

Applicazione della tecnica MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) per lo screening dei riarrangiamenti subtelomerici in pazienti pediatrici con ritardo mentale

E. Danese^a, F. Bernardi^a, E. Meneghelli^a, F. Darra^b, L. Zoccante^b, M. Montagnana^a, G. Lippi^a, GC. Guidi^a

^aSezione di Chimica Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona

^bSezione di Neuropsichiatria Infantile, Dipartimento Materno Infantile e di Biologia-Genetica, Università degli Studi di Verona

Riassunto

Premesse. I riarrangiamenti subtelomerici rappresentano un'importante causa di ritardo mentale. Le tecniche di citogenetica convenzionale non permettono di rilevare queste aberrazioni a causa della limitata risoluzione dei microscopi ottici. Attualmente, la Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) è la tecnica più utilizzata dai centri diagnostici per lo studio dei riarrangiamenti subtelomerici. Tuttavia, questa tecnica è molto costosa e presenta tempi di analisi molto lunghi perché richiede l'ibridazione di sonde specifiche sui cromosomi in metafase. Di conseguenza non è indicata per screening estesi. L'MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) è una nuova tecnica affidabile, sensibile ed economica adatta allo screening dei riarrangiamenti subtelomerici. Lo scopo di questo studio è quello di mettere a punto un nuovo metodo per lo studio dei riarrangiamenti subtelomerici che consiste in uno screening iniziale mediante tecnica MLPA e successiva conferma dell'eventuale anomalia riscontrata, mediante tecnica FISH.

Summary

Application of MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) for the screening of subtelomeric rearrangements in children with mental retardation

Background. Subtelomeric rearrangements have been reported to be an important cause of mental retardation. These aberrations may remain undetected by rou-

Metodi. Sono stati studiati 70 pazienti con ritardo mentale idiopatico di diversa gravità associato o meno ad anomalie congenite, ritardi di crescita e dismorfismi. L'MLPA è stata eseguita utilizzando il kit SALSA PO36E (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) specifico per i riarrangiamenti subtelomerici. Le anomalie riscontrate sono state verificate tramite tecnica FISH.

Risultati. Dei 70 pazienti studiati 5 sono risultati portatori di riarrangiamenti sbilanciati. Tre pazienti mostravano delezioni delle regioni 6qter, 6pter e 22qter; uno mostrava una duplice parziale aneuploidia: delezione in 21qter e duplicazione in 7qter; infine uno mostrava una duplicazione in 13qter.

Conclusioni. I nostri dati preliminari mostrano un'alta concordanza tra i risultati ottenuti mediante tecnica MLPA e quelli ottenuti dall'analisi FISH, suggerendo come l'MLPA possa essere considerata una tecnica rapida, accurata, affidabile ed economica per lo studio dei riarrangiamenti subtelomerici in routine.

tine conventional cytogenetic analysis because of limited resolution in light microscopy. Increased detection of cryptic subtelomeric abnormalities may be achieved by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) which is the most widely used technique in cytogenetic laboratories. However, this assay is expensive and time consuming, because metaphase spreads are needed. Accordingly, FISH is not indicated for broad screening

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) is a new reliable, sensitive and inexpensive technique, which can be used as a high throughput prospective screening tool for subtelomeric rearrangements. The aim of this study was to introduce a novel strategy for the screening of subtelomeric rearrangements in routine diagnosis which consists in a first screening with MLPA then followed by FISH analysis.

Methods. We tested 70 children with idiopathic mental retardation both severe and mild, often associated with congenital malformations, growth retardation and/or dysmorphic features. MLPA was performed using SALSA P036E human telomere kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). If an aberrant MLPA result was observed, FISH with a probe specific for

the region of interest was performed to validate the result.

Results. Among 70 patients tested, 5 were carriers of unbalanced rearrangements. 3 patients had deletion of 6pter, 2qter and 6qter respectively, one showed a double aneusomy: a distal 21q deletion and 7q duplication and the other one showed a duplication of 13qter.

Conclusions. Our preliminary data show a high degree of agreement between MLPA and FISH suggesting that MLPA might be a rapid, accurate, reliable and cost-effective technique for the screening of subtelomeric rearrangements in routine diagnostics.

Key-words: subtelomeric rearrangements, mental retardation, MLPA.

Introduzione

Il ritardo mentale (RM) è una patologia comune che interessa circa il 3% della popolazione¹. Le cause di RM sono estremamente eterogenee includendo sia fattori ambientali che genetici e vengono identificate solo nel 50% dei casi^{2,3}.

Tra le cause di origine genetica, le anomalie cromosomiche rappresentano un importante gruppo di disordini dal momento che vengono riscontrate in circa il 40% dei RM severi e nel 10-20% dei RM lievi⁴. Tra queste, i riarrangiamenti che coinvolgono le regioni subtelomeriche risultano abbastanza frequenti (7.4% nei RM severi e 0.5% nei RM lievi)^{5,6}. L'omologia di sequenza esistente tra regioni subtelomeriche di cromosomi non omologhi, infatti, può causare riarrangiamenti tra regioni subtelomeriche di cromosomi diversi durante la meiosi e generare parziali aneuploidie dei geni coinvolti⁷⁻⁹. Essendo i subtelomeri estremamente ricchi di geni, sbilanciamenti in queste sequenze sono spesso causa di conseguenze fenotipiche¹⁰. Alcune delezioni e/o traslocazioni che coinvolgono i subtelomeri sono associate a fenotipi caratteristici e inquadrati in sindromi ormai ben conosciute come la Wolf-Hirschhorn (4p-), la sindrome di "cri du chat" (5p-) e la Miller-Dieker (17p-); si tratta di aberrazioni visibili microscopicamente e facilmente diagnosticabili mediante tecniche di citogenetica convenzionale¹¹. Tuttavia, sbilanciamenti subtelomerici che coinvolgono regioni al di sotto delle 5 Mb non sono rilevabili al microscopio ottico neppure con bandeggi ad alta risoluzione (400-550 bp) e per questo definiti "riarrangiamenti criptici"¹². Inoltre, per la maggior parte delle alterazioni subtelomeriche non è stato ancora definito un fenotipo caratteristico e quindi tali alterazioni non sono clinicamente diagnosticabili.

Attualmente, la FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) è la tecnica più usata dai centri diagnostici per lo studio dei riarrangiamenti subtelomerici. Rispetto ad altri metodi offre il grande vantaggio di discriminare, oltre a delezioni e duplicazioni, anche traslocazioni su-

btelomeriche che, in alcuni pazienti, possono causare RM e dismorfismi anche se presenti in forma apparentemente bilanciata¹³. Gli svantaggi della FISH sono dovuti alla bassa sensibilità nel discriminare le microduplicazioni. È una tecnica che ha costi elevati e lunghi tempi di analisi dal momento che richiede l'ibridazione di specifiche sonde su cromosomi in metafase¹⁴.

Negli ultimi anni, nuove tecniche, tra le quali l'Array CGH (Array Comparative Genomic Hybridization), sono state proposte come metodi di screening per i riarrangiamenti subtelomerici. Il maggior vantaggio di questa tecnica è dato dalla possibilità di effettuare, in un unico test, il dosaggio di centinaia di geni con un'altissima sensibilità sia per le delezioni che per le duplicazioni. Tuttavia, come la FISH, anche l'Array CGH ha costi molto elevati perché necessita di strumenti sofisticati¹⁵. Da recenti studi è emerso come la tecnica l'MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) sia la candidata più promettente per questo tipo di analisi, grazie soprattutto alla sua robustezza, affidabilità, semplicità e ridotto costo¹⁶⁻¹⁸.

L'MLPA è una tecnica che permette di amplificare simultaneamente fino a 46 sequenze specifiche del DNA identificando delezioni e duplicazioni dei geni situati nelle regioni subtelomeriche. Introdotta nel 2002 da MRC-Holland, consiste nell'ibridazione di due sonde oligonucleotidiche adiacenti alla regione da indagare, nella loro successiva ligazione, amplificazione mediante Polimerase Chain Reaction (PCR) e separazione mediante elettroforesi capillare in fluorescenza; l'area di ogni picco di amplificazione riflette il numero di copie della sequenza target¹⁹. Possiede le caratteristiche adatte ad ampi screening essendo una tecnica sensibile, accurata, economica e di semplice utilizzo²⁰.

In questo studio, abbiamo messo a punto un nuovo metodo per la ricerca dei riarrangiamenti subtelomerici che consiste in uno screening iniziale di tutti i pazienti con RM mediante tecnica MLPA e successiva conferma mediante tecnica FISH dell'eventuale anomalia riscontrata.

Materiali e Metodi

Popolazione studiata

Tra gennaio 2008 e gennaio 2009, sono stati studiati 70 pazienti con RM idiopatico di età compresa tra 1 e 18 anni selezionati dalla Sezione di Neuropsichiatria Infantile afferente al Dipartimento Materno-Infantile e di Biologia-Genetica dell'Università di Verona. Tutti i pazienti presentavano RM o disturbo dello sviluppo, associati o meno a dismorfismi, malformazioni congenite o storia familiare di RM. In tutti i pazienti è stata precedentemente esclusa la sindrome dell'X fragile, principale causa genetica di RM dopo la sindrome di Down. Inoltre, tutti i pazienti presentavano un cariotipo normale a 450 bande. Dei 70 pazienti studiati, 30 mostravano un RM lieve (QI 50-70) e 40 un RM medio-severo (QI <50).

Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification (MLPA)

Per questa analisi abbiamo utilizzato il kit SALSA P036E (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) che contiene un set di sonde che ibridano specifiche sequenze di DNA nelle regioni subtelomeriche in p e q di ciascun cromosoma. L'unica eccezione riguarda i cromosomi acrocentrici per i quali, non essendoci geni ben caratterizzati sulle braccia corte, le sonde in p ibridano sequenze immediatamente adiacenti al centromero sul braccio q. Le regioni bersaglio di ciascun sonda sono geni funzionali o sequenze che codificano proteine.

Il DNA di ciascun paziente è stato estratto a partire da 300 µL di sangue in EDTA utilizzando il kit di estrazione Purgene Gentra (Qiagen, Valencia, CA, USA).

La metodica è divisa in cinque passaggi: 1) denaturazione del DNA e ibridazione delle sonde; 2) reazione della ligasi termostabile; 3) Amplificazione mediante PCR; 4) separazione dei prodotti di amplificazione tramite elettroforesi capillare; 5) analisi dei dati.

Nel primo passaggio 5 µL di campione di DNA sospeso in acqua o TE ad una concentrazione compresa tra 10 e 20 ng/µL, vengono denaturati mediante riscaldamento a 98 °C per 5 min e incubati con 3 µL di mix di sonde a 60 °C over night. Ogni sonda consiste in due oligonucleotidi che ibridano in siti immediatamente adiacenti l'uno all'altro e che contengono sequenze riconosciute dai primers. Solo se entrambi gli oligonucleotidi di ciascuna sonda hanno ibridato correttamente le sequenze target possono essere uniti durante la reazione della ligasi che avviene portando il campione a 54 °C per 15 min. La sonda che ne risulta contiene entrambe le sequenze riconosciute dai primers e può essere amplificata mediante PCR.

La PCR viene condotta aggiungendo a 10 µL di prodotto della ligasi, 30 µL di PCR buffer e altri 10 µL di mix contenente dNTP's, Taq polimerasi e primers (una sola coppia identica per tutte le sonde di cui uno marcato con il fluorocromo Cy5.0) in quantità adeguate.

Le sonde amplificate vengono separate mediante sequenziatore automatico CEQ 8800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, U.S.A.). L'analizzatore genetico, alla fine di ogni corsa, fornisce un elettroferogramma di intensità di fluorescenza (asse Y) contro numero di pb (asse X) in cui ciascun picco rappresenta il prodotto di amplificazione di ciascuna sonda e quindi il dosaggio della sequenza target corrispondente nel campione.

Gli elettroferogrammi di ciascun campione vengono analizzati da un software (Coffalyser, Amsterdam, Paesi Bassi) che consente la quantificazione di ciascun picco.

Il Kit contiene 7 controlli di qualità interni che indicano se la concentrazione di DNA del campione è adeguata, se è avvenuta la denaturazione e se la reazione della ligasi è stata completata. Il sistema, inoltre, analizza i picchi relativi a ciascun amplificato, solo se sono tutti presenti e marcati correttamente.

Utilizzando il metodo Population Analysis ogni picco viene normalizzato all'interno della corsa, dividendo l'area per l'area totale di tutti i picchi del campione. La normalizzazione così ottenuta per il paziente viene divisa per il corrispondente valore mediano normalizzato dei controlli. Risultati compresi tra 0.7 e 1.3 sono indici di normalità, risultati inferiori a 0.7 e superiori a 1.3 sono indice rispettivamente di delezioni e di duplicazioni.

FISH

Delezioni o duplicazioni subtelomeriche riscontrate mediante tecnica MLPA sono state studiate anche con tecnica FISH utilizzando solo le sonde specifiche per le regioni di interesse, al fine di confermare i risultati.

Nel caso di aberrazioni, la FISH è stata eseguita anche sui genitori dei probandi per escludere polimorfismi e caratterizzare l'eventuale origine parentale dell'anomalia. È stato utilizzato il set di sonde ToTelVysion Probe panel (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) seguendo la procedura raccomandata dal protocollo della ditta produttrice. Le sonde, di grandezza compresa tra le 70 e le 200 Kb ibridano sequenze di DNA che distano circa 300 Kb da ciascun telomero.

Risultati

Dopo validazione della tecnica MLPA su 10 pazienti portatori di anomalie subtelomeriche precedentemente identificate mediante tecnica FISH, sono stati studiati 70 pazienti con RM da lieve a severo dei quali 5 sono risultati positivi ai riarrangiamenti (Tab. I).

Due pazienti presentavano delezioni *de novo* delle regioni 6pter e 22qter; uno mostrava una duplice aneuploidia: delezione in 21qter e duplicazione in 7qter (Fig. 1). Gli ultimi due pazienti, dei quali non è stato possibile studiare i genitori, presentavano rispettivamente una delezione in 6qter e una duplicazione in 13qter (Tab. II).

La FISH è stata eseguita sui campioni risultati positi-

Tabella I. Caratteristiche cliniche dei pazienti risultati positivi ai riarrangiamenti subtelomerici con tecnica MLPA.

Paziente	Sesso	Età	Indicazioni cliniche
1	M	18	RM lieve, lievi dismorfismi facciali, anomalie encefaliche.
2	F	2	Grave ritardo dello sviluppo, cardiopatia congenita, pielectasia renale, ipotonia, assenza di linguaggio.
3	M	1	Ritardo motorio, anomalia di Dandy-Walker, plagiocefalia, ipertelorismo, asimmetria facciale e auricolare, disturbi del sonno.
4	F	2	Lieve ritardo dello sviluppo, microcefalia, impianto anomalo delle orecchie, ipotonia.
5	M	11	RM lieve, disturbi comportamentali.

vi ai riarrangiamenti utilizzando sonde specifiche per le regioni coinvolte confermando tutte le anomalie ad eccezione della duplicazione in 13qter.

La stessa tecnica eseguita sui genitori dei pazienti ha dato risultati normali ad eccezione del padre del paziente 1 in cui è stata identificata una traslocazione bilanciata delle regioni subtelomeriche delle braccia lunghe dei cromosomi 7 e 21.

Discussione

Le regioni subtelomeriche sono estremamente ricche di geni²¹. Riarrangiamenti sbilanciati di queste sequenze possono avere conseguenze fenotipiche sia lievi che severe tra le quali, anomalie congenite, ritardo mentale, dismorfismi, ritardi di crescita o disturbi del comportamento^{4,12}. A causa della mancanza di test di screening adeguati e dell'eterogeneità delle caratteristiche fenotipiche riferibili a ciascuna anomalia subtelomeriche, molti casi non vengono diagnosticati. La FISH,

che rappresenta la tecnica di riferimento per questo tipo di analisi è molto costosa e laboriosa, pertanto viene generalmente richiesta solo per pazienti altamente selezionati in base alla severità della sintomatologia clinica permettendo di fare diagnosi in un numero ridotto di casi.

D'altra parte, l'identificazione dei riarrangiamenti subtelomerici è di fondamentale importanza sia per i pazienti che per le loro famiglie. I benefici per i probandi riguardano soprattutto la possibilità di identificare terapie ed interventi appropriati, di eliminare test e valutazioni non necessarie e di programmare una pianificazione educativa adeguata. Una diagnosi certa permette di offrire ai genitori una consulenza genetica accurata e personalizzata riguardo al rischio di ricorrenza. Al fine di migliorare l'approccio diagnostico, molti centri hanno testato metodi alternativi alla FISH con risultati più o meno incoraggianti^{18,22-25}.

In questo studio abbiamo adottato un nuovo ap-

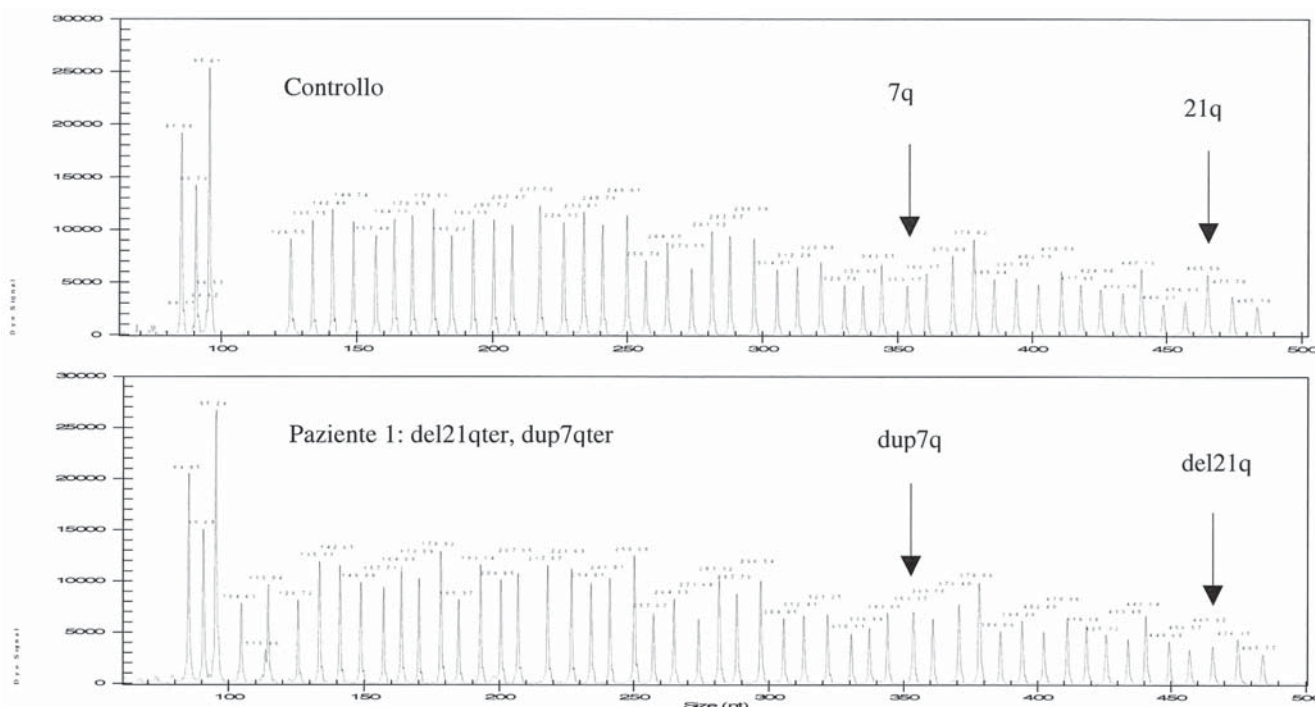


Figura 1. Caso 1: delezione della regione 21qter (sonda HMT1, 466 pb) e duplicazione della regione 7qter (sonda VIPR2, 354 pb) identificate mediante tecnica MLPA.

Tabella II. Microdelezioni e duplicazioni identificate con tecnica MLPA.

Paziente	Telomero	MLPA	Verifica FISH	Origine parentale	Cariotipo
1	7q 21q	VIPR2 dup HMT1 del	VIJ2yRM2000H+ VIJ2yRM2185-	paterna t(7;21)	46,XY ish. der(21)t(21;7)(q22;q36)
2	22q	RABL2B del	ARSA-	de novo	46,XX ish. del(22)(q13)
3	6p	IRF4 del	6pTEL48-	de novo	46,XY ish. del(6)(p25.3)
4	6q	PSMB1 del	VIJ2yRM2158-	n.d.*	46,XX ish. del(6)(q27)
5	13q	F7 dup	VIJyRM2002 (segnale normale)	n.d.	46,XX

n.d.: genitori non disponibili per lo studio. *: paziente adottata.

proccio per lo studio dei riarrangiamenti subtelomerici che consiste in un primo screening mediante tecnica MLPA e successiva conferma delle anomalie tramite FISH. A differenza di lavori precedenti, per l'inclusione in questo studio non sono stati adottati criteri clinici di selezione sulla base della severità del ritardo mentale, permettendo così uno screening allargato dei pazienti residenti a Verona^{4,26,27}. Questo approccio ci ha permesso di studiare un'ampia categoria di pazienti e di fare diagnosi in bambini che non sarebbero stati selezionati applicando ristretti criteri di inclusione. È il caso ad esempio dei pazienti 1 e 4 che mostravano rispettivamente un lieve ritardo mentale e dello sviluppo.

I vantaggi dell'MLPA rispetto ad altre tecniche, tra le quali la FISH, sono la relativa semplicità, il basso costo e i brevi tempi di esecuzione. L'MLPA inoltre permette di analizzare contemporaneamente, in un'unica reazione, un grande numero di campioni e richiede solo un termociclatore e un sequenziatore.

In questo studio abbiamo identificato due delezioni *de novo* (pz. 2 e 3), una delezione/duplicazione risultato di uno sbilanciamento di origine paterna (pz. 1), una delezione (pz. 4) e una duplicazione (pz. 5) delle quali non è stato possibile definire l'origine a causa dell'impossibilità di studiare i genitori dei pazienti.

Nei casi in cui non è possibile lo studio dei genitori, solo un'attenta ed accurata analisi clinica può stabilire se l'anomalia riscontrata sia associata o meno alle manifestazioni fenotipiche del paziente.

La duplicazione del subtelomero in 13qter riscontrata nel paziente 5 non è stata confermata dalla tecnica FISH. La causa è probabilmente imputabile al fatto che la sonda MLPA ibridando una regione situata in posizione più prossimale rispetto alla rispettiva sonda FISH, (distanza dal telomero in q di 1309 Kb vs 90 Kb) abbia dato un risultato falsamente positivo.

In letteratura non sono riportati casi in cui la duplicazione della regione in 13q fosse causa di fenotipi riconducibili alle caratteristiche cliniche di questo paziente; è pertanto possibile che si tratti di un polimorfismo anche se per tale conferma sono necessari ulteriori accertamenti^{28,29}.

In questo caso, e soprattutto nei casi in cui le sonde FISH e MLPA ibridano regioni sovrapponibili, non è

sufficiente un risultato FISH negativo per catalogare un'aberrazione riscontrata in MLPA come falsamente positiva. Infatti, la maggior grandezza delle sonde FISH rispetto alle sonde utilizzate in MLPA (alcune centinaia di Kb vs circa 40 Kb), spesso preclude l'identificazione di microdelezioni e duplicazioni. Come suggeriscono molti autori, per avere la conferma che una delezione/duplicazione sia, o meno, un polimorfismo, è raccomandabile lo studio del DNA dei genitori^{17,30,31}.

La paziente 4, con delezione in 6qter rilevata sia da tecnica MLPA che FISH, presentava lieve ritardo dello sviluppo, microcefalia, impianto basso delle orecchie ed ipotonia. Le caratteristiche cliniche relative a questa anomalia includono ritardo mentale, microcefalia, dismorfismi facciali, anomalie del corpo calloso, epilessia, ipotonia e ritardo di crescita³². In questo caso, data la concordanza delle caratteristiche cliniche della nostra paziente con i dati riportati in letteratura, è presumibile che la microdelezione sia la causa genetica del fenotipo.

L'affidabilità e la robustezza della tecnica MLPA, già ampiamente dimostrata in letteratura, è stata confermata anche nel nostro studio, con un'alta concordanza di risultati tra MLPA e FISH con un'unica eccezione per il paziente 5¹⁶. La frequenza delle aberrazioni subtelomeriche clinicamente rilevanti riscontrata in questo studio è stata del 5,7%, in accordo con i dati riportati in letteratura. Tuttavia, in contrasto con i risultati pubblicati da Knight e colleghi⁶, secondo i quali aberrazioni subtelomeriche sono riscontrabili solo nello 0,5% dei RM lievi, nella nostra coorte di 30 pazienti appartenenti a questa categoria, 2 pazienti (1 e 4) sono risultati positivi allo screening con MLPA evidenziando un'incidenza del 6,6%, superiore a quella riportata in letteratura.

In accordo con quanto ipotizzato da Koolen e colleghi¹⁷ questa discordanza di risultati potrebbe essere spiegata tenendo conto dell'aumentata sensibilità del nostro metodo, rispetto a tecniche meno recenti, nell'identificare piccole aberrazioni che causano generalmente fenotipi meno severi. I nostri dati suggeriscono, pertanto, l'importanza di sottoporre a screening per i riarrangiamenti subtelomerici, non solo i pazienti affetti da RM moderato e severo come precedentemente consigliato da molti autori, ma anche i pazienti affet-

ti da RM lieve^{26,27}.

Questo studio mostra come l'MLPA rappresenti una valido strumento per la ricerca dei riarrangiamenti subtelomerici e come, per le sue caratteristiche di semplicità e velocità di esecuzione, possa essere utilizzata per ampi screening di popolazione permettendo di conseguenza di aumentare il numero dei casi identificati.

Bibliografia

- Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8:117-34.
- Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a consensus conference. *Am J Med Genet* 1997; 72:468-77.
- Flint J, Wilkie AO. The genetics of mental retardation. *Br Med Bull* 1996; 52:453-64.
- Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 1995; 9:132-40.
- Flint J, Knight S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13:310-6.
- Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, et al. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 1999; 354:1676-81.
- Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Härle M, Cremer T. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* 1996; 134:1109-25.
- Brown WR, MacKinnon PJ, Villasanté A, Spurr N, Buckle VJ, Dobson MJ. Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell* 1990; 63:119-32.
- Riethman H. Human telomere structure and biology. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9:1-19.
- Saccone S, De Sario A, Wiegant J, Raap AK, Della Valle G, Bernardi G. Correlations between isochores and chromosomal bands in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11929-33.
- De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 2003; 40:385-98.
- Knight SJ, Flint J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *Med Genet* 2000; 37:401-9.
- Walter S, Sandig K, Hinkel GK, Mitulla B, Ounap K, Sims G, et al. Subtelomere FISH in 50 children with mental retardation and minor anomalies, identified by a checklist, detects 10 rearrangements including a de novo balanced translocation of chromosomes 17p13.3 and 20q13.33. *Am J Med Genet* 2004; 128:364-73.
- Rooms L, Reyniers E, Kooy RF. Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat* 2005; 25:513-24.
- Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17:182-92.
- Ahn JW, Ogilvie CM, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A, et al. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Med Genet* 2007; 8:9.
- Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merkx GF, Knoppers NV, Kets M, et al. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 2004; 41:892-9.
- Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B, et al. Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Hum Mutat* 2004; 23:17-21.
- 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.
- Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Amiñoso C, Arcas J, et al. MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet* 2006; 69:228-33.
- Saccone S, DeSario A, Della Valle G, Bernardi G. The highest gene concentrations in the human genome are in the telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4913-7.
- Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Kooy RF. Screening for subtelomeric rearrangements using genetic markers in 70 patients with unexplained mental retardation. *Ann Genet* 2004; 47:53-9.
- Sismani C, Armour JA, Flint J, Girgalli C, Regan R, Patsalis PC. Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:527-32.
- Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merkx G, van Cleef B, et al. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of arraybased comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1269-76.
- Boehm D, Herold S, Kuechler A, Liehr T, Laccone F. Rapid detection of subtelomeric deletion/duplication by novel real-time quantitative PCR using SYBR-green dye. *Hum Mutat* 2004; 23:368-78.
- De Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 2001; 38:145-50.
- Lam AC, Lam ST, Lai KK, Tong TM, Chau TC. High rate of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation. *Clin Biochem* 2006; 39:196-202.
- Di Bella MA, Calì F, Seidita G, Mirisola M, Ragusa A, Ragalmuto A, et al. Screening of Subtelomeric Rearrangements in Autistic Disorder: Identification of a Partial Trisomy of 13q34 in a Patient Bearing a 13q21p Translocation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006; 141B:584-90.

29. Ribacoba R, Menendez-Gonzalez M, Hernando I, Salas J, Giros ML. Partial trisomy 13q22-qter associated to leukoencephalopathy and late onset generalised epilepsy. *Int Arch Med* 2008; 29:1-5.
30. Stegmann APA, Jonker LMH, Engelen JJM. Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Am J Med Genet* 2008; 51:93-105.
31. Kirchhoff M, Gerdes T, Brunebjerg S, Bryndorf T. Investigation of patients with mental retardation and dysmorphic features using comparative genomic hybridization and subtelomeric multiplex ligation dependent probe amplification. *Am J Med Genet* 2005; 139:231-3.
32. Eash D, Waggoner D, Chung J, Stevenson D, Martin CL. Calibration of 6q subtelomere deletions to define genotype/phenotype correlations. *Clin Genet* 2005; 67: 396-403.