

Resultats

ESTUDI DEL QUIMERISME DELS YACS DEL CROMOSOMA 21

Dels YACs que CEPH/Généthon va posar a l'abast públic entre el 1992 i el 1993, se'n van triar inicialment deu per tal que el HSA21 quedés cobert en regions grans i per a començar els estudis moleculars de cerca de gens al nostre grup. Degut a la presència de quimerisme (presència de senyal en més d'un cromosoma, és a dir, contingut de seqüències diverses en un mateix YAC) en un nombre remarcable d'aquests YACs (cosa que els feien inútils per al seu ús en els estudis moleculars), va caldre triar-ne més. D'aquesta manera el HSA21 també va quedar saturat de sondes per a determinar l'abast de cadascuna de les trisomies parcials que vam caracteritzar (Fig. 8). En total vam estudiar 49 YACs dels quals en vam trobar 12 de quimèrics i 6 que no estaven al HSA21, sinó que pertanyien a altres cromosomes. Mitjançant la contratació amb DAPI, es van poder identificar els cromosomes en els quals hi havia senyal. Els 6 YACs pels quals no es va veure senyal de FISH al HSA21, podien ser quimèrics però amb una seqüència tan petita del HSA21 (probablement inferior a 2 kb) que no es va detectar (Taula 7).

Si es comparen aquests resultats amb els que estan publicats a les bases de dades (http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/yac_info i <http://chr21.rz-berlin.mpg.de/>) hi ha alguna discordança pel que fa al quimerisme. Alguns laboratoris han trobat quimerismes que nosaltres no hem detectat. Aquests resultats indiquen que un 38% dels YACs són quimèrics la qual cosa es correspon amb el valor del 40% que dona el CEPH.

Taula 7. Resultats de l'estudi del quimerisme de 49 YACs de 21q mitjançant FISH

YAC	Localització	Mida (kb)	Marcadors
YACs no-quimèrics			
52h4	21q11.1	350	D21S286
124a7	21q11.2	450	D21S120
145e3	21q11.2	800	D21S371
193g12	21q21.1		
814c1	21q22.1	1250	D21S1901
232c7	21q22.1	600	D21S213
280b1	21q22.1	375	D21S304
731h10	21q22.1	630	D21S263
103c4	21q22.1	300	D21S261
667b10	21q22.1	410	D21S262
876d4	21q22.1	700	D21S1910
666a5	21q22.1	610	D21S216
a222a12	21q22.1	265	D21S17
860g11	21q22.1-22.2	1130	D21S65
73d10	21q22.2	600	D21S65
72h9	21q22.2	400	D21S211
529c8	21q22.2	880	D21S211
230e8	21q22.2	625	D21S33
743a4	21q22.2	955	D21S167
745h11	21q22.2	1000	D21S1919
238b1	21q22.2	490	D21S55
259h11	21q22.2	700	D21S259
374b8	21q22.2	340	D21S259
221b9	21q22.2	400	D21S259
767b3	21q22.3	450	D21S259
265h12	21q22.3	630	D21S266
552a3	21q22.3	400	D21S266
235d5	21q22.3	550	D21S266
94e4	21q22.3	450	D21S171
YACs quimèrics			
330h1	21q11.1/13cen	240	D21S297
185f1	21q11.1/18cen	1400	D21S308
179b7	21q21.1/19q	240	D21S338
880g3	21q22.1/5p	2000	D21S263
850c6	21q22.1/Xq	850	D21S93
750h2	21q22.1/10q	760	D21S262
812f11	21q22.2/9q	1490	D21S65
916h12	21q22.2/5q	1500	D21S65
806a11	21q22.2/2p	1500	D21S270
826a8	21q22.21/5q	1710	D21S259
152g11	21q22.3/1p	750	D21S15
782d7	21q22.3/22q	550	D21S171
YACs d'altres cromosomes			
831b6	22q	1700	-
770b3	20q	1700	-
849b10	15q	1650	-
861c9	1p	600	-
746b10	Xq	1300	-
841c4	6q	650	-

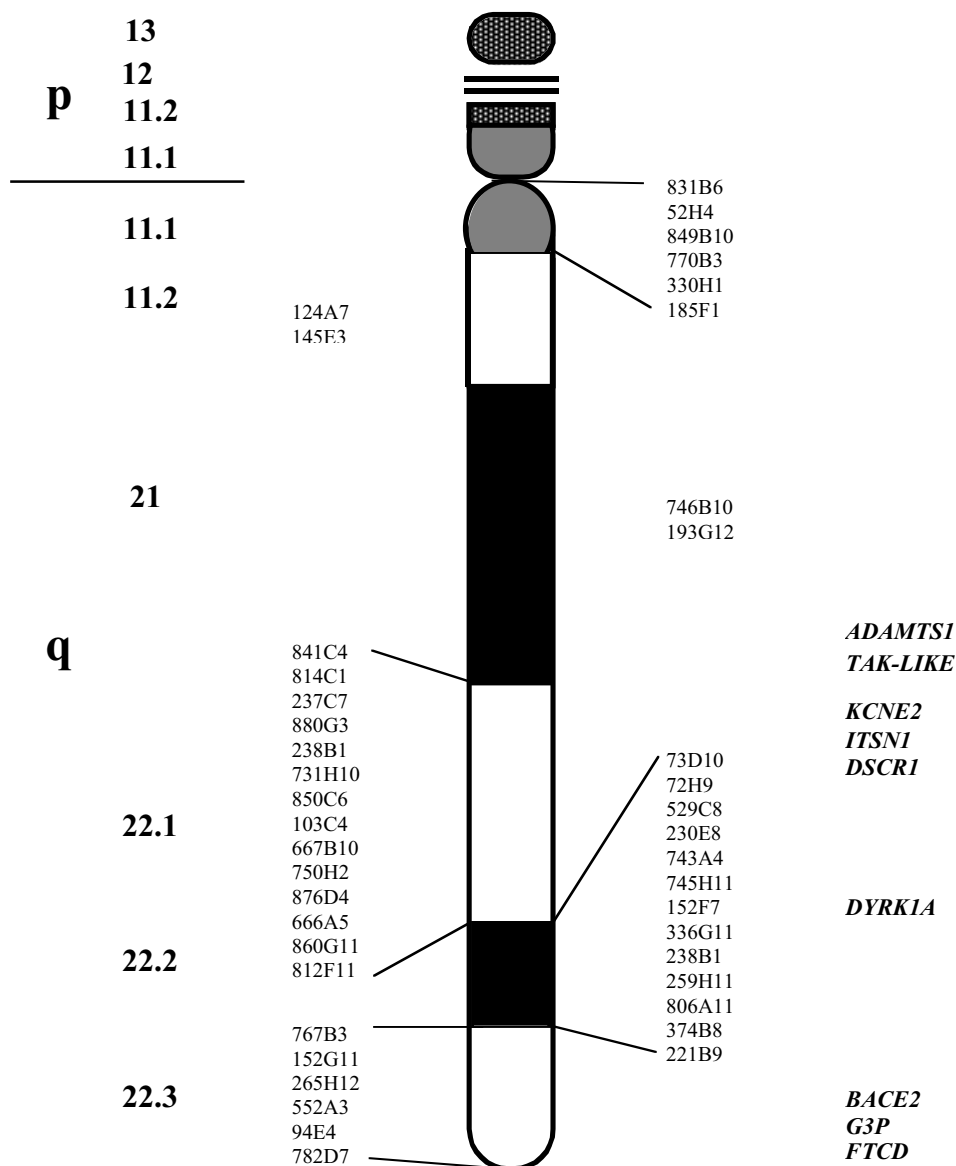


Figura 8. Ideograma del cromosoma 21 en el qual s'hi han ordenat de centròmer a telòmer i per bandes G, tots els YACs estudiats. Al costat dels YACs s'hi han localitzat aquells gens identificats al Grup de Recerca del Cromosoma 21 del CGMM de l'IRO: *DSCR1* (Fuentes i col., 1995), *DYRK1A* (Guimerà i col., 1996), *ITSN1* (Pucharcós i col., 1999), *FTCD* (Solans i col., 2.000), *BACE2* (Solans i col., 2000), *ADAMTS1*, *TAK-LIKE*, *KCNE2* i *G3P* (K. Casas, A. Domènech i A. Solans, comunicació personal).

**MAPATGE DELS GENS *DSCR1* I *MINIBRAIN (MNBH O DYRK1A)*
AL CROMOSOMA 21**

Tots dos gens van ser clonats al nostre laboratori (Fuentes i col., 1995 i Guimerà i col., 1996) mitjançant l'estratègia de la PCR "Alu-splice" el primer, i mitjançant selecció de cDNA (*cdNA selection*), el segon. Tots dos gens es van mapar per FISH al HSA21, concretament a les bandes 21q22.1-22.2 essent *DSCR1* més centromèric que *DYRK1A*. El mapatge cromosòmic ha estat l'única tasca en la qual ha contribuït la doctorant.

- . Mapatge del gen *DSCR1* al cromosoma 21
- . Mapatge del gen *DYRK1A* al cromosoma 21

Mapatge del gen *DSCR1* al cromosoma 21

DSCR1 (Down Syndrome Candidate Region 1) és un gen identificat mitjançant la tècnica de la PCR *Alu*-Splice (Fuentes i col., 1995) dins del YAC 72H9. La seqüència completa té 2.174 pb i presenta una fase oberta de lectura de 513 nucleòtids que codifiquen per una proteïna de 171 aminoàcids. *DSCR1* codifica quatre proteïnes isoformes segons l'ús alternatiu dels quatre primers exons (Fuentes i col., 1997).

Els diferents transcrits generats per *splicing* alternatiu s'expressen tots a cor i a múscul esquelètic, però en cervell fetal i adult només s'expressa el transcrit que conté l'exó 1. A placenta i ronyó només s'expressa el mRNA que conté l'exó 4. L'expressió de *DSCR1* al cor i al cervell de ratolí es dona en estadis molt inicials del desenvolupament (Katy Casas, comunicació personal), la qual cosa fa pensar que *DSCR1* pot tenir un paper important en el desenvolupament d'aquests òrgans. Mitjançant la tècnica del doble híbrid s'ha trobat que *DSCR1* interacciona amb calcineurina (CaNA) (Fuentes i col., 2000). La CaNA és l'única serina/treonina fosfatasa sota el control de Ca²⁺/calmodulina i té un paper molt important en la regulació de diversos processos fisiològics, com són la neurotransmissió i l'alliberament d'hormones, la plasticitat sinàptica i la transcripció gènica. La interacció de *DSCR1* amb CaNA inhibiria com a mínim, una via de senyalització mediada per CaNA. Aquests resultats dels estudis funcionals suggereixen que la sobreexpressió de *DSCR1* en la SD podria estar implicada en el retard mental, en els DCC (sobretot en la formació dels coixinets endocàrdics) i en la immunosupressió i major susceptibilitat a les infeccions.

Per al mapatge cromosòmic de *DSCR1* mitjançant FISH, es va fer servir el cDNA complet (1.300 pb) i es va marcar amb biotina mitjançant una reacció de "Nick translation". La hibridació es va fer sobre cromosomes d'un individu control. Mitjançant la contratinció amb DAPI i gràcies a la conversió de bandes que permet l'analitzador d'imatges Cytovision, es van analitzar 100 cromosomes de 50 metafases. L'eficiència de la sonda va ser del 84%. Els resultats van assignar *DSCR1* a la regió 21q22.1-22.2. (Fig. 9)

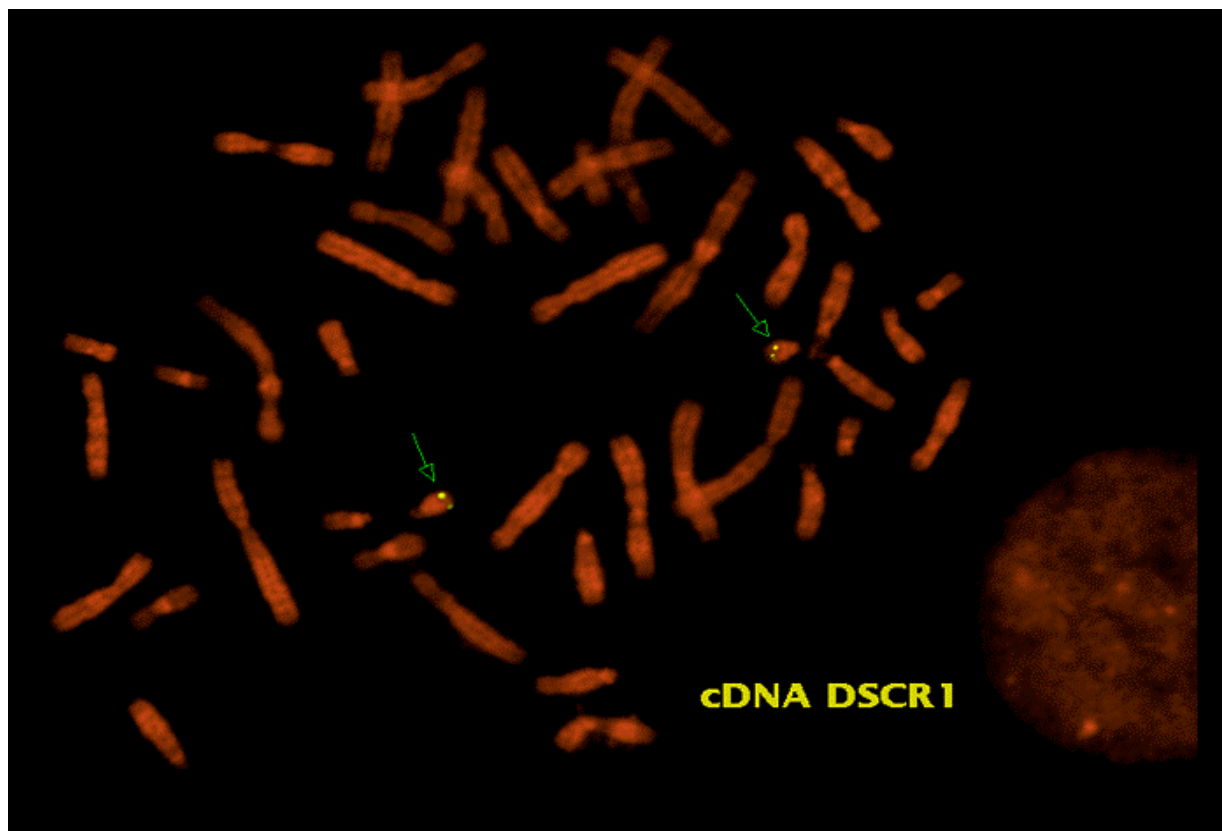


Figura 9. Localització cromosòmica del gen *DSCR1*. Metafase humana hibridada amb el cDNA de *DSCR1* on es poden veure clarament els senyals d'hibridació als dos cromosomes 21 homòlegs. Els cromosomes apareixen tenyits amb iodur de propidi.

Mapatge del gen *DYRK1A* (*MNBH*) al cromosoma 21

“Minibrain (MNBH) is a single copy gene mapping to human chromosome 21q22.2”.
Cytogenetics and Cell Genetics (1997)**77**:182-184

Guimera J, Pritchard M, Nadal M, Estivill X

ESTUDIS DE CASOS DE SD I TRISOMIA PARCIAL DEL CROMOSOMA 21

S'han identificat i estudiat a nivell clínic i molecular sis casos de trisomia parcial del HSA21 i SD de procedència diversa, nacional i internacional. Els sis casos s'han estudiat a nivell clínic seguint el protocol d'Epstein (1991). A nivell citogenètic-molecular, l'estratègia d'estudi que s'ha seguit és la mateixa en tots els casos. Primer s'ha fet una hibridació de pintat cromosòmic del HSA21 per tal de detectar una possible translocació d'aquest cromosoma amb un altre cromosoma. A continuació, el procés d'estudi ha estat l'anàlisi mitjançant FISH dels YACs del contigu del HSA21, fent hibridacions simultànies amb un YAC de la regió centromèrica i un YAC de la regió telomèrica del braç llarg, de manera que s'anés cobrint el HSA21 fins arribar al punt de trencament. Aquesta estratègia també ha permès definir la orientació (directa o invertida) dels segments del HSA21 en trisomia.

Els sis casos estudiats es presenten de manera individual i en ordre cronològic d'estudi. Tres d'aquests casos han estat publicats i es recullen en forma d'article. Els resultats dels tres casos que no han estat publicats, es descriuen després dels articles. La taula 8 recull els resultats dels estudis de fenotip dels sis pacients, ordenats segons l'abast de la seva trisomia (de més gran a més petita), per tal de facilitar les comparacions.

- . “YAC and cosmid FISH mapping of an unbalanced chromosomal translocation causing partial trisomy 21 and Down syndrome”. *Human Genetics* (1996) **98**:460-466
M. Nadal, M. Mila, M. Pritchard, A. Mur, J. Pujals, J. L. Blouin, S. E. Antonarakis, F. Ballesta, X. Estivill.
- . “Down syndrome: characterisation of a case with partial trisomy of chromosome 21 owing to a paternal balanced translocation (15;21)(q26;q22.1) by FISH”. *Journal of Medical Genetics* (1997) **34**:50-54
M. Nadal, S. Moreno, M. Pritchard, M. A. Preciado, X. Estivill, M. A. Ramos-Arroyo,
- . “Clinical and cytogenetic characterisation of a case of Down syndrome due to a duplication 21q22.1→qter”. *Journal of Medical Genetics*, (en premsa).

M. Nadal, C. Guzmán Vigo, M. I. Melaragno, J.A.D. Andrade, L.G. Alonso, D. Brunoni, M. Pritchard, X. Estivill

- . Caracterització clínica i citogenètica d'un cas de SD i trisomia parcial del HSA21 deguda a una translocació (21;21)(p;q22.1).
- . Caracterització citogenètica d'una duplicació 21q22.1 → qter en un cas de SD adult.
- . Identificació d'una duplicació intersticial del HSA21 en una pacient amb dos trets de la SD mitjançant FISH.
- . Compendi dels resultats clínics.

En tots els treballs d'aquesta secció, la doctorant ha contribuït a la caracterització dels punts de trencament, en l'escriptura del manuscrit i la configuració de les figures dels articles publicats.

. “YAC and cosmid FISH mapping of an unbalanced chromosomal translocation causing partial trisomy 21 and Down syndrome”. *Human Genetics* (1996) **98**:460-466

M. Nadal, M. Mila, M. Pritchard, A. Mur, J. Pujals, J. L. Blouin, S. E. Antonarakis, F. Ballesta, X. Estivill.

Nota: Aquest cas serà designat d'ara endavant com SD#1.

. “Down syndrome: characterisation of a case with partial trisomy of chromosome 21 owing to a paternal balanced translocation (15;21)(q26;q22.1) by FISH”. *Journal of Medical Genetics* (1997) **34**:50-54

M. Nadal, S. Moreno, M. Pritchard, M. A. Preciado, X. Estivill, M. A. Ramos-Arroyo,

Nota: Aquest cas serà designat d'ara endavant com SD#2.

Tal com s'indica en l'article, el cas SD#2 va ser identificat gràcies a que la seva germana va demanar assessorament genètic a l'Hospital Virgen del Camino de Pamplona. D'aquesta manera, un cop detectada la trisomia parcial del proband, es va estudiar tota la família per tal de determinar si la translocació entre els cromosomes 15 i 21 era d'origen familiar. Els resultats van indicar que el pare (I-1) és portador d'una translocació equilibrada $t(15;21)(q26;q22.1)$ i que l'havia transmesa de la mateixa manera a dos dels seus quatre fills (II-2 i II-3) i de manera desequilibrada al proband (II-4). El quart fill no va poder ser estudiat (Fig. 10). La germana del proband, portadora de la translocació equilibrada, va sol·licitar diagnòstic prenatal en dues ocasions i ha tingut dos fills, el primer amb la translocació equilibrada (III-1) i el segon amb un cariotip normal (III-2) (Fig. 11).

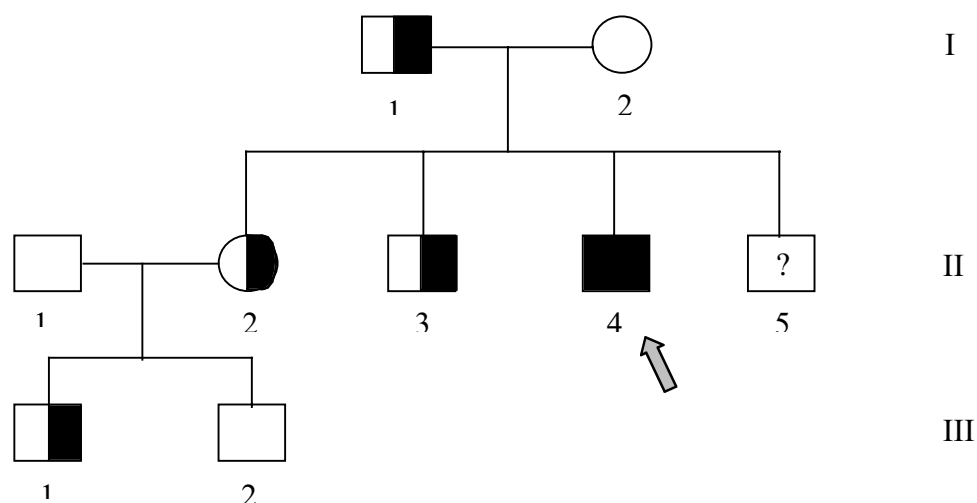


Figura 10. Arbre genealògic de la família del cas SD#2 on es pot veure com segrega la translocació en la família. El proband s'assenyala amb una fletxa. Els quadres i cercles mig pintats indiquen la presència de la translocació $t(15;21)(q26;q22.1)$ en equilibri. ?, indica que l'individu no s'ha estudiat.

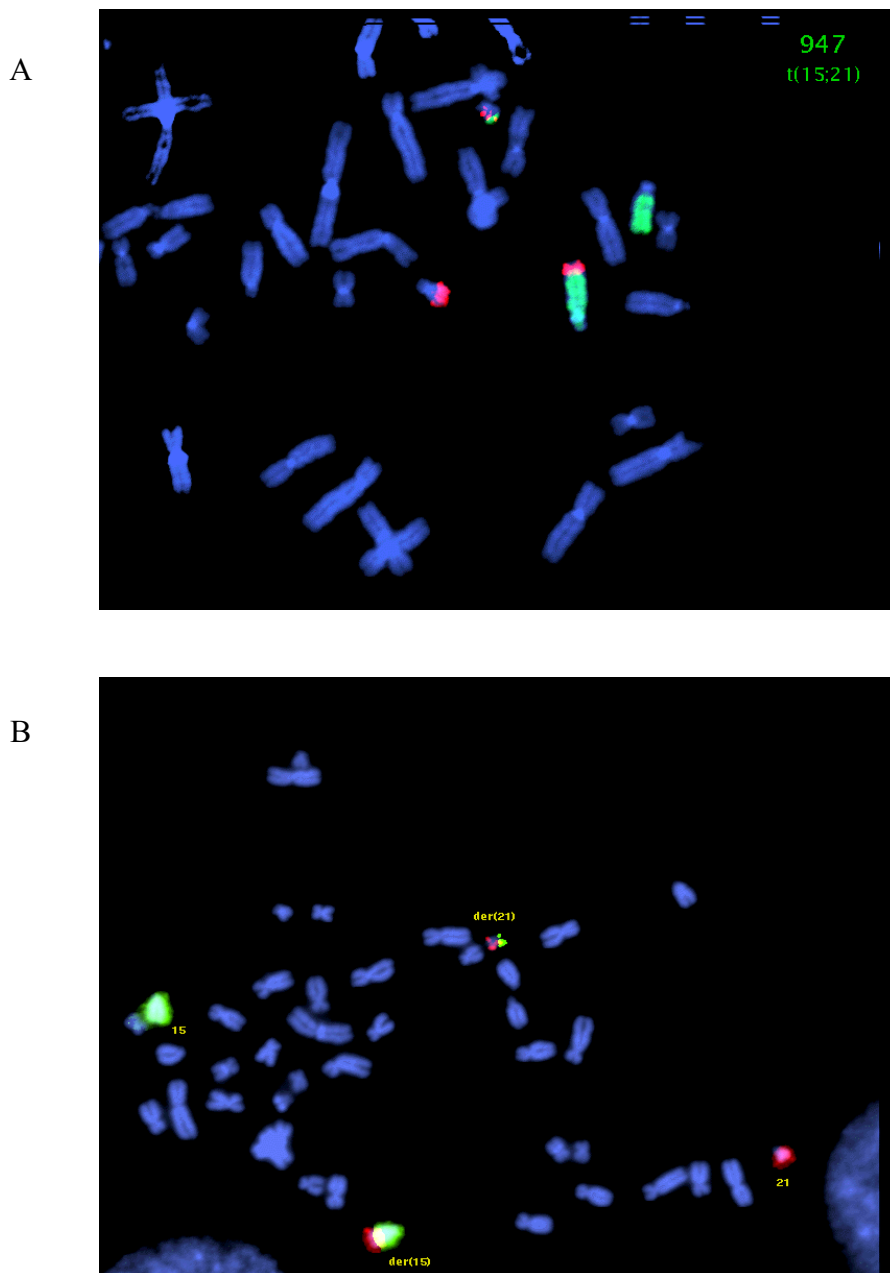


Figura 11. Resultats de l'estudi de FISH per tal de veure la segregació familiar de la translocació $t(15;21)(q26;22.1)$ en dos membres de la família del cas SD#2. A/ Pintat cromosòmic dels cromosomes 15 (verd) i 21 (vermell) en una metafase de la germana del proband on s'aprecia l'equilibri de la translocació. B/ Doble pintat cromosòmic dels cromosomes 15 (verd) i 21(vermell) en el primer estudi prenatal fet a la germana de SD#2. La fotografia mostra com la translocació està en equilibri.

. “Clinical and cytogenetic characterisation of a case of Down syndrome due to a duplication 21q22.1→qter”. *Journal of Medical Genetics*, en premsa.
M. Nadal, C. Guzmán Vigo, M. I. Melaragno, J.A.D. Andrade, L.G. Alonso, D. Brunoni, M. Pritchard, X. Estivill

Nota: Aquest cas serà designat d'ara endavant com SD#3.

. Caracterització clínica i citogenètica d'un cas de SD i trisomia parcial del HSA21 deguda a una translocació (21;21)(p;q22.1).

SD#4 és una pacient que va arribar a l'Hospital de la Vall d'Hebron (referida des de l'Hospital Arnau de Vilanova) amb 10 dies de vida i un fenotip característic de SD amb cardiopatia severa. La pacient és filla única de pares de vint-i-nou anys, tots dos. La gestació va ser normal de 39 setmanes i el part eutòcic. En néixer, el pes va ser de 2.150 g, la talla de 45 cm, el perímetre cranial de 33 cm i l'Apgar de 7-9.

L'exploració als deu dies (Fig. 12) va donar com a resultat:

Cara: rodona amb aspecte suggestiu de SD d'expressió moderada.

Boca: llavis fins, filtre marcat amb zona central més estreta. Arcada gingival inferior una mica irregular i eixamplada.

Ulls: obliquïtat palpebral superoexterna amb epicant escàs. Les parpelles inferiors mostraven gran pobresa de pestanyes i les superiors gairebé no en tenien. No es van apreciar taques de Brushfield.

Orelles: petites, hipomodelades amb plegament de l'hèlix dret i hipertròfia de l'antehèlix esquerra. Longitud de les orelles: 33 mm la dreta i 31 mm l'esquerra.

Mans: clinodactília bilateral del cinquè dit.

Peus: augment de la separació bilateral entre el primer i el segon dit.

Genitals: hipertròfia moderada dels llavis menors.

Dermatoglífics: els triradis axials dels palmells no es van apreciar per hipoplàsia de les crestes. Equivalent a solc transvers a mà dreta i línia de sidney a la mà esquerra.

Anomalies viscerals: només s'ha detectat cardiopatia complexa: CIV àmplia subaòrtica, dilatació d'artèries pulmonars, FOP tipus *ostium secundum*, conducte arteriós persistent, coartació-hipoplàsia aòrtica.

La pacient també presentava hipotonia i laxitud lligamentosa. Degut a la seva edat, no es van poder valorar ni el retard mental ni la dentició.

La pacient va morir als nou mesos d'edat en el postoperatori d'una intervenció quirúrgica cardíaca.

Estudi citogenètic de Bandes G

L'estudi citogenètic convencional de la pacient va posar de manifest la presència de material cromosòmic extra translocat a un dels cromosomes 21. El cariotip que es va donar va ser: 46,XX,-21,+der(21),t(21p;?). El cariotip dels pares va ser normal de manera que el reordenament cromosòmic de la pacient es va produir *de novo*.

Donat que el fenotip de la pacient era clarament suggestiu de SD, es va pensar que el material cromosòmic extra podia correspondre al mateix cromosoma 21. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi i per a estudiar la translocació amb més detall mitjançant FISH, es va obtenir una nova mostra de sang perifèrica de la pacient.

Estudi de FISH

Per tal d'identificar l'origen cromosòmic del material translocat al HSA21, es va fer primer un "pintat cromosòmic" d'aquest cromosoma (Fig. 13A). Els resultats d'aquest primer estudi va confirmar la hipòtesi d'una trisomia parcial del HSA21 a causa d'un translocació (21p;21q). Posteriorment, es va procedir a la caracterització del punt de trencament de la translocació i, consegüentment, a la definició de l'abast de la trisomia parcial. Això es va fer mitjançant FISH, utilitzant com a sondes el pannel de YACs contigus del braç llarg del HSA21.

Els resultats obtinguts indiquen que la trisomia parcial de la pacient implica només el HSA21 i abasta des del telòmer fins el YAC 814c1 que conté els marcadors: *D21S226* fins *D21S303* (Fig. 13B).



Figura 12. Imatge frontal de la cara de la pacient SD#4 amb SD i trisomia parcial del HSA21 als 10 dies de vida.

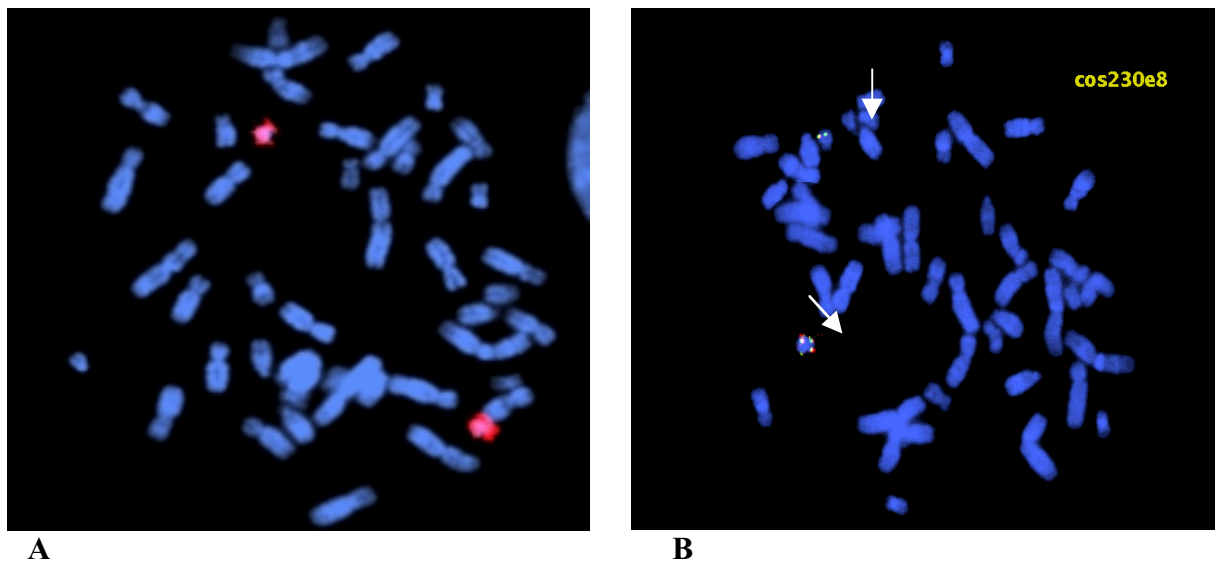


Figura 13. Imatges de FISH en metafases de la pacient SD#4 amb SD i trisomia parcial del HSA21. A/ Pintat cromosòmic amb una sonda de tot el HSA21 en una metafase de la pacient. Es pot veure que la translocació del HSA21 implica només aquest cromosoma la qual cosa indica l'absència de tota translocació críptica amb un altre cromosoma. B/ Metafase parcial de la mateixa pacient hibridada amb els cosmidis A11 i 28C6 que pertanyen al YAC 230e8, els quals es troben clarament en triple dosi.

. Caracterització citogenètica d'una duplicació 21q22.1→qter en un cas de SD adult

SD#5 va néixer a Itàlia el 1965 i va ser diagnosticada amb SD. Quan va néixer va pesar 3.000 g i va presentar un retard considerable en el desenvolupament psicomotor.

Malgrat que l'aspecte fenotípic facial d'aquesta noia és clarament de SD (Fig. 14), és remarcable l'absència d'alguns trets considerats típics d'aquesta síndrome. SD#5 presenta braquicefàlia i fenedures palbebrals però no presenta plec epicàntic ni blefaritis. Té un pont nasal pobrament desenvolupat i a nivell de boca, no presenta una llengua protruïent ni escrotal i el seu paladar és normal. Les orelles són normals i el coll és curt. Les mans són curtes i amples amb un dit petit curt i encorbat i un plec simià unilateral. SD#5 no ha patit leucèmia ni cap tipus de problema cardíac. El seu retard mental és considerat lleu malgrat que no se li ha evaluat mai el quocient intel·lectual (QI). Segons les dades clíniques rebudes, la seva intel·ligència és substancialment superior a la que s'observa de manera més freqüent en la SD. La pacient va assistir a l'escola primària i secundària.

Actualment SD#5 pesa 66 kg i medeix 150 cm, pateix atacs d'asma de manera recurrent i sovint presenta bronquitis. De manera remarcable, donada l'edat de 34 anys, SD#5 no presenta cap simptomatologia de demència senil ni de malaltia d'Alzheimer.

Estudi citogenètic de Bandes G

L'estudi citogenètic convencional de la pacient va posar de manifest que, de manera consistent, un dels seus cromosomes 21 era més llarg que l'altre. El fenotip va fer pensar en la presència d'una duplicació del mateix cromosoma dins del braç llarg (21q). El cariotip que es va donar va ser: 46,XX,-21,+der(21),t(21q?;21qter). Per tal de confirmar aquesta hipòtesi i per a estudiar la translocació amb més detall mitjançant FISH, es va estudiar una nova mostra de sang perifèrica de la pacient.

Estudi de FISH

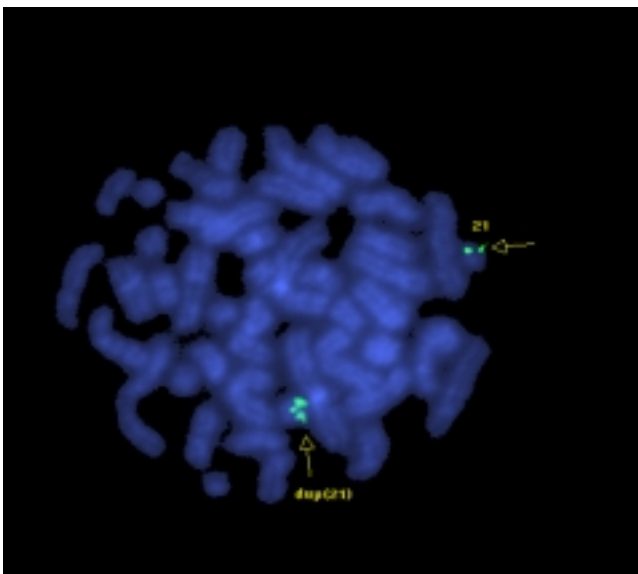
Per tal de confirmar que l'origen cromosòmic del material translocat al HSA21 era del mateix cromosoma, es va fer primer un "pintat cromosòmic" d'aquest cromosoma (Fig. 15A). Posteriorment, i un cop confirmada la hipòtesi de trisomia parcial del HSA21, es va procedir a la caracterització del punt de trencament de la translocació i, consegüentment, a

la definició de l'abast de la trisomia parcial. Això es va fer mitjançant FISH i utilitzant com a sondes el pannel de YACs contigus del braç llarg del HSA21.

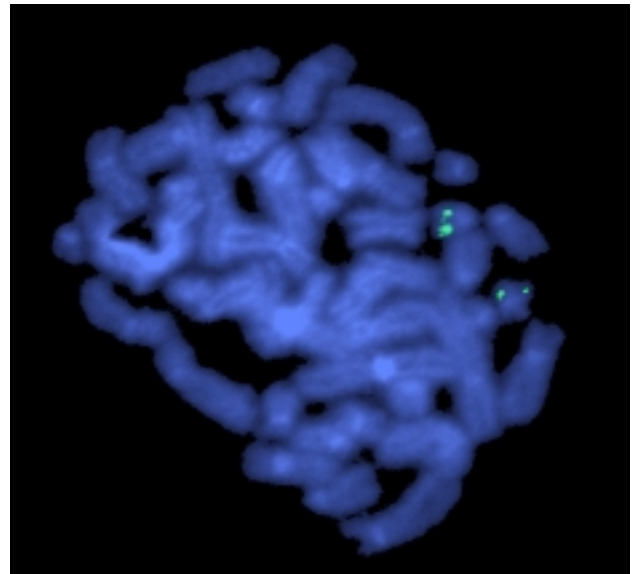
Els resultats obtinguts indiquen que la trisomia parcial de la pacient es deu a una translocació o duplicació del braç llarg del HSA21 orientada de manera directa, que implica només el HSA21 i que abasta des del telòmer fins el YAC 814c1, el qual conté els marcadors: *D21S226* fins *D21S303* (Fig. 15B).



Figura 14. Visió frontal de la pacient SD#5. Destaca l'aspecte general de SD malgrat la seva trisomia parcial del HSA21.



A



B

Figura 15. Resultats de l'estudi de FISH en dues metafases de la pacient SD#5. A/ Metafase hibridada amb el YAC 280b1, clarament duplicat en un dels HSA21. B/ Imatge d'una metafase de la pacient hibridada amb el YAC 814c1. S'aprecia que aquest YAC està present en dues dosis i que, consegüentment, el punt de trencament és més distal.

. Identificació d'una duplicació intersticial del HSA21 en una pacient només amb tres trets de la SD mitjançant FISH.

SD#6 és una nena filla única de pares sans no consanguinis i sense antecedents familiars significatius. La mare té 30 anys i durant la gestació se li va practicar un cariotip fetal en amniòcits per indicació de cribatge no invasiu. El resultat del cariotip va ser normal. La gestació va ser normal i el part va ser per cesàrea per manca de dilatació a les 39 2/7 setmanes. El nadó va pesar 2.840 g, va medir 48 cm i tenia un perímetre cranial de 34,5 cm.

L'exploració neonatal mostrava: buf sistòlic (l'ecocardiograma va demostrar una CIV de 3 mm), facies lleugerament downiana (Fig. 16) i la presència d'un solc transvers al palmell dret. No es van detectar altres anomalies i el to muscular era normal. L'exploració clínica als tres mesos, va demostrar una bona evolució psicomotora i estatoponderal, així com una disminució de la impressió downiana facial.

Estudi de bandes G

Degut a la presència dels tres trets clínics suggestius de SD, es va repetir el cariotip de la pacient per a confirmar que no hi havia cap trisomia del HSA21 constitutiva o en mosaïcisme. Els resultats dels cariotips de la pacient i dels seus pares van ser normals. Amb l'objectiu de detectar algun reordenament cromosòmic críptic, es va fer un estudi de FISH del HSA21.

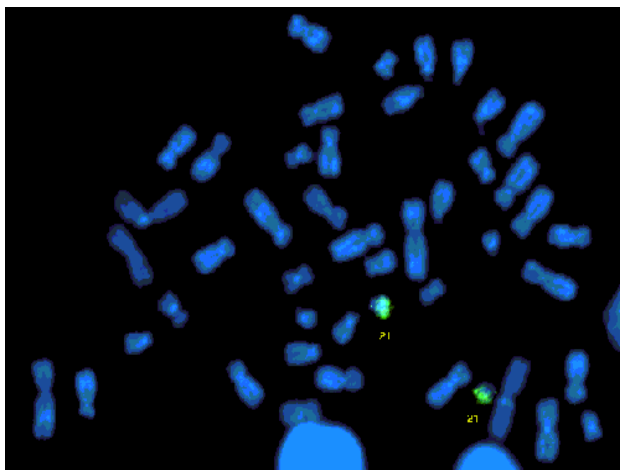
Estudi de FISH del HSA21

Els resultats del pintat cromosòmic del HSA21 fet en la mostra de sang perifèrica de la pacient, no va donar cap alteració en aquest cromosoma ni es va detectar la presència de senyal en cap altre cromosoma (Fig. 17A). Així doncs, un cop descartada la presència d'una possible translocació, vam començar l'estudi de tots els YACs que tenim del braç llarg del HSA21. Aquest estudi va ser normal per a totes les sondes excepte per al YAC 876d4 que presentava claríssimament un senyal doble en un dels HSA21 (Fig. 17B). Aquest YAC es va tornar a hibridar i el resultat va ser el mateix. Finalment, per a confirmar aquesta

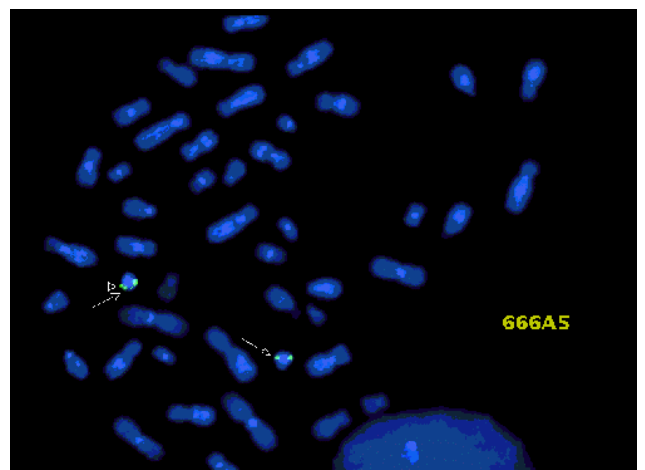
duplicació intersticial, vam hibridar el YAC 666a5 el qual, segons els marcadors, està contingut dins del YAC 876d4. També es va estudiar el YAC contigu 246c2. Els resultats obtinguts van confirmar la sospita d'una duplicació intersticial que abasta només els marcadors continguts dins del YAC 876d4: *D21S216*, *D21S320*, *GART* i *D21S323*. El mateix estudi es va dur a terme en les mostres dels pares i els resultats van ser normals, definint la duplicació intersticial com a *de novo*.



Figura 16. Vista facial frontal de la pacient SD#6 als tres mesos d'edat.



A



B

Figura 17. Resultats de l'estudi de FISH amb sondes de 21q en metafases de la pacient SD#6. A/ Pintat cromosòmic del HSA21. Es descarta qualsevol reordenament del HSA21 amb un altre cromosoma. B/ Hibridació del YAC 666a5 en una metafase de la pacient on s'hi aprecia el senyal doble en un dels HSA21.

- . **Compendi de tots els resultats clínics.**

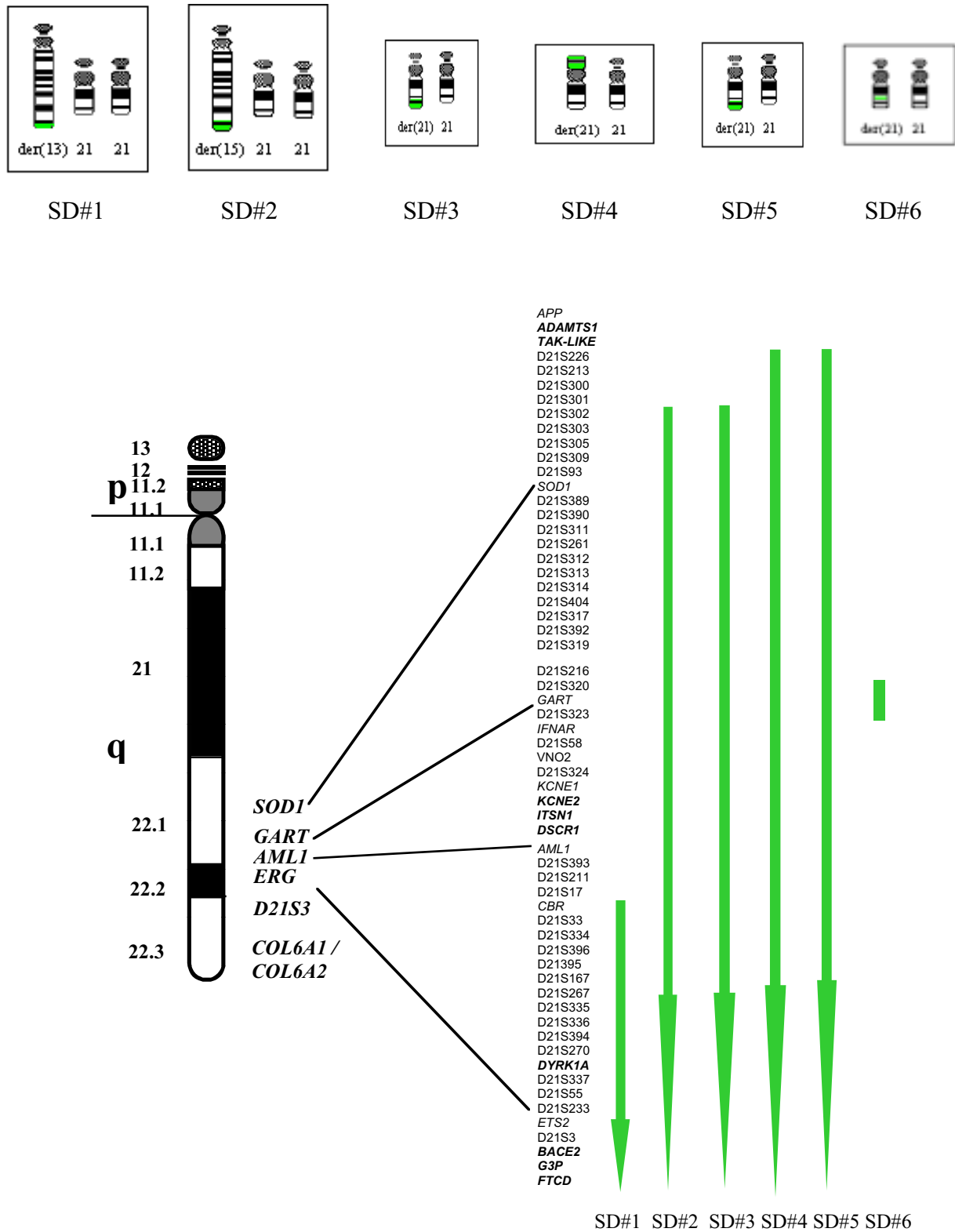
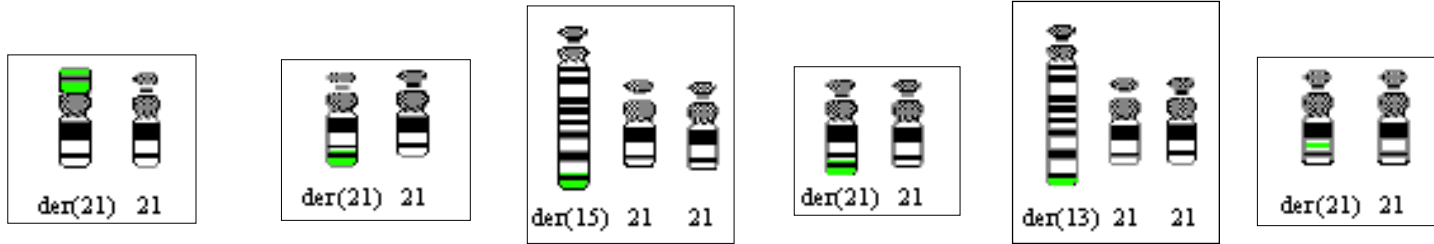


Figura 18. Representació esquemàtica de tots els reordenaments identificats als pacients amb trisomia parcial 21 i SD (en verd s'indica el segment del HSA21 extranumerari). Al costat de l'ideograma del HSA21, s'hi ha posat els marcadors de les regions que contenen els punts de trencament i amb les fletxes verdes s'indica l'abast de cadascuna de les trisomies.

PACIENTS



	t(21;21)(p11;q22.1) SD#4	dup(21)(q22.1-qter) SD#5	t(15;21)(q26;q22.1) SD#2	dup(21)(q22.1-qter) SD#3	t(13;21)(q32;q22.1) SD#1	dup(21)(q22.1) SD#6
FENOTIPS						
origen	BCN	Itàlia	Navarra	Brasil	BCN	BCN
edat	10 dies	34 anys	27 anys	2 anys 11 mesos	14 mesos	3 months
sexe	dona	dona	home	home	dona	dona
IGR (retard creix. intrauterí)	+	?	?	?	-	-
pes naix. (g)	2150	3000	2550	?	3015	2840
temps gestació (setmanes)	39	terme	terme	?	40	39
PGR (retard creix. postnatal)	?	+	+	+	+	-
alçada (cm)	46,5	150	?	85	71,5	?
pes (kg)	?	66	?	?	7,5	?
perímetre cranial	33	52	?	48	42,5	?
braquicefàlia	+	+	+	+	+	-
microcefàlia	?	-	+	?	?	-
occiput prominent	?	?	-	?	-	-
línia baixa implant. cabells	?	?	?	?	+	-
fened. palpebral oblíqua	+	+	+	+	?	-
epicant	+	-	+	+	+	-
blefaritis, conjuntivitis	?	-	?	?	?	-
taques de Brushfield	-	?	-	-	-	-
epicant invertit	amunt	-	amunt	-	-	-
hipertelorisme	?	?	?	?	?	-
nistagmus	?	?	?	-	+?'	-
pont nasal prominent	-	-	-	-	-	-
nas gran	-	-	-	-	-	-
llengua escrotal	-	-	-	-	-	-
fenedura palatina	?	-	?	?	-	-
paladar alt i corbat	-	-	+	+	?	-
paladar estret	-	-	+	+	+	-
retrognatia	?	?	?	?	-	-

orella plegada	+	-	?	?	+	-
orelles implantació baixa	+	?	-	+	+	-
coll curt / pell coll laxa	+	+	+	-	+	-
mans curtes i amples	+	+	+	+	+	-
dit petit curt	+	+	+	+	-	-
solc simià transvers	+	+	+	-	-	+
espai entre 1º i 2º dits peu	+	+	?	-	+	-
defecte cardíac congènit	++	-	-	-	+	+'/?'
buf	+	-	-	-	+	
laxitud lligamentosa	+	-	?	?	-	-
hipotonia muscular	+	-	+	-!/+'	+	-
retard mental	?	+'/'-'	++	?	+	?
cifosi	-	?	-	-	-	?
síмптоemes artro-griposos	-	?	-	-	-	?
estatura baixa	?	+	+	+	+	?
t'' palmar	?	?	?	?	?	-
sindactília dits peus		-	-	?	-	-
<i>hypothenar ulnar loop</i>	?	?	?	?	?	-
índex Cummins elevat	?	?	?	?	?	?
atrèsia duodenal	-	-	-	-	-	-
leucèmia	-	-	-	-	-	-
malatia Alzheimer	-	-	-	-	-	-
hipertonia muscular	-	-	-	-	-	-
QI	no valorable	intel.ligència mitja	?	?	53	?
criptorquidisme		-	+	-	-	-
altres anomalies viscerals	?	-	-	hèrnia umbilical	-	-
hipotiroidisme	?	?	-	?	-	-
hipertiroidisme	?		-	?	-	-
CuZn SOD elevat	?	?	?	?	-	?
CuZn SOD disminuït	?	?	?	?	-	?
CBS elevat	?	?	?	?	?	?
CBS disminuït	?	?	?	?	?	?
orelles mal posicionades	+	?	-	+	+	-
facies plana	+	+	+	-	+	-
altres trets clínics	-	asma	sordesa	-	coag. VIII and X	-

Taula 8. Recull de totes les dades clíniques obtingudes en els casos de SD i trisomia parcial del HSA21 estudiats

ESTUDIS DE FISH EN MODELS MURINS DE LA SD

- . Mapatge dels gens *Dyrk1A* i *Dscr1* al ratolí trisòmic parcial Ts65Dn.
- . Tipatge dels ratolins Ts65Dn mitjançant el mètode de les emprentes de teixits:
“A new protocol to type the Ts65Dn mouse model for Down syndrome by FISH in newborn or embryo tissue imprints”. *Technical Tips on Line* (T01796)
M Nadal i X. Estivill
- . Estudi de la inserció genòmica de transgens en models murins de sobreexpressió dels gens *Dyrk1A* i *Dscr1*.

. Mapatge dels gens *Dyrk1A* i *Dscr1* al ratolí trisòmic parcial Ts65Dn

El cromosoma 16 de ratolí (MMU16) conté una gran regió d'homologia amb el HSA21 humà. El ratolí Ts65Dn és trisòmic parcial per a la regió cromosòmica de sintènia conservada amb el HSA21 humà i es considera un model murí per a la SD. Diversos grups han demostrat que en aquest model hi ha alteracions conductuals, alteracions en alguns sistemes de segons missatgers, degeneració depenents de l'edat de les neurones colinèrgiques del septe-hipocampal i hipertròfia astrocítica. Aquests resultats suggereixen que una còpia extra de material genètic a la part distal del MMU16 comporta una alteració conductual i neuroquímica. Dos gens identificats al nostre laboratori, *DSCR1* i *DYRK1A*, podrien estar implicats en el procés de desenvolupament neuronal alterat, essent candidats per al retard mental que s'ha descrit en la SD.

El mapatge dels dos gens es va fer en cromosomes metafàsics obtinguts a partir del cultiu de sang perifèrica d'un ratolí Ts65Dn tal com es descriu en la secció de Materials i Mètodes. Per a *Dscr1*, es va fer servir un producte de PCR de 1.6 kb, obtingut a partir de DNA genòmic total de ratolí (Fig. 19A). Per a *Dyrk1A* es va fer servir un P1 8(pAd10-SacBII), que conté seqüències de *Dyrk1A* (Fig. 19B). Com a sonda control es va fer servir un clon genòmic de 9 kb del gen *Ets2* (R. Reeves).

Els resultats del mapatge dels gens *Dscr1* i *Dyrk1A* van confirmar la seva presència en l'interval *APP – MX1* i la seva presència en trisomia en el ratolí Ts65Dn. Aquests resultats també confirmen la localització de *Dyrk1A* que es va fer utilitzant el pannel 2 BSS (BSS backcross panel 2) dels laboratoris Jackson (resultats que no es mostren). Finalment, els resultats del mapatge d'aquests gens confirma la conservació de grans regions cromosòmiques entre home i ratolí.

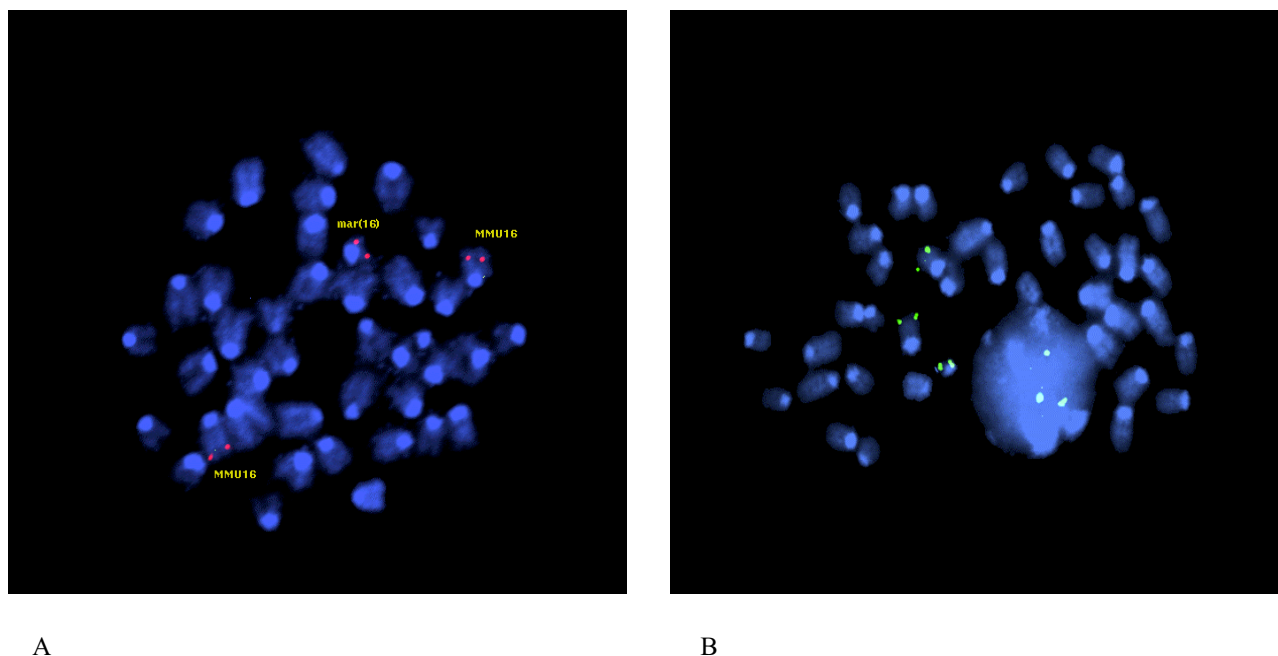


Figura 19. A/ Metafase d'un ratolí Ts65Dn hibridada amb un producte de PCR de *Dscr1*. S'observa la trisomia del gen *Dscr1* mitjançant tres senyals fluorescents (vermells) als dos cromosomes homòlegs MMU16 i al cromosoma marcador derivat del MMU16. B/ Metafase i nucli interfàsic d'un ratolí Ts65Dn hibridats amb un PAC que conté seqüències de *Dyrk1A*. Es pot veure el senyal fluorescent en els dos cromosomes MMU16 homòlegs i en el cromosoma marcador cosa que indica la presència en triple dosi d'aquest gen. Al nucli interfàsic s'hi distingeixen també tres grups de senyals.

Nota: Aquests resultats van ser presentats al 7th International Workshop on Human Chromosome 21, Berlin (Alemanya), setembre de 1997 amb el títol: "FISH mapping of *Dscr1* and *Mnb* to the trisomic region of mouse chromosome 16 in Ts65Dn". (M.Nadal, M. Dierssen, JJ. Fuentes, J. Guimerà, C. Fillat, WJ. Song, DM. Kurnit, X. Estivill, M. Pritchard).

. Tipatge dels ratolins Ts65Dn mitjançant el mètode de les improntes de teixits

“A new protocol to type the Ts65Dn mouse model for Down syndrome by FISH in newborn or embryo tissue imprints”. M. Nadal i X. Estivill (1999) *Technical Tips on Line* (T01796).

Aquest treball representa una eina metodològica per al tipatge dels ratolins trisòmics parcials Ts65Dn. El mètode suposa una bona alternativa al sistema utilitzat fins el moment basat en el cariotipatge. Aquest mètode té l'avantatge que no cal fer cultius de cap mena permetent el tipatge d'embrions i de ratolins nounats.

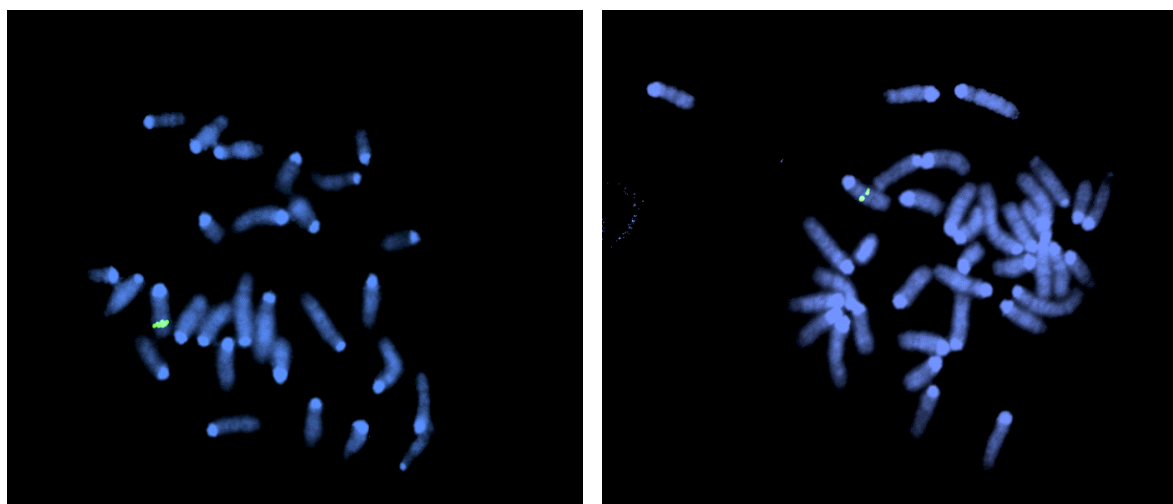
. Estudi de la inserció genòmica de transgens

. Ratolí transgènic que sobreexpressa el gen *DSCR1*: un model per a estudiar algunes anomalies de la SD

El gen *DSCR1* que va ser aïllat al nostre laboratori (Fuentes i col., 1995), es troba a la regió 21q22.1-22.2 i alguns trànscrips tenen un nivell d'expressió alt a cervell fetal (Fuentes i col., 1997). L'estructura del gen fa pensar que pot estar implicat en processos de regulació de la transcripció i/o transducció de senyal. L'elevada expressió de *Dscr1* als cervells de rates joves respecte rates adultes, suggereix un possible paper d'aquest gen en el desenvolupament del sistema nerviós central. Amb l'objectiu d'estudiar les conseqüències de la sobreexpressió al cervell, es va generar un ratolí transgènic amb el gen humà de *DSCR1*. Per tal d'assegurar la sobreexpressió del gen al cervell, es va construir un gen quimèric PDGFB/*DSCR1* el qual va ser microinjectat a ous fecundats de ratolí (C57BL6/SJL) i es van obtenir quatre línies de ratolins transgènics. El promotor PDGFB dirigeix l'expressió de gens foranis cap el cortex cerebral, l'hipocamp, el cerebel, el tronc de l'encèfal i el bulb olfatori, regions en les quals també s'hi expressa el *Dscr1* endògen.

A partir del cultiu d'una mostra de sang extreta per la cua del ratolí, cultivada segons el protocol de Davisson i col. (1987), es van obtenir extensions cromosòmiques sobre les quals es van fer els estudis de localització. Mitjançant FISH, fent servir com a sonda la mateixa construcció o transgen amb el qual es va fer la microinjecció, es va determinar que la integració dels transgens en les línies 81 i 73 s'havia produït en cromosomes independents. Mitjançant l'opció que ofereix l'analitzador d'imatges Cytovision de transformar les bandes DAPI en bandes G, vam poder determinar que la integració del transgen en la línia 83 es va produir al cromosoma MMU3, a la regió mitja proximal (Fig. 20A); de la mateixa manera, en la línia 73, el transgen es va integrar al cromosoma MMU11, prop de la regió telomèrica (Fig. 20B).

Aquestes línies transgèniques s'estan estudiant al nostre laboratori a nivell de neurodesenvolupament postnatal, morfològic i conductual.



A

B

Figura 20. Estudi de la inserció del transgen de *DSCR1* en el model murí de sobreexpressió. A/ Metafase del ratolí transgènic de la línia 83 TsDSCR1-83 en la qual es pot veure un únic senyal d'hibridació al cromosoma MMU3, en la regió mitja proximal. B/ Metafase del ratolí transgènic de la línia 73 TsDSCR1-73 en la qual es pot veure una única integració al cromosoma MMU11, prop del telòmer.

Nota: Aquests resultats van ser presentats al 47th International Meeting of the American Society of Human Genetics, Baltimore (USA), novembre de 1997, amb el títol: "Transgenic mice overexpressing the human *DSCR1* gene: a model to study Down syndrome-like abnormalities". (C. Fillat, M. Dierssen, M. Oset, C. Martínez-Cue, IF. Vallina, C. Baamonde, M.Nadal, M. Pritchard, JJ. Fuentes, J. Flórez, X. Estivill).

- . Ratolí transgènic que sobreexpressa el gen *DYRK1A*: un model per a estudiar anomalies que es troben en la SD

Amb l'objectiu d'estudiar el paper del gen *DYRK1A* (*minibrain*) al cervell, al desenvolupament neuroconductual i de la memòria, es van generar ratolins transgènics que sobreexpressen el gen *Dyrk1A* de rata sota el control del promotor induïble de la metalotioneïna (MT), el qual pot dirigir l'expressió de gens heteròlegs a diversos teixits fetals i adults dels ratolins transgènics. El gen quimèric *sMT/Dyrk1A* es va microinjectar en ous fecundats de ratolins (C57B6/SJL) i es van obtenir quatre línies de ratolins transgènics.

Per mapar el punt d'integració del transgen de *Dyrk1A*, es va marcar i hibridar la mateixa construcció que s'havia microinjectat. L'estudi es va fer en cromosomes metafàsics obtinguts a partir d'una mostra de sang perifèrica extreta per la cua del ratolí. Es va analitzar la línia 31, per la qual els estudis de *Southern blot* suggerien que hi podia haver una doble integració. Els resultats de FISH van confirmar aquesta sospita i es va trobar que en aquesta línia el transgen s'havia integrat en dos cromosomes independents. Un cromosoma podia ser, per la seva mida i patró de bandes, el cromosoma MMU1. Donat que disposàvem d'una sonda d'aquest cromosoma (de la Fuente i col., 1999), vam fer una doble hibridació i vam confirmar que la integració s'havia produït al MMU1 (Fig. 21). Per a identificar l'altre cromosoma, vam convertir el patró de bandes DAPI en bandes G i els resultats van indicar que el segon lloc d'integració s'havia produït al cromosoma MMU5. Una altra observació que es va poder fer mitjançant l'estudi de FISH, va ser que el nombre de còpies integrat al cromosoma MMU1 era molt superior al del MMU5, ja que el senyal fluorescent era, en el primer cas, molt més gran i intens. Posteriorment es va estudiar la descendència d'aquest doble transgènic amb la finalitat de separar les dues sublínies i obtenir així dues línies transgèniques independents.

Aquests ratolins s'estan estudiant a nivell de desenvolupament embrionari i postnatal, conductual i morfològic, al nostre laboratori.

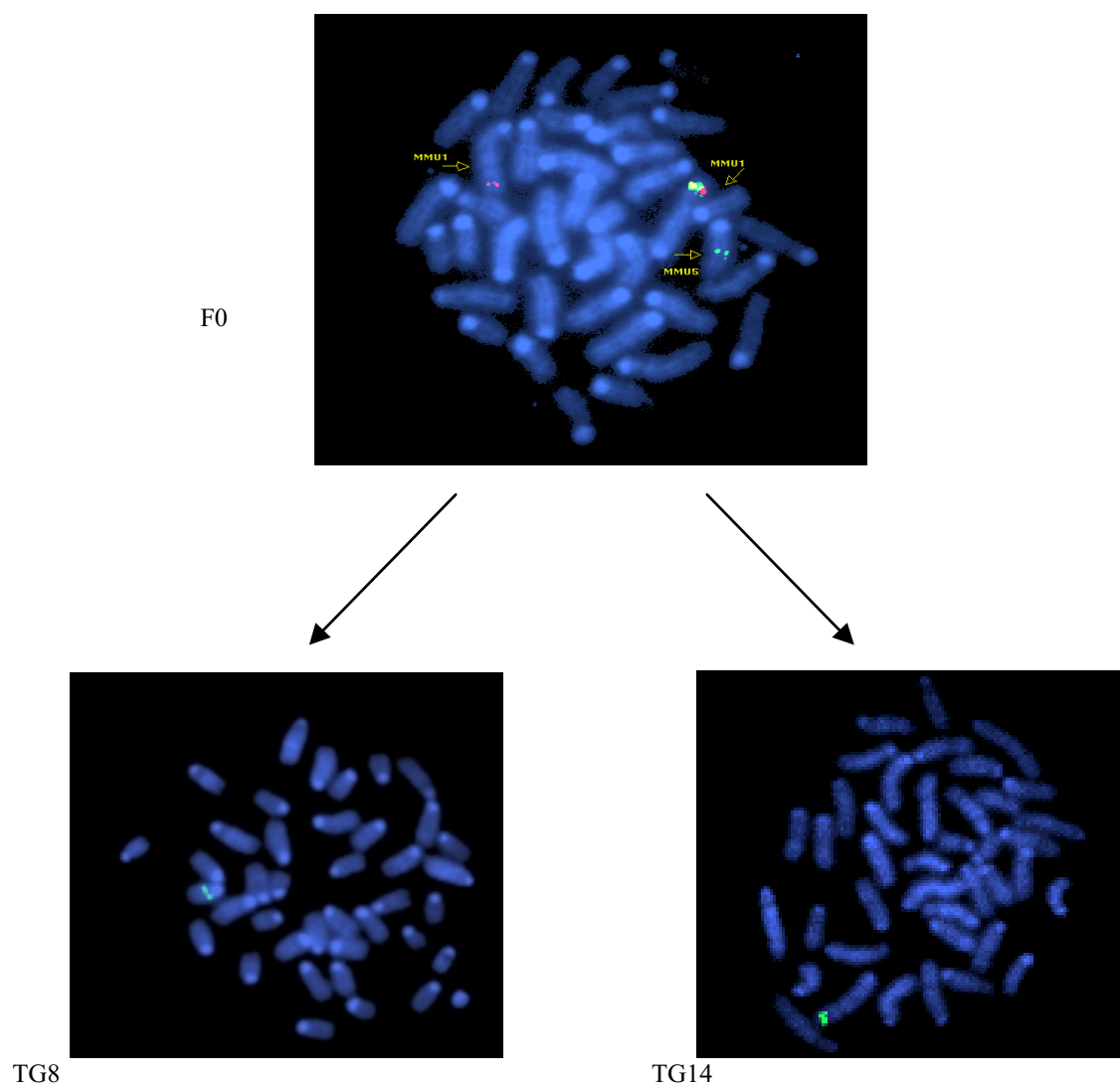


Figura 21. Estudi de la línia amb doble integració del transgen de *Dyrk1A* i de les línies filials. F0 presenta dos llocs d'integració, als cromosomes MMU1 (el senyal verd correspon al transgen i el vermell a la sonda control CD84 (de la Fuente i col., 1999)) i MMU5 (verd). L'estudi de les línies filials mitjançant FISH i la sonda del transgen, permet segregar dues línies amb un sol lloc d'integració: la línia TG8 presenta un senyal al cromosoma MMU5 i la línia TG14 presenta també un senyal per a la sonda del transgen al cromosoma MMU1.

Discussió

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat la caracterització dels punts de trencament del HSA21 en pacients amb SD deguda a trisomia parcial d'aquest cromosoma. D'aquesta manera, es volia intentar establir una correlació entre el genotip i el fenotip i contribuir així, al mapa fenotípic del HSA21 humà. Per a assolir aquest objectiu final, s'han seleccionat i posat a punt sondes no quimèriques de tipus YAC. A partir de sang perifèrica dels pacients, s'han definit els reordenaments cromosòmics causants de la trisomia parcial, s'han trobat els punts de trencament al HSA21 en cadascun dels casos. Finalment, s'han integrat les dades clíniques, citogenètiques i moleculars per tal d'establir les possibles correlacions entre el genotip i el fenotip.

Abans d'iniciar aquest treball, ja s'havien descrit pacients amb SD i trisomia parcial del HSA21. Els punts de trencament havien estat caracteritzats bàsicament mitjançant eines de genètica molecular de quantificació de dosi de marcadors (*Southern blot*) i en alguns casos també, mitjançant FISH (Delabar i col., 1993; Korenberg i col., 1994). L'estudi de dosi de marcadors mitjançant *Southern blot* és una tècnica quantitativa que comporta l'anàlisi de molts marcadors, ja que les sondes que s'hibriden són, generalment, més petites que les que es fan servir en FISH i la regió genòmica que es cobreix en cada hibridació és, conseqüentment, petita. Els mètodes de genètica molecular desenvolupats més recentment, com la PCR fluorescent quantitativa comporten l'anàlisi d'un gran nombre de marcadors i en aquest cas, els resultats depenen de la seva informativitat. El treball realitzat aquí ha utilitzat una estratègia citogenètica-molecular, la FISH, la qual no comporta cap de les limitacions esmentades i permet una anàlisi de regions cromosòmiques més grans. Aquesta estratègia, ha permès caracteritzar de forma ràpida i precisa els punts de trencament del HSA21 en sis pacients amb SD i trisomia parcial del HSA21.

ESTUDI DEL QUIMERISME DE YACS DEL BRAÇ LLARG DEL HSA21

Inicialment, aquest estudi va comportar el desenvolupament de sondes de pintat cromosòmic a partir del DNA del pannel de línies amb cromosomes humans específics i posar a punt un contigu de sondes de tipus YAC del HSA21

(Chumakov i col., 1992b), tots mitjançant *Alu*-PCR. Aquests YACs havien de servir tant per als estudis de FISH, com per a la cerca de gens al HSA21 que s'ha fet al laboratori durant els darrers cinc anys. Els cromosomes artificials de llevat o YACs contenen un insert de mida gran (humà en aquest cas), cosa que fa que les pèrdues del DNA clonat degut a processos de recombinació siguin molt freqüents. Els YACs també poden contenir seqüències d'altres cromosomes (YACs quimèrics) o no contenir seqüències del cromosoma originari (HSA21, en aquest cas). Aquests YACs no són útils per als estudis moleculars ni per a la cerca de gens al HSA21. El valor de quimerisme que dona el CEPH pels seus YACs és del 40%. Dels 49 YACs que s'han estudiat, se n'han trobat 18 (38%) de quimèrics. Per a la cerca de gens i per a la construcció de contigus de cosmidis, es van triar cinc YACs no quimèrics: 72h9, 336g11, 238b1, 221b9 i 552a3 (Guimerà i col., 1996). Tota aquesta tasca es va iniciar a finals de l'any 1993, època en la qual el projecte de seqüenciació del genoma humà, i concretament del HSA21, no estava tan avançat com ara. Actualment, el procés de seqüenciació del HSA21 ja ha acabat (Hattori i col., 2000) i la seqüència es troba a l'abast públic a través de les bases de dades. També en aquests darrers cinc anys, la informació sobre el quimerisme dels YACs s'ha anat fent molt més precisa gràcies a les eines moleculars noves, i als estudis de la presència o absència de marcadors que s'han identificat. Això ha suposat que quimerismes que no s'havien detectat mitjançant FISH, degut a la limitació que suposa la mida de la diana i la gran condensació de la cromatina als cromosomes, ara han quedat resolts. Si es consulten les bases de dades (http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/yac_info, <http://www.rzpd.de/general/cgi-general>) i es comparen els resultats, es conclou que dels 49 YACs que s'han estudiat, n'hi ha 18 de quimèrics (quimerismes confirmats posteriorment per altres laboratoris). D'aquests 18 YACs quimèrics, n'hi ha 6 que tenen un grau de quimerisme tan gran, que mitjançant FISH no es va detectar la seqüència del HSA21. D'altra banda, els estudis presentats han donat com no quimèrics 4 YACs que sí que han resultat ser-ho (probablement la seqüència quimèrica és massa petita per ser detectada mitjançant FISH). Contràriament, s'ha detectat quimerisme en un YAC que apareix a les bases de dades com no quimèric (segons l'estudi presentat, el YAC 746b10 conté seqüències del cromosoma X). La discrepància es podria explicar, en aquest cas, per una contaminació de la soca

(Taula 4). Aquests resultats donen una eficiència de detecció de quimerisme mitjançant FISH del 92%.

A banda dels plasmidis i cosmidis que permeten inserir fragments de DNA d'entre poques bases fins a 40 kb, recentment s'han generat altres tipus de vectors per a clonar fragments grans de DNA genòmic humà, que resolen els problemes del quimerisme dels YAC. S'han generat els BACs (cromosomes artificials bacterians) i els PACs (cromosomes artificials de P1) que, tot i que contenen inserts de 100 a 300 kb, no presenten els problemes d'inestabilitat i quimerisme. Malgrat tot, pels estudis de FISH com el que s'ha presentat en aquest treball, els YACs no quimèrics continuen tenint validesa ja que, en contenir fragments de DNA molt llargs, permeten detectar el punt de trencament d'una manera més ràpida. Els cosmidis i els plasmidis, tal com ha quedat reflectit al cas SD#1, serveixen per a caracteritzar de manera més precisa el punt de trencament dins del YAC, sempre i quan es tingui aquest YAC subclonat en aquests vectors.

Així doncs, els avantatges globals que presenta una tècnica com la FISH per a l'estudi de trisomies parcials, comparat amb estratègies estrictament moleculars com poden ser els estudis de microsatèl·lits o de quantificació de dosi mitjançant *Southern blot*, són la informativitat total de les hibridacions. Sigui quin sigui l'origen de la trisomia (meiòtica I o meiòtica II), els resultats no depenen de la informativitat dels al·lels ni de la presència de tres al·lels. Per altra banda, la FISH no presenta els inconvenients del *Southern blot* d'haver de densitometrar els fragments obtinguts amb cada sonda per a quantificar les hibridacions.

Ara que tota la informació de la seqüenciació del HSA21 és a l'abast, es podran definir molt millor els punts de trencament. Així que es coneguin tots els gens del HSA21 es podrà determinar, no només quins són els gens que es troben en triple dosi i es sobreexpressen en pacients amb SD, sinó si n'hi ha cap que hagi quedat interromput a causa del reordenament cromosòmic en les trisomies parcials i si això pot arribar a tenir cap conseqüència concreta al fenotip de cada cas. Els estudis de FISH en aquests casos de trisomies parcials del HSA21 tindran un paper molt important, probablement en combinació amb sistemes de *microarrays*, en els que es disposi de sondes genòmiques de la totalitat del HSA21.

DADES EPIDEMIOLÒGIQUES

La identificació d'alguns casos de trisomia parcial del HSA21 –concretament dels casos SD#1, SD#2, SD#6-, ha estat fruit de la caracterització citogenètica molecular de pacients que presentaven un fenotip de SD i un cariotip de bandes G aparentment normal. En els altres casos, el cariotip de bandes G va detectar un reordenament cromosòmic (concretament, la presència de material cromosòmic extra), el qual, juntament amb un fenotip de SD, van suggerir directament l'existència de la trisomia parcial del HSA21 que calia confirmar i caracteritzar mitjançant FISH.

Pel que fa a les característiques de la mostra i tal com ha quedat reflectit a la secció de *Resultats*, dels sis pacients estudiats, només tres pertanyen al territori de Catalunya (SD#1, SD#4 i SD#6) i un d'ells (SD#1) és d'origen pakistanès. A banda dels casos presentats en aquest estudi, només hi ha documentat un cas de trisomia parcial i SD del nostre territori (Serés-Santamaría, 1999). Actualment, la natalitat a Catalunya és d'uns 50.000 naixements per any. Si es dona per bona la prevalença de SD de 1 de cada 700 nounats, hi hauria aproximadament 71 casos de trisomia del HSA21 anuals i per tant, la probabilitat que un d'aquests nadons fos trisòmic parcial, seria baixíssima, menys de l'1%. Tanmateix, els càlculs no es poden fer de manera tan senzilla ja que cal revisar les prevalences oficials de la SD que contempnen paràmetres tan importants com l'edat materna. En consultar la prevalença de la SD a la base de dades de l'EUROCAT (el registre Europeu d'anomalies congènites o European Registry Of Congenital Anomalies and Twins, <http://iph.fgov.be/eurocat>), es troba que, dins l'àmbit de Catalunya, només hi ha dades de la ciutat de Barcelona i de la comarca del Vallès. A Barcelona, la incidència total (es compten nounats, morts fetals a partir de la vintena setmana de gestació i les interrupcions voluntàries de l'embaràs) de la SD en el període 1980-1994, és de 44 per 10.000 naixements per any i al Vallès és de 34. Si es tenen en compte les edats maternes, per a mares de menys de 30 anys, el mateix valor és de 11 a Barcelona i 10 al Vallès, mentre que per a mares de més de 35 anys, els valors són 23 i 15, respectivament. Pel que fa només als nounats, la xifra que dona l'EUROCAT és de 21 a Barcelona i de 16 al Vallès. El que reflexen aquestes dades és que el major nombre de casos de nounats amb SD correspon a les mares

amb menys de 30 anys, cosa que es pot explicar pel fet que el diagnòstic prenatal és menys freqüent en aquest segment de la població. També es dedueix que tot i el diagnòstic prenatal que comporta que gairebé el 48% de les parelles que esperen un SD (27% de les mares més joves de 30 anys i el 89.5% de les mares més grans de 35 anys) interrompeixen l'embaràs, a Barcelona de cada 700 nounats en neix més d'un amb SD. Segons Cuckle (1999), en aquest tipus d'estudis epidemiològics, hi ha molts esbiaixaments possibles, sobretot degut a l'edat materna i al nombre mínim de naixements que s'han de contemplar per a poder fer aquests estudis (la xifra idònia mínima és de 100.000 naixements). Els resultats dels estudis demogràfics, que han comparat les prevalences de diferents poblacions i grups ètnics, han arribat a la conclusió que l'únic factor de risc, a part de les translocacions familiars i de la presència de mosaïcisme gonadal, és l'edat materna; no existeix cap risc ambiental, ni geogràfic, ni racial. Només s'ha trobat una incidència de SD més elevada en una població jueva d'origen no europeu a Israel (Hook i Harlap, 1979) i en tres estudis de poblacions californianes d'origen hispànic (Wilson i col., 1992; Bishop i col., 1997; Hook i col., 1999).

Per tal de fer una estimació del número de casos de SD a Catalunya amb trisomia parcial del HSA21, caldria saber quantes persones vives amb SD hi ha a Catalunya i quantes n'hi ha que hagin estat estudiades citogenèticament. La Fundació Catalana Síndrome de Down informa que no hi ha cap cens oficial de persones amb SD a Catalunya, cosa que es confirma als registres epidemiològics de la Generalitat de Catalunya. Així doncs, l'única dada que es pot considerar és la de les 1.300 persones amb SD a les quals la Fundació dóna suport. Per les xifres que s'han donat, a Catalunya hi hauria d'haver al voltant d'una desena de casos deguts a trisomia parcial del HSA21, però només n'hi ha quatre de documentats. Aquesta informació no és només important pel que fa als estudis de correlacions entre el genotip i el fenotip, sinó que també ho és des de la vessant de l'assessorament genètic per a les famílies. Un exemple de la necessitat d'estudiar els casos de SD i trisomia parcial, queda reflectit en la família de SD#2 en la qual la translocació entre els cromosomes 15 i 21 és d'origen familiar. La translocació és recíproca en el pare i segrega de la mateixa manera en un dels fills i en l'única filla, i de manera desequilibrada en SD#2. Gràcies a l'estudi citogenètic i molecular de la família, es va poder oferir assessorament genètic i diagnòstic

prenatal a la germana de SD#2 qui ha tingut un fill portador de la translocació recíproca i un fill amb un cariotip normal. La translocació en el cas SD#1 també és d'origen familiar. La translocació entre els cromosomes 13 i 21 és equilibrada en el pare. En aquest cas, però, no es va poder tenir accés a la germana gran de la nena amb SD ni a cap altre membre de la família. Malgrat tot, es va poder oferir assessorament genètic als pares.

Per tal de poder establir comparacions entre els casos estudiats, calia que el protocol d'avaluació clínica fos el mateix per a tots ells i que aquesta fos el més detallada possible en cada cas. Per aquest motiu, es va demanar a cada equip clínic que omplís un formulari que es va traduir estrictament a partir del protocol d'Epstein (1991a). Els trets dismòrfics van ser els menys difícils de recollir, si es compara amb l'avaluació d'altres manifestacions com el retard mental, bàsicament perquè la majoria dels pacients són molt petits. Cal remarcar l'esforç dels equips mèdics participants al projecte per tal de facilitar les dades que se'ls van demanar, especialment quan les exploracions requerien la intervenció de serveis clínics no estrictament genètics com els serveis de cardiologia, d'oftalmologia, d'endocrinologia, etc.

En alguns casos, el problema que va sorgir va ser que un cop fet el diagnòstic i el consell genètic, les famílies van deixar de ser participatives. Aquest fet, a banda de produir un cert desencís, ha fet impossible el seguiment clínic del pacient i per tant, impossibilita avaluar manifestacions clíniques que, com ja s'ha dit, poden anar apareixent en el decurs del temps. Això és especialment important en aquells pacients als quals se'ls va fer un diagnòstic quan encara eren molt petits per a poder valorar el retard psicomotor, el retard mental, etc., però també és molt important per a les correlacions d'aquelles manifestacions clíniques que apareixen més tard com la malaltia d'Alzheimer.

MAPA FENOTÍPIC DE LA SD: CORRELACIONS GENOTIP-FENOTIP

Hi ha dos fets fonamentals que dificulten la construcció de mapes fenotípics en síndromes causats per aneuploïdies. D'una banda, cal tenir en compte les penetracions de cadascun dels trets clínics que es volen estudiar. L'absència d'un determinat tret clínic es pot deure tant a la no trisomia del gen o gens, com a la manca de penetració i d'expressivitat del tret en aquell pacient determinat. És per això que a l'hora d'intentar definir una regió o grup de gens responsables d'una característica clínic de la SD, és indispensable basar-se en fenotips presents, mai en la seva absència. Només hi ha dues excepcions a aquesta regla: en primer lloc, quan el grup de pacients és prou gran i el tret no és present en cap d'ells i en segon lloc, quan la penetració d'aquell tret és del 100%. Només en aquests dos casos, l'absència d'una manifestació clínic es pot considerar conseqüència de la dosi euploide d'un gen o d'un grup de gens.

L'altre aspecte molt important que cal tenir present en aquest tipus d'anàlisis és la implicació d'altres cromosomopaties presents en el pacient amb SD i trisomia parcial del HSA21. Un exemple és la correlació entre el retard mental (present en tots els casos de SD) i la trisomia parcial del HSA21. Si la trisomia parcial es deu a una translocació no recíproca entre el HSA21 i qualsevol altre cromosoma, sempre hi ha implicada una monosomia parcial d'aquest segon cromosoma la qual, entre d'altres trets clínics, és gairebé segur que comporta algun tipus de retard mental. Els casos SD#1 i SD#2 són exemples dels possibles efectes d'una monosomia concomitant amb la trisomia parcial del HSA21. SD#1 presenta un defecte dels factors VIII i X de la coagulació que mapen a la regió monosòmica de 13q del pacient generada per la translocació. Defectes en aquests factors hemostàtics han estat associats a delecions de q13-qter. SD#2 té unes extremitats molt curtes que es podrien relacionar amb la monosomia de 15q26 deguda també a la translocació. A 15q26 hi ha el gen *IGFRI* (Insulin-like Growth Factor Receptor I) que s'ha descrit que pot estar associat a retard del creixement (Fryns i col., 1979). Així doncs, la hipotonia del nouat seria un fenotip menys complicat d'assignar a una determinada regió del HSA21, ja que també té una penetració del 100% en la SD i no està descrita en totes les altres

cromosomopaties. Segons el mapa fenotípic del grup de Korenberg (1994), aquest tret es deu a la trisomia de les bandes 21q21.1-q22.2. Dels estudis presentats en aquest treball es podria acotar més aquesta regió excloent-ne el segment comprès entre els marcadors *D21S216* i *D21S323*, ja que el cas SD#6 té una duplicació intersticial que abasta aquesta regió i no presenta hipotonia.

De tota manera, les assignacions dels fenotips a les diferents regions del HSA21 no estan indiscutiblement determinades, perquè si ens basem en aquest mateix cas (SD#6), els dos trets clínics de SD que presenta són el solc simià i la comunicació interventricular. Aquests dos trets van ser assignats per Korenberg i col. (1994) a la regió més distal del braç llarg del HSA21, regió que en SD#6 tampoc no està triplicada. Aquesta discrepància es pot explicar només de dues maneres: per la incidència de tots dos trets en la població general (en tots dos casos, la incidència és de l'1% i podrien ser considerats esdeveniments independents de la trisomia parcial), o bé perquè hi ha més d'una regió del HSA21 la trisomia de les quals produeixen el mateix fenotip. Podria el gen *GART*, únic gen conegut en la regió trisòmica d'aquesta pacient, ser responsable dels seus trets clínics? *GART* codifica per una proteïna trifuncional implicada en la síntesi de purines. Els nucleòtids purínics funcionen com precursors de la síntesi de RNA i de DNA, de coenzims, de molècules transferidores d'energia i de factors de regulació. Els nivells elevats de purines que es detecten en la SD (Brodsky i col., 1997) han estat associats al retard mental (Jaeken i Van Den Berghe, 1984), no a la comunicació interventricular ni a les alteracions dels dermatoglifs.

Els sis casos de SD i trisomia parcial del HSA21 estudiats presenten quatre regions trisòmiques diferents (Fig. 18, Taula 8). SD#2 i SD#3 comparteixen la mateixa regió en trisomia, des del marcador *D21S302* fins el telòmer; SD#4 i SD#5 presenten trisomia des del marcador *D21S226* també fins el telòmer; SD#1 té una regió trisòmica més petita, des de *CBR* fins el telòmer; i SD#6, presenta una duplicació intersticial des del marcador *D21S216* fins el *D21S323*. Totes aquestes dades indiquen d'una banda, la possible existència de punts calents de trencament (*hot spots*) al voltant dels marcadors *D21S302* i *D21S226* i d'altra banda, permeten establir comparacions entre els fenotips dels pacients. SD#4 i SD#5, els dos pacients amb la trisomia parcial del HSA21 més gran, presenten, gairebé tots els trets fenotípics de la SD excepte la llengua escrotal, les taques de

Brushfield, la boca permanentment oberta i el paladar alt i estret. D'altra banda, els casos SD#2 i SD#3, també presenten gairebé tots els trets clínics de la síndrome, excepte les taques de Brushfield, la llengua escrotal i el paladar alt i estret. En conseqüència, les taques de Brushfield i la llengua escrotal serien els dos trets clínics absents en tots quatre casos i, segons aquests resultats, haurien de mapar entre el centròmer i el marcador *D21S226*. Si s'estableix una correlació d'aquests quatre casos amb el cas SD#1, la llengua escrotal i les taques de Brushfield continuen estant absents, cosa que corroboraria la hipòtesi plantejada. Aquests resultats són en part coincidents amb els de Delabar i col. (1993) i Korenberg i col. (1994), però més restrictius ja que la regió que aquí es defineix és molt més petita. D'altra banda, els resultats presentats confirmen que les regions més proximals del braç llarg del HSA21 tenen una participació menys substancial al fenotip final de la SD.

Si es comparen els trets clínics estudiats en tots sis pacients i segons el mateix protocol, es veu que si es consideren tots els casos en conjunt, es donen tots els trets clínics de la SD excepte els esmentats anteriorment, l'estenosi duodenal i la leucèmia, els quals no es presenten en cap d'ells. La incidència de l'estenosi duodenal en la SD, ja s'ha dit que és del 4-7% i això podria explicar l'absència d'aquesta alteració en els tres casos esmentats ja que Korenberg i col. (1992), van mapar aquest tret entre els marcadors *D21S8* i *D21S15*, en trisomia en tots tres casos. Pel que fa a les leucèmies, cal tenir en compte que els pacients SD#1, SD#3 i SD#4 són encara menors de 16 anys, pel que tenen un risc d'entre 10 i 18 vegades superior respecte la població general de desenvolupar aquesta malaltia, mentre que els casos SD#2 i SD#5 tenen un risc menor ja que són majors de 16 anys (Miller, 1970; Evans i col, 1972). Així doncs, l'absència d'aquestes dues malalties en aquests tres pacients tampoc no es pot afirmar que es deguin a la diploïdia de la regió proximal al marcador *D21S302*.

La malaltia d'Alzheimer en els casos de SD es deu a la trisomia del gen *APP* -que es troba prop del marcador *D21S386*-, fora de la trisomia parcial en tots els casos. Els dos casos estudiats amb edats superiors als 30 anys donarien suport a aquesta hipòtesi donat que SD#2 té actualment 30 anys, SD#5 en té 34 i cap dels dos no ha desenvolupat trets clínics de la malaltia d'Alzheimer. No obstant, per a confirmar això caldrà esperar com evolucionen en els propers anys.

Després de les consideracions que s'han fet aquí, el que és clar és que per a establir les correlacions genotip/fenotip, cal disposar de molts casos de trisomies parcials del HSA21 i tenir-los ben caracteritzats des del punt de vista clínic i molecular per tal de poder fer comparacions vàlides. Amb aquest objectiu, el 1996, J. Delabar va crear una base de dades accessible a través d'internet que vol recollir tots els casos d'aneuploïdies parcials del HSA21 (<http://www.infobiogen.fr/services/aneu21/>). Actualment hi ha recollits 52 casos dels quals 9 són monosomies parcials, 34 són trisomies parcials i 6 són translocacions robertsonianes o isocromosomes del HSA21. Dintre de les trisomies parcials hi ha 15 casos que no impliquen cap altra cromosomopatia. Aquesta base de dades resulta útil per a poder comparar casos similars de trisomies parcials, malgrat que el llistat de punts de trencament al HSA21 és, en molts casos, incompleta o fins i tot, absent. D'aquesta base de dades s'han extret dos casos de trisomia parcial (DL i SOL) amb punts de trencament similars als dels casos que s'han estudiat aquí i així s'han establert les comparacions que s'han presentat a la secció de *Resultats*. Possiblement, si els estudis de marcadors fossin més complets, es podrien comparar un nombre més gran de casos. Tanmateix, amb el nombre de trisomies que s'ha descrit fins ara, n'hi hauria prou per a establir les correlacions si la informació clínic, molecular i funcional del HSA21 fos completa.

CONTRAST ENTRE DUES HIPÒTESIS PER A EXPLICAR EL FENOTIP DE LA SD I LA TRISOMIA DEL HSA21

Per tot el que s'ha exposat fins aquí, és clar que els estudis exhaustius clínics i moleculars dels casos de trisomia parcial del HSA21 i SD no han estat tan informatius com en un principi s'esperava. Tanmateix, segons la hipòtesi de l'efecte de la dosi gènica (*gene dosage effect*) que aquí es defensa, continua sent lícit l'estudi detallat d'aquests casos, ja que si bé la SD no serà el resultat de la sobreexpressió de tots els gens del HSA21, sí que n'hi haurà alguns que, essent dependents de dosi, contribuiran de manera molt important a algun dels trets que presenta la SD, com per exemple, la implicació del gen *APP* en la malaltia d'Alzheimer. Es defensa aquesta hipòtesi en contrast a la hipòtesi de l'amplificació

de la inestabilitat durant el desenvolupament (*amplified developmental instability*) postulada per Hall (1965) i àmpliament defensada per Shapiro (1971, 1975, 1983, 1989, 1997, 2000). Bàsicament, aquesta segona hipòtesi desvincula la sobreexpressió de qualsevol dels gens del HSA21 que es trobi en trisomia amb els trets fenotípics de la SD. Per a aquesta asseveració, aquest autor es basa en la similitud fenotípica entre totes les síndromes causades per aneuploïdies i en la informativitat de vegades controvertida que han aportat fins ara els casos de SD i trisomia parcial del HSA21 (Aula i col., 1973; Niebuhr i col., 1974; Williams i col., 1975; Wahrman i col., 1976; Poissonnier i col., 1976; Raoul i col., 1976; Sinet i col., 1976; Pfeiffer i col., 1977; Cantu i col., 1980; Mattei i col., 1981; Pellissier i col., 1988; McCormick i col., 1989; Rahmani i col., 1989; Korenberg i col., 1990 i 1994; Delabar i col., 1993; Daumer-Haas i col., 1994, Nadal i col. 1996; 1997 i 2000). Dins del marc de la defensa de la hipòtesi de Hall, Shapiro també planteja errors conceptuals, per nosaltres, probablement, només lèxics.

Segons Shapiro (1997, 2000), en primer lloc cal recordar que, donat que encara no s'ha trobat la implicació directa de cap dels gens identificats al HSA21 amb cap de les manifestacions clíniques de la SD, és inadequat parlar de penetració i d'expressivitat, ja que aquests dos termes es refereixen a la funció d'un determinat gen i no al contingut genètic d'un segment cromosòmic. D'altra banda, tampoc no resulta del tot legítim parlar de "Regió crítica" quan es defineixen diverses regions d'un mateix cromosoma. "Regió crítica", en sentit estricte, es refereix a aquella regió mínima de gens que, en trisomia en aquest cas, causen el fenotip final, i per a la SD es parla gairebé de tot el braç llarg del HSA21. També, segons aquest autor, és qüestionable la voluntat d'assignar a un determinat gen o grup de gens un conjunt d'alteracions del fenotip que, en cap cas, és exclusiu de la SD, al contrari, per separat, totes les alteracions es troben en altres anomalies cromosòmiques. És per aquest motiu també que tampoc no és estrictament correcte parlar de "mapa fenotípic". Finalment, parlar de la SD com una "síndrome de gens contigus" (Korenberg i col., 1994) quan el significat d'aquesta expressió es refereix a determinades manifestacions causades per microdeleció i (de manera teòrica) microduplicació de dos o més loci consecutius que resulten en diversos efectes fenotípics, no seria tampoc aplicable a la SD. Per fer aquestes darreres afirmacions, Shapiro es basa en el cas descrit per Daumer-

Haas (i la pròpia J. Korenberg) (1994) d'una tetrasomia parcial del HSA21 i fenotip de SD que exclou justament tots els marcadors inclosos al mapa fenotípic de Korenberg. Això qüestiona, doncs, la presumpció d'una síndrome de gens contigus i de que determinats loci configuren la majoria de les alteracions descrites en la SD. Segons la hipòtesi defensada per Shapiro, el fenotip de la SD seria la conseqüència de la interacció dels productes gènics en excés durant el procés de desenvolupament. És a dir, no seria la sobreexpressió de determinats gens el que causaria el fenotip de la SD, sinó l'excés de material genètic durant el desenvolupament. L'autor es basa en què totes les aneuploïdies comparteixen trets fenotípics i excés de material genètic, però el que no explica, és perquè la SD s'associa a un fenotip tan clarament distingible del d'altres aneuploïdies.

Des de mitjans dels anys 70 s'està intentant trobar un segment concret del HSA21 que, en trisomia, sigui responsable de totes les manifestacions clíniques de la SD. La idea inicial es basa en el fet que regions cromosòmiques riques en gens, estan associades citogenèticament a bandes G negatives. En aquest cas, el HSA21 tindria al voltant de la banda 21q22, una regió rica en gens. Concretament, s'havia arribat a definir la regió al voltant del marcador *D21S55* com aquella que contindria la majoria dels gens que, en triple dosi, causarien el fenotip de SD. Després, tal com s'ha documentat tant en la *Introducció* com en aquesta mateixa secció, aquesta hipòtesi va anar perdent força a favor d'aquella que postula que no hi ha una regió única, sinó que hi hauria diverses regions a tot el braç llarg del HSA21 que participarien al fenotip final de la SD i que, per tant, cap gen del HSA21, independentment de la seva localització, queda descartat per a contribuir al fenotip SD.

En resposta a Shapiro, cal dir que parlar de "penetració" i d'"expressivitat" per a referir-se a la presència o absència d'una determinada manifestació clínica, potser sí que no és estrictament correcte però en cap cas no es fan servir aquests dos termes per a referir-se a un determinat gen. Pel que fa a l'anomenat "mapa fenotípic" que considera diverses regions del HSA21 com a directament responsables de determinades manifestacions clíniques, definida de manera explícita per Korenberg (1994) com "la definició molecular d'una regió física que presumiblement conté el o els gens la sobreexpressió dels quals és finalment responsable de part del fenotip", penso que en base a aquesta definició, sí que

l'expressió "mapa fenotípic" és legítima. Finalment, si s'entén que el que es busca són regions cromosòmiques que continguin gens contigus la triple dosi dels quals sigui responsable d'un fenotip determinat, es pot entendre que es pugui parlar de la SD com una síndrome de gens contigus. D'aquesta manera, pensem que en part, tot pot ser un problema lèxic i, en això estem d'acord amb Shapiro, si es fa servir una terminologia que no és totalment estricta, cal especificar-ho.

Si bé és cert que tots els trets clínics que es descriuen en la SD estan presents també en altres síndromes causades per aneuploïdies, també és cert que la combinació final d'aquests trets és específica de cada síndrome. Probablement, molt d'aquests trets clínics comuns, són un mateix resultat final de diferents alteracions (causades per gens en diferents cromosomes) que alteren una mateixa via de desenvolupament. També és cert que fins ara, degut a la limitació de les eines diagnòstiques, alteracions diferents han quedat englobades dins del mateix grup, com poden ser el retard mental o les alteracions cardíques. Cada vegada més, es poden distingir les diferències entre fenotips antigament classificats com iguals (Pritchard i Kola, 2000).

Pel que no hi ha una resposta satisfactòria és per aquells casos en què hi ha una trisomia del HSA21 i no hi ha fenotip de SD (Avramopoulos i col., 1997), ni per aquells en què, no havent-se detectat la trisomia del HSA21 en sang perifèrica ni en fibroblasts, el pacient té un fenotip indistingible de la SD (Petersen i col., 2000). Totes dues situacions es podrien explicar per un quimerisme de la trisomia en els diferents teixits: en el primer cas, la trisomia es podria perdre durant els estadis més inicials del desenvolupament sense afectar llinatges crucials, però sí ser detectada en sang perifèrica. També podria explicar-se aquest cas pel fet que el HSA21 extranumerari es trobés "inactivat" d'alguna manera o perquè existissin en la SD casos aïllats de fenocòpies. Una altra explicació seria l'existència de variants o inactivacions de les còpies addicionals de poc gens que serien responsables del fenotip SD. En el segon cas, hi podria haver dues explicacions possibles: o bé també hi ha un quimerisme que en aquest cas no afecta ni sang perifèrica ni fibroblasts, o bé hi ha una trisomia parcial críptica. En tots dos casos, caldria fer estudis de trisomia en altres teixits i un estudi molecular complert dels HSA21.

Els estudis de les trisomies parcials del HSA21 han de contribuir al coneixement global del HSA21 i tindran una participació important als estudis de la SD. Probablement, la clau de les manifestacions clíniques de la SD es trobarà així que es dilucidi quin és l'efecte de cadascun dels gens en triple dosi durant els processos embrionaris de morfogènesi i sobretot, quina és la interacció entre els productes gènics, excessius o no, de manera que es puguin trobar i definir les conseqüències finals en el pacient amb SD. Probablement la resposta no es trobarà només amb la informació continguda al HSA21, sinó que s'hauran de trobar les xarxes d'interacció entre molts dels gens del genoma i els seus productes, independentment del cromosoma on es trobin. Això pot acabar explicant les diferències de fenotip entre persones amb SD i un mateix tipus de trisomia del HSA21. Caldrà veure també quin efecte "tamponador" tenen alguns gens sobre d'altres gens o regions cromosòmiques en trisomia, tant durant els processos de desenvolupament, com en el decurs de la vida de la persona nascuda amb SD, i quin factor té més pes en el fenotip final, la sobreexpressió dels gens del HSA21 o la presència de material cromosòmic extra *per se*. En qualsevol cas, les crítiques de Shapiro no invaliden els plantejaments dels estudis de les trisomies parcials tal com s'ha fet aquí.

Quan es van iniciar els estudis i les caracteritzacions de les trisomies parcials en la SD l'any 1989, va semblar que això donaria la resposta a preguntes que d'altra manera, no es podrien respondre fins que el projecte de seqüenciació del HSA21 no estigués acabat i es conegués la funció de cadascun dels gens que el componen. Això, tal com queda reflectit en aquest treball, no ha estat així, principalment pel problema afegit de les penetracions de cadascuna de les manifestacions clíniques que componen aquesta síndrome. Si bé *a priori* ja se sabia que dins del grup de persones amb SD i trisomia regular del HSA21 hi havia una gran variabilitat en la incidència de determinades manifestacions clíniques i una diversitat interpersonal molt gran, s'esperava que els casos de trisomies parcials omplirien moltes de les llacunes del coneixement clínic i molecular d'aquesta síndrome. Tal com afirma S. Antonarakis (1998), els progressos han estat moltíssims i potser, a nivell genèric, la conclusió és que cada persona amb SD és diferent degut a la seva càrrega genètica particular. Una clau per veure si una trisomia del HSA21 produeix una sobreexpressió d'altres gens a tot el

genoma, l'hauran de donar els estudis de sobreexpressió de RNAs mitjançant la tècnica del SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) (Velculescu i col., 1995) o (potser més factible des del punt de vista tècnic), els estudis amb *microarrays* (Pinkel i col., 1998).

VALIDESA DELS MODELS MURINS EN L'ESTUDI DE LA SÍNDROME DE DOWN

Una altra pregunta que cal fer-se és si el ratolí és un bon model per als estudis de la SD i si les conclusions que es treuen de les alteracions dels models murins són extrapolables a l'espècie humana. Aquesta pregunta ja va sorgir així que els estudis en models murins es van començar a publicar. Els avantatges i els inconvenients que comporta treballar amb models murins han estat plenament discutits, però cal tenir en compte que per a l'estudi de determinats aspectes de la síndrome –especialment perquè moltes de les conseqüències de les aneuploidies als humans es donen durant el període de la morfogènesi- el ratolí suposa, si més no, un model vàlid ja que conserva regions cromosòmiques de mida considerable amb gens que es conserven intactes i estructuralment similars entre els humans i els ratolins (Nadeau i col., 1984). Un altre avantatge és que existeix un mapa de sintènia molt complert entre totes dues espècies (<http://www.jax.com/>)

L'estudi del retard mental en la SD suposa un desafiament a tots els nivells ja que les anomalies que s'han descrit a les àrees cognitives, com són les deficiències que impliquen alteracions en la memòria a curt termini i una incapacitat per als processos globals, són molt diferents de les que es troben en altres aneuploidies, com per exemple la síndrome de Williams (Paterson i col., 1999). Els estudis en models animals per a la SD de Reeves, Holtzman i Escorihuela potser poden respondre algunes d'aquestes preguntes. La informació que està aportant l'estudi de les alteracions dels models animals transgènics de sobreexpressió (Tg *SOD1*, Tg *Ets2*, Tg *Sim2* i Tg *DYRK1A*, entre d'altres), és molt important per a arribar a conèixer la funció d'aquests gens del HSA21 i la seva contribució al fenotip de la SD i recolzen la hipòtesi de l'efecte de dosi discutida anteriorment. Les eines de les quals es disposa a nivell de definició fenotípica són

avui prou bones com per a definir molt bé quines són les alteracions morfològiques en cadascuna de les àrees cerebrals i establir conseqüències funcionals en aspectes cognitius concrets. Pel que fa a les altres característiques clíniques de la SD, l'avenç en les eines diagnòstiques també ha estat notable de manera que, per exemple, les cardiopaties es poden definir molt millor. Una dada important obtinguda del model murí Ts65Dn és que no presenta cardiopatia (Davisson i col., 1987). D'altra banda, la comparació entre aquest model i el trisòmic parcial Ts108Cje, indica que existeixen diferències entre els dèficits cognitius que presenten els dos models.

La informació que ja estan donant els models murins de sobreexpressió de gens del HSA21 és valuosíssima per a entendre la funció de tots aquests gens i el paper que juguen en els processos de desenvolupament, tant prenatals com postnatals. El creuament entre els diferents models modificades genèticament per a l'estudi de la SD, serà una font molt important d'informació fenotípica i per als assajos terapèutics. Finalment, els models murins de la SD han permès constatar que l'impacte fenotípic que presenten depèn del seu fons genètic. Això podria donar arguments per a explicar la variabilitat fenotípica que es troba en els pacients amb SD.

PERSPECTIVES DE FUTUR DELS ESTUDIS DE LES TRISOMIES PARCIALES DEL CROMOSOMA 21

Aquest any en fa quaranta-un que es va trobar l'associació entre la trisomia del HSA21 i la SD (Lejeune, 1959; Jacobs, 1959). Des de llavors, els avenços en el coneixement tant de les característiques de la pròpia síndrome com, sobretot, del HSA21, han estat remarcables. Potser ara que la seqüència nucleotídica d'aquest cromosoma s'ha enllestit i que és a l'abast de tothom, que es disposa de mapes precisos i que es coneixen ja uns quants casos de trisomies parcials del HSA21 ben caracteritzats, seria un bon moment per a fer una integració de totes les dades acumulades. D'aquesta manera, de tota la informació recollida en podria sorgir la resposta a moltes de les qüestions que queden per resoldre, algunes de les quals han quedat paleses en aquest treball.

Considerem que una informació molt important per a la correlació genotip/fenotip en la SD, la donaran els casos de monosomies parcials del HSA21, ja que aquests casos han de contribuir a dilucidar la funció de cadascun dels gens del HSA21. Això no serà senzill, tal com passa per exemple en el cas del gen *PMP22*, la sobreexpressió del qual causa la malaltia de Charcot-Marie Tooth, mentre que la pèrdua de la seva funció per deleció produeix la Neuropatia Hereditària de Paràlisi per Pressió o HNPP. Serà molt vàlida la troballa de mutacions puntuals en gens del HSA21 i la seva associació a determinades malalties, perquè donaran una informació addicional sobre la possible funció dels gens *in vivo*. En aquest camp els progressos són també remarcables i fins ara han estat la clau per a determinar la implicació en determinades malalties de gens com el gen *AIRE* que causa la malaltia APECED, el gen *SOD1* associat a l'esclerosi lateral amiotròfica familiar, del gen *CBS* associat a l'homocistinúria, l'*AML1* interromput per translocació en alguns casos de leucèmia amiloide o de l'*APP* associat a formes familiars de la malaltia d'Alzheimer, entre d'altres gens i malalties.

Un altre aspecte que cal tenir en compte quan es valoren els estudis de les trisomies parcials del HSA21, és l'assessorament genètic que permet oferir a les famílies. Cal tenir present que els reordenaments cromosòmics són, sovint, d'origen familiar i que la seva caracterització és indispensable per a poder oferir assessorament genètic a les famílies afectades. Aquesta raó ja és suficient per a justificar els esforços dedicats a l'estudi de les trisomies parcials del HSA21.

Conclusions

. L'estudi de trisomies parcials del HSA21, mitjançant FISH i utilitzant sondes de tipus YAC, és una estratègia ràpida i eficient que, malgrat les limitacions de resolució, presenta avantatges respecte estratègies estrictament moleculars.

. La caracterització dels punts de trencament al HSA21 en casos de trisomia parcial i SD, juntament amb els estudis clínics detallats, és una aproximació necessària per a establir correlacions entre el genotip i el fenotip, fins que no es desenvolupin mètodes basats en microxips del HSA21.

. Els gens *DSCR1* i *DYRK1A* mapen al HSA21, a les bandes 21q22.1-22.2, essent el primer més centromèric que el segon.

. Els mapes fenotípics de la SD defineixen regions cromosòmiques molt àmplies, que poden ser restringides amb la caracterització detallada de nous casos de SD deguts a trisomia parcial del HSA21:

- La llengua escrotal mapa a la regió del HSA21 compresa entre el centròmer i el marcador *D21S302*.
- L'estenosi duodenal queda restringida a la regió compresa entre els marcadors *D21S59* i *D21S302*.
- La dosi euploide del gen *APP* en tots els casos estudiats, confirma que per a l'aparició de la malaltia d'Alzheimer, aquest gen ha d'estar en trisomia.

. La majoria dels casos de SD i trisomia parcial del HSA21, presenten la regió 22q22.1-qter en trisomia, lloc on es concentren el major nombre de manifestacions clíniques i de gens.

. Les discordances en les correlacions entre el genotip i el fenotip, probablement s'explicaran per l'efecte redundat de gens de la mateixa família al genoma, pel fet que un mateix tret fenotípic estigui causat per la sobreexpressió de diversos gens del HSA21, i per les conseqüències de la sobreexpressió de gens sobre el global del genoma, amb diferències a nivell individual.

- . La detecció i caracterització de trisomies parcials del HSA21 en casos de SD, és indispensable per a l'assessorament genètic.
- . Els gens *Dscr1* i *Dyrk1A* mapen al MMU16 i es troben en trisomia al ratolí Ts65Dn.
- . El tipatge de ratolins Ts65Dn mitjançant FISH en improntes, representa una alternativa al cariotipatge clàssic i té l'avantatge respecte aquest, que no necessita cap cultiu cel.lular, essent possible tipar teixits, embrions i nounats.
- . L'estudi mitjançant FISH de la incorporació de transgens en ratolins transgènics de sobreexpressió, permet la seva localització cromosòmica i determinar-ne el nombre de llocs d'inserció.

Bibliografia

(Groner, 1995)
(Klever et al., 1991)
(Puri, 1981)
(Fishler et al., 1976)
(Thuline and Pueschel, 1982)
(Nadal et al., 2000)
(Morton, 1991)
(Hook and al., 1979)
(Hall, 1966)
(Montero et al., 1996)
(Friedman and Child, 1998)
(Polani, 1960)
(Barbi et al., 2000)
(Gearhart et al., 1986)
(Klever, 1991)
(Guimera et al., 1997)
(Smith et al., 1995)
(Tomizuka et al., 1997)
(Velculescu et al., 1995)
(Korenberg et al., 1992)
(Pucharcos et al., 1999)
(Smith et al., 1997)
(Ema et al., 1999)
(Gerlai et al., 1994)
(Smith et al., 1995)
(Greig and Willard, 1992)
(Guimera et al., 1999)
(Guimera et al., 1996)
(Cavani et al., 1998)
(Jackson et al., 1976)
(Buchin et al., 1986)
(Epstein et al., 1991)
(Avramopoulos et al., 1997)
(Ahlbom et al., 1996)
(Korenberg et al., 1995)
(Hernandez and Fisher, 1996)
(Pueschel et al., 1991)
(Wisniewski et al., 1996)
(Raz et al., 1995)
(Logdberg and Brun, 1993)
(Wang et al., 1992)
(Freeman et al., 1998)
(Lie et al., 1996)
(Niikawa et al., 1991)
(Shen et al., 1995)
(Van Duijn et al., 1994)
(Saunders et al., 1993)
(Goate et al., 1991)
(Potter, 1991)
(Robinson et al., 1994)
(Lamb et al., 1997)
(Hawley et al., 1994)
(Avramopoulos et al., 1996)
(Blanco et al., 1998)

(Fuentes et al., 1995)
(Fuentes et al., 1997)
(Delabar et al., 1993)
(Korenberg et al., 1994)
(Nadeau and Taylor, 1984)
(Davisson et al., 1990)
(Cox et al., 1984)
(Davisson et al., 1993)
(Escorihuela et al., 1995)
(Reeves et al., 1995)
(Holtzman et al., 1996)
(Escorihuela et al., 1998)
(Dierssen et al., 1997)
(Insausti et al., 1998)
(Sago et al., 1998)
(Epstein et al., 1987)
(Sumarsono et al., 1996)
(Elson et al., 1994)
(Elson et al., 1994)
(St George-Hyslop et al., 1987)
(Neve et al., 1988)
(Rumble et al., 1989)
(Goldgaber et al., 1987)
(Kang et al., 1987)
(Robakis et al., 1987)
(Tanzi et al., 1987)
(Heston and Mastri, 1977)
(Heston et al., 1981)
(Rowe et al., 1989)
(Shapiro, 1989)
(Pagon et al., 1979)
(Ford, 1981)
(Giraud and Mattei, 1975)
(Richards, 1974)
(Carlin et al., 1978)
(Taysi et al., 1970)
(Uchida and Whelan, 1980)
(Wilson et al., 1980)
(Kohn et al., 1970)
(Hook, 1983)
(Wisniewski, 1990)
(Aase et al., 1973)
(Walby and Schuknecht, 1984)
(Harada and Sando, 1981)
(Puri, 1981)
(Friedman and Heiferman, 1982)
(Ugazio et al., 1990)
(Madden et al., 1976)
(Oster et al., 1975)
(Levin, 1987)
(Slordahl et al., 1993)
(Peeters and Poon, 1987)
(Strittmatter et al., 1993)
(Chartier-Harlin et al., 1994)
(Corder et al., 1994)

(van Duijn et al., 1995)
(Olson and Shaw, 1969)
(Glenner and Wong, 1984)
(Prasher et al., 1998)
(Giraud and Mattei, 1975)
(Page et al., 1996)
(Hook and Liss, 1982)
(Antonarakis et al., 1990)
(Jalbert et al., 1980)
(Fryns and van den Berghe, 1979)
(Fryns et al., 1986)
(Richards, 1974)
(Taysi et al., 1970)
(Uchida and Whelan, 1980)
(Wilson et al., 1980)
(Kohn et al., 1970)
(Carlin et al., 1978)
(Hook, 1983)
(Blanco et al., 1996)
(Choo, 1990)
(Hansson and Mikkelsen, 1978)
(Jackson and Gurley, 1985)
(Cox et al., 1990)
(Burmeister et al., 1991)
(Laurie and Hulten, 1985)
(McInnis et al., 1993)
(Bosch et al., 1994)
(Buetow et al., 1994)
(Gyapay et al., 1994)
(Nizetic et al., 1991)
(Cox et al., 1994)
(Chumakov et al., 1992)
(Schlessinger, 1990)
(Lovett et al., 1991)
(Buckler et al., 1991)
(Estivill and Williamson, 1987)
(Sargent and Bennett, 1990)
(Niebuhr, 1974)
(McCormick et al., 1989)
(Pinkel et al., 1986)
(McClure et al., 1969)
(Games et al., 1995)
(Hsiao et al., 1996)
(Sturchler-Pierrat et al., 1997)
(Chumakov et al., 1992)
(Chumakov et al., 1992)
(Heslop-Harrison et al., 1992)
(Bosch et al., 1996)
(Raziuddin et al., 1984)
(Saiki et al., 1988)
(Kelly et al., 1970)
(Selleri et al., 1991)
(Heslop-Harrison et al., 1992)
(Tagle et al., 1992)
(Overhauser and Radic, 1987)

(Down, 1866)
(Jacobs et al., 1959)
(Lejeune et al., 1959)
(Bishop et al., 1997)
(Hook et al., 1999)
(Nadal et al., 1996)
(Nadal et al., 1997)
(Miller, 1970)
(Evans and Steward, 1972)
(Shapiro, 1997)
(Daumer-Haas et al., 1994)
(Antonarakis, 1998)
(Nadeau and Taylor, 1984)
(Reeves et al., 1995)
(Holtzman et al., 1995)
(Escorihuela et al., 1995)
(Farrer et al., 1997)
(Knox and Bense, 1972)
(Peeters and Poon, 1987)
(Lamb et al., 1996)
(Korenberg et al., 1995)
(Patterson et al., 1993)
(Patterson, 1991)
(Elson et al., 1994)
(Petersen et al., 1991)
(Antonarakis et al., 1990)
(Sherman et al., 1991)
(Thase, 1982)
(Fryers, 1986)
(Rarick and Seefeldt, 1974)
(Motte and Williams, 1989)
(Ferrer and Gullotta, 1990)
(Becker et al., 1986)
(Marin-Padilla, 1976)
(Morris et al., 1982)
(Melyn and White, 1973)
(Rex and Preus, 1982)
(Hestnes et al., 1991)
(Fischer-Brandies, 1988)
(Reed, 1991)
(Crome et al., 1966)
(Shah, 1979)
(Mann and Esiri, 1989)
(Spicer, 1984)
(Gordon, 1990)
(Fabia and Drolette, 1970)
(Garrod, 1894)
(Rowley, 1981)
(Seibel et al., 1984)
(Karttunen et al., 1984)
(Niikawa, 1996)
(Cavani et al., 1998)
(Carter, 1858)
(Rowe and Uchida, 1961)
(Alzheimer, 1907)

- (Meng et al., 1998)
(Kainulainen et al., 1990)
(Ruiz-Perez et al., 2000)
(Russell et al., 1996)
(Li et al., 1997)
(Basson et al., 1997)
(Witt et al., 1999)
(Brown et al., 2000)
(Sherman et al., 1994)
(Burn et al., 1995)
(Pinkel et al., 1998)
(Antonarakis et al., 1992)
(Robinson and Neglia, 1987)
(Jacobs et al., 1978)
(Fort et al., 1984)
(Peeters and Poon, 1987)
(Pueschel, 1982)
(Johannisson et al., 1983)
(Epstein, 1995)
[Korenberg, 1995 #2285]
(Levy, 1991)
(Garver et al., 1985)
(Fabia and Drolette, 1970)
(Navarro-López, 1995)
(Wilson et al., 1993)
(Flórez, 1991)
(Flórez, 1992)
(Wisniewski et al., 1996)
(St George-Hyslop et al., 1987)
(Ford, 1981)
(Pagon et al., 1979)
(Gardiner et al., 1988)
(Andrle et al., 1979)
(Epstein et al., 1991)
(Hernandez et al., 1999)
(Tagle and Collins, 1992)
(Leicht et al., 1994)
(de la Fuente et al., 1999)
(Therman et al., 1989)
(Koehler et al., 1996)
(Henderson et al., 1972)
(Choo et al., 1988)
(Vissel and Choo, 1992)
(Nizetic et al., 1994)
(Korenberg et al., 1995)
(Wang et al., 1999)
(Drwinga et al., 1993)
(Davisson and Akeson, 1987)
(Cuckle and Sehmi, 1999)
(Wilson et al., 1992)
(Paterson et al., 1999)
(Solans et al., 2000)
(Wahrman et al., 1976)
(Aula et al., 1973)
(Niebuhr, 1974)

- (Williams et al., 1975)
- (Poissonnier et al., 1976)
- (Raoul et al., 1976)
- (Sinet et al., 1976)
- (Pfeiffer et al., 1977)
- (Cantu et al., 1980)
- (Mattei et al., 1981)
- (Pellissier et al., 1988)
- (McCormick et al., 1989)
- (Rahmani et al., 1989)
- (Korenberg et al., 1990)
- (Abe et al., 1989)
- (Hill et al., 1991)
- (Shapiro, 2000)
- (Shapiro, 1971)
- (Shapiro, 1975)
- (Shapiro, 1983)
- (Shapiro, 1989)
- (Shapiro, 1997)
- (Shapiro, 1999)
- (Pritchard and Kola, 2000)
- (Price et al., 1986)
- (Serés-Santamaria et al., 1999)
- (Nee et al., 1987)
- (Wisniewski and Wrzolek, 1988)
- (Zipursky et al., 1987)
- (Krivit and Good, 1957)
- (Robinson and Neglia, 1987)
- (Dickson, 1997)
- (Goedert et al., 1992)
- (Lue et al., 1996)
- (Rogers et al., 1996)
- (Levy-Lahad et al., 1995)
- (Sherrington et al., 1995)
- (Fuentes et al., 2000)
- (Solans et al., 2000)
- (Hattori et al., 2000)
- (Jaeken and Berghe, 1984)
- (Brodsky et al., 1997)
- (Velculescu et al., 1995)
- (Gerlai et al., 1994)
- (Ema et al., 1999)
- (Tomizuka et al., 1997)
- (Smith et al., 1995)
- (Smith et al., 1997)
- (Megias et al., 1997)

- Aase, J. M., Wilson, A. C., and Smith, D. W. (1973). Small ears in Down's syndrome: a helpful diagnostic aid. *J Pediatr* 82, 845-7.
- Abe, K., Kajii, T., and Niikawa, N. (1989). Disomic homozygosity in 21-trisomic cells: a mechanism responsible for transient myeloproliferative syndrome. *Hum Genet* 82, 313-316.
- Ahlbom, B. E., Goetz, P., Korenberg, J. R., Pettersson, U., Seemanova, E., Wadelius, C., Zech, L., and Anneren, G. (1996). Molecular analysis of chromosome 21 in a patient with a phenotype of Down syndrome and apparently normal karyotype. *Am J Med Genet* 63, 566-72.
- Alzheimer, A. (1907). Uber eine eigernartige erkrankung der hirnrinde. *Allg S Psychiatr* 64, 146-8.
- Andrle, M., Fiedler, W., Rett, A., Ambros, P., and Schweizer, D. (1979). A case of trisomy 22 in Pongo pygmaeus. *Cytogenet Cell Genet* 24, 1-6.
- Antonarakis, S. E. (1998). 10 years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics* 51, 1-16.
- Antonarakis, S. E., Adelsberger, P. A., Petersen, M. B., Binkert, F., and Schinzel, A. A. (1990). Analysis of DNA polymorphisms suggests that most de novo dup(21q) chromosomes in patients with Down syndrome are isochromosomes and not translocations. *Am J Hum Genet* 47, 968-72.
- Antonarakis, S. E., Petersen, M. B., McInnis, M. G., Adelsberger, P. A., Schinzel, A. A., Binkert, F., Pangalos, C., Raoul, O., Slaugenhaupt, S. A., Hafez, M., and et al. (1992). The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 50, 544-50.
- Aula, P., Leisti, J., and Koskull, H. v. (1973). Partial trisomy 21. *Clin Genet* 4, 241-51.
- Avramopoulos, D., Kennerknecht, I., Barbi, G., Eckert, D., Delabar, J. M., Maunoury, C., Hallberg, A., and Petersen, M. B. (1997). A case of apparent trisomy 21 without the Down's syndrome phenotype. *J Med Genet* 34, 597-600.
- Avramopoulos, D., Mikkelsen, M., Vassilopoulos, D., Grigoriadou, M., and Petersen, M. B. (1996). Apolipoprotein E allele distribution in parents of Down's syndrome children. *Lancet* 347, 862-5.
- Barbi, G., Kennerknecht, G., Avramopoulos, D., Karadima, G., and Petersen, M. (2000). Mirror-symmetric duplicated chromosome 21q with minor proximal deletion, and with neocentromere in a child without the classical Down syndrome phenotype. *Am. J. Med. Genet* 91.

- Basson, C. T., Bachinsky, D. R., Lin, R. C., Levi, T., Elkins, J. A., Soultz, J., Grayzel, D., Kroumpouzou, E., Traill, T. A., Leblanc-Straceski, J., Renault, B., Kucherlapati, R., Seidman, J. G., and Seidman, C. E. (1997). Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome [published erratum appears in *Nat Genet* 1997 Apr;15(4):411. *Nat Genet* 15, 30-5.
- Becker, L. E., Armstrong, D. L., and Chan, F. (1986). Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann Neurol* 20, 520-6.
- Bishop, J., Huether, C. A., Torfs, C., Lorey, F., and Deddens, J. (1997). Epidemiologic study of Down syndrome in a racially diverse California population, 1989-1991. *Am J Epidemiol* 145, 134-47.
- Blanco, J., Egozcue, J., and Vidal, F. (1996). Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 11, 722-6.
- Blanco, J., Gabau, E., Gomez, D., Baena, N., Guitart, M., Egozcue, J., and Vidal, F. (1998). Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with a high prevalence of Down syndrome: increased incidence in cases of paternal origin. *Am J Hum Genet* 63, 1067-72.
- Bosch, A., Guimera, J., Pereira de Souza, A., and Estivill, X. (1994). The EUROGEN map of human chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 2, 244-5.
- Bosch, A., Guimera, J., Graw, S., Gardiner, K., Chumakov, I., Patterson, D., and Estivill, X. (1996). Integration of 30 CA-repeat markers into the cytogenetic, genetic and YAC maps of human chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 4, 135-42.
- Brodsky, G., Barnes, T., Bleskan, J., Becker, L., Cox, M., and Patterson, D. (1997). The human GARS-AIRS-GART gene encodes two proteins which are differentially expressed during human brain development and temporally overexpressed in cerebellum of individuals with Down syndrome. *Hum Mol Genet* 6, 2043-50.
- Brown, A. S., Feingold, E., Broman, K. W., and Sherman, S. L. (2000). Genome-wide variation in recombination in female meiosis: a risk factor for non-disjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* 9, 515-23.
- Buckler, A. J., Chang, D. D., Graw, S. L., Brook, J. D., Haber, D. A., Sharp, P. A., and Housman, D. E. (1991). Exon amplification: a strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4005-9.
- Buchin, P. J., Levy, J. S., and Schullinger, J. N. (1986). Down's syndrome and the gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol* 8, 111-4.

- Buetow, K. H., Ludwigsen, S., Scherpbier-Heddema, T., Quillen, J., Murray, J. C., Sheffield, V. C., Duyk, G. M., Weber, J. L., Weissenbach, J., Gyapay, G., and et al. (1994). Human genetic map. *Genome maps V. Wall chart. Science* 265, 2055-70.
- Burmeister, M., Kim, S., Price, E. R., de Lange, T., Tantravahi, U., Myers, R. M., and Cox, D. R. (1991). A map of the distal region of the long arm of human chromosome 21 constructed by radiation hybrid mapping and pulsed-field gel electrophoresis. *Genomics* 9, 19-30.
- Burn, J., Wilson, D., Cross, I., Atif, U., Scambler, P., Takao, A., and Goodship, J. (1995). The clinical significance of 22q11 deletion. In *Developmental mechanisms of heart disease*, E. Clark, R. Markwald and A. Takao, eds. (Armonk, New York: Futura), pp. 559-67.
- Cantu, J. M., Hernandez, A., Plascencia, L., Vaca, G., Moller, M., and Rivera, H. (1980). Partial trisomy and monosomy 21 in an infant with an unusual de novo 21/21 translocation. *Ann Genet* 23, 183-6.
- Carlin, M. E., Leon, S., and Gilbert, J. D. (1978). A comparison between a trisomy 21 child (probably mosaic) with normal intelligence and a mosaic Down syndrome population. *Birth Defects Orig Artic Ser* 14, 327-41.
- Carter, C. (1858). A life table for mongols with the causes of death. *J Ment Defic Res* 2, 64.
- Cavani, S., Perfumo, C., Argusti, A., Pierluigi, M., Perroni, L., Schmiegelow, K., Petersen, M. B., Cotter, F. E., Strigini, P., Dagna-Bricarelli, F., and Nizetic, D. (1998). Cytogenetic and molecular study of 32 Down syndrome families: potential leukaemia predisposing role of the most proximal segment of chromosome 21q. *Br J Haematol* 103, 213-6.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Risch, N. J., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Jr., Rimmler, J. B., Locke, P. A., Conneally, P. M., Schmechel, K. E., and et al. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7, 180-4.
- Cox, D. R., Smith, S. A., Epstein, L. B., and Epstein, C. J. (1984). Mouse trisomy 16 as an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome): production of viable trisomy 16 diploid mouse chimeras. *Dev Biol* 101, 416-24.
- Cox, D. R., Burmeister, M., Price, E. R., Kim, S., and Myers, R. M. (1990). Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. *Science* 250, 245-50.
- Cox, D. R., Green, E. D., Lander, E. S., Cohen, D., and Myers, R. M. (1994). Assessing mapping progress in the Human Genome Project. *Science* 265, 2031-2.

Crome, L., Cowie, V., and Slater, E. (1966). A statistical note of cerebellar and brain stem weight in mongolism. *J Ment Defic Res* 10, 69.

Cuckle, H., and Sehmi, I. (1999). Calculating correct Down's syndrome risks. *Br J Obstet Gynaecol* 106, 371-2.

Chartier-Harlin, M. C., Parfitt, M., Legrain, S., Perez-Tur, J., Brousseau, T., Evans, A., Berr, C., Vidal, O., Roques, P., Gourlet, V., and et al. (1994). Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet* 3, 569-74.

Choo, K. H., Vissel, B., Brown, R., Filby, R. G., and Earle, E. (1988). Homologous alpha satellite sequences on human acrocentric chromosomes with selectivity for chromosomes 13, 14 and 21: implications for recombination between nonhomologues and Robertsonian translocations. *Nucleic Acids Res* 16, 1273-84.

Choo, K. H. (1990). Role of acrocentric cen-pter satellite DNA in Robertsonian translocation and chromosomal non-disjunction. *Mol Biol Med* 7, 437-49.

Chumakov, I., Rigault, P., Guillou, S., Ougen, P., Billaut, A., Guasconi, G., Gervy, P., LeGall, I., Soularue, P., Grinas, L., and et al. (1992a). Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q. *Nature* 359, 380-7.

Chumakov, I., Le Gall, I., Billaut, A., Ougen, P., Soularue, P., Guillou, S., Rigault, P., Bui, H., De Tand, M. F., Barillot, E., and et al. (1992b). Isolation of chromosome 21-specific yeast artificial chromosomes from a total human genome library. *Nat Genet* 1, 222-5.

Daumer-Haas, C., Schuffenhauer, S., Walther, J. U., Schipper, R. D., Porstmann, T., and Korenberg, J. R. (1994). Tetrasomy 21 pter-->q22.1 and Down syndrome: molecular definition of the region. *Am J Med Genet* 53, 359-65.

Davisson, M. T., and Akeson, E. C. (1987). An improved method for preparing G-banded chromosomes from mouse peripheral blood [published erratum appears in *Cytogenet Cell Genet* 1988;48(3):192]. *Cytogenet Cell Genet* 45, 70-4.

Davisson, M. T., Schmidt, C., and Akeson, E. C. (1990). Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 360, 263-80.

Davisson, M. T., Schmidt, C., Reeves, R. H., Irving, N. G., Akeson, E. C., Harris, B. S., and Bronson, R. T. (1993). Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 384, 117-33.

de la Fuente, M. A., Tovar, V., Pizcueta, P., Nadal, M., Bosch, J., and Engel, P. (1999). Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of the mouse

homologue of CD84, a member of the CD2 family of cell surface molecules. *Immunogenetics* 49, 249-55.

Delabar, J. M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J. L., Prieur, M., Noel, B., and Sinet, P. M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 1, 114-24.

Dickson, D. (1997). Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol Aging* 18, S21-6.

Dierssen, M., Vallina, I. F., Baamonde, C., Garcia-Calatayud, S., Lumbreras, M. A., and Florez, J. (1997). Alterations of central noradrenergic transmission in Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Brain Res* 749, 238-44.

Down, J. (1866). Observations of an ethnic classification of idiots. *Clinical Lectures and Reports by the Medical and Surgical Staff of the London Hospital* 3, 259-62.

Drwinga, H. L., Toji, L. H., Kim, C. H., Greene, A. E., and Mulivor, R. A. (1993). NIGMS human/rodent somatic cell hybrid mapping panels 1 and 2. *Genomics* 16, 311-4.

Elson, A., Levanon, D., Weiss, Y., and Groner, Y. (1994a). Overexpression of liver-type phosphofructokinase (PFKL) in transgenic- PFKL mice: implication for gene dosage in trisomy 21. *Biochem J* 299, 409-15.

Elson, A., Weiss, Y., and Groner, Y. (1994b). Protein kinase C (PKC) level is increased in PC12 cells overexpressing transfected liver-type phosphofructokinase. *Biol Cell* 81, 23-9.

Ema, M., Ikegami, S., Hosoya, T., Mimura, J., Ohtani, H., Nakao, K., Inokuchi, K., Katsuki, M., and Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Mild impairment of learning and memory in mice overexpressing the mSim2 gene located on chromosome 16: an animal model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* 8, 1409-15.

Epstein, C. J., Avraham, K. B., Lovett, M., Smith, S., Elroy-Stein, O., Rotman, G., Bry, C., and Groner, Y. (1987). Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity: animal model of dosage effects in Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8044-8.

Epstein, C. J., Korenberg, J. R., Anneren, G., Antonarakis, S. E., Ayme, S., Courchesne, E., Epstein, L. B., Fowler, A., Groner, Y., Huret, J. L., and et al. (1991a). Protocols to establish genotype-phenotype correlations in Down syndrome. *Am J Hum Genet* 49, 207-35.

Epstein, C. J., Foster, D. B., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1991b). Acceleration of scrapie in trisomy 16---diploid aggregation chimeras. *Ann Neurol* 29, 95-7.

- Epstein, C. (1995). Down syndrome (Trisomy 21). In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, A. B. CR Scriver, WS Sly and D Valle, ed. (New York: MacGraw-Hill), pp. 749-94.
- Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., Vallina, I. F., Baamonde, C., Lumbreras, M. A., Dierssen, M., Tobena, A., and Florez, J. (1995). A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci Lett* 199, 143-6.
- Escorihuela, R. M., Vallina, I. F., Martinez-Cue, C., Baamonde, C., Dierssen, M., Tobena, A., Florez, J., and Fernandez-Teruel, A. (1998). Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci Lett* 247, 171-4.
- Estivill, X., and Williamson, R. (1987). A rapid method to identify cosmids containing rare restriction sites. *Nucleic Acids Res* 15, 1415-25.
- Evans, D. K., and Steward, J. K. (1972). Down's syndrome and leukaemia. *Lancet* 2, 1322.
- Fabia, J., and Drolette, M. (1970). Malformations and leukaemia in children with Down's syndrome. *Pediatrics* 45, 60.
- Farrer, M. J., Crayton, L., Davies, G. E., Oliver, C., Powell, J., Holland, A. J., and Kessling, A. M. (1997). Allelic variability in D21S11, but not in APP or APOE, is associated with cognitive decline in Down syndrome. *Neuroreport* 8, 1645-9.
- Ferrer, I., and Gullotta, F. (1990). Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol* 79, 680-5.
- Fischer-Brandies, H. (1988). Cephalometric comparison between children with and without Down's syndrome. *Eur J Orthod* 10, 255-63.
- Fishler, K., Koch, R., and Donnell, G. N. (1976). Comparison of mental development in individuals with mosaic and trisomy 21 Down's syndrome. *Pediatrics* 58, 744.
- Flórez, J. (1991). Patología cerebral y aprendizaje en el síndrome de Down. In *Síndrome de Down y educación*, J. F. a. M. Troncoso, ed. (Barcelona: Masson), pp. 37-60.
- Flórez, J. (1992). Neurologic abnormalities. In *Biomedical concerns in persons with Down syndrome*, S. P. a. J. Pueschel, ed. (Baltimore: Paul H Brookes), pp. 159-73.
- Ford, C. E. (1981). Nondisjunction. *Hum Genet Suppl* 2, 103-43.
- Fort, P., Lifshitz, F., Bellisario, R., Davis, J., Lanes, R., Pugliese, M., Richmond, R., Post, E., and David, R. (1984). Abnormalities in thyroid function in infants with Down syndrome. *J Pediatr* 104, 545-9.

- Freeman, S. B., Taft, L. F., Dooley, K. J., Allran, K., Sherman, S. L., Hassold, T. J., Khoury, M. J., and Saker, D. M. (1998). Population-based study of congenital heart defects in Down syndrome. *Am J Med Genet* 80, 213-7.
- Friedman, W. F., and Heiferman, M. F. (1982). Clinical problems of postoperative pulmonary vascular disease. *Am J Cardiol* 50, 631-6.
- Friedman, W., and Child, J. (1998). Congenital heart disease in the adult. In *Harrison's principles of internal medicine* (New York: McGraw-Hill), pp. 235.
- Fryers, T. (1986). Survival in Down's syndrome. *J Ment Defic Res* 30, 101-10.
- Fryns, J. P., and van den Berghe, H. (1979). Possible excess of mental handicap and congenital malformations in autosomal reciprocal translocations. *Ann Genet* 22, 125-7.
- Fryns, J. P., Kleczkowska, A., Kubien, E., and Van den Berghe, H. (1986). Excess of mental retardation and/or congenital malformation in reciprocal translocations in man. *Hum Genet* 72, 1-8.
- Fuentes, J. J., Pritchard, M. A., Planas, A. M., Bosch, A., Ferrer, I., and Estivill, X. (1995). A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Hum Mol Genet* 4, 1935-44.
- Fuentes, J. J., Pucharcos, C., Pritchard, M., and Estivill, X. (1997). Alu-splice PCR: a simple method to isolate exon-containing fragments from cloned human genomic DNA. *Hum Genet* 101, 346-50.
- Fuentes, J., Genescà, E., Kingsbury, T., Cunningham, K., Pérez-Riba, M., Estivill, X., and Luna, S. d. l. (2000). DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Hum Mol Genet* 9, 1681-90.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., and et al. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-7.
- Gardiner, K., Watkins, P., Munke, M., Drabkin, H., Jones, C., and Patterson, D. (1988). Partial physical map of human chromosome 21. *Somat Cell Mol Genet* 14, 623-37.
- Garrod, A. (1894). On the association of cardiac malformations with other congenital defects. *St Barth Hosp Rep* 30, 53.
- Garver, K., Law, J., and Garver, B. (1985). Hirschprung disease: a genetic study. *Clin Genet* 28, 503.

- Gearhart, J., Davisson, M., and Oster-Granite, M. (1986). Autosomal aneuploidy in mice: Generation and developmental consequences. *Brain Res. Bull.* 16, 789-801.
- Gerlai, R., Marks, A., and Roder, J. (1994). T-maze spontaneous alternation rate is decreased in S100 beta transgenic mice. *Behav Neurosci* 108, 100-6.
- Giraud, F., and Mattei, J. F. (1975). [Epidemiological aspects of trisomy 21]. *J Genet Hum* 23 SUPPL, 1-30.
- Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122, 1131-5.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., and et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer disease. *Nature* 349, 704-6.
- Goedert, M., Spillantini, S., Cairns, N., and Crowther, R. (1992). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159-68.
- Goldgaber, D., Lerman, M. I., McBride, W. O., Saffiotti, U., and Gajdusek, D. C. (1987). Isolation, characterization, and chromosomal localization of human brain cDNA clones coding for the precursor of the amyloid of brain in Alzheimer's disease, Down's syndrome and aging. *J Neural Transm Suppl* 24, 23-8.
- Gordon, L. (1990). Cardiac conditions. In *Clinical perspectives in the management of Down syndrome*, L. D. Van Dyke DC, Heide F, van Duyne S, Soucek MJ, eds, ed. (New York: Springer-Verlag), pp. 55-71.
- Greig, G. M., and Willard, H. F. (1992). Beta satellite DNA: characterization and localization of two subfamilies from the distal and proximal short arms of the human acrocentric chromosomes. *Genomics* 12, 573-80.
- Groner, Y. (1995). Transgenic models for chromosome 21 gene dosage effects. *Prog Clin Biol Res* 393, 193-212.
- Guimera, J., Casas, C., Pucharcos, C., Solans, A., Domenech, A., Planas, A. M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., and Pritchard, M. A. (1996). A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum Mol Genet* 5, 1305-10.
- Guimera, J., Pucharcos, C., Domenech, A., Casas, C., Solans, A., Gallardo, T., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., and Pritchard, M. (1997). Cosmid contig and transcriptional map of

three regions of human chromosome 21q22: identification of 37 novel transcripts by direct selection. *Genomics* 45, 59-67.

Guimera, J., Casas, C., Estivill, X., and Pritchard, M. (1999). Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in down syndrome. *Genomics* 57, 407-18.

Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millasseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M., and Weissenbach, J. (1994). The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat Genet* 7, 246-339.

Hall, B. (1966). Mongolism in newborn infants. *Clin. Pediatr. (Phila.)* 5, 4.

Hansson, A., and Mikkelsen, M. (1978). The origin of the extra chromosome 21 in Down syndrome. Studies of fluorescent variants and satellite association in 26 informative families. *Cytogenet Cell Genet* 20, 194-203.

Harada, T., and Sando, I. (1981). Temporal bone histopathologic findings in Down's syndrome. *Arch Otolaryngol* 107, 96-103.

Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T. D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H. S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D. K., Soeda, E., Ohki, M., Takagi, T., Sakaki, Y., Taudien, S., Blechschmidt, K., Polley, A., Menzel, U., Delabar, J., Kumpf, K., Lehmann, R., Patterson, D., Reichwald, K., Rump, A., Schillhabel, M., and Schudy, A. (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. The chromosome 21 mapping and sequencing consortium. *Nature* 405, 311-9.

Hawley, R. S., Frazier, J. A., and Rasooly, R. (1994). Separation anxiety: the etiology of nondisjunction in flies and people. *Hum Mol Genet* 3, 1521-8.

Henderson, A. S., Warburton, D., and Atwood, K. C. (1972). Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 3394-8.

Hernandez, D., and Fisher, E. M. (1996). Down syndrome genetics: unravelling a multifactorial disorder. *Hum Mol Genet* 5, 1411-6.

Hernandez, D., Mee, P. J., Martin, J. E., Tybulewicz, V. L., and Fisher, E. M. (1999). Transchromosomal mouse embryonic stem cell lines and chimeric mice that contain freely segregating segments of human chromosome 21. *Hum Mol Genet* 8, 923-33.

Heslop-Harrison, J. S., Harrison, G. E., and Leitch, I. J. (1992). Reprobing of DNA:DNA in situ hybridization preparations. *Trends Genet* 8, 372-3.

Hestnes, A., Sand, T., and Fostad, K. (1991). Ocular findings in Down's syndrome. *J Ment Defic Res* 35, 194-203.

Heston, L. L., and Mastri, A. R. (1977). The genetics of Alzheimer's disease: associations with hematologic malignancy and Down's syndrome. *Arch Gen Psychiatry* 34, 976-81.

Heston, L. L., Mastri, A. R., Anderson, V. E., and White, J. (1981). Dementia of the Alzheimer type. Clinical genetics, natural history, and associated conditions. *Arch Gen Psychiatry* 38, 1085-90.

Hill, L., Rivel, D., Peterson, C., and Marchese, S. (1991). The transverse cerebellar diameter in the second trimester is unaffected by Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 164, 101-3.

Holtzman, D. M., Kilbridge, J., Chen, K. S., Rabin, J., Luche, R., Carlson, E., Epstein, C. J., and Mobley, W. C. (1995). Preliminary characterization of the central nervous system in partial trisomy 16 mice. *Prog Clin Biol Res* 393, 227-40.

Holtzman, D. M., Santucci, D., Kilbridge, J., Chua-Couzens, J., Fontana, D. J., Daniels, S. E., Johnson, R. M., Chen, K., Sun, Y., Carlson, E., Alleva, E., Epstein, C. J., and Mobley, W. C. (1996). Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13333-8.

Hook, E., and al., e. (1979). Differences in maternal age-specific rates of Down syndrome between Jews of European origin and North African or Asian origin. *Teratology* 20, 243-8.

Hook, E. B., and Liss, S. M. (1982). Age of ascertainment: an index of relative severity of cytogenetic conditions. *J Chronic Dis* 35, 207-9.

Hook, E. B. (1983a). Down syndrome rates and relaxed selection at older maternal ages. *Am J Hum Genet* 35, 1307-13.

Hook, E. B. (1983b). Chromosome abnormalities and spontaneous fetal death following amniocentesis: further data and associations with maternal age. *Am J Hum Genet* 35, 110-6.

Hook, E. B., Carothers, A. D., and Hecht, C. A. (1999). Elevated maternal age-specific rates of Down syndrome liveborn offspring of women of Mexican and Central American origin in California. *Prenat Diagn* 19, 245-51.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99-102.

Insausti, A. M., Megias, M., Crespo, D., Cruz-Orive, L. M., Dierssen, M., Vallina, T. F., Insausti, R., and Florez, J. (1998). Hippocampal volume and neuronal number in Ts65Dn mice: a murine model of Down syndrome. *Neurosci Lett* 253, 175-8.

- Jackson, J. F., North, E. R. d., and Thomas, J. G. (1976). Clinical diagnosis of Down's syndrome. *Clin Genet* 9, 483-7.
- Jackson, P. S., and Gurley, L. R. (1985). Analysis of nucleoproteins by direct injection of dissolved nuclei or chromosomes into a high-performance liquid chromatographic system. *J Chromatogr* 326, 199-216.
- Jacobs, P., Baikie, A., Court-Bourn, W., and Strong, J. (1959). The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet* *i*, 710-1.
- Jacobs, P., Burdash, N., Manos, J., and Duncan, R. (1978). Immunological parameters in Down's syndrome. *Ann Clin Lab Sci* 8, 17.
- Jaeken, J., and Berghe, G. V. d. (1984). An infantile autistic syndrome characterised by the presence of succinylpurines in body fluids. *Lancet* 2, 1058-61.
- Jalbert, P., Sele, B., and Jalbert, H. (1980). Reciprocal translocations: a way to predict the mode of imbalanced segregation by pachytene-diagram drawing. *Hum Genet* 55, 209-22.
- Johannisson, R., Gropp, A., Winking, H., Coerdts, W., Rehder, H., and Schwinger, E. (1983). Down's syndrome in the male: Reproductive pathology and meiotic studies. *Hum Genet* 63, 132.
- Kainulainen, K., Pulkkinen, L., Savolainen, A., Kaitila, I., and Peltonen, L. (1990). Location on chromosome 15 of the gene defect causing Marfan syndrome. *N Engl J Med* 323, 935-9.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-6.
- Karttunen, R., Nurmi, T., Ilonen, J., and Surcel, H.-M. (1984). Cell-mediated immunodeficiency in Down's syndrome: Normal IL-2 production but inverted ratio of T cell subsets. *Clin Exp Immunol* 55, 257.
- Kelly, R. B., Cozzarelli, N. R., Deutscher, M. P., Lehman, I. R., and Kornberg, A. (1970). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polymerase at a single strand break. *J Biol Chem* 245, 39-45.
- Klever, M., Grond-Ginsbach, C., Scherthan, H., and Schroeder-Kurth, T. M. (1991). Chromosomal in situ suppression hybridization after Giemsa banding. *Hum Genet* 86, 484-6.

Knox, G. E., and Benschel, R. W. t. (1972). Gastrointestinal malformations in Down's Syndrome. *Minn Med* 55, 542-4.

Koehler, K. E., Boulton, C. L., Collins, H. E., French, R. L., Herman, K. C., Lacefield, S. M., Madden, L. D., Schuetz, C. D., and Hawley, R. S. (1996). Spontaneous X chromosome MI and MII nondisjunction events in *Drosophila melanogaster* oocytes have different recombinational histories. *Nat Genet* 14, 406-14.

Kohn, G., Taysi, K., Atkins, T. E., and Mellman, W. J. (1970). Mosaic mongolism. I. Clinical correlations. *J Pediatr* 76, 874-9.

Korenberg, J. R., Kawashima, H., Pulst, S. M., Ikeuchi, T., Ogasawara, N., Yamamoto, K., Schonberg, S. A., West, R., Allen, L., Magesis, E., and et al. (1990). Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am J Hum Genet* 47, 236-46.

Korenberg, J. R., Bradley, C., and Disteché, C. M. (1992). Down syndrome: molecular mapping of the congenital heart disease and duodenal stenosis. *Am J Hum Genet* 50, 294-302.

Korenberg, J. R., Chen, X. N., Schipper, R., Sun, Z., Gonsky, R., Gerwehr, S., Carpenter, N., Daumer, C., Dignan, P., Disteché, C., and et al. (1994). Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4997-5001.

Korenberg, J. R., Chen, X. N., Mitchell, S., Fannin, S., Gerwehr, S., Cohen, D., and Chumakov, I. (1995). A high-fidelity physical map of human chromosome 21q in yeast artificial chromosomes. *Genome Res* 5, 427-43.

Krivit, W., and Good, R. (1957). Simultaneous occurrence of mongolism and leukaemia; report of a nationwide survey. *Am J Pediatrics* 94, 289-93.

Lamb, N. E., Freeman, S. B., Savage-Austin, A., Pettay, D., Taft, L., Hersey, J., Gu, Y., Shen, J., Saker, D., May, K. M., Avramopoulos, D., Petersen, M. B., Hallberg, A., Mikkelsen, M., Hassold, T. J., and Sherman, S. L. (1996). Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* 14, 400-5.

Lamb, N. E., Feingold, E., Savage, A., Avramopoulos, D., Freeman, S., Gu, Y., Hallberg, A., Hersey, J., Karadima, G., Pettay, D., Saker, D., Shen, J., Taft, L., Mikkelsen, M., Petersen, M. B., Hassold, T., and Sherman, S. L. (1997). Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* 6, 1391-9.

Laurie, D. A., and Hulten, M. A. (1985). Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann Hum Genet* 49, 203-14.

- Leicht, A., Schwarzacher, T., Jackson, D., and Leicht, I. (1994). Detection of the in situ hybridisation sites (Oxford: BIOS Scientific Publishers), pp. 68.
- Lejeune, J., Gautier, M., and Turpin, R. (1959). Etudes chromosomiques somatiques de neuf enfants mongoliens. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* 248, 409-11.
- Levin, S. (1987). The immune system and susceptibility to infections in Down's syndrome. *Prog Clin Biol Res* 246, 143-62.
- Levy, J. (1991). The gastrointestinal tract in Down syndrome. In *The morphogenesis of Down syndrome*, C. Epstein, ed. (New York: Wiley-Liss), pp. 245.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., Yu, C. E., Jondro, P. D., Schmidt, S. D., Wang, K., and et al. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973-7.
- Li, Q. Y., Newbury-Ecob, R. A., Terrett, J. A., Wilson, D. I., Curtis, A. R., Yi, C. H., Gebuhr, T., Bullen, P. J., Robson, S. C., Strachan, T., Bonnet, D., Lyonnet, S., Young, I. D., Raeburn, J. A., Buckler, A. J., Law, D. J., and Brook, J. D. (1997). Holt-Oram syndrome is caused by mutations in *TBX5*, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet* 15, 21-9.
- Lie, S. O., Jonmundsson, G., Mellander, L., Siimes, M. A., Yssing, M., and Gustafsson, G. (1996). A population-based study of 272 children with acute myeloid leukaemia treated on two consecutive protocols with different intensity: best outcome in girls, infants, and children with Down's syndrome. *Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology (NOPHO). Br J Haematol* 94, 82-8.
- Logdberg, B., and Brun, A. (1993). Prefrontal neocortical disturbances in mental retardation. *J Intellect Disabil Res* 37, 459-68.
- Lovett, M., Kere, J., and Hinton, L. M. (1991). Direct selection: a method for the isolation of cDNAs encoded by large genomic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9628-32.
- Lue, L., Brachova, L., Civin, W., and Rogers, J. (1996). Inflammation, a beta deposition, and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 1083-8.
- Madden, D. L., Matthew, E. B., Dietzman, D. E., Purcell, R. H., Sever, J. L., Rostafinski, M., and Mata, A. (1976). Hepatitis and Down's syndrome. *Am J Ment Defic* 80, 401-6.
- Mann, D., and Esiri, M. (1989). The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J Neurol Sci* 89, 169.

- Marin-Padilla, M. (1976). Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A Golgi study. *J Comp Neurol* *167*, 63-81.
- Mattei, J. F., Mattei, M. G., Baeteman, M. A., and Giraud, F. (1981). Trisomy 21 for the region 21q223: identification by high-resolution R-banding patterns. *Hum Genet* *56*, 409-11.
- McClure, H. M., Belden, K. H., Pieper, W. A., and Jacobson, C. B. (1969). Autosomal trisomy in a chimpanzee: resemblance to Down's syndrome. *Science* *165*, 1010-2.
- McCormick, M. K., Schinzel, A., Petersen, M. B., Stetten, G., Driscoll, D. J., Cantu, E. S., Tranebjaerg, L., Mikkelsen, M., Watkins, P. C., and Antonarakis, S. E. (1989a). Molecular genetic approach to the characterization of the "Down syndrome region" of chromosome 21. *Genomics* *5*, 325-31.
- McCormick, M. K., Shero, J. H., Cheung, M. C., Kan, Y. W., Hieter, P. A., and Antonarakis, S. E. (1989b). Construction of human chromosome 21-specific yeast artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 9991-5.
- McInnis, M. G., Chakravarti, A., Blaschak, J., Petersen, M. B., Sharma, V., Avramopoulos, D., Blouin, J. L., Konig, U., Brahe, C., Matisse, T. C., and et al. (1993). A linkage map of human chromosome 21:43 PCR markers at average intervals of 2.5 cM. *Genomics* *16*, 562-71.
- Megias, M., Verduga, R., Dierssen, M., Florez, J., Insausti, R., and Crespo, D. (1997). Cholinergic, serotonergic and catecholaminergic neurons are not affected in Ts65Dn mice. *Neuroreport* *8*, 3475-8.
- Melyn, M. A., and White, D. T. (1973). Mental and developmental milestones of noninstitutionalized Down's syndrome children. *Pediatrics* *52*, 542-5.
- Meng, X., Lu, X., Li, Z., Green, E. D., Massa, H., Trask, B. J., Morris, C. A., and Keating, M. T. (1998). Complete physical map of the common deletion region in Williams syndrome and identification and characterization of three novel genes. *Hum Genet* *103*, 590-9.
- Miller, R. W. (1970). Neoplasia and Down's syndrome. *Ann NY Acad Sci* *171*, 637.
- Montero, J., Flórez, J., Baamonde, C., Vallina, I., García-Calatayud, S., and Dierssen, M. (1996). Valoración ecográfica mediante doppler pulsado de la función cardíaca en el ratón Ts65Dn, un modelo murino de síndrome de Down. *Rev. Síndrome Down* *13*, 31-2.
- Morris, A. F., Vaughan, S. E., and Vaccaro, P. (1982). Measurements of neuromuscular tone and strength in Down's syndrome children. *J Ment Defic Res* *26*, 41-6.

- Morton, N. (1991). Parameters of the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7474-6.
- Motte, J., and Williams, R. S. (1989). Age-related changes in the density and morphology of plaques and neurofibrillary tangles in Down syndrome brain. *Acta Neuropathol* 77, 535-46.
- Nadal, M., Mila, M., Pritchard, M., Mur, A., Pujals, J., Blouin, J. L., Antonarakis, S. E., Ballesta, F., and Estivill, X. (1996). YAC and cosmid FISH mapping of an unbalanced chromosomal translocation causing partial trisomy 21 and Down syndrome. *Hum Genet* 98, 460-6.
- Nadal, M., Moreno, S., Pritchard, M., Preciado, M. A., Estivill, X., and Ramos-Arroyo, M. A. (1997). Down syndrome: characterisation of a case with partial trisomy of chromosome 21 owing to a paternal balanced translocation (15;21) (q26;q22.1) by FISH. *J Med Genet* 34, 50-4.
- Nadal, M., Guzman-Vigo, C., Melaragno, M., Andrade, J., García-Alonso, L., Brunoni, D., Pritchard, M., and Estivill, X. (2000). Clinical and cytogenetic characterisation of a patient with Down syndrome due to a 22q22.1-->qter duplication. *Journal of Medical Genetics (In press)*.
- Nadeau, J. H., and Taylor, B. A. (1984). Lengths of chromosomal segments conserved since divergence of man and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 814-8.
- Navarro-López, F. (1995). Cardiopatías congénitas. In *Medicina interna*, Farreras-Rozman, ed., pp. 590-605.
- Nee, L., Eldridge, R., Sunderland, T., Thomas, C., Katz, D., Thompson, K., Weingartner, H., Weiss, H., Julian, C., and Cohen, R. (1987). Dementia of Alzheimer type: clinical and family study of 22 twin pairs. *Neurology* 37, 359-63.
- Neve, R. L., Finch, E. A., and Dawes, L. R. (1988). Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron* 1, 669-77.
- Niebuhr, E. (1974). Down's syndrome. The possibility of a pathogenetic segment on chromosome no. 21. *Humangenetik* 21, 99-101.
- Niikawa, N., Deng, H. X., Abe, K., Harada, N., Okada, T., Tsuchiya, H., Akaboshi, I., Matsuda, I., Fukushima, Y., Kaneko, Y., and et al. (1991). Possible mapping of the gene for transient myeloproliferative syndrome at 21q11.2. *Hum Genet* 87, 561-6.
- Niikawa, N. (1996). [Positional cloning of the putative gene responsible for transient abnormal myelopoiesis and that for multiple cartilaginous exostoses]. *Rinsho Byori* 44, 13-8.

- Nizetic, D., Zehetner, G., Monaco, A. P., Gellen, L., Young, B. D., and Lehrach, H. (1991). Construction, arraying, and high-density screening of large insert libraries of human chromosomes X and 21: their potential use as reference libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3233-7.
- Nizetic, D., Gellen, L., Hamvas, R. M., Mott, R., Grigoriev, A., Vatcheva, R., Zehetner, G., Yaspo, M. L., Dutriaux, A., Lopes, C., and et al. (1994). An integrated YAC-overlap and 'cosmid-pocket' map of the human chromosome 21. *Hum Mol Genet* 3, 759-70.
- Olson, M. I., and Shaw, C. M. (1969). Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism. *Brain* 92, 147-56.
- Oster, J., Mikkelsen, M., and Nielsen, A. (1975). Mortality and life-table in Down's syndrome. *Acta Paediatr Scand* 64, 322-6.
- Overhauser, J., and Radic, M. Z. (1987). Encapsulation of cells in agarose beads for use with pulsed-field gel electrophoresis. *Focus*, 8-9.
- Page, S. L., Shin, J. C., Han, J. Y., Choo, K. H., and Shaffer, L. G. (1996). Breakpoint diversity illustrates distinct mechanisms for Robertsonian translocation formation. *Hum Mol Genet* 5, 1279-88.
- Pagon, R. A., Hall, J. G., Davenport, S. L., Aase, J., Norwood, T. H., and Hoehn, H. W. (1979). Abnormal skin fibroblast cytogenetics in four dysmorphic patients with normal lymphocyte chromosomes. *Am J Hum Genet* 31, 54-61.
- Paterson, S. J., Brown, J. H., Gsodl, M. K., Johnson, M. H., and Karmiloff-Smith, A. (1999). Cognitive modularity and genetic disorders. *Science* 286, 2355-8.
- Patterson, D. (1991). Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 21 mapping. *Cytogenet Cell Genet* 57, 168-74.
- Patterson, D., Rahmani, Z., Donaldson, D., Gardiner, K., and Jones, C. (1993). Physical mapping of chromosome 21. *Prog Clin Biol Res* 384, 33-50.
- Peeters, M., and Poon, A. (1987). Down syndrome and leukemia: unusual clinical aspects and unexpected methotrexate sensitivity. *Eur J Pediatr* 146, 416-22.
- Pellissier, M. C., Laffage, M., Philip, N., Passage, E., Mattei, M. G., and Mattei, J. F. (1988). Trisomy 21q223 and Down's phenotype correlation evidenced by in situ hybridization. *Hum Genet* 80, 277-81.
- Petersen, M. B., Adelsberger, P. A., Schinzel, A. A., Binkert, F., Hinkel, G. K., and Antonarakis, S. E. (1991). Down syndrome due to de novo Robertsonian translocation

t(14q;21q): DNA polymorphism analysis suggests that the origin of the extra 21q is maternal. *Am J Hum Genet* 49, 529-36.

Pfeiffer, R. A., Kessel, E. K., and Soer, K. H. (1977). Partial trisomies of chromosome 21 in man. Two new observations due to translocations 19;21 and 4;21. *Clin Genet* 11, 207-13.

Pinkel, D., Gray, J. W., Trask, B., van den Engh, G., Fuscoe, J., and van Dekken, H. (1986). Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51, 151-7.

Pinkel, D., Segraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W. L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S. H., Ljung, B. M., Gray, J. W., and Albertson, D. G. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20, 207-11.

Poissonnier, M., Saint-Paul, B., Dutrillaux, B., Chassaigne, M., Gruyer, P., and de Bagnieres-Strouk, G. (1976). [Partial trisomy 21 (21q21 - 21q22.2)]. *Ann Genet* 19, 69-73.

Polani, P. (1960). Chromosomal factors in certain types of educational subnormality. In *Mental retardation*, B. a. Mauntner, ed. (New York: Grune & Stratton), pp. 421-38.

Potter, H. (1991). Review and hypothesis: Alzheimer disease and Down syndrome--chromosome 21 nondisjunction may underlie both disorders. *Am J Hum Genet* 48, 1192-200.

Prasher, V. P., Farrer, M. J., Kessling, A. M., Fisher, E. M., West, R. J., Barber, P. C., and Butler, A. C. (1998). Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann Neurol* 43, 380-3.

Price, D. L., Struble, R. G., Whitehouse, P. J., Kitt, C. A., Cork, L. C., Walker, L. C., and Casanova, M. F. (1986). Alzheimer's disease: a multisystem disorder. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 64, 209-14.

Pritchard, M., and Kola, I. (2000). The "gene dosage effect" hypothesis versus the "amplified developmental instability" hypothesis in Down syndrome. In *The molecular biology of Down syndrome*, G. Lubec, ed. (Wien: Springer Medicine), pp. 293-303.

Pucharcos, C., Fuentes, J. J., Casas, C., de la Luna, S., Alcantara, S., Arbones, M. L., Soriano, E., Estivill, X., and Pritchard, M. (1999). Alu-splice cloning of human Intersectin (ITSN), a putative multivalent binding protein expressed in proliferating and differentiating neurons and overexpressed in Down syndrome. *Eur J Hum Genet* 7, 704-12.

Pueschel, S. (1982). Biomedical aspects in Down syndrome: Biochemistry. In *Down syndrome. Advances in biomedicine and the behavioural sciences*, R. J. Pueschel SM, ed. (Cambridge MA, Ware, pp. 249.

- Pueschel, S. M., Bernier, J. C., and Pezzullo, J. C. (1991). Behavioural observations in children with Down's syndrome. *J Ment Defic Res* 35, 502-11.
- Puri, P. (1981). Outlook after surgery for congenital intrinsic duodenal obstruction in Down syndrome. *Lancet* 2, 802.
- Rahmani, Z., Blouin, J. L., Creau-Goldberg, N., Watkins, P. C., Mattei, J. F., Poissonnier, M., Prieur, M., Chettouh, Z., Nicole, A., Aurias, A., and et al. (1989). Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5958-62.
- Raoul, O., Carpentier, S., Dutrillaux, B., Mallet, R., and Lejeune, J. (1976). [Partial trisomy of chromosome 21 by maternal translocation t(15;21) (q26.2; q21)]. *Ann Genet* 19, 187-90.
- Rarick, G. L., and Seefeldt, V. (1974). Observations from longitudinal data on growth in stature and sitting height of children with Down's syndrome. *J Ment Defic Res* 18, 63-78.
- Raz, N., Torres, I. J., Briggs, S. D., Spencer, W. D., Thornton, A. E., Loken, W. J., Gunning, F. M., McQuain, J. D., Driesen, N. R., and Acker, J. D. (1995). Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates: evidence from MRI morphometry. *Neurology* 45, 356-66.
- Raziuddin, A., Sarkar, F. H., Dutkowski, R., Shulman, L., Ruddle, F. H., and Gupta, S. L. (1984). Receptors for human alpha and beta interferon but not for gamma interferon are specified by human chromosome 21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5504-8.
- Reed, T. (1991). Dermatoglyphics findings in Down syndrome: a summary of over seven hundred cases. In *The morphogenesis of Down syndrome*, E. CJ, ed. (New York: Wiley-Liss), pp. 277.
- Reeves, R. H., Irving, N. G., Moran, T. H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S. S., Schmidt, C., Bronson, R. T., and Davisson, M. T. (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet* 11, 177-84.
- Rex, A. P., and Preus, M. (1982). A diagnostic index for Down syndrome. *J Pediatr* 100, 903-6.
- Richards, B. W. (1974). Investigation of 142 mosaic mongols and mosaic parents of mongols; cytogenetic analysis and maternal age at birth. *J Ment Defic Res* 18, 199-208.
- Robakis, N. K., Ramakrishna, N., Wolfe, G., and Wisniewski, H. M. (1987). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Oct;84(20):7221]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4190-4.

- Robinson, L., and Neglia, J. (1987). Epidemiology of Down syndrome and childhood acute leukaemia. In *Oncology and Immunology of Down syndrome*, E. C. e. McCoy EE, ed. (New York: Liss), pp. 19-32.
- Robinson, W. P., Bernasconi, F., Basaran, S., Yüksel-Apak, M., Neri, G., Serville, F., Balicek, P., Haluza, R., Farah, L. M. S., Lüleci, G., and Schinzel, A. A. (1994). A somatic origin of homologous robertsonian translocations and isochromosomes. *American Journal of Human Genetics* 54, 290-302.
- Rogers, J., Webster, S., Lue, L., Brachova, L., Civin, W., Emmerling, M., Shivers, B., Walker, D., and McGeer, P. (1996). Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Aging* 17, 681-6.
- Rowe, I. F., Ridler, M. A., and Gibberd, F. B. (1989). Presenile dementia associated with mosaic trisomy 21 in a patient with a Down syndrome child . *Lancet* 2, 229.
- Rowe, R., and Uchida, I. (1961). Cardiac malformations in mongolism: A prospective study of 184 mongoloid children. *Am J Med* 30, 53.
- Rowley, J. (1981). Down's syndrome and acute leukemia: increased risk may be due to trisomy 21. *Lancet* ii, 1020-2.
- Ruiz-Perez, V. L., Ide, S. E., Strom, T. M., Lorenz, B., Wilson, D., Woods, K., King, L., Francomano, C., Freisinger, P., Spranger, S., Marino, B., Dallapiccola, B., Wright, M., Meitinger, T., Polymeropoulos, M. H., and Goodship, J. (2000). Mutations in a new gene in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrorenal dysostosis. *Nat Genet* 24, 283-6.
- Rumble, B., Retallack, R., Hilbich, C., Simms, G., Multhaup, G., Martins, R., Hockey, A., Montgomery, P., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1989). Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease . *N Engl J Med* 320, 1446-52.
- Russell, M. W., Dick, M., 2nd, Collins, F. S., and Brody, L. C. (1996). KVLQT1 mutations in three families with familial or sporadic long QT syndrome. *Hum Mol Genet* 5, 1319-24.
- Sago, H., Carlson, E. J., Smith, D. J., Kilbridge, J., Rubin, E. M., Mobley, W. C., Epstein, C. J., and Huang, T. T. (1998). Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6256-61.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.

- Sargent, M. G., and Bennett, M. F. (1990). Identification in *Xenopus* of a structural homologue of the *Drosophila* gene *snail*. *Development* *109*, 967-73.
- Saunders, A. M., Schmader, K., Breitner, J. C., Benson, M. D., Brown, W. T., Goldfarb, L., Goldgaber, D., Manwaring, M. G., Szymanski, M. H., McCown, N., and et al. (1993). Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet* *342*, 710-1.
- Schlessinger, D. (1990). Yeast artificial chromosomes: tools for mapping and analysis of complex genomes. *Trends Genet* *6*, 248, 255-8.
- Seibel, N., Sommer, A., and Miser, J. (1984). Transient neonatal leukemoid reactions in mosaic trisomy 21. *J Pediatr* *104*, 251.
- Selleri, L., Hermanson, G. G., Eubanks, J. H., and Evans, G. A. (1991). Chromosomal in situ hybridization using yeast artificial chromosomes. *Genet Anal Tech Appl* *8*, 59-66.
- Serés-Santamaria, A., Triviño, E., Giménez, C., and Corretger, J. (1999). Trisomía parcial del cromosoma 21 diagnosticada mediante hibridación in situ (FISH). *SD* *6*, 6-9.
- Shah, S. (1979). Fatty acid composition of lipids of human brain myelin and synaptosomes: changes in phenylketonuria and Down's syndrome. *Int J Biochem* *10*, 477.
- Shapiro, B. L. (1971). Developmental stability and instability. *J Dent Res* *50*, 1505-6.
- Shapiro, B. L. (1975). Amplified developmental instability in Down's syndrome. *Ann Hum Genet* *38*, 429-37.
- Shapiro, B. L. (1983). Down syndrome--a disruption of homeostasis. *Am J Med Genet* *14*, 241-69.
- Shapiro, B. L. (1989). The pathogenesis of aneuploid phenotypes: the fallacy of explanatory reductionism. *Am J Med Genet* *33*, 146-51.
- Shapiro, B. L. (1997). Whither Down syndrome critical regions? *Hum Genet* *99*, 421-3.
- Shapiro, B. L. (1999). The Down syndrome critical region. *J Neural Transm Suppl* *57*, 41-60.
- Shapiro, B. (2000). The Down syndrome critical region. In *The molecular biology of Down syndrome*, G. Lubec, ed. (Wien: Springer Medicine), pp. 41-59.
- Shen, J. J., Williams, B. J., Zipursky, A., Doyle, J., Sherman, S. L., Jacobs, P. A., Shugar, A. L., Soukup, S. W., and Hassold, T. J. (1995). Cytogenetic and molecular studies of Down syndrome individuals with leukemia. *Am J Hum Genet* *56*, 915-25.

Sherman, S. L., Takaesu, N., Freeman, S. B., Grantham, M., Phillips, C., Blackston, R. D., Jacobs, P. A., Cockwell, A. E., Freeman, V., Uchida, I., and et al. (1991). Trisomy 21: association between reduced recombination and nondisjunction . *Am J Hum Genet* 49, 608-20.

Sherman, S. L., Petersen, M. B., Freeman, S. B., Hersey, J., Pettay, D., Taft, L., Frantzen, M., Mikkelsen, M., and Hassold, T. J. (1994). Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-dependent mechanism involving reduced recombination. *Hum Mol Genet* 3, 1529-35.

Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., and et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease . *Nature* 375, 754-60.

Sinet, P. M., Couturier, J., Dutrillaux, B., Poissonnier, M., Raoul, O., Rethore, M. O., Allard, D., Lejeune, J., and Jerome, H. (1976). [Trisomy 21 and superoxide dismutase-1 (IPO-A). Tentative localization of sub-band 21Q22.1]. *Exp Cell Res* 97, 47-55.

Slordahl, S. H., Smeland, E. B., Holte, H., Gronn, M., Lie, S. O., and Seip, M. (1993). Leukemic blasts with markers of four cell lineages in Down's syndrome ("megakaryoblastic leukemia"). *Med Pediatr Oncol* 21, 254-8.

Smith, D. J., Zhu, Y., Zhang, J., Cheng, J. F., and Rubin, E. M. (1995). Construction of a panel of transgenic mice containing a contiguous 2-Mb set of YAC/P1 clones from human chromosome 21q22.2. *Genomics* 27, 425-34.

Smith, D. J., Stevens, M. E., Sudanagunta, S. P., Bronson, R. T., Makhinson, M., Watabe, A. M., O'Dell, T. J., Fung, J., Weier, H. U., Cheng, J. F., and Rubin, E. M. (1997). Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome . *Nat Genet* 16, 28-36.

Solans, A., Estivill, X., and de La Luna, S. (2000). Cloning and characterization of human FTCD on 21q22.3, a candidate gene for glutamate formiminotransferase deficiency. *Cytogenet Cell Genet* 88, 43-9.

Solans, A., Estivill, X., and Luna, S. d. l. (2000). A new aspartyl protease on 21q22.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein β -secretase. *Cytogenet Cell Genet* 89, 177-84.

Spicer, R. (1984). Cardiovascular disease in Down syndrome. *Pediatr Clin North Am* 31, 1331-43.

- St George-Hyslop, P. H., Tanzi, R. E., Polinsky, R. J., Haines, J. L., Nee, L., Watkins, P. C., Myers, R. H., Feldman, R. G., Pollen, D., Drachman, D., and et al. (1987). The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235, 885-90.
- Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L. M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A. M., Goldgaber, D., and Roses, A. D. (1993). Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8098-102.
- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K. H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Burki, K., Frey, P., Paganetti, P. A., Waridel, C., Calhoun, M. E., Jucker, M., Probst, A., Staufenbiel, M., and Sommer, B. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13287-92.
- Sumarsono, S. H., Wilson, T. J., Tymms, M. J., Venter, D. J., Corrick, C. M., Kola, R., Lahoud, M. H., Papas, T. S., Seth, A., and Kola, I. (1996). Down's syndrome-like skeletal abnormalities in Ets2 transgenic mice. *Nature* 379, 534-7.
- Tagle, D. A., and Collins, F. S. (1992a). An optimized Alu-PCR primer pair for human-specific amplification of YACs and somatic cell hybrids. *Hum Mol Genet* 1, 121-2.
- Tagle, D. A., Blanchard-McQuate, K. L., and Collins, F. S. (1992b). Dinucleotide repeat polymorphism in the Huntington's disease region at the D4S43 locus. *Hum Mol Genet* 1, 215.
- Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M. L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D. M., and Neve, R. L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880-4.
- Taysi, K., Kohn, G., and Mellman, W. J. (1970). Mosaic mongolism. II. Cytogenic studies. *J Pediatr* 76, 880-5.
- Thase, M. E. (1982). Longevity and mortality in Down's syndrome. *J Ment Defic Res* 26, 177-92.
- Therman, E., Susman, B., and Denniston, C. (1989). The nonrandom participation of human acrocentric chromosomes in Robertsonian translocations. *Ann Hum Genet* 53, 49-65.
- Thuline, H., and Pueschel, S. (1982). Cytogenetics in Down's syndrome. In *Down's syndrome. Advances in biomedicine and behavioral sciences*, S. a. R. Pueschel, JE, ed. (Cambridge, MA: Ware), pp. 133.

- Tomizuka, K., Yoshida, H., Uejima, H., Kugoh, H., Sato, K., Ohguma, A., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Oshimura, M., and Ishida, I. (1997). Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice . *Nat Genet* *16*, 133-43.
- Uchida, I. A., and Whelan, D. T. (1980). A rare case of mosaic Down syndrome 46,XY/46,XY,-21,+i(21q). *Clin Genet* *17*, 271-4.
- Ugazio, A. G., Maccario, R., Notarangelo, L. D., and Burgio, G. R. (1990). Immunology of Down syndrome: a review. *Am J Med Genet Suppl* *7*, 204-12.
- Van Duijn, C. M., Clayton, D. G., Chandra, V., Fratiglioni, L., Graves, A. B., Heyman, A., Jorm, A. F., Kokmen, E., Kondo, K., Mortimer, J. A., and et al. (1994). Interaction between genetic and environmental risk factors for Alzheimer's disease: a reanalysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Genet Epidemiol* *11*, 539-51.
- Van Duijn, C. M., de Knijff, P., Wehnert, A., De Voecht, J., Bronzova, J. B., Havekes, L. M., Hofman, A., and Van Broeckhoven, C. (1995). The apolipoprotein E epsilon 2 allele is associated with an increased risk of early-onset Alzheimer's disease and a reduced survival. *Ann Neurol* *37*, 605-10.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression . *Science* *270*, 484-7.
- Vissel, B., and Choo, K. H. (1992). Evolutionary relationships of multiple alpha satellite subfamilies in the centromeres of human chromosomes 13, 14, and 21. *J Mol Evol* *35*, 137-46.
- Wahrman, J., Goitein, R., Richler, C., Goldman, B., Ackstein, E., and Chaki, R. (1976). The mongoloid phenotype in man is due to trisomy of the distal pale G-band of chromosome 21. In *Chromosomes today*, P. P. a. K. Lewis, ed. (New York: Halstead Press).
- Walby, A. P., and Schuknecht, H. F. (1984). Concomitant occurrence of cochleosaccular dysplasia and Down's syndrome. *Arch Otolaryngol* *110*, 477-9.
- Wang, P. P., Doherty, S., Hesselink, J. R., and Bellugi, U. (1992). Callosal morphology concurs with neurobehavioral and neuropathological findings in two neurodevelopmental disorders. *Arch Neurol* *49*, 407-11.
- Wang, S. Y., Cruts, M., Del-Favero, J., Zhang, Y., Tissir, F., Potier, M. C., Patterson, D., Nizetic, D., Bosch, A., Chen, H., Bennett, L., Estivill, X., Kessling, A., Antonarakis, S. E., and van Broeckhoven, C. (1999). A high-resolution physical map of human chromosome 21p using yeast artificial chromosomes. *Genome Res* *9*, 1059-73.

Wilson, L., Curtis, A., Korenberg, J., Schpper, R., Allan, L., Chevenix-Trench, G., Stephenson, A., Goodship, J., and Burn, J. (1993). A large, dominant pedigree of atrioventricular septal defect (AVSD): exclusion from the Down syndrome critical region on chromosome 21. *Am J Hum Genet* 53, 1262-8.

Wilson, M. G., Towner, J. W., and Forsman, I. (1980). Decreasing mosaicism in Down's syndrome. *Clin Genet* 17, 335-40.

Wilson, M. G., Chan, L. S., and Herbert, W. S. (1992). Birth prevalence of Down syndrome in a predominantly Latino population: a 15-year study. *Teratology* 45, 285-92.

Williams, J. D., Summitt, R. L., Martens, P. R., and Kimbrell, R. A. (1975). Familial Down syndrome due to t(10;21) translocation: evidence that the Down phenotype is related to trisomy of a specific segment of chromosome 21. *Am J Hum Genet* 27, 478-85.

Wisniewski, H. M., and Wrzolek, M. (1988). Pathogenesis of amyloid formation in Alzheimer's disease, Down's syndrome and scrapie. *Ciba Found Symp* 135, 224-38.

Wisniewski, K. E. (1990). Down syndrome children often have brain with maturation delay, retardation of growth, and cortical dysgenesis. *Am J Med Genet Suppl* 7, 274-81.

Wisniewski, K., Kida, E., and Brown, W. (1996a). Consequences of genetic abnormalities in Down's syndrome on brain structure and function. In *Down's syndrome. Psychoological and socio-educational perspectives*, L. Nadel, ed. (London: Whurr), pp. 3-19.

Wisniewski, T., Lalowski, M., Baumann, M., Rauvala, H., Raulo, E., Nolo, R., and Frangione, B. (1996b). HB-GAM is a cytokine present in Alzheimer's and Down's syndrome lesions. *Neuroreport* 7, 667-71.

Witt, M., Wang, Y., Wang, S., Sun, C., Pawlik, J., Rutkiewicz, E., Zembrak, J., and Diehl, S. R. (1999). Exclusion of chromosome 7 for Kartagener syndrome but suggestion of linkage in families with other forms of primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 64, 313-8.

Zipursky, A., Peeters, M., and Poon, A. (1987). Megakaryoblastic leukemia and Down's syndrome: a review. *Pediatr Hematol Oncol* 4, 211-30.