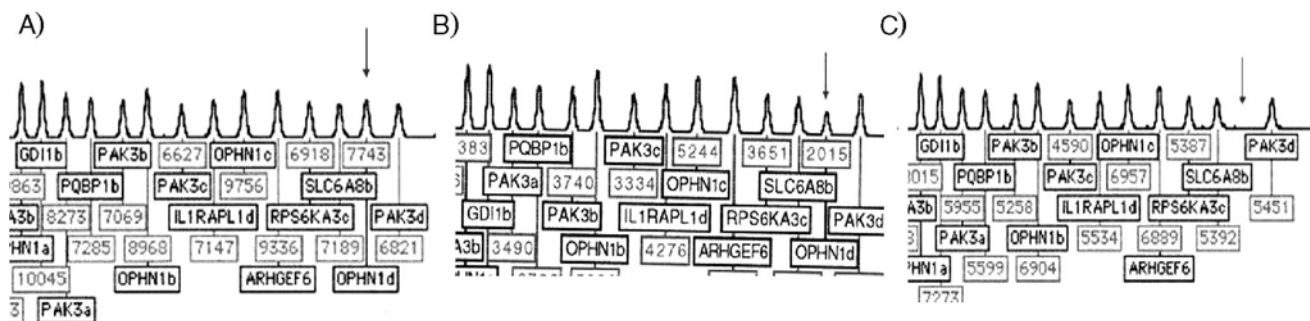


Fig. 3. Multiplex ligation-dependent probe amplification electropherogram traces from a control sample (A), a female carrier of the *OPHN1* deletion (B), and the patient with the *OPHN1* deletion (C). Amplified probes are detected as fluorescent signals, the areas of which are compared and normalized to quantify the gene dosage. The lack of the peak corresponding to exon 21 of the *OPHN1* gene (arrows) reveals a deletion in the patient (C). The carrier state of the mother and the sister is shown by the half-signal intensity of the peak compared with the control sample.

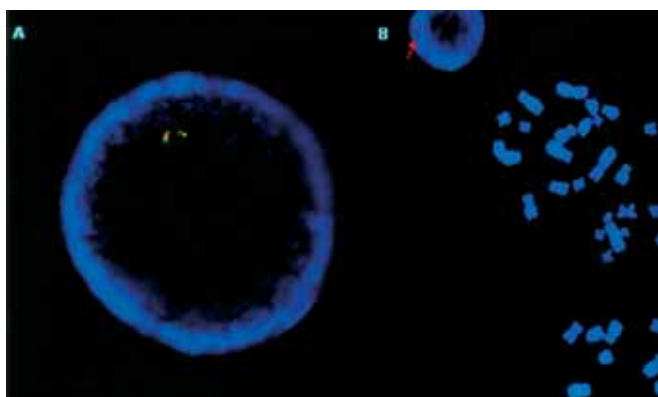


Fig. 4. A, Dual-color FISH used to detect the duplication in the region of the previously reported *ARHGEF6* duplication. Probe: RP11-431K12 (red) and RP11-378N15 (green). B, Duplication of the RP11-812C12 clone (red arrow) in an interphase nuclei.

alterations in samples with at least 50% of aberrant cells. Relative peak area ratios corresponding to samples with 30%, 50%, and 80% of mosaicism were 0.74, 0.6, and 0.54, respectively.

DISCUSSION

In the last few years, much interest has been focused on the identification of X-linked genes implicated in MR. OMIM lists 395 XLMR entries (syndromic and nonsyndromic), but advances in this field are limited because of the high heterogeneity of this entity. Each gene usually accounts for a small number of families; thus, families with an unknown cause clearly exceed the number of families with identified mutations.⁶ The development of new diagnostic tools, such as MLPA and array CGH, has facilitated the detection of deletions and duplications in patients with idiopathic MR.^{7,8} Some deletions and duplications are not easily detected by PCR analysis, and despite the high reliability of other methods, such as Southern blot analysis or FISH, they are laborious and not suitable for routine screening. We used an MLPA approach to detect copy number aberrations in 80 patients with XLMR, and we identified one deletion and three duplications possibly involved in MR.

None of these aberrations has been described as a genomic polymorphism (see database: <http://projects.tcag.ca/variation/>).

Duplication of the *RPS6KA3* gene seems to be disease-causing in Family 1. *RPS6KA3* codes a member of the RSK family of serine/threonine kinases, acting in the Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway.⁹ Activation of the *RPS6KA3* protein by MAPK leads to the activation of numerous and diverse cytosolic and nuclear substrates (CREB, c-FOS, c-JUN, SRF, Nur77) and various histones, among others. *RPS6KA3* protein seems to be important in chromatin-remodeling events and in gene regulation. Mutations in this gene cause Coffin-Lowry syndrome, an XLMR syndrome.^{10,11} Mutations causing Coffin-Lowry are heterogeneous and include truncating mutations (60% of cases) and mis-sense mutations (38% of cases). Our patient carrying the *RPS6KA3* duplication does not share the typical phenotype of Coffin-Lowry syndrome, characterized by severe MR, facial dysmorphism, and progressive skeletal malformations. The other three genes that map in the duplicated region are an essential eukaryotic translation initiation factor (*EIF1AX*) required for the binding of the 43S complex (a 40S subunit, eIF2/GTP/Met-tRNA_i and eIF3) to the 5' end of capped RNA, an open reading frame 23 (*CXorf23*), and a predicted hypothetical protein (*FLJ14503*). We cannot rule out that other genes may contribute to the clinical phenotype. *RPS6KA3* is the only known gene in this region that plays a fundamental role in neural development and signaling. We hypothesize that dosage effect of *RPS6KA3* may be the major cause for the MR syndrome in this family.

Duplication of the *GDI1* gene in Xq28 was detected in Family 2. This is one of the genes involved in the control of cycling between the active and inactive states of the RAB3 protein, a member of the Rab family, and has a major role in mental disorder. Mutations in *GDI1* are responsible for nonspecific XLMR. Mutations described in the *GDI1* gene include one non-sense and two mis-sense and are known to decrease the affinity between RAB3 and *GDI1* proteins.^{12,13} Expression analysis of *GDI1* at the mRNA level detected a significant increment in those patients carrying the duplication. Xq28 is a chromosomal region frequently affected by rearrangements and contains several genes mutated in MR. Emerin (*EMD*) is a serine-rich nuclear membrane protein and a member of the

nuclear lamina-associated protein family. It mediates membrane anchorage to the cytoskeleton. Mutations in the *EMD* gene cause the X-linked recessive form of Emery Dreifuss dystrophy.^{14,15} Filamin A, encoded by the *FLNA* gene, is a widely expressed protein that regulates reorganization of the actin cytoskeleton by interacting with integrins, transmembrane receptor complexes, and second messengers. Recent reports suggest that neuropathological anomalies and clinical mental retardation seen in an affected male subject with the *BPNH* disorder could result from a mutation of the *FLNA* gene.^{16,17} Until now, no duplication has been found to be responsible for MR in any of these genes. However, the implication of duplications in the *MECP2* region, also mapping in Xq28, has recently been described in severe MR.¹⁸ Thus, we examined our patient to determine whether the duplication expanded to the *MECP2* region. Results of the MLPA did not show alterations in the *MECP2* gene and allowed us to discard the implication of *MECP2* in our patient's phenotype.

In our study of Patient 3, we detected an intragenic deletion in the *OPHN1* gene. This gene was identified through the cloning of a balanced X-12 translocation in a girl affected with MR.¹⁹ *OPHN1* encodes a Rho-GTPase-activating protein (Rho-GAP) involved in the regulation of the G-protein cycle. Mutations in this gene were initially reported to be responsible for nonspecific XLMR. However, new reports suggest that *OPHN1* mutations result in a recognizable syndrome. All patients display similar neuroradiological anomalies such as cerebellar hypoplasia and ventriculomegaly.^{20–22} We have noted the importance of magnetic resonance imaging in male patients diagnosed with XLMR to investigate these anomalies (unpublished data).

The variation detected in Family 4 was a duplication in the *ARHGEF6* gene. *ARHGEF6* encodes a Rac1/Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor. Mutations in this gene have been implicated in XLMR. *ARHGEF6* is mainly expressed in the central nervous system, in ventricular zones where neuronal progenitor cells are located and in other non-neural tissues involved in different signaling cascades in Rho-mediated signaling pathways.^{23,24}

Errors in regulators or effectors of the Rho GTPases are a significant cause of XLMR, revealing the important role of Rho signaling in cognitive function. *ARHGEF6* and *OPHN1* proteins directly interact with Rho GTPases, a family of regulatory molecules that play an important role in the organization of the actin cytoskeleton. *GDI1* is one of the proteins controlling the activity of the small GTPases of the Rab family in vesicle fusion and intracellular trafficking. These three proteins are crucial for neuronal morphogenesis and connectivity, and all of them participate in numerous cellular processes.²⁵

Reports in the literature indicate that deletions in XLMR genes are more frequent than duplications. Our findings highlight the advantage of MLPA compared with other previously used techniques for the detection of duplications. The use of MLPA will allow investigators to determine the real implication of these kinds of rearrangements in patients with MR. Male subjects with duplications within the long or the short

arm of the X chromosome are rare, and the phenotype associated with these duplications is usually attributed to an excess of gene dosage. One of the most recent cases described in the literature is the previously mentioned microduplication syndrome involving the *MECP2* region. Other high-resolution technologies, such as array CGH, also allow the screening for copy number aberrations in patients with MR.²⁶ Nevertheless, they are still not suitable for routine diagnosis in most molecular laboratories not only because of their high cost, but also because of the difficulty in their interpretation.

MLPA allows the study of up to 46 sequences in a single experiment with results in less than 48 hours. It only requires 20 ng of human DNA and the necessary equipment present in most molecular biology laboratories. Furthermore, it is both highly specific and sensitive, allowing the detection of mosaicism and the diagnosis of carriers, which is a powerful tool when providing genetic counseling. Families 1 and 3 went undiagnosed for a long time; the daughters, carriers of the *RPS6KA3* duplication and *OPHN1* deletion, will benefit from our studies by receiving genetic counseling.

However, MLPA analysis is limited to deletions/duplications closer to the selected probe mixes in the kit, although probes can be easily designed for specific regions.

We conclude that MLPA is a powerful tool for screenings of small deletions and duplications in XLMR because of its cost-effectiveness (we detected the causative mutation in 5% of patients), and it should be included in routine diagnostic protocols for patients with XLMR.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Instituto Carlos III (PI041126, PI050776, PI050159).

References

1. Ropers HH, Hamel BC. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 2005;6:46–57.
2. Zechner U, Wilda M, Kehrer-Sawatzki H, Vogel W, et al. A high density of X-linked genes for general cognitive ability: a run-away process shaping human evolution? *Trends Genet* 2001;1:697–701.
3. Kleefstra T, Hamel BC. X-linked mental retardation: further lumping, splitting and emerging phenotypes. *Clin Genet* 2005;67:451–467.
4. Koelen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merckx GF, et al. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 2004;41:892–899.
5. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
6. Ropers HH, Hoeltzenbein M, Kalscheuer V, Yntema H, et al. Nonsyndromic X-linked mental retardation: where are the missing mutations? *Trends Genet* 2003;19:316–320.
7. Bauters M, Van Esch H, Marynen P, Froyen G. X chromosome array-CGH for the identification of novel X-linked mental retardation genes. *Eur J Med Genet* 2005;48:263–275.
8. Lugtenberg D, de Brouwer AP, Kleefstra T, Oudakker AR, et al. Chromosomal copy number changes in patients with non-syndromic X linked mental retardation detected by array CGH. *J Med Genet* 2006;43:362–370.
9. Poteet-Smith CE, Smith JA, Lannigan DA, Freed TA, et al. Generation of constitutively active p90 ribosomal S6 kinase in vivo: implications for the mitogen-activated kinase-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 1999;274:22135–22138.
10. Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, et al. Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin–Lowry syndrome. *Nature* 1996;384:567–570.
11. Hanauer A, Young ID. Coffin–Lowry: clinical and molecular features. *J Med Genet* 2002;39:705–713.

12. Bione S, Tamanini F, Maestrini E, Tribioli C, et al. Transcriptional organization of a 450-Kb region of the human X chromosome, in Xq28. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10977–10981.
13. D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro Cristiana, Grasso M, et al. Mutations in *GDII* are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet* 1998;19:134–139.
14. Emery AEH. Emery-Dreifuss syndrome. *J Med Genet* 1989;26:637–641.
15. Yorifuji H, Tadano Y, Tsuchiya Y, Ogawa M, et al. Emerin, deficiency of which causes EDMD, is localized at the inner nuclear membrane. *Neurogenet* 1997;1:135–140.
16. Robertson SP. FLNA has diverse roles in embryonic, fetal and postnatal development. Molecular pathology of filamin A: diverse phenotypes, many functions. *Clin Dysmorphol* 2004;12:123–131.
17. Gerar-Blanluet M, Sheen V, Machinis K, Neal J, et al. Bilateral periventricular heterotopias in an X-linked dominant transmission in a family with a two affected males. *Am J Genet* 2006;140:1041–1046.
18. Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, et al. Duplication of the MECP2 regions is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Genet* 2005;77:442–453.
19. Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, et al. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci* 2002;4:191–199.
20. Bergmann C, Zerres K, Senderek J, Rudnik-Schoneborn S, et al. Oligophrenin 1 (OPHN1) gene mutation causes syndromic X-linked mental retardation with epilepsy, rostral ventricular enlargement and cerebellar hypoplasia. *Brain* 2003;126:1537–1544.
21. des Portes V, Boddaert N, Sacco S, Briault S, et al. Specific clinical and brain MRI features in mentally retarded patients with mutations in the Oligophrenin-1 gene. *Am J Med Genet* 2004;124:364–371.
22. Chabrol B, Girard N, N'Guyen K, Gérard A, et al. Delineation of the clinical phenotype associated with OPHN1 mutations based on the clinical and neuropsychological evaluation of three families. *Am J Med Genet* 2005;138:314–317.
23. Kutsche K, Yntema H, Brandt A, Jantke I, et al. Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet* 2000;26:247–250.
24. Kohn M, Steinbach P, Hameister H, Kehrer-Sawatzki H, et al. A comparative expression analysis of four MRX genes regulating intracellular signalling via small GTPases. *Eur J Hum Genet* 2004;12:29–37.
25. Ramakers GJ. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci* 2002;25:191–199. Erratum in *Trends Neurosci* 2002;8:432.
26. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 2004;41:241–248.

4.2. Artículo II

X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation.BMC

Madrigal *et al.*
Genomics. 2007; 8(1):443

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation

BMC Genomics 2007, **8**:443 doi:10.1186/1471-2164-8-443

I Madrigal (imadriba@gmail.com)
L Rodriguez-Revenga (lbodi@clinic.ub.es)
L Armengol (lluis.armengol@crg.es)
E Gonzalez (eva.gonzalez@crg.es)
B Rodriguez (benjamin.rodriguez@upf.edu)
C Badenas (cbadenas@clinic.ub.es)
A Sanchez (asanchez@clinic.ub.es)
F Martinez (martinez_fracas@gva.es)
M Guitart (MGuitart@cspt.es)
I Fernandez (metabol@ped.uva.es)
J A Arranz (jaarranz@vhebron.net)
M I Tejada (MARIAISABEL.TEJADAMINGUEZ@osakidetza.es)
L A Perez-Jurado (luis.perez@upf.edu)
X Estivill (xavier.estivill@crg.es)
M Mila (mmila@clinic.ub.es)

ISSN 1471-2164

Article type Research article

Submission date 16 July 2007

Acceptance date 29 November 2007

Publication date 29 November 2007

Article URL <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/443>

Like all articles in BMC journals, this peer-reviewed article was published immediately upon acceptance. It can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in BMC journals are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in BMC journals or any BioMed Central journal, go to

© 2007 Madrigal *et al.*, licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<http://www.biomedcentral.com/info/authors/>

X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation

I Madrigal^{1,10,11}, L Rodríguez-Revenga^{1,10,11}, L Armengol², E González³, B Rodríguez^{4,11}, C Badenas^{1,10,11}, A Sánchez^{1,10,11}, F Martínez^{5,10}, M Guitart^{6,10}, I Fernández^{7,10}, JA Arranz⁸, MI Tejada^{9,10}, LA Pérez-Jurado^{4,11}, X Estivill², M Milà^{1,10,11}§

¹Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic and IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer), Barcelona, Spain

²Genes and Disease Program. Center for Genomic Regulation (CRG-UPF), Barcelona, Spain

³Microarray Laboratory, Bioinformatics and Genomics Program, (CRG-UPF), Barcelona, Spain

⁴Genetics Unit, Universitat Pompeu Fabra, Program in Molecular Medicine and Genetics, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁵Unidad de Genética. Hospital Universitario La Fe. Valencia, Spain

⁶Laboratori Genètica, UDIAT-Centre Diagnòstic, Corporació Sanitaria Parc Taulí, Institut Universitari Parc Taulí-UAB, Sabadell, Spain

⁷Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM). Universidad de Valladolid, Spain

⁸Unitat de Metabolopaties, Hospital Universitari Materno-Infantil Vall d'Hebron, Spain

⁹Molecular Genetics Laboratory, Cruces Hospital, Barakaldo-Bizkaia, Spain

¹⁰GIRMOGEN (Spanish Network for Mental Retardation)

¹¹Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), ISCIII, Barcelona, Spain

§Corresponding author

Email address: mmila@clinic.ub.es

Abstract

Background: Approximately 5-10% of cases of mental retardation in males are due to copy number variations (CNV) on the X chromosome. Novel technologies, such as array comparative genomic hybridization (aCGH), may help to uncover cryptic rearrangements in X-linked mental retardation (XLMR) patients. We have constructed an X-chromosome tiling path array using bacterial artificial chromosomes (BACs) and validated it using samples with cytogenetically defined copy number changes. We have studied 54 patients with idiopathic mental retardation and 20 controls subjects.

Results: Known genomic aberrations were reliably detected on the array and eight novel submicroscopic imbalances, likely causative for the mental retardation (MR) phenotype, were detected. Putatively pathogenic rearrangements included three deletions and five duplications (ranging between 82 kb to one Mb), all but two affecting genes previously known to be responsible for XLMR. Additionally, we describe different CNV regions with significant different frequencies in XLMR and control subjects (44% vs. 20%).

Conclusions: This tiling path array of the human X chromosome has proven successful for the detection and characterization of known rearrangements and novel CNVs in XLMR patients.

Background

Mental Retardation (MR) is a common disorder affecting 1-3% of the general population [1]. An excess of affected males over females has been noted among mentally delayed patients, especially in moderate to severe MR. This phenomenon has usually been explained by the presence of many genes responsible for MR on the X chromosome. X-linked MR (XLMR) is a heterogeneous condition representing an important proportion of patients affected by MR and can be classified either as nonsyndromic, when mental delay is the only symptom, or as syndromic when MR is associated with other specific clinical features.

Copy number variations (CNVs) are defined as copy number changes including deletions, insertions and duplications of genomic regions that range from one kilobase (kb) to megabases (Mb) in size. CNVs can influence gene expression by directly disrupting genes or by altering gene dosage [2,3], and some are involved in specific genetic disorders such as microdeletion and microduplication syndromes (e.g. Williams-Beuren, Smith-Magenis or DiGeorge syndromes). Several studies report an incidence of cryptic chromosomal imbalances in about 10-25% of MR cases [4-6]. Other copy number variations are present as polymorphisms in the general population without apparent relation to disease [7-10]. Several of these cryptic chromosomal rearrangements occur in regions flanked by segmental duplications or low-copy repeats and likely result from non-allelic homologous recombination between different copies of these repeats [11].

Nowadays, array-based comparative genomic hybridization (aCGH) represents a useful and cost-effective tool for the detection of submicroscopic copy number changes in genetic diseases [12]. Here, we describe the development, validation and use of a BAC derived tiling path array covering the entire euchromatic portion of the human X

chromosome, which has allowed the screening for copy number changes in 54 XLMR patients.

Results

Validation of the X-chromosome BAC array

Sensitivity and specificity of the X-array to detect copy number changes were tested with DNA from four patients with known cytogenetic aberrations on the X chromosome (see material and methods). In all these individuals, the corresponding changes in copy number were clearly detected and confirmed by the array-CGH. A series of sex mismatched hybridizations of controls versus controls, as well as self-self hybridizations allowed the detection of clones in the array that performed abnormally. Criteria for considering problematic clones were: 1) clones with absolute value of \log_2 ratios >0.2 in self-self hybridizations, 2) clones with high standard deviations (SD) (> 2 times the deviation of deviations) in different hybridizations and 3) clones displaying normal \log_2 ratios within a known aberration. Thirty clones were considered problematic and were excluded from further analyses.

Array CGH findings in X-linked MR patients

Fifty-two patients with unexplained XLMR and two patients with an X-linked trait were analyzed using the tiling path X chromosome array. Copy number variations were observed in 26 patients (48%) and in 8 patients (14.8%), we identified imbalances probably causative of the phenotype observed in the patients. An overview of these imbalances is shown in Figure 1. Table 1 summarizes the phenotype and genotype of these 8 patients.

Known genomic aberrations

In the two patients with a presumed rearrangement in the short arm of the X chromosome (Xp11.4 and Xp11.3), aberrations in these regions were identified by the array CGH.

Case 1

Case one was a newborn biochemically diagnosed of OTC deficiency. His mother had been diagnosed of OTC deficiency and associated neurological impairment since childhood. We identified a small deletion (400kb) at Xp11.4 both in the patient and his mother. This deletion involved six adjacent clones (RP13-486L5, RP11-401A21, RP11-727P7, CTD-213N1, RP11-416I6 and RP11-604A4) and *OTC*, *TSPAN7 (TM4SF2)* and *RPGR* genes at Xp11.4 [13]. Deletion of the *OTC* and *RPGR* genes in the patient was confirmed by PCR. Deletion of the *TMSF4* gene was confirmed by MLPA both in the patient and his mother (see Additional file 1A).

Case 2

Case two was a boy with clinical suspicion of Norrie disease. He presented a severe psychomotor retardation without verbal language skills, microcephaly, bilateral retinal detachment and epilepsy. A deletion spanning 11 clones with an estimate size of 1Mb was identified at Xp11.3 in the patient and his mother (see Additional file 1B). Array results confirmed the clinical suspicion of Norrie disease. The deletion involves *NDP*, *MAOA*, *MAOB*, *EFHC2* genes. In this case, epilepsy, not a common trait of Norrie disease, is probably caused by the deletion of the *EFHC2* gene [14].

Patients with non-syndromic mental retardation

In 6 out of 52 patients, we identified genomic imbalances in regions, which included at least one gene related with MR (Table 1). Family studies supported the causal

relationship with the MR phenotype observed in the index cases and demonstrated that the imbalance was inherited from an obligate carrier, except in case 8.

Case 3

Case three was one of four MR siblings from healthy, consanguineous parents (see Additional file 1C). The major clinical features were mild mental retardation, strabismus, hypogenitalism, a marked synophrys or medial eyebrow flare, a prominent nose and a broad high nasal root. aCGH detected a deletion spanning two clones on Xq12 affecting *OPHN1* gene (Figure 1C). MLPA detected a deletion of exon 21 of this gene. The estimation of the altered size was achieved by PCR which revealed a deletion involving only exons 21 and 22. The deletion fully segregates with the phenotype in the family. X-inactivation analysis showed a skewed X-inactivation pattern in the carrier mother (99/1) and not skewed in the carrier sister (72/28).

Case 4

Case 4 was a boy affected by mild MR, dyslexia and mild dysmorphic features. A duplication of approximately 1Mb was detected at Xp22.12 (Figure 1D), affecting four genes (*CXorf23*, *MAP7D2*, *EIF1AX* and *RPS6KA3*). MLPA study detected duplication of *RPS6KA3* in the patient, one sister, mother and affected uncles (see Additional file 1D). X-inactivation studies showed a random X-inactivation pattern in the mother (41/59).

Case 5

This boy was born to healthy nonrelated parents at term. His psychomotor development was delayed with severe MR, generalized hypotonia, limited walking and speech delay. He has a family history of MR (affected relatives not studied)(see Additional file 1E). He presented some mild facial dysmorphisms such as narrow forehead, thin nose, small mouth and marked dark rings under the eyes. aCGH showed a duplication of at least

700kb involving 15 genes at Xq28 (Figure 1E), including *SCL6A8* and *MECP2* genes. Specific MLPA for this region confirmed duplication of *MECP2*, *LICAM* and *IRAK1* genes in the patient and his mother.

Case 6

This boy was diagnosed of mild MR with an IQ of 58. He was born at 8 months from non-consanguineous parents after a pregnancy affected by acute pancreatitis. He presented neonatal seizures and cyanotic crisis. He acquired sedestation at 6 months, deambulation at 14 months and speech at 15 months. He showed psychomotor delay and learning disabilities, microcephaly, hyperkinesias and other mild dysmorphic features such as medial eyebrow flare and deep palate. A duplication spanning 6 clones with an estimate size of 250kb was identified at Xq28 (Figure 1F). MLPA confirmed duplication of *GDII*, *FLNA* and *EMD* genes and discarded any alteration in the *MECP2* gene in the patient, two affected relatives and two carrier women (see Additional File 1F). RT-PCR studies revealed a significantly higher *GDII* expression in the patient and his affected uncle (from 2.8 to 5 fold compared to four male controls; (SD = 0.19 Ct controls; SD= 0.09 Ct patient; SD= 0.25 Ct affected uncle). The carrier mother showed a complete skewed X-inactivation (100/0) inactivating the X-chromosome inherited by the patient.

Case 7

Case 7 was a boy affected by moderate MR, and minor dysmorphic features. aCGH detected a duplication of approximately 420kb spanning the *HUWE1* gene and probably the *PHF8* gene at Xp11.22 (Figure 1G). The development of MLPA custom probes for *HUWE1* and *PHF8* allowed confirmation of the duplication of *HUWE1* gene both in the patient and his affected brother (see Additional file 1G) and discard implication of *PHF8* gene in the duplication. His mother was carrier of the duplication. X-inactivation

pattern was skewed in the mother (90/10) and not skewed in the aunt (77/23). The screening of 75 normal male controls did not detect this CNV in any of them.

Case 8

Case 8 was a boy with moderate mental retardation and minor facial dysmorfisms. He has a family history of MR although no family members were available for study (see Additional File 1H). A duplication of approximately 350kb, involving four clones on Xq12 was identified by aCGH (Figure 1H). The duplication spans the *EDA2R* gene that encodes a receptor of the tumor necrosis factor receptor family. MLPA screening with custom probes for *EDA2R* gene confirmed the duplication in the patient and discarded it in 75 male controls.

Some other variations identified in XLMR patients correspond to previously reported CNVs present in the reference database of genomic variants [15]. The most common ones were deletions and reciprocal duplications in the Xq28 and Xq26.3 regions of an average size of 200 kb and 140 kb, respectively. The proportion of patients carrying CNVs was double than that of controls (44% vs. 20%). Further description of the identified CNVs is provided in Table 2. In general XLMR patients presented more changes and duplications were more common in XLMR patients than in controls (Table 3).

Discussion

The applicability of the array-based comparative genomic hybridization technology to detect copy number changes in mentally delayed patients has been described in a number of previous reports. An incidence of cryptic imbalances in about 10-25% of the cases has been reported [4,5,16-18]. With the aim of identifying novel aberrations involved in the cognitive impairment in XLMR patients, we have developed

a tiling path X chromosome array for CGH with a 100 kb resolution. Clinically relevant imbalances were identified in 8 cases (14,8%) with genomic sizes ranging between 100 kb and 900 kb. In all these cases we have identified genes related to MR that could be responsible for the phenotype in these patients (Table 1). In cases 1 and 2, array CGH supported the previous clinical suspicion and helped to roughly delineate the location of breakpoints for the different aberrations. In case 3, the identification of an 82 kb deletion, affecting exons 21 and 22 of the *OPHN1* gene at Xq12, demonstrated the usefulness and accuracy of array CGH to detect small copy number changes. In cases 4, 5 and 6 we identified duplication of *RPS6KA3*, *MECP2*, and *GDII* genes, respectively, all of them implicated in mental retardation and neurological disease. Mutations in *RPS6KA3* are responsible for the Coffin-Lowry Syndrome and *GDII* has been related to nonsyndromic MR forms. As previously pointed out [19] we propose that the copy number alteration of dosage sensitive genes *RPS6KA3* and *GDII* may be the major cause for the mental retardation in cases 4 and 6, respectively. In fact, case 6 and related family members carrying the duplication at Xq28 presented higher *GDII* mRNA levels than controls. As far as we are aware, there is only other report describing duplications of *RPS6KA3* and *GDII* genes causing MR. Froyen *et al.*,(2007) described a boy with psychomotor delay with a small duplication of 0.3Mb in size involving the XLMR genes *FLNA* and *GDII*, among others [20]. In the same work, they also detected a duplication of 21 Mb involving known MRX genes such as *RPS6KA3*, *CDKL5* and *NLGN4X* in a patient affected by severe psychomotor delay. The detection in our series of two cases with smaller duplications involving *GDII* and *RPS6KA3* genes reinforces the idea that increased gene dosage of these genes may be related to abnormal cognitive impairment.

In cases 7 and 8 we detected duplications of regions in which no genes involved in MR have been described. In case 7, the duplication at Xp11.22 was proximal but close to the MR related *PHF8* gene [21]. MLPA only confirmed duplication of *HUWE1* gene and although *PHF8* is not implicated in the duplication, it might be somehow influenced by this CNV. In case 8, the duplication at Xq12 was confirmed by MLPA of *EDA2R* gene, which encodes a tumor necrosis factor receptor. Although the imbalance was confirmed by other molecular method, no DNA from the parents was available for genotyping and we could not establish the causativeness of the aberration in the observed phenotype. Nevertheless, duplications of *HUWE1* and *EDA2R* have not been detected upon screening 75 male controls neither have ever been reported as genomic polymorphisms, suggesting that these changes are not very common in the general population. Nevertheless, further studies are needed in order to clarify their role in MR.

It has been shown that in several X-linked disorders, the X-inactivation process evidences a bias in mothers of affected individuals [22]. We have investigated the X-inactivation pattern in six female carriers. Fifty per cent of them showed a skewed X-inactivation of the chromosome carrying the mutant allele, which is in agreement with the literature [22]. However we have to bear in mind that this inactivation pattern has been observed in blood samples and we do not know what is happening in other tissues.

Until now among mentally retarded patients, deletions were the most commonly genomic aberrations identified. Recently, the use of array technologies has led to the detection of new duplications in mentally retarded patients and the description of new syndromes, i.e. *MECP2* duplication syndrome [23]. The identification of new cases harboring duplications in these genes should be of help in order to elucidate their potential involvement in XLMR.

The number of described CNVs in human genome is exponentially increasing due to the high number of genome wide analyses. Nowadays there are reported more than 3500 CNVs, 110 on the X-chromosome [15]. We described here seven different CNV regions in the X-chromosome (Table 2). All these CNV regions overlap with others previously identified [10,24,25], and all are associated with segmental duplications. One of the most common CNV both in XLMR patients and in control subjects is at Xq28, at approximately two Mb from the telomere and associated to known segmental duplications. CNV regions and segmental duplications are not uniformly distributed throughout the genome, being significantly overrepresented in number within two Mb of telomeres and centromeres [26]. This Xq28 polymorphic region encompasses the opsin cluster, a family of genes involved in color perception. It has been previously reported that many genes involved in the senses such as olfactory receptors and opsins (cone pigments) associate with CNVs [10,27]. The second most common CNV in XLMR patients is at Xq26.3. This region is polymorphic in the general population [10,25,28] and it contains several cancer-related genes such as SAGE and MAGE tumor antigen families. Curiously, CNVs are more common in XLMR patients than in controls; i.e. 26% of patients were polymorphic for the Xq28 region vs. 5% of controls. Furthermore, the percentage of CNVs is statistically higher in XLMR than in controls (proportion test $Z=2,51$, $p=0,012$; Fisher's exact test: P-Value = 0,035). Also the average size of CNVs seems to be higher in patients than in controls (Table 3). We still do not know the significance of some of these CNVs, i.e. they can influence expression of other genes. Further characterization of these variable regions, including quantitative analyses, opens a new field of study that should assist to understand the role of this genomic variation in mental retardation.

Conclusions

The X chromosome aCGH presented here has been proven successful for the detection of novel CNVs and characterization of known rearrangements in XLMR patients. Even more we have detected some polymorphic CNV that seem to be more frequent in XLMR than in controls. Further characterization of these variable regions, including quantitative analyses, opens a new field of study that should assist to understand the role of this genomic variation in MR.

Methods

Patient and control samples

We studied a total of 54 unrelated patients with mental retardation: 52 MR patients belonging to families compatible with an X-linked inherited MR and two patients with suspicion of an X chromosome deletion due to their clinical manifestations (*OTC* deficiency and Norrie disease). All XLMR patients displayed normal karyotype, and CGG-expansions of the *FMR1* gene were ruled out. We also studied four samples with cytogenetically visible copy number aberrations validated by molecular cytogenetic techniques (46,XX,dupXq22-q26; 46,XX,dupXq28; 46,XX, delXq27-qter; 46,XX, dupXp11-p21) and a series of 20 control males.

This study has been approved by the ethic committee of the Hospital Clinic of Barcelona. All the subjects provided written informed consent for the use of their phenotypic and genetic data.

Construction of the tiling-path X chromosome CGH array

The X chromosome-specific tiling path array consists of about 1,600 genomic BAC clones derived from the human X chromosome plus 3 *Drosophila* negative control clones. The clone set used to produce this array was mainly derived from the 32K human BAC library from the Children Hospital Oakland Research Institute [29]. Gaps

were covered using BACs from other libraries (mainly RP11). Slides contained quadruplicates of the 1,600 clones providing an average density of at least one clone per 100 kb along the entire euchromatic portion of the X chromosome. The production of the X-array, probe preparation, and hybridization on the array were performed in the Microarray Unit of the Center for Genomic Regulation (CRG, Barcelona, Spain). BAC DNA was isolated from 1.5 ml bacterial cultures using the Montage BAC96 Miniprep kit following manufacturer's instructions (Millipore, Billerica, MA). DNA amplification by DOP-PCR was done as previously described [30]. PCR products were purified using the Montage PCR₉₆ Plates kit (Millipore, Billerica, MA) and quantified using the PicoGreen dsDNA Quantification kit (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA). Purified products were dried, dissolved at 400 ng/μl in 50% DMSO and spotted in quadruplicate using a VersArray ChipWriterTM Pro System (Bio-Rad).

Sample hybridization

Hybridization was performed as previously described [31]. For each hybridization, 400 ng of test and control DNA were labeled by random priming using the BioPrime Array CGH Genomic Labeling System (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA).

Reversed-dye labeling of the samples was always used to minimize the effect of dye-specific artifacts. Each patient was hybridized against a sex-matched pool of 50 healthy controls. Arrays were scanned using an Agilent G2565BA MicroArrayScanner System (Agilent Inc., Palo Alto, CA) and the acquired images were analyzed using GenePix Pro 6.0 software (Axon, Molecular Devices) using the irregular feature finding option.

Extracted raw data was filtered and Lowess normalized using Bacanal (Lozano *et al.*, unpublished), an in-house developed suite for microarrays analysis linked to a management system.

On top of an Apache server and an Oracle database, a combination of different R packages process the raw data obtained from GenePix, performs a quality control of the signals, performs a loess normalisation of spot signals (using LIMMA package) taking into account spot quality control and background intensities and tries to identify copy number variable regions using circular binary segmentation (using the DNACopy R package). SD of all X-chromosome clones was calculated for each hybridization experiment. Genomic imbalances were determined based on log₂ of the Cy5/Cy3 ratios of the average of the four replicates, and regions were considered as duplicated or deleted when at least two consecutive clones exceeded the ± 0.2 range.

Confirmatory analyses

Putative copy number aberrations were confirmed by other molecular techniques such as *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), quantitative PCR (qPCR) and/or PCR

Multiplex Ligation Probe Amplification

All 54 samples were included in a parallel MLPA screening [32] in which we used a commercial specific probe mixture with 43 probes for 14 known genes responsible for X-linked MR (Salsa P106, MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Additionally for *MECP2* gene we used a specific kit for Rett syndrome that includes probes for *MECP2*, *LICAM* and *IRAK1* genes (Salsa P015C, MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). The assays were performed following manufacturer's recommendations (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Specific MLPA probes were designed for *HUWE11*, *PHF8*, *EMD*, *EDA2R* and *FLNA* genes for screening of 75 male controls (see Additional file 2).

PCR

PCR was always performed for confirmation of our array-CGH data when losses were detected. Primers for *OPHN1* gene (*case 3*) were designed with the Primer3 software (primer3 V0.3.0) (see Additional file 3).

Quantitative RT-PCR

Expression of *GDII* gene was analyzed by real time RT-PCR using TaqMan probes (ref. Hs00181741_m1, Applied Biosystems, CA, USA). Total RNA of the patient and other affected males in the family was extracted from whole blood. Relative quantification was performed against a control amplicon of the GUSB mRNA following manufacturer instructions (Applied Biosystems, CA, USA).

X-inactivation

Androgen-receptor gene methylation assay to assess the methylation status was performed over lymphocyte genomic DNA of female carriers, as previously described [33]. Results are presented as the percentages of inactivation of both alleles. Skewed alleles were considered when the inactivation percentage was over 80%.

Authors' contributions

IM carried out the extraction of DNA samples, construction and validation of the tiling-path X chromosome CGH array, analysis of array results, MLPA analysis, interpretation of array results and preparation of the manuscript ; LRR carried out the extraction of DNA samples, FISH experiments, PCR analysis and participated in the preparation of the manuscript; LA carried out design of the tiling-path X chromosome CGH array, interpretation of data, preparation of the manuscript and participated in the revision of the manuscript; EG carried out the construction and validation of the tiling-path X chromosome CGH array, hybridization of samples, interpretation of array results, revision of the manuscript; BR carried out the design of custom MLPA probes and participated in the revision of the manuscript; CB participated in the interpretation of data and revision of the manuscript; AS carried out the clinical evaluation of patients and revision of clinical data; FM carried out the collection of samples and acquisition of clinical data and participated in the revision of the manuscript; MG carried out the collection of samples and acquisition of clinical data participated in the revision of the manuscript; IF carried out collection of samples and acquisition of clinical data, revision of the manuscript; JAA carried out the collection of samples and acquisition of clinical data and participated in the revision of the manuscript; MIT carried out the collection of samples and acquisition of clinical data and participated in the revision of the manuscript; LAPJ carried out the revision of the manuscript and final approval of the version; XE carried out the conception and design of the work and participated in the revision of the manuscript and final approval of the version; MM carried out the conception and design of the work and participated in the revision of the manuscript and final approval of the version

Acknowledgements

The authors thank the “Genoma España” and Genome Canada joint R+D+I projects in human health, plants and aquiculture; the former “Departament d’Universitats i Societat de la Informació” (DURSI) and the “Departament de Salut”, from the Catalan Autonomous Government (2005SGR00008 - Generalitat de Catalunya); the Instituto de Salud Carlos III (PI041126, CIBER-ESP) and the EU’s Sixth Framework Programme [FP6-2005-LIFESCIHEALTH-7; ANEUPLOIDY No. 037627].

References

1. Chelly J, Mandel JL: **Monogenic causes of X-linked mental retardation.** *Nat Rev Genet* 2001, **2**:669-680.
2. Buckland PR: **Polymorphically duplicated genes: their relevance to phenotypic variation in humans.** *Ann Med.* 2003, **35**:308-315.
3. Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW: **Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies.** *Hum Mol Genet.* 2006, **15**:R57-66.
4. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L, Bobrow M, Carter NP: **Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features.** *J Med Genet.* 2004, **41**:241-248.
5. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjold M: **Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH).** *J Med Genet.* 2005, **42**:699-705.
6. Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Asano J, Bailey DK, Barber S, Birch P, Brown-John M, Cao M, Chan S, Charest DL, Farnoud N, Fernandes N, Flibotte S, Go A, Gibson WT, Holt RA, Jones SJ, Kennedy GC, Krzywinski M, Langlois S, Li HI, McGillivray BC, Nayar T, Pugh TJ, Rajcan-Separovic E, Schein JE, Schnerch A, Siddiqui A, Van Allen MI, Wilson G, Yong SL, Zahir F, Eydoux P, Marra M: **Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation.** *Am J Hum Genet.* 2006, **79**:500-513.
7. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M: **Large-scale copy number polymorphism in the human genome.** *Science.* 2004, **305**:525-528.
8. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C: **Detection of large-scale variation in the human genome.** *Nat Genet.* 2004, **36**:949-51
9. Fiegler H, Redon R, Andrews D, Scott C, Andrews R, Carder C, Clark R, Dovey O, Ellis P, Feuk L, French L, Hunt P, Kalaitzopoulos D, Larkin J, Montgomery L,

- Perry GH, Plumb BW, Porter K, Rigby RE, Rigler D, Valsesia A, Langford C, Humphray SJ, Scherer SW, Lee C, Hurles ME, Carter NP: **Accurate and reliable high-throughput detection of copy number variation in the human genome.** *Genome Res* 2006, **16**:1566-1574.
10. 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, Gonzalez JR, Gratacos 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* 2006, 444:444-454.
 11. Eichler, EE: **Masquerading repeats: Paralogous pitfalls of the human genome.** *Genome Res.* 1998, **8**:758-762.
 12. Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA: **Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities.** *Am J Hum Genet.* 2003, **73**:1261-70.
 13. Arranz J, Madrigal I, Riudor E, Armengol L, Milà M: **Complete deletion of ornithine transcarbamylase gene confirmed by CGH array of X chromosome.** *J Inh Metab Dis* 2007, Jun 14
 14. Rodriguez-Revenga L, Madrigal I, Alkhalidi LS, Armengol L, Gonzalez E, Badenas C, Estivill X, Mila M: **Contiguous deletion of the NDP, MAOA, MAOB, and EFHC2 genes in a patient with Norrie disease, severe psychomotor retardation and myoclonic epilepsy.** *Am J Med Genet A.* 2007, **143**:916-920.
 15. Database of Genomic Variants. [<http://projects.tcag.ca/variation/>]
 16. Veltman JA, Yntema HG, Lugtenberg D, Arts H, Briault S, Huys EH, Osoegawa K, de Jong P, Brunner HG, Geurts van Kessel A, van Bokhoven H, Schoenmakers EF: **High resolution profiling of X chromosomal aberrations by array comparative genomic hybridisation.** *J Med Genet.* 2004, **41**:425-432.

17. Bauters M, Van Esch H, Marynen P, Froyen G: **X chromosome array-CGH for the identification of novel X-linked mental retardation genes.** *Eur J Med Genet.* 2005, **48**:263-275.
18. Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, de Ravel T, Van Vooren S, Balikova I, Backx L, Janssens S, De Paepe A, De Moor B, Moreau Y, Marynen P, Fryns JP, Mortier G, Devriendt K, Speleman F, Vermeesch JR: **Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports.** *J Med Genet.* 2006, **43**:625-633.
19. Lee JA, Lupski JR: **Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders.** *Neuron.* 2006, **52**:103-121.
20. Froyen G, Van Esch H, Buaters M, Hollanders M, Frints S, Vermeesch J, Devriendt K, Fryns J-P, Marynen P: **Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-Array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes.** *Hum Mut* 2007, **0**:1-9.
21. Laumonnier F, Holbert S, Ronce N, Faravelli F, Lenzner S, Schwartz CE, Lespinasse J, Van Esch H, Lacombe D, Goizet C, Phan-Dinh Tuy F, van Bokhoven H, Fryns JP, Chelly J, Ropers HH, Moraine C, Hamel BC, Briault S: **Mutations in PHF8 are associated with X linked mental retardation and cleft lip/cleft palate.** *J Med Genet.* 2005, **42**:780-786.
22. Plenge RM, Stevenson RA, Lubs HA, Schwartz CE, Willard HF. **Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders.** *Am J Hum Genet.* 2002, **71**:168-73.
23. Van Esch H., Bauters M., Ignatius J., Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, Lugtenberg D, Bienvenu T, Jensen LR, Gecz J, Moraine C, Marynen P, Fryns JP, Froyen G: **Duplication of the MECP2 regions is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males.** *Am. J. Genet* 2005, **77**:442-453.
24. Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, Pertz LM, Clark RA, Schwartz S, Segraves R, Oseroff VV, Albertson DG, Pinkel D, Eichler EE: **Segmental duplications and copy-number variation in the human genome.** *Am J Hum Genet.* 2005, **77**:78-88.
25. Locke DP, Sharp AJ, McCarroll SA, McGrath SD, Newman TL, Cheng Z, Schwartz S, Albertson DG, Pinkel D, Altshuler DM, Eichler EE: **Linkage disequilibrium**

- and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome.** *Am J Hum Genet.* 2006, **79**:275-290.
26. Nguyen DQ, Webber C, Ponting CP: **Bias of selection on human copy-number variants.** *PLoS Genet.* 2006, **2**:e20.
27. Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, MacAulay C, Ng RT, Brown CJ, Eichler EE, Lam WL: **A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome.** *Am J Hum Genet.* 2007, **80**:91-104.
28. Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, Haugen E, Hayden H, Albertson D, Pinkel D, Olson MV, Eichler EE: **Fine-scale structural variation of the human genome.** *Nat Genet.* 2005, **37** 727-732.
29. BACPAC Resources Center. [<http://bacpac.chori.org/home.htm>]
30. Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP, Carter NP: **DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones.** *Genes Chromosomes Cancer* 2003, **36**:361-374.
31. Wang NJ, Liu D, Parokony AS, Schanen NC: **High-resolution molecular characterization of 15q11-q13 rearrangements by array comparative genomic hybridization (array CGH) with detection of gene dosage.** *Am J Hum Genet.* 2004, **75**:267-281.
32. Madrigal I, Rodriguez-Revenga L, Badenas C, Sanchez A, Martinez F, Fernandez I, Fernandez-Buriel M, Mila M: **MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation.** *Genet Med.* 2007, **9**:117-122.
33. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW: **Methylation of HpaII and HhaI sites near polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X-chromosome inactivation.** *Am J Hum Genet* 1992, **51**:1229-1239.
34. UCSC Genome Browser. [<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>]

Figure legend

Figure 1

Array CGH profiles for XLMR patients with relevant CNVs. Each dot represents the mean log₂ transformed and Lowess normalized test over reference intensity ratio (y-axis), which is derived from four independent replicate spots on the array, in a replicate dye swap experiment. The Mb position of the clones on the X chromosome is displayed in the x-axis, ordered from p-telomere to q-telomere on the basis of physical mapping positions, according to the hg17 assembly of the UCSC genome browser [34]. (A) 400-kb deletion at Xp11.4 (37.9-38.8 Mb) in patient 1. (B) Deletion spanning a region of 1 Mb (43.01-43.98 Mb) in Xp11.3 in patient 2. (C) Deletion of two clones in Xq12 spanning 82 kb (67.10-67.18 Mb) in patient 3. (D) 800-kb duplication at Xp22.12 (19.82-20.65 Mb) in patient 4. (E) Duplication of 700 kb at Xq28 (152.4-153.1 Mb) in patient 5. (F) Duplication of 250 kb at Xq28 (153.2-153.5 Mb) in patient 6. (G) Duplication of 400 kb at Xp11.22 (53.53-53.94 Mb) in patient 7. (H) Duplication of 180 kb at Xq12 (62.07-62.26 Mb) in patient 8.

Table 1. Patients with mental retardation and imbalances detected with the X-chromosome tiling path BAC array not identified in control samples

Case	Region	Gain/loss	Size kb	Origin	Phenotype	Altered clones	Affected genes	Confirmatory studies
Known								
1	Xp11.4	Loss	400	Inherited	OTC deficiency, neurological deterioration	RP13-486L5, RP11-401A21, RP11-727P7, CTD-2135N1, RP11-416I6, RP11-604A4	RPGR, OTC , TMSF4 (TSPAN7), SRPX	<i>Arranz et al., 2007</i>
2	Xp11.3	Loss	1Mb	Inherited	Norrie disease, severe psychomotor retardation, epilepsy, microcephaly,	RP11-558I17, RP11-561O22, RP11-643D7, RP11-455O7, RP11-72J3, RP11-291H16, RP11-355O20, RP11-11B9, RP11-634A3, RP11-110B2, RP11-605I23	NDP , MAOA, MAOB, EFHC2	Rodriguez-Revenga <i>et al.</i> , 2007
Causal								
3	Xq12	Loss	82	Inherited	Severe MR, strabismus, cerebellar hypoplasia, Dandy-Walker malformation, prominent chin, high nasal root	RP11-586C9, RP11-466E18	OPHN1	MLPA PCR
4	Xp22.12	Gain	800	Inherited	Mild MR, Robust built, dyslexia, facial dysmorphism	RP11-191B9, RP11-393H10, RP11-382L18, RP11-254G9, RP11-367L17, RP11-203E14, RP11-703P16, RP11-48D14, RP11-712B24, RP11-158M19	RPS6KA3 , CXorf23, EIF1AX	MLPA
5	Xq28	Gain	700	Inherited	Severe MR, psychomotor retardation, hypotonia,	RP11-54I20, RP11-437K1, RP11-314B3, RP11-398P14, RP11-846A22, RP11-617G6, RP11-485N14, RP11-119A22, RP11-333O6, RP11-330B2, CTD-2238E23	SLC6A8 , PLXNB3, LICAM, MECP2 , IRAK1, ARHGAP4, OPN1MW, CXorf2, TKTL1, PDZK4, ABCD1, PNCK, DUSP9, FAM58A, ATP2B3	MLPA
6	Xq28	Gain	250	Inherited	Moderate MR, facial dysmorphism, microcephaly,	RP11-666B23, RP11-316P8, CTD-2511C7, CTD-2242O14, RP11-696D6, RP11-103M23	GDI1 , FLNA EMD, TAZ, TKTL1, RPL10, DNASE1L1	MLPA RT-PCR
Causal?								
7	Xp11.22	Gain	420	Inherited	Moderate MR	RP11-390E18, RP11-585D6, RP11-555J12, RP11-272G22, RP13-444K19	HUWE1, PHF8?	MLPA
8	Xq12	Gain	350	ND	Moderate MR	RP11-414C19, RP13-547B18, RP11-655E9, RP11-715J23	EDA2R	MLPA

ND, not determined; in bold are represented the genes related to MR.

Table 2. X-chromosome CNVRs detected in patients and controls using the X-chromosome tiling path BAC array.

Region	Controls (20)	Cases (54)	Start	Clone	End	Clone	Size kb	Gain/Loss	OMIM Genes within CNVs
Xp22.33	-	1	2497952	RP11-325D5	2773932	RP11-457M7	278	Gain	CD99, XG, GYG2
Xp22.31	1	-	9304013	RP11-951B16	9510840	RP11-29K8	207	Gain	TBL1X
Xp21.2	1	-	30597301	RP11-710J8	30681589	RP11-642K22	84	Loss	TAB3
Xp11.23	-	1/1	47732169	RP11-423H3	47806532	RP11-38O23	74	Loss/Gain	SSX5, SSX6, LOC389852
Xq26.3	-/1	3/4	134591734	CTD-2225C20	134733742	RP11-111C16	142	Loss/Gain	SAGE1, MGC88118, MGC27005
Xq28*	1/-	7/7	152963046	CTD-2149G5	153072850	RP11-330B2	110-315	Loss/Gain	OPN1LW, OPN1MW
Xq28	1	-	151551673	RP11-793M20	151886266	CTD-2515E20	335	Loss	MAGEA6, MAGEA12, MAGEA2B, MAGEA2, MAGEA2B, CSAG2, MAGEA3

Table 3. Summary of changes detected both in controls and XLMR patients

		Controls (20)	Patients (54)
Samples with CNVs		20% (4/20)	48% (26/54)
Total of CNVs		5	32
Dups		20% (1/5)	56,2% (18/32)
Dels		80% (4/5)	43,7% (14/32)
CNVs/ sample	1CNV	75% (3/4)	71,9% (23/32)
	2CNVs	25% (1/4)	28,1% (9/32)
Size		100-400kb	100-900Kb

Additional files

Additional file 1 .jpeg.

Pedigrees of the 8 subjects with clinically relevant imbalances detected by the aCGH.

(A) Case 1: 400-kb deletion at Xp11.4). (B) Case 2: 1 Mb deletion at Xp11.3. (C) Case 3: 82 kb deletion at Xq12. (D) Case 4: 800-kb duplication at Xp22.12. (E) Case 5: 700 kb duplication of at Xq28. (F) Case 6: 250 kb duplication at Xq28 (G) Case 7: 400 kb duplication at Xp11.22 (H) Case 8: 180 kb duplication at Xq12. Members tested for segregation analysis are marked with an asterisk. In all cases the imbalances segregated with pedigrees. Affected individuals are represented with black symbols. Carrier women confirmed by molecular studies are shown with a black dot inside their symbol.

Additional file 2. .doc Sequences of designed MLPA probes

Additional file 3. .doc Primers for *OPHN1* gene.

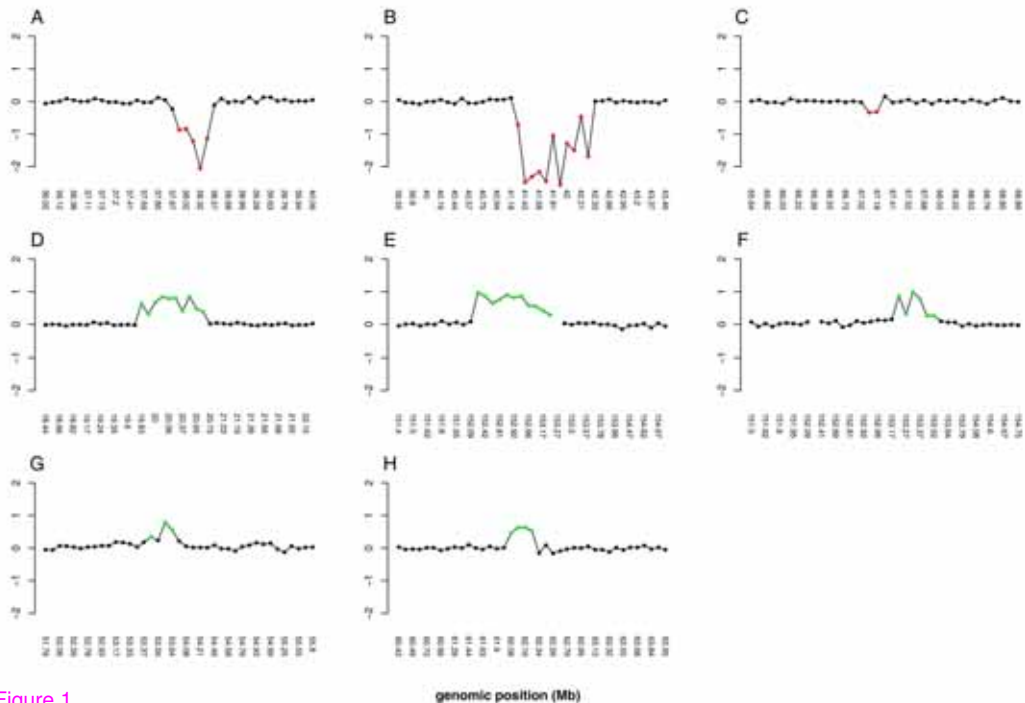


Figure 1

Additional files provided with this submission:

Additional file 1: additional file 1.jpg, 36K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1645712829171454/supp1.jpeg>

Additional file 2: additional file 2.doc, 35K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/9005766351624436/supp2.doc>

Additional file 3: additional file 3.doc, 28K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1299708895162443/supp3.doc>

Supp2

Additional file 2. Sequences of designed MLPA probes

<i>Gene</i>	<i>Probe</i>	<i>Sequence</i>
HUWE1	L1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAGTGGAGAATATGTCATGGATGCTCG
	R1	pTATGTGATAGGCCAGAAAGAGAGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
	L2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGATCCAGAGAAACCAGCAGGCCAACTTG
	R2	pGTCAGGAAGGTTTCGGGAAGCTGTTGGAGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
	L3	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAGGTTCTCGCGGGATCGCGCGG
	R3	pAGCGGCGGTGGCTCGGTTACTGACTGCAGTAGCCGCGGATCTAGATTGGA TCTTGCTGGCAC
PHF8	L1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGCTTCCTTACAGGGGGAAGAACCAACAAC
	R1	pGCAGAGACCGTGGGAAAGAGCCCAGCCTATCTCTAGATTGGATCTTGCTGGC AC
	L2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACTTCCAACAGAACGTTGGGAAGACGAG
	R2	CAATATCTTTGGGCTGCAGAGGATCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
EDA2R-	L1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCTTCCCACCATGGATTGCCAA
	R1	pGAAAATGAGTACTGGGACCAATGGGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
	L2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACATGAATGCTATGTGGACAGCCCAAGCCATACCC AGAATC
	R2	pACCTTAATTCCAACCTTTTTGAGGTTTCTAGCAATTGTCTAGATTGGATCTTGCTG GCAC
FLNA-	L	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGCATCGAGCCCACAGGCAACATGGTGAAGA
	R	pAGCGGGCAGAGTTCCTGTGGAGACCAGAAGTGCTCTAGATTGGATCTTGCT GGCAC
EMD	L	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAATTCGACTAGAGGGGATGCAGATATGTATGAT CTCCCA
	R	pAGAAAGAGGACGCTTTACTCTACCAGAGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC

p: phosphate (R probes are modified with a phosphate in the 5'extreme)

Supp3

Additional file 3. Primers for *OPHN1* gene.

<i>Gene</i>	<i>Exon</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequence (5'->3')</i>
OPHN1	20	OP20F	ATCAACTGGTGGGTAGCATT
		OP20R	GGAGCCAGGAAAGGTCTACT
	21	OP21F	TAGTTGGTTTGTGCCACAGT
		OP21R	CTCAGAAGGATCTCAAGGTGA
	22	OP22F	AAGTTGGCCAGGTA ACTCT
		OP22R	GTGATCCTGAAAGCATTCT

4.3. Artículo III

Contiguous deletion of the NDP, MAOA, MAOB, and EFHC2 genes in a patient with Norrie disease, severe psychomotor retardation and myoclonic epilepsy.

Rodriguez-Revenga, Madrigal *et al.*
Am J Med Genet A. 2007; 143(9):916-20.

Contiguous Deletion of the *NDP*, *MAOA*, *MAOB*, and *EFHC2* Genes in a Patient With Norrie Disease, Severe Psychomotor Retardation and Myoclonic Epilepsy

L. Rodríguez-Revenga,^{1,2} I. Madrigal,^{1,2} L.S. Alkhalidi,³ L. Armengol,⁴ E. González,⁴ C. Badenas,^{1,2} X. Estivill,^{1,5} and M. Milà^{1,2*}

¹Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

²IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer), Barcelona, Spain

³Department of Health and Medical Services, Rashid Hospital, Dubai, United Arab Emirates

⁴Genes and Disease Programme, Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcelona Biomedical Research Park, Barcelona, Spain

⁵Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain

Received 20 February 2006; Accepted 7 September 2006

Norrie disease (ND) is an X-linked disorder, inherited as a recessive trait that, therefore, mostly affects males. The gene responsible for ND, called *NDP*, maps to the short arm of chromosome X (Xp11.4-p11.3). We report here an atypical case of ND, consisting of a patient harboring a large submicroscopic deletion affecting not only the *NDP* gene but also the *MAOA*, *MAOB*, and *EFHC2* genes. Microarray comparative genomic hybridization (CGH) analysis showed that 11 consecutive bacterial artificial chromosome (BAC) clones, mapping around the *NDP* gene, were deleted. These clones span a region of about 1 Mb on Xp11.3. The deletion was ascertained by fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis with different BAC clones located within the region.

Clinical features of the proband include bilateral retinal detachment, microcephaly, severe psychomotor retardation without verbal language skills acquired, and epilepsy. The identification and molecular characterization of this case reinforces the idea of a new contiguous gene syndrome that would explain the complex phenotype shared by atypical ND patients. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: microarray comparative genomic hybridization; Norrie disease; *NDP* gene; *MAOA* and *MAOB* genes; *EFHC2* gene; contiguous gene syndrome

How to cite this article: Rodríguez-Revenga L, Madrigal I, Alkhalidi LS, Armengol L, González E, Badenas C, Estivill X, Milà M. 2007. Contiguous deletion of the *NDP*, *MAOA*, *MAOB*, and *EFHC2* genes in a patient with Norrie disease, severe psychomotor retardation and myoclonic epilepsy. *Am J Med Genet Part A* 143A:916–920.

INTRODUCTION

Norrie disease (ND, OMIM# 310600) is a rare inherited neurodevelopmental disorder of congenital blindness that occurs early during embryogenesis [Norrie, 1927; Warburg, 1971]. It is characterized by bilateral and severe retinal malformations and opacity of the lens. In addition to ocular symptoms, a certain portion of patients present mental disturbances, often with psychotic features, and/or sensorineural deafness. The hearing loss is progressive and recent evidence shows that its penetrance appears to be complete, although there is some variability in the clinical severity and the age of onset [Rehm et al., 2002]. Even though these symptoms are considered as classical in ND, the clinical diagnosis is often difficult, mainly because more than half of patients are neither deaf nor mentally delayed at the

time of clinical examination. ND is inherited as an X-linked recessive trait and therefore it mostly affects males. The gene responsible for ND, named *NDP* gene, maps to the short arm of chromosome X (p11.4-p11.3) [Chen et al., 1992; Sims et al., 1992]. The function of the gene product is still unknown, although most observations are consistent with a primary role of *norrin* in vascular development and

Grant sponsor: "Fondo de Investigación Sanitaria", Spain; Grant numbers: PI050776, PI050159, FS041126, RGPG, (G03/184); Grant sponsor: Genome Spain.

*Correspondence to: M. Milà, Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: mmila@clinic.ub.es

DOI 10.1002/ajmg.a.31521

proliferation [Shastry and Trese, 2003; Michaelides et al., 2004].

Atypical ND patients harboring large DNA deletions have also been reported. Those fewer patients, in addition to the retinal abnormalities, show other clinical features, including microcephaly, growth delay, severe to profound mental retardation, immunodeficiency, and epileptic seizures [Donnai et al., 1988; Zhu et al., 1989; Suarez-Merino et al., 2001]. We report here on the clinical and molecular characterization of a new case of a large deletion of Xp11.4-p11.3, including the *NDP* gene. Genotype-phenotype correlation has allowed us to establish the cause of epilepsy that this patient shows. The identification of this case reinforces the idea of a new contiguous gene syndrome that could explain the complex phenotype shared by these patients.

CLINICAL REPORT

The patient is a 7-year-old boy, who was born as the second child of healthy unrelated parents. He was born at term after an uneventful pregnancy but at 5 weeks of age he had to be taken into a hospital due to chest infection. At that time he was found to have bilateral yellowish reflex in both eyes. Retinal dysplasia was suggested as the diagnosis, and another molecular laboratory confirmed ND after molecular analysis. The family reported a maternally related nephew with similar clinical features. Patient was not seen again until 5 years when the family visited a specialist seeking for genetic counseling since they were planning for a third child. Physical examination at that age showed that the patient was below the third centile for both height and weight (<3 SD), and that his head size could be considered as microcephalic. He was blind with whitish-yellow retrolental masses that contained proliferated blood vessels, and he exhibited severe psychomotor retardation without verbal language skills acquired. Neither hearing abnormalities nor other congenital findings were detected. At this time, brief seizures were observed and antiepileptic treatment with valproic acid was started. Latest examinations revealed a normal MRI and a diffuse slow wave dysfunction without any epileptiform activity by EEG. No more seizures episodes had occurred after the antiepileptic treatment was initiated. Currently, the patient is regularly followed by pediatric and neuropsychiatric specialists due to severe psychomotor retardation, epilepsy, microcephaly, and blindness.

MATERIAL AND METHODS

Molecular Analysis

Genomic DNA samples were obtained from peripheral blood of patient and his family. The

NDP gene was PCR amplified in different segments containing complete exon, acceptor, and donor splicing sites sequences. PCR conditions for each exon and the primer sequences used were as previously described by Meindl et al. [1992]. PCR amplification products were further sequenced on an automated sequencer (ABI3100; Applied Biosystems, Foster City, CA).

Microarray Comparative Genomic Hybridization (CGH)

The tiling path X chromosome-specific array consists >1,600 genomic bacterial artificial chromosome (BAC) clones derived from the X chromosome, with an average density of one BAC every 100 kb on the X chromosome, plus internal quality control BACs from autosomal chromosomes. All clones had three replicates on the array. The production of the X-array, probe preparation, and hybridization on the array were performed at the microarray unit of the Center for Genomic Regulation (CRG). The set of clones used to produce this array was purchased at the Children Hospital Oakland Research Institute (<http://bacpac.chori.org/home.htm>). DNA amplification, spotting on the slides, and hybridization procedures had been published elsewhere [Fiegler et al., 2003; Wang et al., 2004]. Test and control DNAs were labeled by random priming using the BioPrime Array CGH Genomic Labeling System (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA). Dye swap was used to reduce false positives due to dye-related artifacts. Two hybridization experiments were performed for each sample: in the forward experiment the array was hybridized with a mixture of patient's DNA labeled with Cy3-dCTP and the reference (control) DNA labeled with Cy5-dCTP, while in the reverse experiment patient's DNA was labeled with Cy5-dCTP and co-hybridized with reference (control) DNA labeled with Cy3-dCTP, to a second array. Genomic imbalances were determined based on log₂ ratios of the average of their replicates, and sequences were considered as amplified or deleted when reported in the direct and reverse experiment outside the ± 0.30 range.

Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) Analysis

BAC/PAC clones located in the region identified as deleted by array CGH were purchased from the BAC/PAC Resources of the Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI, Oakland, CA). The order of the probes according to the current mapping data is: centromere—RP1-95C20—RP1-27K14—RP6-218J18—RP11-334D18—telomere. Clones were grown and DNA was extracted as manufacturer's instructions. Afterwards, approximately 200 ng of each DNA sample were labeled with Spectrum

Orange or Spectrum Green by nick translation (Vysis, Downers Grove, IL). Then 100 ng of each sample were precipitated with 5 μ g of human cot-1 DNA (Vysis, Downers Grove, IL) and dissolved in 10 μ L of hybridization buffer (Vysis, Downers Grove, IL). FISH using this solution as a probe was performed in a chromosome preparation from the patient and patient's mother. Briefly, the slide was denatured by immersion in 70, 85, and 100% ethanol. The probe was also denatured at 73°C for 5 min. After application of 10 μ L of probe, the slide was incubated in a moist chamber for 16 hr at 37°C. After hybridization, the slide was washed in 0.4 \times SSC at 72°C during 2 min and 2 \times SSC at room temperature during 30 sec; chromosomal DNA was counterstained with DAPI (Vysis, Downers Grove, IL). FISH analyses were done using a Leica DMRXA epifluorescence microscope. Images were captured by using a COHU camera and analyzed with the Cytovision Ultra Workstation (Applied Imaging, Sunderland, UK). For each FISH probe, at least 10 metaphase cells were studied.

RESULTS

The patient and his family were referred to our molecular laboratory to better characterize the deletion of the *NDP* gene and to elucidate the carrier status of the mother. First, we confirmed that none of the *NDP* exons could be amplified in the proband, while a signal of PCR amplification was readily detected in his mother and healthy brother (data not shown). We also sequenced the *NDP* gene in the mother in order to rule out the possibility of a point mutation. Second, hybridization on a tilling-path X-specific CGH microarray was performed. Analysis of the normal versus proband ratio profiles confirmed a deletion of 11 contiguous BAC clones on the short arm of the X chromosome (RP11-558I17, RP11-561O22, RP11-643D7, RP11-455O7, RP11-72J3, RP11-291H16, RP11-355O20, RP11-11B9, RP11-

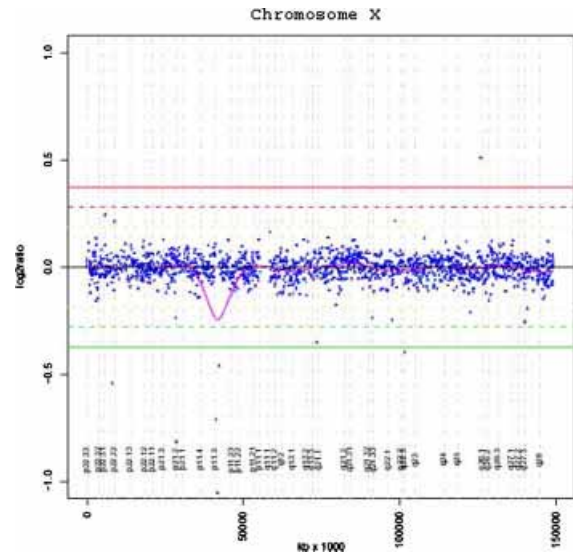


FIG. 1. Chromosome X array CGH profile of the proband. Each dot represents the mean \log_2 transformed and Lowess normalized test over reference intensity ratio (y-axis), which is derived from three independent replicate spots on the array, in a replicate dye swap experiment. The Mb position of the clones on the X chromosome is displayed in the x-axis, ordered from p-telomere to q-telomere on the basis of physical mapping positions, according to the hg17 assembly of the UCSC (see <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Thresholds for copy number gain (log ratio = 0.3) or loss (log ratio = -0.3) are indicated by horizontal dashed lines. In this patient a microdeletion on Xp11.3 was identified: a total of three clones showed log ratios below -0.3 and eight had log ratios below -1 (data not shown).

634A3, RP11-110B2, and RP11-605I23) (Fig. 1), spanning a region of, at least, 1 Mb in Xp11.3. Finally, FISH analysis with four different BAC/PAC clones located in the deleted region was performed to confirm the results obtained by array CGH. The deletion was ascertained in the patient since all used clones failed to hybridize (Fig. 2A). Regarding the patient's mother, FISH analysis confirmed her carrier status, as only one signal corresponding to the normal X chromosome was detected (Fig. 2B). Based on the FISH and microarray results, the deletion

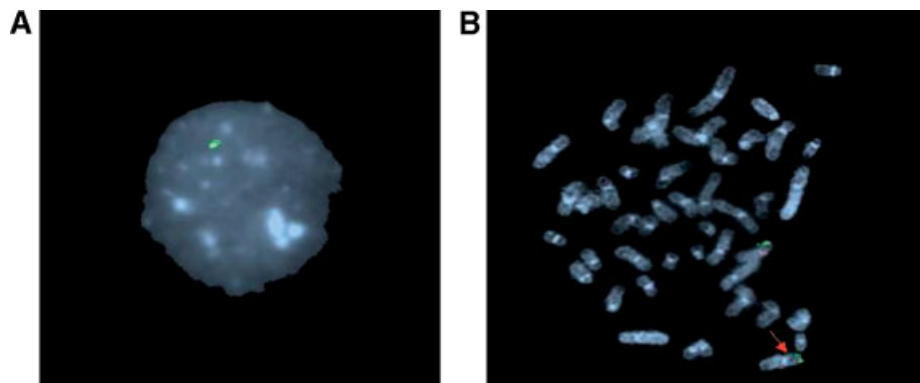


FIG. 2. FISH studies on interphase nuclei and metaphase spreads with the clone RP11-218J18, that maps within the deletion (red probe), and the clone GS-98-C4, that maps Xp telomere (green probe) on the proband (A) and his mother (B). The red arrow indicates the lack of signal for clone RP11-218J18 corresponding to the deleted X chromosome.

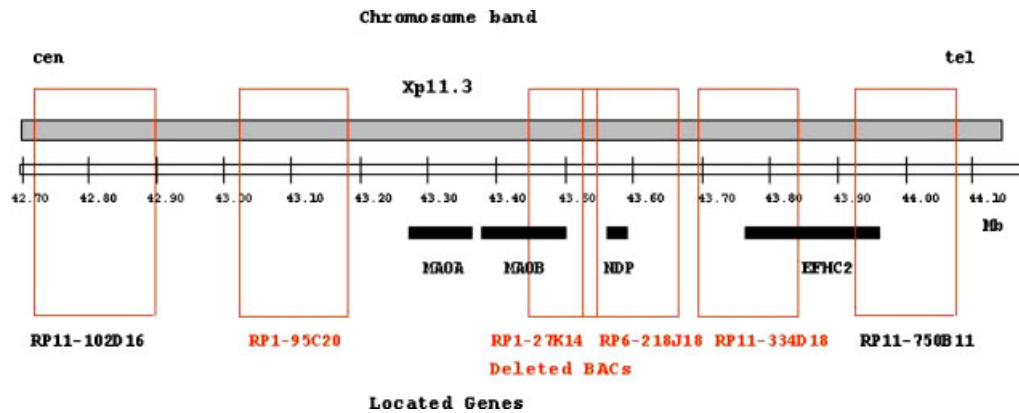


FIG. 3. Schematic presentation of clones and genes located within the deleted region (Xp11.3). The RP11-102D16, and RP11-750B11 (in bold) BAC clones are the first two ones that were found not to be deleted by microarray CGH. The rest (RP1-95C20, RP1-27K14, RP6-218J18, and RP11-334D18) are the clones used to ascertain the deletion by FISH analysis.

includes the *NDP*, *MAOA*, *MAOB*, and *EFHC2* genes (Fig. 3). Unfortunately, we have not had access to samples from the maternal relative that the family reports with a similar phenotype.

DISCUSSION

Systematic screening of the *NDP* gene sequence has led to the identification of more than 80 disease-causing mutations [see Rodriguez-Revena et al., 2004 for a review]. In general, there were no differences in disease severity caused by these variants, except in those cases of large submicroscopic deletions, which are associated with a more severe neurologic phenotype. The latter patients, in addition to the typical ocular manifestations, have microcephaly, severe to profound mental retardation, seizures, abnormal sexual maturation, and growth delay. On the basis of this observation, a contiguous gene syndrome has been suggested for these cases involving deletion of the *NDP*, *MAOA*, and *MAOB* genes [Chen et al., 1995; Schuback et al., 1995].

Here we report on our findings in a ND patient with a microdeletion at Xp11.3 delineated using a 100-kb resolution CGH-array. This approach has allowed us to establish the location of the deletion breakpoints and estimate that it spans about 1 Mb, affecting not only the *NDP* gene but also the *MAOA*, *MAOB*, and *EFHC2* genes. No obvious segmental duplications have been detected at the breakpoints of the deletion (http://chr7.ocgc.ca/cgi-bin/dupbrowse/dupbrowse/human_b34 and <http://genome.ucsc.edu/index.html>), and therefore its formation does not appear to be due to non-allelic homologous recombination.

Clinical features of the proband include bilateral retinal detachment and severe psychomotor retardation, which can be attributed to the absence of NDP protein and possibly to the lack of monoamine oxidase (MAO) enzymes. The *MAO* genes encode for

a nuclear mitochondrial isoenzymes that catalyze the oxidative deamination of a number of biogenic amines, including the neurotransmitters serotonin (5-HT), norepinephrine and dopamine, and the neuromodulator phenylethylamine [Shih and Thompson, 1999]. Due to this ability, both enzymes (*MAOA* and *MAOB*) have been implicated in predisposition to a range of neurological disorders and psychiatric traits [Brunner et al., 1993a,b]. Indeed, this suspicion is consistent with the findings in *Maoa*- and *Maob*-knockout mice [Cases et al., 1995; Grimsby et al., 1997].

The patient that we report here also shows a deletion of the *EFHC2* gene. Little is known about this gene, recently cloned by Gu et al. [2005], on account to its similarity to the previously described *EFHC1*. This latter gene, which is located on 6p12-p11, was described as the first susceptibility gene for juvenile myoclonic epilepsy. *EFHC1* encodes a protein that is characterized by Ca^{2+} -binding EF-hand motifs and DM10 domains [Suzuki et al., 2004]. The exact function of *EFHC1* is still unknown but it has been demonstrated that it may have a role in cell-death. By compromising the apoptotic activity of *EFHC1* one might speculate about an incorrect elimination of unwanted neurons during development of the central nervous system, leading to an increased density of neurons with precarious calcium homeostasis and to the production of hyperexcitable circuits [Suzuki et al., 2004]. *EFHC2* is the only paralog of *EFHC1* gene and similarly, it has also been suggested to be associated with epilepsy. Additionally to the classical ND clinical features, the patient that we report also presents myoclonic epilepsy, supporting the idea that the *EFHC2* gene may be responsible for this clinical feature.

In summary, our findings are in accordance with the clinical traits previously described to large deletions affecting the *NDP* gene; moreover, we provide a detailed molecular characterization of the deleted region and a genotype-phenotype correlation. We

therefore highlight the importance of array-based CGH studies in order to establish more precise genotype–phenotype correlations. The extensive use of these studies would also be helpful to understand the phenotypic variants of microdeletional syndromes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the family for their cooperation and consent to publish this study. This work has received financial support from grants PI050776, PI050159, FS041126, and RGPG (G03/184) financed by the “Fondo de Investigación Sanitaria”, Spain; and by Genome Spain.

REFERENCES

- Brunner HG, Nelen MR, Breakefield XO, Ropers HH, van Oost BA. 1993a. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 262:578–580.
- Brunner HG, Nelen MR, van Zandvoort P, Abeling NG, van Gennip AH, Wolters EC, Kuiper MA, Ropers HH, van Oost BA. 1993b. X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: Phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. *Am J Hum Genet* 52:1032–1039.
- Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, Pournin S, Muller U, Aguet M, Babinet C, Shih JC, De Maeyer E. 1995. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 268:1763–1766.
- Chen ZY, Hendriks RW, Jobling MA, Powell JF, Breakefield XO, Sims KB, Craig IW. 1992. Isolation and characterization of a candidate gene for Norrie disease. *Nat Genet* 1:204–208.
- Chen ZY, Denney RM, Breakefield XO. 1995. Norrie disease and MAO genes: Nearest neighbors. *Hum Mol Genet* 4:1729–1737.
- Donnai D, Mountford RC, Read AP. 1988. Norrie disease resulting from a gene deletion: Clinical features and DNA studies. *J Med Genet* 25:73–78.
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP, Carter NP. 2003. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 36:361–374.
- Grimsby J, Toth M, Chen K, Kumazawa T, Klaidman L, Adams JD, Karoum F, Gal J, Shih JC. 1997. Increased stress response and beta-phenylethylamine in MAOB-deficient mice. *Nat Genet* 17:206–210.
- Gu W, Sander T, Heils A, Lenzen KP, Steinlein OK. 2005. A new EF-hand containing gene EFHC2 on Xp11.4: Tentative evidence for association with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Res* 66:91–98.
- Meindl A, Berger W, Meitinger T, van de Pol D, Achatz H, Dorner C, Haasemann M, Hellebrand H, Gal A, Cremers FPM, Ropers HH. 1992. Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins. *Nat Genet* 2:139–143.
- Michaelides M, Luthert PJ, Cooling R, Firth H, Moore AT. 2004. Norrie disease and peripheral venous insufficiency. *Br J Ophthalmol* 88:1475.
- Norrie G. 1927. Causes of blindness in children. *Acta Ophthalmol* 5:357–386.
- Rehm HL, Zhang DS, Brown MC, Burgess B, Halpin C, Berger W, Morton CC, Corey DP, Chen ZY. 2002. Vascular defects and sensorineural deafness in a mouse model of Norrie disease. *J Neurosci* 22:4286–4292.
- Rodriguez-Revenca L, Badenas C, Madrigal I, Mallolas J, Milà M. 2004. Molecular basis of Norrie disease. *Recent Res Dev Hum Genet* 2:137–151.
- Schuback DE, Chen ZY, Craig IW, Breakefield XO, Sims KB. 1995. Mutations in the Norrie disease gene. *Hum Mutat* 5:285–292.
- Shastri BS, Trese MT. 2003. Overproduction and partial purification of the Norrie disease gene product, norrin, from a recombinant baculovirus. *Biochem Biophys Res Commun* 312:229–234.
- Shih JC, Thompson RF. 1999. Monoamine oxidase in neuropsychiatry and behavior. *Am J Hum Genet* 65:593–598.
- Sims KB, Lebo RV, Benson G, Shalish C, Schuback D, Chen ZY, Bruns G, Craig IW, Golbus MS, Breakefield XO. 1992. The Norrie disease gene maps to a 150 kb region on chromosome Xp11.3. *Hum Mol Genet* 1:83–89.
- Suarez-Merino B, Bye J, McDowall J, Ross M, Craig IW. 2001. Sequence analysis and transcript identification within 1.5 MB of DNA deleted together with the NDP and MAO genes in atypical Norrie disease patients presenting with a profound phenotype. *Hum Mutat* 17:523.
- Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, Alonso ME, Shi J, Hara Y, Nishida M, Numata T, Medina MT, Takeuchi T, Morita R, Bai D, Ganesh S, Sugimoto Y, Inazawa J, Bailey JN, Ochoa A, Jara-Prado A, Rasmussen A, Ramos-Peek J, Cordova S, Rubio-Donnadieu F, Inoue Y, Osawa M, Kaneko S, Oguni H, Mori Y, Yamakawa K. 2004. Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 36:842–849.
- Wang NJ, Liu D, Parokony AS, Schanen NC. 2004. High-resolution molecular characterization of 15q11-q13 rearrangements by array comparative genomic hybridization (array CGH) with detection of gene dosage. *Am J Hum Genet* 75:267–281.
- Warburg M. 1971. Norrie disease. *Birth Defects* 7:117–124.
- Zhu DP, Antonarakis SE, Schmeckpeper BJ, Diergaarde PJ, Greb AE, Maumenee IH. 1989. Microdeletion in the X-chromosome and prenatal diagnosis in a family with Norrie disease. *Am J Med Genet* 33:485–488.

4.4. Artículo IV

Complete deletion of ornithine transcarbamyase gene confirmed by
CGH array of X chromosome.

Arranz, Madrigal *et al.*
J Inherit Metab Dis. 2007; 30 (5):813.

Complete deletion of ornithine transcarbamylase gene confirmed by CGH array of X chromosome

J. A. Arranz · I. Madrigal · E. Riudor ·
Ll. Armengol · M. Milà

Received: 8 February 2007 / Submitted in revised form: 23 April 2007 / Accepted: 24 April 2007 / Published online: 14 June 2007
© SSIEM and Springer 2007

Summary Ornithine transcarbamylase deficiency is an X-linked semidominant trait that is the most frequent inborn error of the urea cycle. Three hundred and fifty different mutations, including mostly point mutations and a small proportion of large rearrangements have been reported. Conventional molecular diagnosis is highly reliable for point mutations but can miss gross rearrangements. We describe a contiguous gene syndrome involving the *RPGR*, *OTC* and *TM4SF2* genes in a male patient with severe neonatal OTC deficiency identified by the conventional molecular approach. Molecular characterization was ascertained by X chromosome CGH array and confirmed by MLPA. Complete deletion of the *OTC* gene led to absent OTC enzymatic activity in liver and to a severe clinical phenotype. The maternal phenotype, characterized by

less severe hyperammonaemic crises associated with neurological impairment would result from a deficient but not null OTC activity due to random X chromosome inactivation in the liver. Our cases are similar to others described presenting with OTC deficient phenotype in which *OTC* and contiguous genes are affected. Clinical expression would be conditioned by complete OTC deficiency in males and by X chromosome inactivation in females, leading to compensation by the normal allele in tissues such as blood or muscle but not sufficiently in liver. The application of high-resolution genetic techniques allows the characterization of causative mutations such as large deletions in order to guide genetic counselling and prenatal diagnosis.

Communicating editor: Mike Gibson

Competing interests: None declared

References to electronic databases: OMIM #311250; EC 2.1.3.3; HUGO-approved gene symbol, *OTC*; GenBank reference sequence for human OTC: NP_000522 for the amino acid sequence; NM_000531 for the mRNA sequence; NC_000023 for the gene sequence.

J. A. Arranz (✉) · E. Riudor
Unitat de Metabolopaties, Hospital Universitari
Materno-Infantil Vall d'Hebron, Passeig de la Vall d'Hebron,
119-129, 08035 Barcelona, Spain
e-mail: jaarranz@vhebron.net

I. Madrigal · M. Milà
Center for Biomedical Research on Rare Diseases
(CIBERER), ISCIII, Barcelona, Spain

L. Armengol
Genes and Disease Program, Center for Genomic
Regulation (CRG), Barcelona, Spain

Abbreviations

CGH	comparative genomic hybridization
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MR	mental retardation
OTC	ornithine transcarbamylase
RPGR	retinitis pigmentosa GTPase regulator
TM4SF2	transmembrane 4 superfamily member 2 (also called tetraspanin 7)

Introduction

Ornithine transcarbamylase (EC 2.1.3.3) deficiency (OMIM #311250) is an X-linked semidominant trait. The *OTC* gene (GenBank K02100) spans 73kb and contains 10 exons (Hata et al 1988). Nearly 350 different mutations, predominantly missense mutations and small deletions or insertions, have been

reported (Yamaguchi et al 2006), while gross rearrangements have been described in only 19 cases (Climent et al 1999; Jakubiczka et al 2007; Segues et al 1995; Slomski et al 1992). We describe a deletion involving the *RPGR*, *OTC* and *TM4SF2* genes which presented diagnostic difficulties by the conventional molecular approach and was definitively ascertained by CGH array of the complete X chromosome.

Patients

Subject 1

Subject 1 was 25-year-old woman who presented at 3 years with crises of irritability, hypotonia and behavioural changes with hyperammonaemia (205 $\mu\text{mol/L}$; normal <50), high orotate excretion and mild arginine decrease. Specific treatment for OTC deficiency was started with good clinical recovery. Later, she exhibited several hyperammonaemic crises coinciding with respiratory infections and mild mental retardation. She was lost to follow-up in late childhood. At 25 years she was admitted for pregnancy monitoring at the 7th month. No vision deficiencies were appreciable although no specific examinations were performed.

Subject 2

A newborn boy, the son of subject 1, exhibited respiratory distress and irritability at a few hours of life with ammonia of 278 $\mu\text{mol/L}$, glutamine of 1830 $\mu\text{mol/L}$ (normal 475–750), undetectable citrulline and orotate excretion of 73.7 mmol/mol creatinine (normal 0.7–3.3), clearly pointing to OTC deficiency. In spite of treatment, he worsened with neurological deterioration until death at 17 days of age.

Methods

Informed consent for DNA analysis was obtained. The complete coding region of the *OTC* gene and the flanking intron-exon boundaries were PCR-amplified as described elsewhere (Garcia-Perez et al 1995) and sequenced using standard methods. The amplification of specific regions of other non-related genes (*FAH* and *GLDC*) was used to control the reactions.

CGH array

The tiling path X chromosome-specific array consists of >1600 genomic BAC clones derived from the X

chromosome with a resolution of approximately 100kb. The set of clones was purchased from the Children's Hospital Oakland Research Institute (<http://bacpac.chori.org/home.htm>). Full-Coverage X-Chromosome Array-CGH production, probe preparation, and hybridization on the array were performed at the microarray unit of the Center for Genomic Regulation (CRG, Barcelona) as described elsewhere (Rodriguez-Revena et al 2007). Data normalization was performed against the mean of the spot ratios of all clones and genomic imbalances were determined based on \log_2 ratios of the average of their replicates. Sequences were considered as amplified or deleted when outside the ± 0.30 range.

MLPA analysis

The carrier state of the mother was confirmed by MLPA. We included both subjects in a screening study of 14 known genes responsible for X-linked mental retardation by MLPA, one of which was the *TM4SF2* gene (Salsa P106, MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). The protocol was performed following the manufacturer's recommendations.

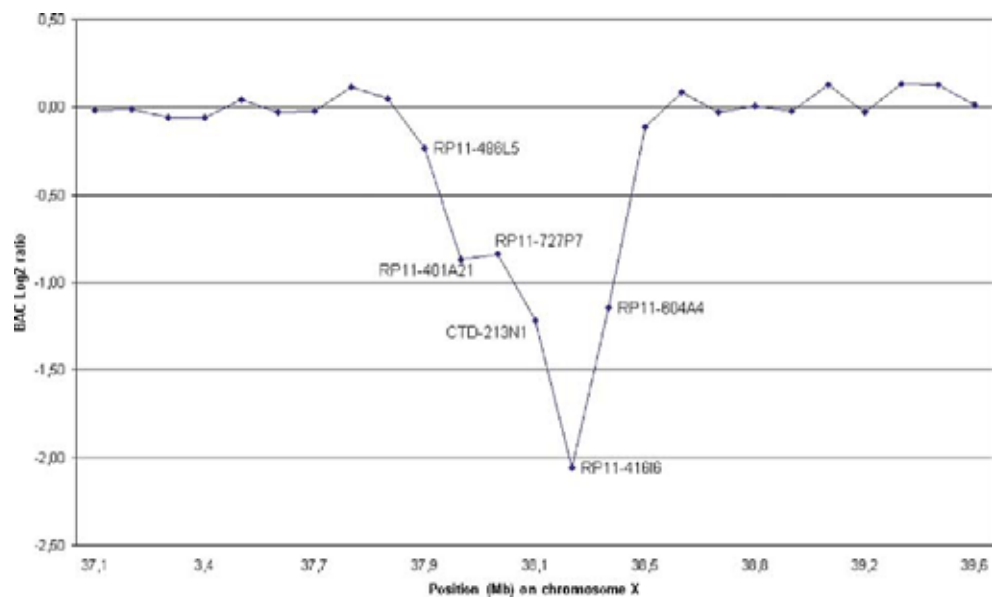
Analysis of *RPGR* gene

Primers used for amplification of the *RPGR* gene were RPGR 5F (5'-ACGTTTTCTTTCCATGTGC-3') and RPGR 5R (5'-GAAAGGAATGTGTCCAGAC-3'). Amplification of the *SRPX* gene that maps near *RPGR* outside the deleted region was used as amplification control. Primers used were SRPX 11F (5'-ACAAAGAGCGCTATGTCTCC-3') and SRPX 11R (5'-TGTTGATAGCCTGTGTATGGTT-3').

Results and discussion

No amplification of *OTC* gene was observed in the newborn and a normal amplification pattern was obtained in the mother. By X-chromosome array-CGH, we identified a small deletion at Xp11.4 in subject 2. The deletion was evident from aberrant ratios of six adjacent clones (RP13-486L5, RP11-401A21, RP11-727P7, CTD-213N1, RP11-416I6 and RP11-604A4) at 37.87–38.40Mb at Xp11.4 (Fig. 1). The \log_2 normalized ratios obtained for these clones varied between -0.38 and -2.63 . Analysis of the 0.5Mb deletion revealed that other genes than *OTC* are included in the deletion: *TM4SF2* (related to MR) and the *RPGR* gene (responsible for retinitis

Fig.1 BAC array CGH results for 26 clones mapping in the region Xp11.3-Xp11.4. In the microdeletion on Xp11.4, six clones showed log ratios below -0.3



pigmentosa). MLPA confirmed the deletion affecting *TM4SF2* in both the subject and his mother and the deletion of the *RPGR* gene in the proband was confirmed by PCR.

Complete deletion of the *OTC* gene in hemizygotic status in the proband led to absent OTC enzymatic activity in liver, explaining his fatal outcome. A less severe maternal phenotype would result from a deficient but not null OTC activity as a consequence of unfavourable X chromosome inactivation in liver. Mental retardation resulted either from repeated hyperammonaemic episodes or the partial lack of the protein encoded by the *TM4SF2* gene. On the other

hand, the *RPGR* gene is related to X-linked retinitis pigmentosa; clinical evidence of this disease could not be obtained, either because of its recessive inheritance or of X inactivation in the retina.

Some of the eight large deletions reported in the literature also include neighbouring genes such as *DMD*, *CYBB*, *RPGR* and *TM4SF2* (Table 1). Nevertheless, and probably owing to the recessive inheritance pattern of these genes, patients only presented OTC deficiency phenotype without any evidence of symptoms of other conditions such muscular dystrophy, chronic granulomatosis or retinitis pigmentosa, as in our patients.

Table1 Comparison of the most relevant data in previously reported complete deletion of *OTC* gene, both isolated and in contiguous gene deletion syndrome

Deletion	Method	Phenotype	Contiguous genes affected	Reference
Whole <i>OTC</i> gene	Southern blot	OTC deficiency	N.A. ^a	Suess et al (1992)
delXp11.4-p21	RFLP hybrid HR ^b cytogenetics	OTC deficiency	N.A. ^a	Slomski et al (1992)
Whole <i>OTC</i> gene	MS markers	OTC deficiency	-	Segues et al (1995)
CYBB-DXS1110-OTC		OTC deficiency	<i>CYBB</i> , <i>RPGR</i> , <i>OTC</i>	
CYBB-DXS1110-OTC-DXS977		OTC deficiency	<i>CYBB</i> , <i>RPGR</i> , <i>OTC</i>	
delXp21 (DXS1003-DXS989)	MS ^c markers HR ^b cytogenetics	OTC deficiency	<i>DMD</i> , <i>CYBB</i> , <i>RPGR</i> , <i>OTC</i>	Climont et al (1999)
Whole <i>OTC</i> gene	Southern blot	OTC deficiency	N.A. ^a	Tuchman et al (2002)
delXp21.1 (DXS1238-DXS8014)	MS ^c markers, FISH, CGH	OTC deficiency	<i>DMD</i> , <i>CYBB</i> , <i>RPGR</i> , <i>OTC</i> , <i>TM4SF2</i> ?	Jakubiczka et al (2007)
delXp11.4	CGH array, MLPA, PCR	OTC deficiency	<i>RPGR</i> , <i>OTC</i> , <i>TM4SF2</i>	This report

^aN.A., data not available.

^bHR, high-resolution.

^cMS, microsatellite.

High-resolution genetic techniques as MLPA and CGH array have proved highly reliable for better characterization and delineation of large rearrangements. They allow the detection of submicroscopic aberrations, providing direct information on the genomic position of the aberration. Further characterization of the precise nature of these deletions is of clinical importance not only for genetic counselling but also for prenatal diagnosis and early clinical management.

Acknowledgements We thank the clinicians involved in the management of the patients: Dr M. Martínez-Pardo (Hospital Ramon y Cajal, Madrid, Spain) and Dr C. Montahud (Hospital General, Elche, Spain). This work was supported by a fund of Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain, Redes Temáticas, project REDEMETH G03/54 and by the Instituto Carlos III (PI041126).

References

- Climont C, Garcia-Perez MA, Sanjurjo P, et al (1999) Identification of a cytogenetic deletion and of four novel mutations (Q69X, I172F, G188V, G197R) affecting the gene for ornithine transcarbamylase (OTC) in Spanish patients with OTC deficiency. *Hum Mutat* **14**: 352–353.
- Garcia-Perez MA, Briones P, Garcia-Munnoz MJ, Rubio V (1995) A splicing mutation, a nonsense mutation (Y167X) and two missense mutations (I159T and A209V) in Spanish patients with ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Genet* **96**: 549–551.
- Hata A, Tsuzuki T, Shimada K, Takiguchi M, Mori M, Matsuda I (1988) Structure of the human ornithine transcarbamylase gene. *J Biochem (Tokyo)* **103**: 302–308.
- Jakubiczka S, Bettecken T, Mohnike K, et al (2007) Symptoms of OTC deficiency but not DMD in a female carrier of an Xp21.1 deletion including the genes for dystrophin and OTC. *Jakubiczka Eur J Pediatr* **166**: 743–745.
- Rodriguez-Revenga L, Madrigal I, Alkhalidi LS, et al (2007) Contiguous deletion of the NDP, MAOA, MAOB, and EFHC2 genes in patient with Norrie disease, severe psychomotor retardation and myoclonic epilepsy. *Am J Med Genet A* **143**(9): 916–920.
- Segues B, Rozet JM, Gilbert B, et al (1995) Apparent segregation of null alleles ascribed to deletions of the ornithine transcarbamylase gene in congenital hyperammonaemia. *Prenat Diagn* **15**: 757–761.
- Slomski R, Bräulke I, Behrend C, Schröder E, Colombo JP, Reiss J (1992) Ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency in a female patient with a de novo deletion of the paternal X chromosome. *Hum Genet* **89**: 632–634.
- Suess PJ, Tsai MY, Holzknicht RA, Horowitz M, Tuchman M (1992) Screening for gene deletions and known mutations in 13 patients with ornithine transcarbamylase deficiency. *Biochem Med Metab Biol* **47**: 250–259.
- Tuchman M, Jaleel N, Morizono H, Sheehy L, Lynch MG (2002) Mutation and polymorphisms in the human ornithine transcarbamylase gene. *Hum Mutat* **19**: 93–107.
- Yamaguchi S, Brailey LL, Morizono H, Bale AE, Tuchman M (2006) Mutations and polymorphisms in the human ornithine transcarbamylase (OTC) gene. *Hum Mutat* **27**: 626–632.

4.5. Artículo V

Deletion of the OPHN1 gene detected by aCGH.

Madrigal *et al.*

J Intel Dis Res (Published article online: 29-Oct-2007 doi:
10.1111/j.1365-2788.2007.00997.x)

Deletion of the *OPHN1* gene detected by aCGH

I. Madrigal,^{1,2} L. Rodríguez-Revenga,^{1,2} C. Badenas,^{1,2} A. Sánchez^{1,2} & M. Milà^{1,2}

¹ Biochemistry and Molecular Genetics Department Hospital Clínic and IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer), Barcelona, Spain

² Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain

Abstract

Background The oligophrenin 1 gene (*OPHN1*) is an Rho-GTPase-activating protein involved in the regulation of the G-protein cycle required for dendritic spine morphogenesis. Mutations in this gene are implicated in X-linked mental retardation (XLMR).

Methods We report a deletion spanning exons 21 and 22 of the *OPHN1* gene identified by a tiling path X-chromosome array comparative genomic hybridization (CGH) and multiplex ligation-dependent probe amplification, confirmed by polymerase chain reaction (PCR), in a family with four males with intellectual disabilities.

Results Patients harbouring mutations in this gene share the same clinical manifestations reinforcing the idea of a syndromic XLMR. The most important neurological findings are cerebellar hypoplasia and ventriculomegaly.

Conclusions We recommend screening of the *OPHN1* gene in male patients with XLMR and cerebellar anomalies. This case highlights the value of high-resolution techniques as Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) and CGH array for a better characterization of copy number changes and suggests that MLPA technology may be very useful

for an initial screening of small deletions and duplications in XLMR patients.

Keywords aCGH, MLPA, *OPHN1*, XLMR

Introduction

The oligophrenin 1 gene (*OPHN1*, OMIM 300127) encodes an Rho-GTPase-activating protein involved in the regulation of the G-protein cycle. Rho proteins are important mediators of intracellular signal transduction required for dendritic spine morphogenesis (Govek *et al.* 2004). *OPHN1* is mainly expressed in foetal and adult nervous system and also in other tissues such as thymus, kidney and lung (Ramakers 2002). Mutations in this gene are associated with a wide range of clinical neuropathies, combining enlarged cerebral ventricles, cerebellar hypoplasia and other clinical traits such as seizures, intellectual disability (ID) and strabismus (Bienvenu *et al.* 1997; Billuart *et al.* 1998; des Portes *et al.* 2004). Although this was the first Rho gene identified responsible for non-syndromic ID (Billuart *et al.* 1998), new reports suggest that *OPHN1* mutations result in a recognizable syndrome where neuroradiological findings are the most specific symptom (Bergmann *et al.* 2003; des Portes *et al.* 2004; Chabrol *et al.* 2005; Higgins & Topaloglu 2005; Zanni *et al.* 2005). Application of high-resolution genetic techniques such as array

Correspondence: M. Milà, Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic, C/Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain (e-mail: mmila@clinic.ub.es).

CGH (aCGH) and Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) have become effective tools for detecting small deletions and duplications which allow for a precise characterization of causing mutations. MLPA is a recent technology based on the relative quantification of specific DNA sequences by the hybridization of genomic DNA with a mixture of probes (Schouten *et al.* 2002). MLPA allows detection of copy number changes of up to 46 different sequences in a single experiment. We report a mutation in a family with four sons with ID associated to a deletion of exons 21 and 22 of the *OPHN1* gene.

Patients and methods

Patients

Four sons from healthy, first cousin consanguineous parents were affected with ID with IQs ranging from 50 to 60 (Fig. 1). Cytogenetic analysis showed normal karyotypes and all were negative for the fragile X syndrome. Previous linkage analysis using Linkage Panel Set n 28 (Applied Biosystems, CA, USA) did not show conclusive results.

Molecular analysis

The tiling path X chromosome-specific array consists of >1600 genomic BAC clones derived from X chromosome with a resolution of approximately 100 kb. Array production, probe preparation and hybridization on the array were performed at the microarray unit of the Centre for Genomic Regulation (CRG, Barcelona) as described elsewhere (Rodriguez-Revinga *et al.* 2007). Data normalization was performed against the mean of the spot

ratios of all clones and genomic imbalances were determined based on \log_2 ratios of the average of the replicates. Sequences were considered as amplified or deleted when outside the ± 0.20 range.

Multiplex Ligation Probe Amplification analysis was performed with Salsa P106 kit (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands), as previously described (Madrigal *et al.* 2007). Analysis of MLPA PCR products was performed on an ABI 310 genetic analyser and the Genotyper software (Applied Biosystems, CA, USA). Target imbalances were determined based on ratios of the relative peak areas. Duplications and deletions were considered when outside the ± 0.30 range. MLPA results were confirmed by PCR by using primers for exons 20, 21, 22 and 23: 20F (5'-ATCAACTGGTGGGTA GCATT-3'), 20R (5'-GGAGCCAGGAAAGGTC TACT-3'), 21F (5'-TTATCATTAATCTTCCC TCTTGG-3'), 21R (5'-AAGTAGTTAGGGTCA GCTCTGG-3'), 22 F (5'-AAGTTGGCCAG GTAACCT-3'), 22R (5'-GTGATCCTGAAAGC ATTCCCT-3'), 23F (5'-CACGTGTATACCAAAG CAACT-3') and 23R (5'-AGGCGATTTGGTTT TTCTTT-3').

Results

Clinical findings

All affected males presented ID. The level of performance was similar to that described for fragile X patients, i.e. ability for only mechanical skills. The major dysmorphic features shared by all brothers were facial asymmetry, long face, prominent chin, strabismus, synophrys or medial eyebrow flare, a prominent nose, a broad high nasal root and hypogenitalism. Patients II.4 and II.6 developed

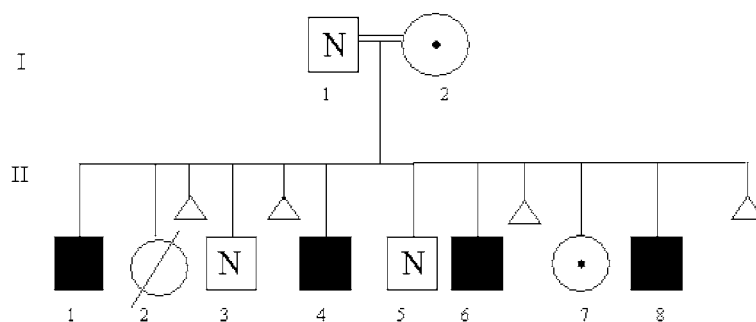


Figure 1 Pedigree of the family.

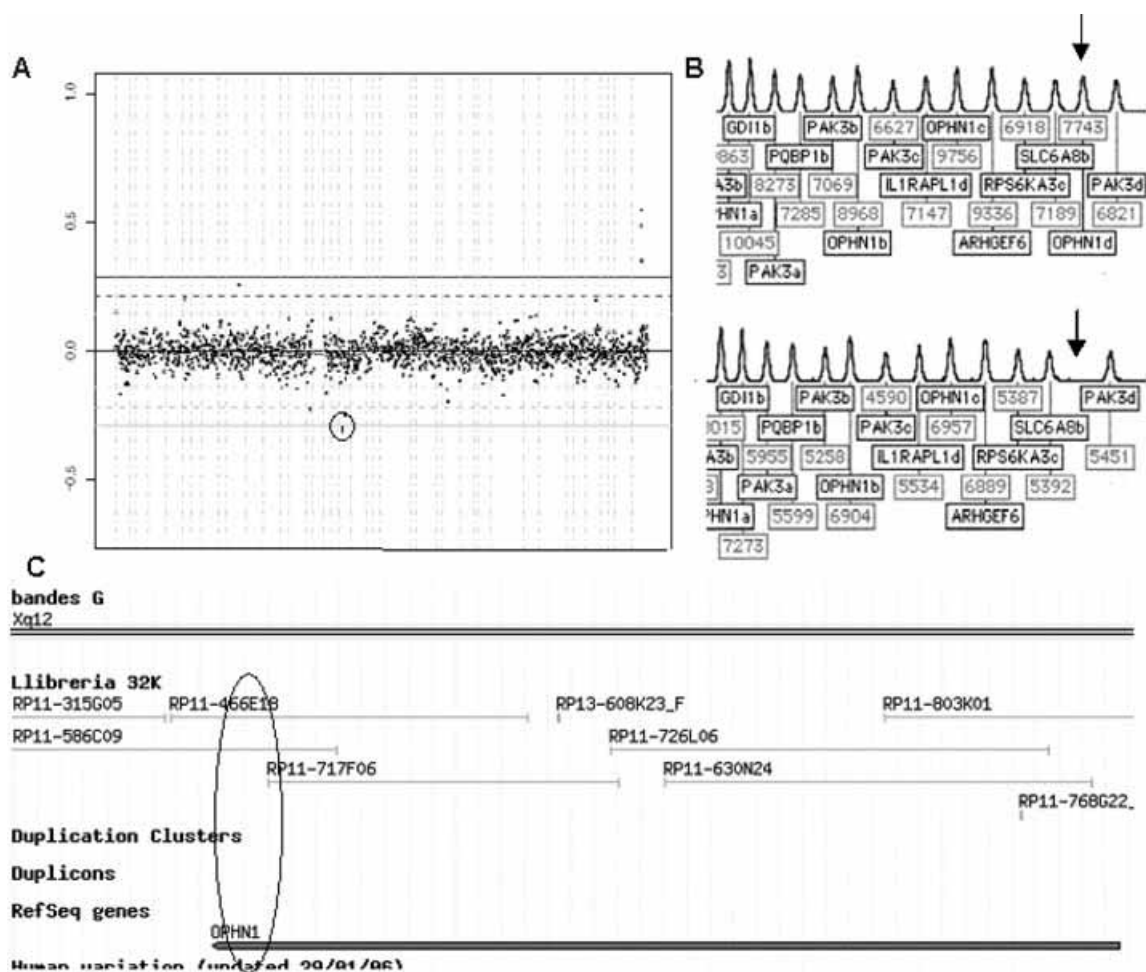


Figure 2 (A) BAC array CGH results. In Y-axis represented the mean \log_2 transformed and Lowess normalized test over reference intensity ratios. In the X-axis are displayed the Mb position of the clones on the X chromosome, ordered from p-telomere to q-telomere on the basis of physical mapping positions, according to the hgt7 assembly of the UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Clones with ratios lower than -0.2 are shown encircled. Other copy number variation (CNV) identified in the patient was duplication at Xq28, that encompasses the opsin cluster and that corresponds to a previously reported CNV present in the reference database (<http://projects.tcag.ca/variation/>). (B) Physical position of clones mapping Xq12. (C) Multiplex Ligation Probe Amplification electropherograms: control sample (first row) and the patient carrying the deletion (second row). The deletion in the patient is evident by the lack of the peak corresponding to exon 21.

early epilepsy and they were on medication with *Topiramate*. Magnetic resonance imaging (MRI) performed in these patients revealed a Dandy-Walker variant malformation which could explain the slightly hydrocephaly and cerebellar hypoplasia.

Molecular analysis

By X-chromosome aCGH, we identified a small deletion at Xq12. The deletion was evident from

aberrant ratios of two adjacent clones (RP11-586C9, RP11-466E18) that overlapped with the end of the *OPHN1* gene (Fig. 2A and B). The normalized \log_2 ratios obtained for these clones were 0.32 and 0.35, respectively. Parallel MLPA analysis (Madrigal *et al.* 2007) showed a deletion affecting exon 21 of the *OPHN1* gene (Fig. 2C). The deletion fully segregates with the phenotype in the family. The mother and sister could be diagnosed as carriers. PCR results revealed a deletion of exons 21 and 22. This

deletion includes the domain of interaction with actin, located to the carboxyl-terminal end of the protein.

Discussion

Mutations in genes engaged in intracellular signalling have usually been considered genes causing XLMR (i.e. *PAK3*, *OPHN1*, *ARHGEF6*, *GDI1*). Few cases are described with mutations in these genes; thus, it is difficult to establish genotype-phenotype correlations. Recent reports suggest the implication of *OPHN1* on a recognizable clinico-radiological syndrome (Philip *et al.* 2003; Higgins & Topaloglu 2005). The revision of reported cases revealed that affected patients harbouring mutations in the *OPHN1* display similar clinico-radiological features, mainly anomalies in the cerebellum and ventriculomegaly (Table 1). In a recent screening of patients with ID and known cerebellar anomalies, mutations in this gene were found in 12% of individuals (Zanni *et al.* 2005), suggesting that MRI should be performed in these patients to further investigate cerebellar anomalies. Mutational spectrum of the *OPHN1* includes three non-sense mutations, one splice site mutation, one insertion and six deletions (Table 1). Unlike other genes responsible for ID, the more frequent mutations are deletions present in almost 60% of the reported cases. The causing-disease mutation in our case is a deletion of exons 21 and 22; this region contains a proliferin-rich motif (PPVRPPDPP) with a consensus sequence for an SH3-binding site (PXXP). Transfection experiments recently confirmed that *OPHN1* interacts directly with the actin cytoskeleton through the proliferin-rich motif located at the carboxyl-terminal end of the protein (Fauchereau *et al.* 2003). This domain prevents actin cytoskeleton binding for the correct formation of growth cones. Neuropsychological deficits in these patients could be explained either by the absence of the actin binding site or by the degradation of the aberrant transcript through the non-sense-mediated mRNA decay mechanism, a process by which cells recognize and degrade non-sense mRNAs to prevent possibly toxic effects of truncated peptides. In neuronal cells, *OPHN1* co-localizes with actin cytoskeleton in the growth cone, the structure that directs the growth of the

Table 1 Main clinical features of patients with alterations of the *OPHN1* locus

Mutation	Billuart <i>et al.</i>	Tentler <i>et al.</i>	Bergmann <i>et al.</i>	Philip <i>et al.</i>	Philip <i>et al.</i>	Chabrol <i>et al.</i>	Zanni <i>et al.</i>	Zanni <i>et al.</i>	Zanni <i>et al.</i>	Zanni <i>et al.</i>	This paper			
											II.1	II.4	II.6	II.8
	c.1587del1fs	1.1Mb deletion	delex19fs	c.1385ins8	Q62X	c.641del2fs	IVS2+ 2T→C	delex 16+17	c.1196 C→T	c.2283 C→T				delex21+ 22
Intellectual disabilities	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Strabismus	+	-	+	-	+	+	+	-*	-	-	+	+	+	+
Epilepsy	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Facial dysmorphism	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	S	S	S	S
Cerebellar ataxia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ventriculomegaly	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MRI	CD		CH	CH	CH	CH	CH	CH	NA	CH DWV	DWV	DWV	DWV	DWV
Tall stature			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* External ophthalmoplegia.

OPHN1, oligophrenin 1 gene; CD, cerebellar dysgenesis; CH, cerebellar hypoplasia; DWV, Dandy-Walker Variant; MRI, magnetic resonance imaging; S, synophrys.

neurone. It plays an important role in neuronal morphology and therefore in synaptic processes and neuronal connectivity.

This case highlights the value of high-resolution techniques as MLPA and aCGH for a better characterization of copy number changes and suggests that MLPA is highly recommended as a first screening method for all subjects with an evidence of X-linked intellectual disability. Furthermore, it may be very useful to identify carrier women and to genetic counselling and prenatal diagnosis in families not previously diagnosed.

Acknowledgements

This work has been sponsored by the Instituto Carlos III (PI041126, PI050776, PI050159).

References

- Bergmann C., Zerres K., Senderek J., Rudnik-Schoneborn S., Eggermann T., Hausler M., Mull M. & Ramaekers V. T. (2003) Oligophrenin 1 (OPHN1) gene mutation causes syndromic X-linked mental retardation with epilepsy, rostral ventricular enlargement and cerebellar hypoplasia. *Brain* **126**, 1537–44.
- Bienvenu T., Der-Sarkissian H., Billuart P., Tissot M., Des Portes V., Bruls T., Chabrolle J. P., Chauveau P., Cherry M., Kahn A., Cohen D., Beldjord C., Chelly J. & Cherif D. (1997) Mapping of the X-breakpoint involved in a balanced X; 12 translocation in a female with mild mental retardation. *European Journal of Human Genetic* **5**, 105–9.
- Billuart P., Bienvenu T., Ronce N., des Portes V., Vinet M. C., Zemni R., Crollius H. R., Carrie A., Fauchereau F., Cherry M., Briault S., Hamel B., Fryns J. P., Beldjord C., Kahn A., Moraine C. & Chelly J. (1998) Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* **392**, 923–6.
- Chabrol B., Girard N., N'Guyen K., Gerard A., Carlier M., Villard L. & Philip N. (2005) Delineation of the clinical phenotype associated with OPHN1 mutations based on the clinical and neuropsychological evaluation of three families. *American Journal of Medical Genetics A* **138**, 314–17.
- Fauchereau F., Herbrand U., Chafey P., Eberth A., Koulakoff A., Vinet M. C., Ahmadian M. R., Chelly J. & Billuart P. (2003) The RhoGAP activity of OPHN1, a new F-actin binding protein, is negatively controlled by its amino-terminal domain. *Molecular Cell Neurosciences* **23**, 574–86.
- Govek E. E., Newey S. E., Akerman C. J., Cross J. R., Van der Veken L. & Van Aelst L. (2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nature Neuroscience* **4**, 364–72.
- Higgins J. J. & Topaloglu H. (2005) X-linked oligophrenic vermian dysgenesis. Syndromic vs non-syndromic X-linked mental retardation? *Neurology* **65**, 1346–7.
- Madrigal I., Rodriguez-Revena L., Badenas C., Sánchez A., Martínez F., Fernández I., Fernández-Buriel M. & Milà M. (2007) MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation. *Genetics in Medicine* **2**, 117–22.
- Philip N., Chabrol B., Lossi A. M., Cardoso C., Guerrini R., Dobyns W. B., Raybaud C. & Villard L. (2003) Mutations in the oligophrenin-1 gene (OPHN1) cause X linked congenital cerebellar hypoplasia. *Journal of Medical Genetics* **40**, 441–6.
- des Portes V., Boddaert N., Sacco S., Briault S., Maignent K., Bahi N., Gomot M., Ronce N., Bursztyn J., Adamsbaum C., Zilbovicius M., Chelly J. & Moraine C. (2004) Specific clinical and brain MRI features in mentally retarded patients with mutations in the Oligophrenin-1 gene. *American Journal of Medical Genetics* **124A**, 364–71.
- Ramakers G. J. (2002) Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends in Neurosciences* **4**, 191–9.
- Rodriguez-Revena L., Madrigal I., Alkhalidi L. S., Armengol L., González E., Badenas C., Estivill X. & Milà M. (2007) Contiguous deletion of the NDP, MAOA, MAOB, and EFHC2 genes in a patient with Norrie disease, severe psychomotor retardation and myoclonic epilepsy. *American Journal of Medical Genetics A* **143**, 916–20.
- Schouten J. P., McElgunn C. J., Waaijer R., Zwijnenburg D., Diepvens F. & Pals G. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* **30**, e57.
- Zanni G., Saillour B. S., Nagara M., Billuart P., Castelnau L., Moraine C., Faivre L., Bertini E., Durr A., Guichet A., Rodriguez D., des Portes V., Beldjord C. & Chelly J. (2005) Oligophrenin 1 mutations frequently cause X-linked mental retardation with cerebellar hypoplasia. *Neurology* **65**, 1365–9.

Accepted 14 August 2007

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El estudio genético del RM constituye uno de los campos más complejos de la genética humana; el avance en la identificación y caracterización de los factores genéticos responsables de RM se ve limitado por la heterogeneidad tanto clínica como molecular de esta patología. Los desórdenes mendelianos, las alteraciones cromosómicas o los factores ambientales pueden actuar como causa única o de forma conjunta en la etiología del RM. Actualmente la base de datos OMIM recoge más de 1000 entradas de genes relacionados con RM, 401 de los cuales mapan en el cromosoma X. El hecho de que cada gen sea responsable de RM en un número reducido de familias, existiendo más familias sin diagnosticar que familias con alteraciones genéticas identificadas, hace más difícil la identificación de estos genes (Ropers *et al.*, 2003).

Hasta ahora la mayoría de las mutaciones identificadas en genes responsables de RM son mutaciones no sinótimas y deleciones, posiblemente debido a la falta de técnicas lo suficientemente eficaces para la detección de otro tipo de reordenamientos. El exceso de dosis génica, y no sólo la falta de ella, es también causa de RM, como sucede en el caso de la duplicación que afecta el gen *MECP2* (Van Esch *et al.*, 2005). En algunos de los casos, sin embargo, falta todavía por determinar la consecuencia fisiopatológica de la dosis extra de las regiones implicadas.

Esta tesis aporta una visión actualizada de las causas genéticas del RM y de las recientes metodologías desarrolladas para alcanzar un diagnóstico molecular. La puesta a punto de nuevas tecnologías en nuestro laboratorio de biología molecular ha derivado en la modificación de los protocolos de estudio del RM, permitiendo de esta forma incrementar el número de diagnósticos e indicándonos cómo y cuándo debemos aplicar la tecnología de la que disponemos en cada caso.

El primer paso para el diagnóstico del RM es la evaluación clínica. Cuando existe una sospecha clínica de un síndrome que cursa con RM para el que se dispone de una prueba de laboratorio determinada, como una anomalía cromosómica, un síndrome microdelecional o

mutaciones en un gen conocido, se realiza un estudio dirigido que permite llegar a un diagnóstico molecular y confirmar la sospecha clínica inicial. En el caso de que no exista sospecha clínica alguna, el primer paso es realizar un cariotipo que permite descartar las anomalías cromosómicas numéricas y estructurales con un tamaño superior a 5 Mb. Las cromosopatías constituyen un porcentaje muy elevado de las causas de RM síndromico (cerca de un 20%), mientras que en los casos de RM no síndromico prácticamente no hay cromosopatías detectables mediante citogenética convencional.

Si el cariotipo no revela ninguna anomalía, el segundo paso es el estudio de reorganizaciones submicroscópicas, lo que requiere técnicas más sensibles que la citogenética convencional. En una primera etapa la aparición de técnicas de citogenética molecular como la CGH y la FISH permitieron dar un paso hacia delante en el conocimiento de la etiología del RM de base genética. Sin embargo éstos no resultan adecuados para realizar *screenings* de rutina ya que son muy laboriosos y son pocos los *loci* que se pueden estudiar en un solo experimento. En la actualidad, la aparición de nuevas tecnologías de alto rendimiento cada vez más sensibles y con mayor capacidad de análisis está permitiendo la detección de nuevos reordenamientos responsables de RM (Bauters *et al.*, 2005; Lugtenberg *et al.*, 2006; Madrigal *et al.*, 2007a). La aplicación tanto del MLPA como del aCGH del cromosoma X en nuestra serie de pacientes ha permitido detectar nuevos reordenamientos previamente no descritos, como por ejemplo las duplicaciones que afectan a los genes *GDII*, *RPS6KA3*, *HUWE1* y *ARHGEF6*, entre otros (Madrigal *et al.*, 2007a, Madrigal *et al.*, 2007b). La descripción clínica detallada de estos pacientes permitirá establecer una correlación fenotipo/genotipo para llegar a identificar y caracterizar nuevos síndromes microdelecionales y microduplicacionales. En este trabajo un ejemplo claro es la delección del gen *OPHNI* en un paciente diagnosticado inicialmente de RM no síndromico (Madrigal *et al.*, 2008). Las mutaciones en este gen siempre se habían considerado responsables de RM no síndromico, sin embargo estudios recientes sugieren un síndrome clínico-radiológico reconocible (Philip *et al.*, 2003; Higgins *et al.*, 2005). La mayoría de pacientes portadores de mutaciones en *OPHNI* comparten ciertas características clínicas como la hipoplasia

cerebelar y la ventriculomegalia (Bergman *et al.*, 2003; des Portes *et al.*, 2004; Chabrol *et al.*, 2005). El grupo de Zanni y col. realizaron en 2005 un análisis de este gen en pacientes afectos de RM y anomalías cerebelares y encontraron una frecuencia de mutaciones del 12%. La mutación detectada en nuestro paciente es una delección intragénica que afecta los exones 20-21 del gen *OPHN1*; la reevaluación clínica del paciente detectó anomalías cerebrales similares a las anteriormente descritas. Nuestros resultados y los trabajos antes mencionados ponen de manifiesto la importancia de realizar una evaluación clínica detallada con exploraciones complementarias, como los estudios de resonancia magnética, con el fin de establecer un fenotipo concreto que permita que estos síndromes sean reconocibles clínicamente.

5.1 Evaluación de las nuevas tecnologías aplicadas al estudio del XLMR

5.1.1 Multiplex Ligation Probe Amplification

La técnica de MLPA permite la detección de alteraciones en el número de copia mediante la amplificación de sondas adyacentes que identifican una secuencia diana (Shouten *et al.*, 2002). Actualmente esta técnica es ampliamente utilizada debido a su relación efectividad/coste. Su puesta a punto ha permitido incluir en los protocolos de estudio de RM de gran parte de los laboratorios de biología molecular, el *screening* de regiones subteloméricas por MLPA, de tal forma que ahora este estudio se realiza ante todo RM que tenga un cariotipo normal y una vez descartado el síndrome del cromosoma X frágil. Hasta la aparición del MLPA, el *screening* de alteraciones subteloméricas se realizaba con sondas FISH, con los inconvenientes antes mencionados y la necesidad de conocer, de antemano, la región a estudiar. En nuestro laboratorio el MLPA ha permitido además incluir el *screening* de reordenamientos en el cromosoma X en los casos en que se sospecha un XLMR. Por el momento, este *screening* ha puesto de manifiesto un 6% de reordenamientos responsables de RM en este cromosoma (Madrigal *et al.*, 2007b). De este modo, a todas estas familias que no disponían de un diagnóstico molecular previo, se les puede ofrecer ahora un consejo genético y un diagnóstico prenatal. Aunque el MLPA no detecta reordenamientos

equilibrados ni alteraciones en aquellas regiones para las cuales no se han diseñado sondas, esta técnica resulta especialmente útil para el diagnóstico de portadores de deleciones o duplicaciones, ya que hasta ahora este tipo de alteraciones requerían de otras tecnologías más costosas como el FISH, la CGH o los SSCPs. Además la posibilidad de diseñar sondas de MLPA *locus* específicas para el estudio de ganancias o pérdidas de cualquier región cromosómica resulta especialmente útil tanto para la detección de portadoras como para la confirmación de resultados de aCGH. La implantación de estas sondas *locus* específicas en nuestros protocolos de estudio de RM es un claro ejemplo de investigación traslativa, que nos permite aprovechar los avances en la investigación básica para el beneficio de los pacientes. Actualmente en nuestro laboratorio disponemos de un *set* de sondas de MLPA diseñadas para los tres exones del gen *NDP* que ya se utilizan para descartar o confirmar deleciones en este gen, presentes en aproximadamente un 30% de los casos de la Enfermedad de Norrie, lo que nos permite ofrecer un consejo genético a mujeres portadoras de estas deleciones.

El nivel de sensibilidad del MLPA para la detección de deleciones y duplicaciones es, según nuestros resultados, comparable al de la CGH. Esta tecnología permite la detección de anomalías en mosaico cuando están presentes en más de un 30% de las células. Este punto es especialmente relevante para la aplicación del MLPA en diagnóstico prenatal, ya que los mosaicismos confinados a placenta están presentes en 1-2% de las muestras de vellosidades coriales remitidas para análisis citogenético (Stetten *et al.*, 2004). Sin embargo todavía existen pocos trabajos, y algunos de ellos contradictorios, en los que se haya valorado la sensibilidad de esta técnica para la detección de anomalías en mosaico. Gerdes y col. (2005) realizaron un *screening* prenatal de aneuploidías para los cromosomas 13, 18, 21 X e Y mediante MLPA en 1542 casos. De todos los casos analizados obtuvieron 2 falsos negativos, una deleción parcial 46,XX,del(18)(q21→qter) y un mosaicismo 45,X(24%)/46,XY. Cabe destacar que el grado de mosaicismo era inferior al 30%, que es el límite a partir del cual nosotros hemos establecido se pueden detectar anomalías en mosaico mediante MLPA. Otro de los estudios fue el realizado por Kozlowski y col. (2007) que diseñaron un conjunto de

sondas de MLPA para el estudio de deleciones en los genes *TSC1* y *TSC2* (responsables de la esclerosis tuberosa), a raíz del cual concluyeron que el MLPA es una técnica eficaz para la detección de alteraciones, incluso cuando estas están presentes en mosaico. Sin embargo, al evaluar esta tecnología para la detección de mutaciones en mosaico (grado de mosaicismo 33% y 60%) en pacientes con Neurofibromatosis tipo 2 (NF2), Evans y col. (2007) concluyeron que esta técnica no es lo suficientemente sensible incluso en muestras con altos niveles de mosaicismo, puesto que detectaron sólo un 20% de las anomalías. Debe tenerse en cuenta que la detección de alteraciones en mosaico depende tanto del grado de mosaicismo como del número de sondas que cubren la región estudiada y el tamaño o número de exones implicados en la alteración. Es por tanto evidente que, aun permitiendo el MLPA la detección de anomalías en mosaico por encima del 30%, la técnica más sensible para el estudio de mosaicismos continúa siendo la FISH.

5.1.2 aCGH del cromosoma X

Los arrays de CGH se han convertido en una herramienta de gran utilidad para la obtención de un “cariotipo molecular”, ya que permite la detección de microduplicaciones y microdeleciones a lo largo de todo el genoma (Flieger *et al.*, 2006). Muchos casos de RM no sindrómico son debidos a reordenamientos cromosómicos desequilibrados que resultan en deleciones o duplicaciones de un determinado cromosoma o región cromosómica. Frente a las técnicas de citogenética convencional, los aCGH confieren las ventajas de una alta cobertura (generalmente todo el genoma), alta resolución y rapidez. Los avances en la tecnología de los *arrays* han revolucionado el estudio de las CNVs especialmente en el campo del RM, incluido el XLMR. La utilidad de esta tecnología para la detección de cambios numéricos en pacientes con RM y cariotipo aparentemente normal ha sido documentada por diversos grupos (Shaw-Smith *et al.*, 2004; Veltman *et al.*, 2004; Bauters *et al.*, 2005; Schoumans *et al.*, 2005; Menten *et al.*, 2006).

Una primera aplicación básica de los aCGH ha sido el estudio de síndromes microduplicaciones/microdelecionales conocidos. Gracias a los *arrays* podemos caracterizar

de forma precisa la región implicada y establecer una correlación fenotipo/genotipo. En Rodríguez-Revenge *et al.*, 2007, presentamos la caracterización molecular de una deleción del locus *NDP* mediante aCGH en un paciente afecto de Enfermedad de Norrie que presentaba una epilepsia poco común entre los pacientes con este síndrome. El aCGH mostró una deleción de aproximadamente 1Mb en Xp11.3, afectando los genes *NDP*, *MAOA*, *MAOB* y *EFHC2*. Las mutaciones en el gen *EFHC2*, que habitualmente no está implicado en el Enfermedad de Norrie, se han relacionado recientemente con la epilepsia mioclónica (Gu *et al.*, 2005), por lo que pudimos concluir que este gen era el responsable directo de la epilepsia que mostraba el paciente. La caracterización precisa de este tipo de deleciones es de importancia clínica no sólo para el consejo genético, especialmente en mujeres portadoras, sino también para el establecimiento temprano de un tratamiento.

Uno de los principales atractivos que presentan los aCGH es que permite tanto el análisis de CNVs a nivel de todo el genoma como el estudio de regiones concretas, como es el caso de los *tiling path arrays* del cromosoma X aplicados a la detección reordenamientos en pacientes con XLMR. Hasta el momento sólo existen 3 trabajos, incluido el nuestro, en los que se haya desarrollado un aCGH específico del cromosoma X (Lugtenberg *et al.*, 2006; Froyen *et al.*, 2007; Madrigal *et al.*; 2007). Los tres *arrays* tienen una cobertura total del cromosoma X y permiten la detección de desequilibrios en este cromosoma con una resolución de aproximadamente 100 kb. En los tres estudios se seleccionaron varones afectados de RM inespecífico ligado a cromosoma X (más de un varón afecto en varias generaciones o más de 3 hermanos afectados). Lugtenberg y col. (2006) analizaron 40 individuos y encontraron una frecuencia de reordenamientos responsables de RM del 7,5% (3/40), con tamaños que variaban entre 200 kb y 7 Mb. Por otro lado, recientemente Froyen y col. (2007) realizaron un screening en 108 pacientes reportando una frecuencia de reordenamientos del 4,6% (5/108), con tamaños que variaban entre 100 kb y 2,7 Mb. Por último, en este trabajo se reportan desequilibrios clínicamente relevantes en un 11,5% de los pacientes analizados (6/52) con tamaños que varían entre 80 kb y 1 Mb, aproximadamente.

Algunos de los cambios detectados mediante el aCGH no han sido previamente descritos, aunque la mayoría implican un gen conocido candidato de XLMR.

Una limitación que presentan los aCGH es que, al igual que el MLPA, no detectan alteraciones equilibradas (traslocaciones recíprocas e inversiones). Estas alteraciones, sin embargo, en la mayoría de casos no se asocian a RM, por lo que no constituiría un problema, a no ser que la misma alteración dé lugar a la desregulación o disrupción de algún gen implicado en el RM.

Otro aspecto relevante en relación a la tecnología de los *arrays* es la interpretación de los resultados. La variabilidad está presente en el genoma de diversas formas, incluyendo *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), repeticiones en tándem de número variable (microsatélites, minisatélites), alteraciones estructurales etc. Recientemente varios grupos han demostrado que la presencia generalizada de variaciones en número de copia en individuos normales es más frecuente de lo esperado. En 2004, Iafrate y colaboradores identificaron mediante un aCGH de BACs, más de 200 *loci* que contenían desequilibrios genómicos en 39 individuos normales, no relacionados, procedentes de 4 poblaciones de HapMap (International HapMap Consortium, 2005). El mismo año Sebat y colaboradores identificaron, mediante un aCGH de oligonucléidos, 76 CNVs diferentes en 20 individuos procedentes de 9 poblaciones. Otros estudios han seguido estos dos trabajos iniciales (Tuzun *et al.*, 2005; Redon *et al.*, 2006) y, actualmente en la base de datos de variaciones genómicas (<http://projects.tcag.ca/variation/>) hay descritas cerca de 21267 CNVs a lo largo de todo el genoma. En un estudio reciente, Wong y col. (2007) analizaron 95 individuos en los que la variación mayor detectada entre dos individuos era de hasta 9 Mb. Es preciso, por lo tanto, tener en cuenta toda esta información para interpretar los resultados obtenidos con los *arrays*, para poder discriminar qué reordenamientos pueden estar implicados en la patología del RM y qué reordenamientos son simplemente cambios benignos sin implicación clínica alguna. En nuestra serie de pacientes, aproximadamente el 76% de las CNVs detectadas corresponden a CNV benignas, comprendidas en 7 regiones distintas y previamente descritas como variables en población general (Locke *et al.*, 2006, Redon *et al.*, 2006, Sharp *et al.*,

2006). El 55% de los genes implicados en estas CNVs son antígenos tumorales de las familias *SAGE* y *MAGE*, mientras que un 15% corresponden a genes relacionados con los sentidos, siendo las opsinas la familia más representada. Este porcentaje es similar al previamente descrito por otros grupos (Nguyen *et al.*, 2006; Redon *et al.*, 2006).

Por tanto, es evidente que una parte importante de nuestro genoma es variable en número de copia y que estas variaciones polimórficas confieren leves o ninguna consecuencia fenotípica. En algunos casos se especula que estas CNVs, sin aparentes consecuencias fenotípicas, podrían estar implicadas en susceptibilidad a enfermedades de aparición tardía o enfermedades complejas. De hecho, muchos genes asociados a enfermedad y susceptibilidad muestran también variaciones en número de copia en la población control. Entre ellos hay genes asociados a *diabetes mellitus*, genes relacionados con cáncer (oncogenes, supresores de tumores) y genes asociados a susceptibilidad a enfermedades coronarias o a la enfermedad de Alzheimer (Wong *et al.*, 2007). Su contribución a enfermedades humanas puede ser sólo identificada mediante estudios de caso-control, con el fin de determinar si variantes específicas de estas CNVs (número de copias y/o tamaño) están asociadas con fenotipos concretos.

Aunque por el momento los aCGH no están al alcance de todos los laboratorios de diagnóstico molecular debido en parte a su alto coste y a la dificultad que conlleva su interpretación, existen ya muchos laboratorios que incluyen el “cariotipo molecular” en los protocolos de estudio de pacientes con RM y malformaciones, pudiendo llegar a sustituir parcialmente al cariotipo convencional en este grupo de pacientes. De hecho, se espera que el porcentaje de reordenamientos crípticos intersticiales en pacientes con RM sea comparable o superior al de reordenamientos subteloméricos, que se sitúa entre el 5-7% (Rodríguez-Revengea *et al.*, 2004; Vermeesch *et al.*, 2007). El uso de aCGH de resolución cada vez mayor, está aumentando las tasas de detección de desequilibrios cromosómicos en pacientes con RM y/o anomalías congénitas (Friedman *et al.*, 2006; Rosenberg *et al.*, 2006). Además del diagnóstico de pacientes sin anomalías cromosómicas visibles, el “cariotipo molecular” puede ser de gran utilidad para desenmascarar desequilibrios submicroscópicos

en pacientes con desequilibrios cromosómicos visibles. En particular, traslocaciones aparentemente equilibradas en pacientes que presentan un fenotipo anómalo pueden enmascarar deleciones tanto en los puntos de rotura como en otros puntos del genoma.

La aplicación de nuevas tecnologías al estudio del RM ha supuesto una mejora significativa del diagnóstico genético en estos pacientes. Los aCGH parecen estar ya preparados para su introducción en los *test* de rutina, sin embargo el desafío principal reside ahora en la correcta interpretación clínica de las CNVs detectadas mediante estas tecnologías y el abaratamiento de costes para que esta tecnología sea accesible a los laboratorios de diagnóstico.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El MLPA es una herramienta diagnóstica muy útil para el estudio de reordenamientos desequilibrados en pacientes con RM y la detección de portadores, por lo que se recomienda su utilización como técnica diagnóstica en el estudio del RM.
2. La incidencia de reordenamientos crípticos del cromosoma X detectados mediante MLPA en pacientes afectados de XLMR es del 6%.
3. Los aCGH representan una buena herramienta para la detección y caracterización de desequilibrios crípticos en pacientes con RM, así como para establecer una correcta correlación fenotipo/genotipo e identificar nuevos síndromes de genes contiguos.
4. La incidencia de reordenamientos crípticos del cromosoma X detectados mediante aCGH en pacientes afectados de XLMR es del 11%.
5. La implicación de duplicaciones en la etiología del RM es mayor de la estimada. Este hecho se debe principalmente a que las técnicas utilizadas hasta el momento no permitían la detección de este tipo de alteraciones.
6. Nuestros resultados apoyan que el RM debido a mutaciones en el gen *OPHN1*, considerado hasta hace poco responsable de retraso mental inespecífico, se trata de un síndrome reconocible clínicamente.
7. La caracterización de la deleción que afectaba al locus del gen *NDP* en uno de los pacientes ha permitido concluir que el gen *EFHC2* es responsable de una forma de epilepsia mioclónica juvenil.

8. Una parte importante de nuestro genoma es variable en número de copia. Estas variaciones deben ser caracterizadas genéticamente (genes que contienen, tamaño, número de copias, región afectada) antes de poder asignarles o no una responsabilidad clínica.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Allen KM, Gleeson JG, Bagrodia S, Partington MW, MacMillan JC, Cerione RA, Mulley JC, Walsh CA. PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat. Genet.* 1998; 20: 25–30.
- Bauters M, Van Esch H, Marynen P, Froyen G. X chromosome array-CGH for the identification of novel X-linked mental retardation genes. *Eur J Med Genet* 2005; 48: 263–75.
- Bayes M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Perez Jurado LA. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet.* 2003; 73(1): 131-51
- Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, Zemni R, Crollius HR, Carrie A, Fauchereau F, Cherry M, Briault S, Hamel B, Fryns JP, Beldjord C, Kahn A, Moraine C and Chelly J. Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* 1998; 392: 923–6.
- Buckland PR. Polymorphically duplicated genes: their relevance to phenotypic variation in humans. *Ann Med.* 2003; 35: 308-15.
- Castellvi-Bel S, Mila M. Genes responsible for nonspecific mental retardation. *Mol Genet Metab* 2001; 72: 104-8.
- Chelly J, Mandel JL. Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 669-80.
- Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, Chérif B, Bienvenu T. Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 701-13.
- Chen, R.H., Chung, J. and Blenis, J. Regulation of pp90rsk phosphorylation and S6 phosphotransferase activity in Swiss 3T3 cells by growth factors, phorbol ester, and cyclic AMP-mediated signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 1991; 11: 1861–7.
- D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro C, Grasso M, Gulisano M, Tamanini F, Bienvenu T, Gedeon AK, Oostra B, Wu SK, Tandon A, Valtorta F, Balch WE, Chelly J, Toniolo D. Mutation in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet.* 1998; 19: 134-9.
- Dent EW, Gertler FB. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron.* 2003; 40(2): 209-27.
- Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab.* 1999; 67(3): 183-93.
- De Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 2001; 38: 145-150.

- De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaai-Arts C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 2003; 40: 385-98.
- des Portes V, Boddaert N, Sacco S, Briault S et al. Specific clinical and brain MRI features in mentally retarded patients with mutations in the Oligophrenin-1 gene. *Am J Med Genet* 2004; 124A: 364-71.
- Eichler, EE. Masquerading repeats: Paralogous pitfalls of the human genome. *Genome Res.* 1998; 8: 758-62.
- Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith WE, Simon-Fayard E, Alexander AA, Kulharya AS, Ketterling RP, Clark RD, Jalal SM. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet.* 2003; 73(5): 1027-40.
- Evans DG, Ramsden RT, Shenton A, Gokhale C, Bowers NL, Huson SM, Pichert G, Wallace A. Mosaicism in neurofibromatosis type 2: an update of risk based on uni/bilaterality of vestibular schwannoma at presentation and sensitive mutation analysis including multiple ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet.* 2007; 44(7): 424-8.
- Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT. Hemizygosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet* 1993; 5: 11-6.
- Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet.* 2006; 15: R57-66.
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP, Carter NP. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003; 36(4): 361-74.
- Fiegler H, Redon R, Andrews D, Scott C, Andrews R, Carder C, Clark R, Dovey O, Ellis P, Feuk L, French L, Hunt P, Kalaitzopoulos D, Larkin J, Montgomery L, Perry GH, Plumb BW, Porter K, Rigby RE, Rigler D, Valsesia A, Langford C, Humphray SJ, Scherer SW, Lee C, Hurles ME, Carter NP. Accurate and reliable high-throughput detection of copy number variation in the human genome. *Genome Res* 2006; 16: 1566-74.
- Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, Mc Dermid HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 1995; 9: 132-40.

- Freeman J.L., Perry G.H., Feuk L., Redon R., McCarroll S.A., Altshuler D.M., Aburatani H., Jones K.W., Tyler-Smith C., Hurles M.E., Carter N.P., Scherer S.W. and Lee C. Copy number variation: new insights in genome diversity, *Genome Res.* 2006; 16: 949–61.
- Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Asano J, Bailey DK, Barber S, Birch P, Brown-John M, Cao M, Chan S, Charest DL, Farnoud N, Fernandes N, Flibotte S, Go A, Gibson WT, Holt RA, Jones SJ, Kennedy GC, Krzywinski M, Langlois S, Li HI, McGillivray BC, Nayar T, Pugh TJ, Rajcan-Separovic E, Schein JE, Schnerch A, Siddiqui A, Van Allen MI, Wilson G, Yong SL, Zahir F, Eydoux P, Marra M. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2006; 79: 500-13.
- Frints SG, Froyen G, Marynen P, Fryns JP. X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clin Genet* 2002; 62: 423-32.
- Froyen G, Van Esch H, Bauters M, Hollanders K, Frints SG, Vermeesch JR, Devriendt K, Fryns JP, Marynen P. Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes. *Hum Mutat.* 2007; 28(10): 1034-42.
- Garrington, T.P. y Johnson, G.L. Organization and regulation of mitogenactivated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999; 11: 211-8.
- Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, Vestergaard G, Schwartz M and Lundsteen C. Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Eur J Hum Genet* 2005; 13: 171-5.
- Greenough WT, Klintsova AY, Irwin SA, Galvez R, Bates KE, Weiler IJ. Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(13): 7101-6.
- Harum KH, Alemi L, Johnston MV: Cognitive impairment in Coffin –Lowry syndrome correlates with reduced RSK2 activation. *Neurology* 2001; 56: 207–14.
- Higgins J.J and Topaloglu H. X-linked oligophrenic vermian dysgenesis. Syndromic vs non-syndromic X-linked mental retardation? *Neurology* 2005; 65: 1346-7.
- Huang, J., Wei, W., Zhang, J., Liu, G., Bignell, G.R., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Wooster, R., Jones, K.W. and Shapero, M.H. Whole genome DNA copy number changes identified by high density oligonucleotide arrays. *Hum. Genomics* 2004; 1: 287–99.
- Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* 2004; 36: 949-51

- Inlow JK, Restifo LL. Molecular and comparative genetics of mental retardation. *Genetics* 2004; 166: 835-81.
- Inoue K, Lupski JR. Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3: 199-242
- International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005; 437(7063): 1299-320.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992; 258(5083): 818-21
- Klein, O.D., Cotter, P.D., Albertson, D.G., Pinkel, D., Tidyman, W.E., Moore, M.W. and Rauen, K.A. Prader-Willi syndrome resulting from an unbalanced translocation: characterization by array comparative genomic hybridization. *Clin. Genet*. 2004; 65: 477-82.
- Knight S, Flint J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 2000; 37: 401-9.
- Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merckx GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BB, Sistermans EA. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet*. 2004; 41(12): 892-9.
- Kozłowski P, Roberts P, Dabora S, Franz D, Bissler J, Northrup H, Au KS, Lazarus R, Domanska-Pakiela D, Kotulska K, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ. Identification of 54 large deletions/duplications in TSC1 and TSC2 using MLPA, and genotype-phenotype correlations. *Hum Genet*. 2007 May; 121(3-4): 389-400
- Kutsche K, Yntema H, Brandt A, Jantke I, Nothwang HG, Orth U, Boavida MG, David D, Chelly J, Fryns JP, Moraine C, Ropers HH, Hamel BC, van Bokhoven H, Gal A. Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet*. 2000; 26: 247-50.
- Lander ES, Linton LM, Birren B et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409(6822): 860-921
- Locke, D.P., Segraves, R., Nicholls, R.D., Schwartz, S., Pinkel, D., Albertson, D.G. and Eichler, E.E. BAC microarray analysis of 15q11-q13 rearrangements and the impact of segmental duplications. *J. Med. Genet*. 2004; 41: 175-82.
- Locke DP, Sharp AJ, McCarroll SA, McGrath SD, Newman TL, Cheng Z, Schwartz S, Albertson DG, Pinkel D, Altshuler DM, Eichler EE Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. *Am J Hum Genet*. 2006; 79(2): 275-90.

- Lucito R, Healy J, Alexander J, Reiner A, Esposito D, Chi M, Rodgers L, Brady A, Sebat J, Troge J, West JA, Rostan S, Nguyen KC, Powers S, Ye KQ, Olshen A, Venkatraman E, Norton L, Wigler M. Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res.* 2004, 13: 2291–305.
- Luckasson, R., Coulter, D.A., Polloway, E.A., Reiss, S., Schalock, R.L., Snell, M.E., Spitalnik, D.M., & Stark, J.A., (1992). *Mental retardation: Definition, classification, and system of supports* (9th ed.). Washington, DC: American Association on Mental Retardation.
- Lugtenberg D, de Brouwer AP, Kleefstra T, Oudakker AR, Frints SG, Schrandt-Stumpel CT, Fryns JP, Jensen LR, Chelly J, Moraine C, Turner G, Veltman JA, Hamel BC, de Vries BB, van Bokhoven H, Yntema HG. Chromosomal copy number changes in patients with non-syndromic X linked mental retardation detected by array CGH. *J Med Genet* 2006; 43: 362–70.
- Madrigal I, Rodríguez-Revenga L, Armengol L, Gonzalez E, Rodríguez B, Badenas C, Sanchez A, Martinez F, Guitart M, Fernandez I, Arranz JA, Tejada MI, Perez-Jurado LA, Estivill X, Mila M. X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation. *BMC Genomics.* 2007a; 8(1): 443.
- Madrigal I, Rodríguez-Revenga L, Badenas C, Sánchez A, Martínez F, Fernández I, Fernández-Buriel M, Milà M. MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation. *Genet Med.* 2007b; 9(2): 117-22.
- Madrigal I, Rodríguez-Revenga L, Badenas C, Sanchez A, Mila M Deletion of the OPHN1 gene detected by aCGH. *J Intel Dis Res* (Published article online: 29-Oct-2007 doi: 10.1111/j.1365-2788.2007.00997.x)
- McLaren J, Bryson SE. Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology. *Am J Ment Retard* 1987; 92: 243-54.
- Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, de Ravel T, Van Vooren S, Balikova I, Backx L, Janssens S, De Paepe A, De Moor B, Moreau Y, Marynen P, Fryns JP, Mortier G, Devriendt K, Speleman F, Vermeesch JR. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet.* 2006, 43: 625-33.
- Mila-Racasens M, Rodríguez-Revenga Bodi L, Madrigal-Bajo I. Diagnosis of genetic mental retardation. Protocol of study. *Rev Neurol.* 2006; 42 Suppl 1: S103-7

- Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci.* 2006; 100,: 433-42.
- Monfort S, Orellana C, Oltra S, Rosello M, Guitart M, Martinez F. Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *J Lab Clin Med.* 2006; 147(6): 295-300.
- Moore T, Haig D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet.* 1991; 7: 45-9.
- Morison IM, Ramsay JP, Spencer HG: A census of mammalian imprinting. *Trends Genet.* 2005; 21(8): 457-65.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(18): 6622-6.
- Nakajima, T., Fukamizu, A., Takahashi, J., Gage, F.H., Fisher, T., Blenis, J. and Montminy, M.R. The signal-dependent coactivator CBP is a nuclear target for pp90RSK. *Cell.* 1996; 86; 465–74.
- Nakayama AY, Luo L. Intracellular signaling pathways that regulate dendritic spine morphogenesis. *Hippocampus.* 2000;10(5): 582-6.
- Newey S, Velamoor V, Govak EE, Van Aels L. Rho GTPases, dendritic structure and mental retardation. *J Neurobiol* 2005; 64: 58-74.
- Nguyen, D.Q., Webber, C. and Ponting, C.P. Bias of selection on human copy-number variants. *PLoS Genet.* 2006; 2: e20.
- Penrose L. A clinical and genetic study of 1280 cases of mental defect, vol.229. London: HMSO, 1938.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83 (9): 2934-8.
- Potocki L, Chen KS, Park SS, Osterholm DE, Withers MA, Kimonis V, Summers AM, Meschino WS, Anyane-Yeboah K, Kashork CD, Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanism for duplication 17p11.2— the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. *Nat Genet.* 2000; 24(1): 84-7.
- Rao A, Craig AM. Signaling between the actin cytoskeleton and the postsynaptic density of dendritic spines. *Hippocampus.* 2000; 10(5): 527-41.
- Ramakers, G.J. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 191–9.
- 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, Gonzalez JR, Gratacos 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* 2006; 444: 444-54.
- Robinson WP, Dutly F, Nicholls RD, Bernasconi F, Penaherrera M, Michaelis RC, Abeliovich D, Schinzel AA. The mechanisms involved in formation of deletions and duplications of 15q11- q13. *J Med Genet.* 1998; 35: 130–6.
- Rodriguez-Revenga L, Badenas C, Sanchez A, Mallolas J, Carrio A, Pedrinaci S, Barrionuevo JL, Mila M.. Cryptic chromosomal rearrangement screening in 30 patients with mental retardation and dysmorphic features. *Clin Genet.* 2004; 65: 17-23.
- Rodriguez-Revenga L, Madrigal I, Alkhalidi LS, Armengol L, Gonzalez E, Badenas C, Estivill X, Mila M. Contiguous deletion of the NDP, MAOA, MAOB, and EFHC2 genes in a patient with Norrie disease, severe psychomotor retardation and myoclonic epilepsy. *Am J Med Genet A.* 2007; 143(9):916-20.
- Rooms L, Reyniers E, Kooy RF. Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat.* 2005; 25(6): 513-24.
- Ropers HH, Hoeltzenbein M, Kalscheuer V, Yntema H, Hamel B, Fryns JP, Chelly J, Partington M, Gecz J, Moraine C. Nonsyndromic X linked mental retardation: where are the missing mutations? *Trends Genet.* 2003; 19: 316–20.
- Ropers HH. X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder. *Curr Opin in Genet and Devel.* 2006; 16: 260-9.
- 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 microrearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet.* 2006; 43: 180–6.
- Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature.* 2005; 434(7031): 325-37.
- Roth DB, Porter TN, Wilson JH. Mechanisms of nonhomologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 1985; 5(10): 2599-607
- Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjold M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet.* 2005; 42: 699-705.

- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: e57.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science.* 2004; 305: 525-8.
- Shaw, C.J and Lupski, J.R. Implications of human genome architecture for rearrangements-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet.* 2004; 13: R57-64.
- Shaw, C.J., Shaw, C.A., Yu, W., Stankiewicz, P., White, L.D., Beaudet, A.L. and Lupski, J.R. Comparative genomic hybridisation using a proximal 17p BAC/PAC array detects rearrangements responsible for four genomic disorders. *J. Med. Genet.* 2004; 41: 113–9.
- Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L, Bobrow M, Carter NP. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet.* 2004; 41: 241-8.
- Sharp, A.J., Cheng, Z. and Eichler, E.E. Structural variation of the human genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2006; 7: 407–42.
- Sheng M, Kim MJ. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science.* 2002; 298(5594): 776-80.
- Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, Majnemer A, Noetzel M, Sheth RD. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy Society. *Neurology* 2003; 60: 367-80.
- Somerville MJ, Mervis CB, Young EJ, Seo EJ, del Campo M, Bamforth S, Peregrine E, Loo W, Lilley M, Perez-Jurado LA, Morris CA, Scherer SW, Osborne LR. Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus. *N Engl J Med.* 2005; 353(16): 1694-701.
- Stetten G, Escallon CS, South ST, McMichael JL, Saul DO, Blakemore KJ: Reevaluating confined placental mosaicism. *Am J Med Genet.* 2004; 131: 232–9.
- Sturgill T.W. and Wu J. Recent progress in characterization of protein kinase cascades for phosphorylation of ribosomal protein S6. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1092: 350–7.

- Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A. Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin–Lowry syndrome. *Nature* 1996; 384: 567–70.
- Turner G, Partington MW. Genes for intelligence on the X chromosome. *J Med Genet.* 1991; 28: 429.
- Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, Haugen E, Hayden H, Albertson D, Pinkel D, Olson MV, Eichler EE. Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet.* 2005; 37(7): 727-32.
- Unger S, Mainberger A, Spitz C, Bähr A, Zeschnigk C, Zabel B, Superti-Furga A, Morris-Rosendahl DJ. Filamin A mutation is one cause of FG syndrome. *Am J Med Genet A.* 2007; 143(16): 1876-9.
- Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, Lugtenberg D, Bienvenu T, Jensen LR, Gez J, Moraine C, Marynen P, Fryns JP, Froyen G. Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Hum Genet.* 2005 Sep;77(3):442-53
- Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merkx G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D and Guerts van Kessel A. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 70: 1269–76.
- Veltman JA, Yntema HG, Lugtenberg D, Arts H, Briault S, Huys EH, Osoegawa K, de Jong P, Brunner HG, Geurts van Kessel A, van Bokhoven H, Schoenmakers EF. High resolution profiling of X chromosomal aberrations by array comparative genomic Veneri M, Zalfa F, Bagni C. FMRP and its target RNAs: fishing for the specificity. *Neuroreport.* 2004; 15(16): 2447-50.
- Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, Van Ravenswaaij C, Sanlaville D, Patsalis PC, Firth H, Devriendt K, Zuffardi O. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15(11): 1105-14.
- Wang NJ, Liu D, Parokony AS, Schanen NC. High-resolution molecular characterization of 15q11-q13 rearrangements by array comparative genomic hybridization (array CGH) with detection of gene dosage. *Am J Hum Genet.* 2004; 75: 267-81.
- Weiler IJ, Irwin SA, Klintsova AY, Spencer CM, Brazelton AD, Miyashiro K, Comery TA, Patel B, Eberwine J, Greenough WT. Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(10): 5395-400.

- Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, MacAulay C, Ng RT, Brown CJ, Eichler EE, Lam WL. A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet.* 2007; 80(1): 91-104.
- Xing, J., Ginty, D.D. and Greenberg, M.E. Coupling of the RAS–MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science.* 1996; 273: 959–63.

