

# Identificación de genes candidatos en las comunicaciones interventriculares congénitas con pérdida de heterocigosis de HSA22q11

Cheng-Liang Lee<sup>a,b</sup>, Kai-Sheng Hsieh<sup>a</sup>, Yi-Ling Chen<sup>b</sup> y Yow-Ling Shiue<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Department of Pediatrics. Kaohsiung Veterans General Hospital. Kaohsiung. Taiwán.

<sup>b</sup>Institute of Biomedical Science. National Sun Yat-sen University. Kaohsiung. Taiwán.

<sup>c</sup>National Sun Yat-sen University-Kaohsiung Medical University Joint Research Center. Kaohsiung. Taiwán.

**Introducción y objetivos.** La comunicación interventricular (CIV) es una de las principales formas de cardiopatía congénita (CPC) en los individuos con el síndrome de delección del cromosoma 22q11 del *Homo sapiens* (HSA22q11). Con objeto de identificar los genes candidatos situados en el HSA22q11 asociados a la CIV, se analizó la pérdida de heterocigosis (LOH) mediante determinación del genotipo de microsatélites y análisis de dosis de siete genes candidatos.

**Métodos.** Se investigó a un total de 82 familias con CPC, en las que había 261 individuos (85 pacientes, 176 hermanos y progenitores). Se efectuó un examen de detección de la LOH en la región HSA22q11 mediante determinación del genotipo de microsatélites ( $n = 10$ ). Las estrategias de bioinformática permitieron caracterizar más detalladamente siete genes candidatos situados en esa región. Se aplicaron reacciones en cadena de polimerasa cuantitativas para el análisis de dosis a siete genes candidatos de 16 pacientes con LOH de HSA22q11.

**Resultados.** En 42 (49,4%) de los 85 pacientes con CPC se identificó la presencia de al menos una LOH en la región HSA22q11. Se observaron LOH de HSA22q11 en 17 de 29 pacientes con CIV y en 3 de 4 familias con ambos hijos afectados por CPC. El análisis de dosis realizado para siete genes candidatos indicó una delección heterocigota recurrente de los genes *HIRA*, *GNB1L* y *TUBA8* en 16 pacientes con CIV que presentaban LOH de HSA22q11.

**Conclusiones.** La determinación del genotipo de microsatélites identificó la LOH de HSA22q11 en varios tipos de CPC. La delección heterocigota de los genes *HIRA*, *GNB1L* o *TUBA8* podría desempeñar un papel importante en el desarrollo del tabique ventricular. Dado que la CPC puede ser una enfermedad familiar, el examen de detección de LOH de HSA22q en los hermanos del caso índice será útil para un diagnóstico y un tratamiento precoces.

**Palabras clave:** *Cardiopatías congénitas. Análisis de dosis génica. Genotipo 22q11del.*

## Identification of Candidate Genes for Congenital Ventricular Septal Defects With HSA22q11 Loss of Heterozygosity

**Introduction and objectives.** Ventricular septal defect (VSD) is one of the major forms of congenital heart disease (CHD) in individuals with *Homo sapiens* chromosome 22q11 (HSA22q11) deletion syndrome. The objective was to identify candidate genes associated with VSD located within HSA22q11 by analyzing loss of heterozygosity (LOH) using microsatellite genotyping and by gene dosage analysis in seven candidate genes.

**Methods.** The study involved 82 families with CHD, which included 261 individuals (85 patients and 176 siblings and parents). All were screened for LOH in the HSA22q11 region by microsatellite ( $n=10$ ) genotyping. Bioinformatic strategies were used to characterize seven candidate genes located within this region in greater detail. Quantitative polymerase chain reaction analysis was used to determine the dosages of the seven candidate genes in 16 patients with LOH of HSA22q11.

**Results.** Overall, 42 out of 85 patients (49.4%) with CHD had at least one LOH in the HSA22q11 region. Moreover, LOH of HSA22q11 was found in 17 out of 29 patients with a VSD and in three out of four families with two offspring affected by CHD. Dosage analysis of the seven candidate genes showed recurrent heterozygous deletion of *HIRA*, *GNB1L* and *TUBA8* genes in 16 VSD patients with a LOH of HSA22q11.

**Conclusions.** Microsatellite genotyping identified LOH of HSA22q11 in several types of CHD. Heterozygous deletion of *HIRA*, *GNB1L* or *TUBA8* genes might play an important role in ventricular septum development. Since CHD can be a familial disease, screening the siblings of a proband for LOH of HSA22q could be valuable for early diagnosis and treatment.

**Key words:** *Congenital heart disease. Gene dosage analysis. Genotyping. 22q11del.*

Full English text available from: [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org)

VÉASE EDITORIAL EN PÁGS. 242-5

Correspondencia: Dr. Yow-Ling Shiue.  
Institute of Biomedical Science, National Sun Yat-sen University.  
70 Lain-Hai Road, Kaohsiung, Taiwán.  
Correo electrónico: yshiue@mail.nsysu.edu.tw

Recibido el 4 de abril de 2008.

Aceptado para su publicación el 6 de noviembre de 2008.

## ABREVIATURAS

CIV: comunicación interventricular.  
 CPC: cardiopatía congénita.  
 FISH: hibridación fluorescente *in situ*.  
 HSA22q11: cromosoma 22q11 de *Homo sapiens*.  
 LOH: pérdida de heterocigosis.  
 PCR: reacción en cadena de polimerasa.

## INTRODUCCIÓN

Las cardiopatías congénitas (CPC) son uno de los tipos de defecto neonatal más frecuentes, y se da en un 1% del total de nacidos vivos y en el 10% de los fetos de abortos espontáneos. Las expresiones genéticas aberrantes de determinados genes pueden dar lugar a defectos del desarrollo del corazón<sup>1</sup>. En la última década, los estudios de genética molecular se han centrado en las familias con CPC en las que hay múltiples individuos afectados y han aportado una mejor perspectiva respecto al fundamento genético de varias formas de CPC, como la comunicación interauricular (CIA) o el conducto arterioso permeable. Pierpont et al<sup>2</sup> (2007) han resumido 15 trastornos cromosómicos representativos que se asocian a las CPC y 28 genes asociados a estos trastornos de los pacientes jóvenes. Las CPC están presentes en un 75-80% de los pacientes con delección autosómica 22q11 de *Homo sapiens* (HSA22q11) y la mayor parte de los casos corresponden a homocigosis regionales o monosomías y causan haploinsuficiencias<sup>3,4</sup>, incluidos los casos síndromicos (CPC asociada a al menos una anomalía no cardíaca) y los casos familiares no síndromicos<sup>2,5,6</sup>. La tabicación de las cámaras cardíacas comienza en las fases iniciales de la embriogénesis y sólo se completa al nacer, con la obliteración del foramen oval. Los defectos en la división de las cámaras cardíacas, como la CIA, los defectos del tabique del canal auriculoventricular, los defectos del tabique conotruncal y la comunicación interventricular (CIV), constituyen una causa importante de cardiopatía congénita<sup>7</sup>.

Un porcentaje considerable de los pacientes con doble salida del ventrículo derecho, interrupción del cayado aórtico, CIV del tipo de mala alineación posterior, atresia pulmonar con CIV, CIV subpulmonar, tronco arterioso, transposición de grandes vasos, tetralogía de Fallot y CIV asociada a otros defectos cardíacos conotruncales presentan una delección de HSA22q11<sup>3,8-11</sup>. La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con sondas de ADN basada en la región cromosómica del síndrome de DiGeorge es la estrategia diagnóstica clínica que se ha utilizado para las pruebas de genética molecular

destinadas a detectar la delección HSA22q11<sup>9,11,12</sup>. Sin embargo, la determinación del genotipo de microsatélites aporta una mayor resolución (basada en *locus*) que la que proporciona la determinación del cariotipo (resolución basada en Mb) para el diagnóstico de microdelecciones de HSA22q11 en pacientes con un cariotipo normal<sup>5,8,13</sup>. Así pues, optamos por utilizar la tecnología de determinación del genotipo de microsatélites para la realización de este estudio. Además, en nuestro análisis genético previo de los marcadores de HSA22q11 en las CPC, observamos una desviación significativa respecto al grado de heterocigosis esperado en un locus D22S1648 de microsatélite, lo cual implicaba que la región HSA22q11 podría ser homocigota en los pacientes con CPC síndromicas<sup>13</sup>. La delección de HSA22q11 en pacientes con CPC síndromicas fue confirmada, además, por el análisis de haplotipo, FISH de doble marcado y reacciones en cadena de polimerasa (PCR) cuantitativas<sup>13,14</sup>. Para mejorar nuestro conocimiento sobre si los tipos específicos de CPC son relevantes en cuanto a la delección de HSA22q11 y delimitar algo más los genes candidatos causales, aplicamos en este estudio la determinación del genotipo de microsatélites y el análisis de dosis génica.

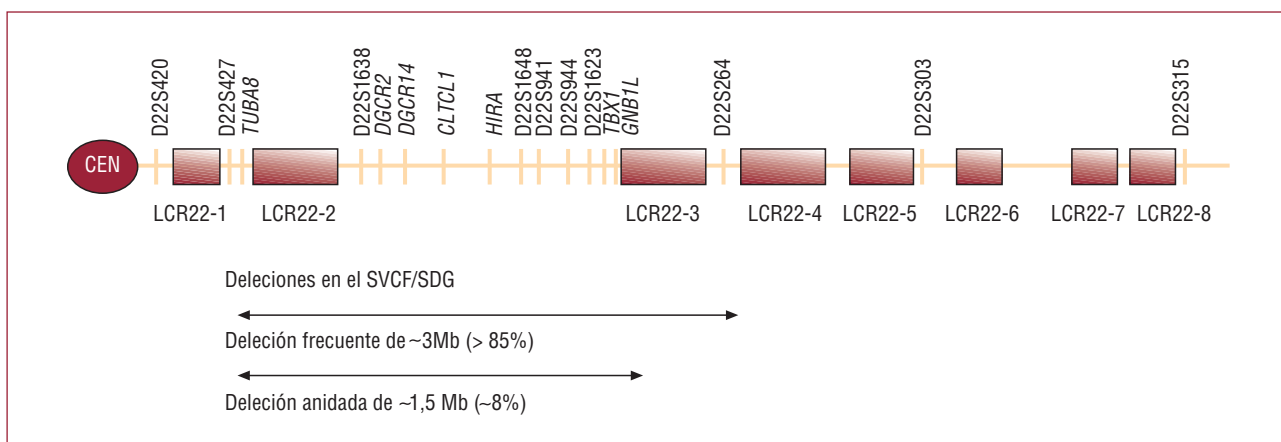
## MÉTODOS

### Muestras de sangre y extracción de ADN

Participó en el estudio un total de 82 familias con CPC que habían sido remitidas al Kaohsiung Veterans General Hospital (Kaohsiung, Taiwán), con un total de 261 individuos (85 pacientes y 176 hermanos y progenitores). Se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los participantes. La edad de los 85 pacientes oscilaba entre 1 y 14 años (media  $\pm$  DE, 3,6  $\pm$  2,9). Los pacientes fueron seleccionados aleatoriamente de entre los atendidos en nuestro departamento ambulatorio de cardiología pediátrica. Se preparó ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica, utilizando un método de extracción de ADN mediante precipitación por saturación con sales (*salting-out*).

### Determinación del genotipo de microsatélites

Los microsatélites son *loci* polimórficos que están presentes en los genomas y consisten en unidades repetidas, de 1-6 pb de longitud, habitualmente neutras y codominantes. Dado que sus números de copias podrían ser altamente poliméricos en un mismo individuo y entre distintos individuos, estos marcadores se han utilizado para identificar la pérdida de heterocigosis (LOH), es decir, la pérdida de uno o más alelos en un individuo en comparación con los



**Fig. 1.** Organización genómica del 22q11 autosómico de *Homo sapiens* (HSA), es decir, HSA22q11, y marcadores utilizados en este estudio. Los D22S— son microsatélites polimórficos. Se ha identificado un total de ocho repeticiones de copias bajas, denominados LCR22-1 a 8, en el mapa de esta región. Se muestra la región que sufre habitualmente la deleción frecuente de ~3 Mb, que está presente en más del 85% de los pacientes con síndrome velocardiofacial (SVCF) o síndrome de DiGeorge (SDG), o la deleción de ~1,5 Mb (~8%). No se indican las deleciones atípicas. Deleciones en el SVCF/SDG: deleción frecuente de ~3 Mb (> 85%); deleción anidada de ~1,5 Mb (~8%).

progenitores<sup>15</sup>. Se utilizó para la determinación del genotipo un total de nueve marcadores de microsatélites polimórficos que cubrían la región del HSA22q11 y un marcador distal, el D22S315, situado en el HSA22q12.1. Se seleccionaron nueve marcadores altamente polimórficos en la población asiática, que se extendían en un total de 8,1 Mb, sobre la base de estudios previos<sup>13,14</sup>, y se seleccionó el marcador distal, D22S315, en Map Viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>; NCBI, Estados Unidos)<sup>16</sup> (fig. 1). Las secuencias de cebadores para la determinación del genotipo de microsatélites (no mostradas) se recuperaron directamente de Electronic PCR (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/>; NCBI, Estados Unidos)<sup>16</sup>. Para la determinación múltiple de genotipo basada en PCR, se marcó un cebador de cada par con FAM (D22S264, D22S303, D22S420, D22S941, D22S1638 y D22S1648), HEX (D22S427, D22S944, D22S1623) o TET (D22S315). Se realizaron PCR múltiples en cebadores con diferentes marcaciones fluorescentes o con la misma marcación pero con una gama de amplificaciones diferente (en tamaño). Las condiciones de uso de la PCR y los métodos de determinación del genotipo de microsatélites se han descrito ya en nuestros estudios previos<sup>5,13</sup>. Para cada muestra, se analizaron todos los marcadores al menos en tres ocasiones para confirmar los genotipos.

### Estrategias de bioinformática para identificar los genes candidatos

Se utilizó Ensemble Genome Browser<sup>17</sup> (<http://www.ensembl.org/index.html>), UCSC Genome Browser<sup>18</sup> (<http://genome.ucsc.edu/>) y NCBI Map Viewer<sup>16</sup> para identificar los genes candidatos

relacionados con CPC en la región HSA22q11. Se examinaron las especificidades tisulares de los genes candidatos con la Swiss-Prot database<sup>19</sup> (<http://www.expasy.ch/sprot/>). Se utilizó, además, el instrumento de extracción de datos FatiGOplus<sup>20</sup> para la búsqueda de genes con términos de Gene Ontology<sup>21</sup> similares a los de un gen candidato para la CPC bien conocido, el gen *TBX1*.

### Análisis de dosis génica mediante reacción en cadena de polimerasa cuantitativa

Los análisis de dosis de los genes candidatos se examinaron mediante PCR cuantitativa (ciclador término iCycler, BioRad, California, Estados Unidos) junto con el método de Ct comparativa (método DDct)<sup>22</sup>. Se diseñaron pares de cebadores con Beacon Designer 2.1 (Biomedal, España) (tabla 1). Además de siete genes candidatos, se analizó un gen ligado al cromosoma X, el gen de la 6-fosfofructo-2-cinasa (*PFKFB1*)<sup>23</sup>, como referencia de dosis de un gen de copia única. Cada experimento de PCR cuantitativa se realizó en un volumen de 15  $\mu$ l (7,5  $\mu$ l de SYBR® Green Mix y 0,75  $\mu$ l de cebadores anterógrados e inversos y 6  $\mu$ l [12,5 ng/ $\mu$ l] de ADN genómico). La concentración de cada cebador fue de 4  $\mu$ mol y la temperatura de templado se optimizó a 55-60 °C. Se realizaron amplificaciones en bandejas de 96 pocillos durante 55-60 ciclos. Se combinaron cantidades iguales de una serie de 12 muestras de ADN genómico para que constituyeran un ADN genómico de referencia común para la realización de los cálculos posteriores del múltiplo de expresión relativo en cada transcrito candidato. Con objeto de garantizar una eficiencia de amplificación equivalente de todas las series de

TABLA 1. Cebadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Gen	Secuencia de cebadores (5' a 3')	Longitud (meros)	Tamaño de amplicón (pb)	Temperatura media (°C)	Pendiente*
<i>ACTB</i>	F: CCCAG CCATG TACGT TGCT	19	86	59,8	—
	R: CGTCA CCGGA GTCCA TCAC	19		60,1	
<i>CLTCL1</i>	F: CCGCT GTTAC GAGGA GGGAA TG	22	120	60,4	0,093
	R: TTGTC CACTG CTGCC TGATA CTC	23		60,1	
<i>DGCR2</i>	F: CCAGA GCTAG AGGGT GATGC	20	121	59,9	-0,074
	R: GGGCA CAGGG AACTT GATAA	20		59,9	
<i>DGCR14</i>	F: ACTGG AGAAA GGGGC TGTG	19	106	60,2	-0,089
	R: TCAAG GGGCC AATTA AACAG	20		59,9	
<i>GNB1L</i>	F: CCGTG TGCTT GGAGA GTGTG G	21	107	60,7	-0,081
	R: AATCT GAACC TCGTC GCTGC C	21		60,3	
<i>HIRA</i>	F: AGGTG GAGAA TGAAG TGACA GTGG	24	116	60,2	-0,064
	R: GCCCG CAGCA GTGAG GATC	19		60,1	
<i>PFKFB1</i>	F: AGCCC ACTAC TGAGC CCTTT C	21	146	56	0,097
	R: GTTGC GGAGG ACTTC TTCAC TG	22		57	
<i>TBX1</i>	F: TGGGA GAAAT GGGCG TCTTG TC	22	142	60,3	-0,07
	R: TTGCG TGGAT CAGGA AGGTG AG	22		60	
<i>TUBA8</i>	F: GACAA CGAAG CCATC TATGA CATC	24	119	57,7	-0,054
	R: AAGCG GAGAG AAGCA GTGAT TG	22		58,4	

\*Se realizaron ensayos de validación para determinar la eficiencia de cada par de cebadores. Se analizaron diluciones seriadas (de 75 ng a 7,5 pg en reacciones de 15  $\mu$ l) para cada gen estudiado y para el gen de control interno, *ACTB*, y se representó gráficamente el resultado con el log de concentración de entrada para cada dilución en el eje x y la diferencia de Ct ( $\Delta Ct = Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{ACTB}}$ ) para cada dilución en el eje y. Si el valor absoluto de la pendiente de la curva es  $< 0,1$  puede usarse el método de Ct comparativo<sup>24</sup>.

cebadores utilizadas en este estudio, se llevaron a cabo análisis de validación según lo descrito por Senchenko et al<sup>24</sup> (2003).

Los datos de PCR cuantitativa se expresaron en forma de media  $\pm$  desviación estándar (DE). El número de copias de inicio en las muestras de ADN genómico desconocidas se determinó mediante comparación con el número de copias conocido de la muestra de calibrado (ADN genómico de referencia común) utilizando la siguiente fórmula:  $DDCt = DcT [\text{gen candidato, muestra desconocida}] - (ACTB, \text{muestra desconocida}) - DcT [\text{gen candidato, ADN de referencia común} - (ACTB, \text{ADN de referencia común})]$ . El número de copias génicas relativo se calculó mediante la expresión  $2^{-DDCt}$ . Antes del análisis de dosis para los genes candidatos, se establecieron los límites estándar de dosis génicas de una y dos copias mediante la cuantificación del gen de tipo *housekeeping* ligado al cromosoma X, *PFKFB1*<sup>23</sup>, en ADN genómico procedente de 12 varones y 12 mujeres.

## RESULTADOS

### Fenotipos de los pacientes con CPC

No se registraron fenotipos de CPC en los progenitores de ninguna de las familias incluidas en el estudio. La CIV se identificó en 29 (34,1%) pacientes, lo cual la convierte en la CPC de mayor prevalencia en esta cohorte. La tetralogía de Fallot y la CIA se

identificaron en 10 (11,7%) y 7 (8,2%) pacientes, respectivamente. Los casos de CIV correspondían a los siguientes subtipos: membranosa (n = 18), subpulmonar (n = 6), muscular (n = 4) y canal auriculoventricular (n = 1). La presencia de más de tres defectos anatómicos en un paciente se definió como una CPC compleja (n = 4; 4,7%) (tabla 2). En cuatro familias, los números 102, 106, 260 y 352, estaban afectados los dos hijos. Los dos hijos de la familia 352 tenían una CIV membranosa. Se diagnosticó también una CIV en los dos hijos de la familia 102, pero los subtipos eran muscular apical y membranosa. A 2 pacientes con CPC de las familias 106 y 260 se les diagnosticó una CIV membranosa (caso 106-1) y una estenosis pulmonar (106-2) y una CIV membranosa (260-1) y una CIA (260-2), respectivamente (tabla 3).

### La pérdida de heterocigosis en HSA22q11 se identificó en varios tipos de CPC

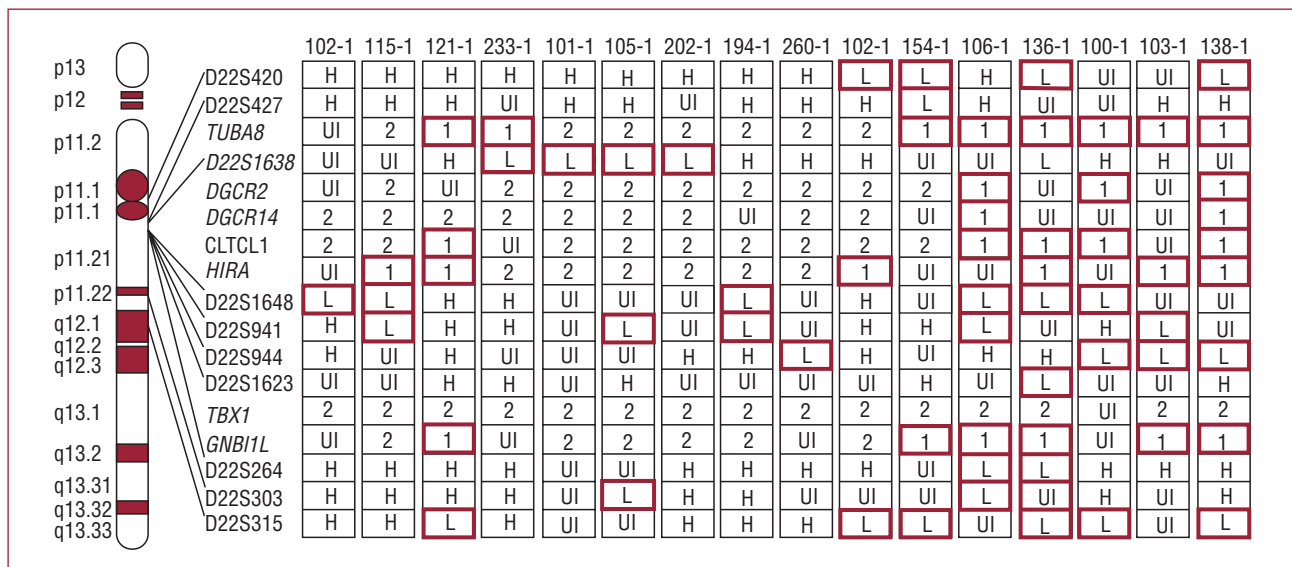
Además de en los 85 pacientes y 164 progenitores no afectados, se determinó también el genotipo de 12 hermanos no afectados para 10 microsatélites (se presentan datos parciales al respecto en la tabla 3). Aunque los dos progenitores compartan un alelo (p. ej., el D22S1623 en la familia 260) o ambos alelos (p. ej., el D22S941 en la familia 297), el estado de LOH de sus hijos podría no identificarse (no informativo, que se indica por UI en la tabla 3 y la fig. 2), lo cual indica que

**TABLA 2. Pacientes con pérdida de heterocigosis (LOH) de HSA22q11 según la determinación del genotipo de microsatélites en pacientes con cardiopatías congénitas**

Tipo de enfermedad	Pacientes, n	LOH de HSA22q11	Pacientes con LOH (%)
Cardiopatía congénita	85	42	49,4
Comunicación interventricular (CIV)	29	17	58,6
Membranosa	18	12	66
Muscular	4	1	25
Subpulmonar	6	4	66
Canal auriculoventricular	1	0	0
Tetralogía de Fallot (TdF)	10	3	30
Comunicación interauricular	7	3	42,9
Cardiopatía congénita compleja	4	3	75
Estenosis pulmonar	4	2	50
TdF con atresia pulmonar	4	2	50
Estenosis aórtica	2	1	50
Miocardopatía dilatada	4	1	25
Falta de compactación del ventrículo izquierdo	1	1	100
Insuficiencia mitral	4	1	25
Conducto arterioso permeable	3	1	33,3
Transposición de grandes vasos	2	1	50
Anillo vascular	2	1	50
Insuficiencia aórtica más insuficiencia mitral	4	1	25
Coartación más estenosis mitral	2	1	50
Coartación más CIV	1	1	100
Atresia pulmonar con tabique interventricular indemne	1	1	100
Estenosis pulmonar más CIV	1	1	100

no se obtuvo información. Así pues, la situación UI no descarta la posibilidad de que esa región estuviese afectada. Otra posibilidad es que la falta de transmisión hereditaria de cualquier alelo de los progenitores con homocigotos (p. ej., D22S1648 en la familia 100, hijos 1 —100-1— y 3

—100-3—) o heterocigotos (p. ej., D22S420 en la familia 106, hijo 2 —106-2—, caso de estenosis pulmonar) (tabla 3) pueda dar lugar a una LOH. En la tabla 2 se indica el número y el porcentaje de pacientes con deleciones de HSA22q11 según la determinación del genotipo de microsatélites y



**Fig. 2.** Combinación de datos de pérdida de heterocigosis (según la determinación del genotipo de microsatélites) y de dosis génica (mediante reacción en cadena de polimerasa cuantitativa) en 16 pacientes con comunicación interventricular. Para los marcadores de microsatélites (D22S-): H, conservación de la heterocigosis; L, pérdida de la heterocigosis; UI, no informativo; para los genes candidatos: 1, una copia; 2, dos copias; UI, no informativo.

**TABLA 3. Diez genotipos de microsatélites (D22S-)ª en familias de pacientes en las que había más de un hijo afectado**

Familia	ID <sup>b</sup>	CPC	Subtipo	D22S420	D22S427	D22S1638	D22S1648	D22S941	D22S944	D22S1623	D22S264	D22S303	D22S315
102	P			140	98/102	116	178	230/256	158	152	198/206	228/230	194
	M			136	98/102	114/116	176	244	156/158	152	200	228	194/196
	1	CIV	Muscular apical	136/140	98/102	116 (UI)	<b>178 (LOH)</b>	244/256	158/158	152 (UI)	198/200	228/230	194/194
352	2	CIV	Membranosa	<b>136 (LOH)</b>	102/102	114/116	176/178	230/244	156/158	152 (UI)	200/206	228 (UI)	196 (LOH)
	P			140/148	110	114/118	172/176	244	164/166	152/154	198/200	218/230	192/200
	M			136/142	110	110/114	176	230	164/166	148/154	198/200	230	194/200
260	1	CIV	Membranosa	142/148	110 (UI)	110/114	172/176	230/244	164/166	148/154	198/200	230 (UI)	192/200
	2	CIV	Membranosa	136/140	110 (UI)	114/118	176 (UI)	230/244	164/166	148/154	198/200	218/230	194/200
	P			132/140	96/104	102/108	172/176	230/244	162	152	198/208	218	194/198
106	M			134/144	98/102	110/116	176	244	164	152/168	202	218	184/194
	1	CIV	Membranosa	140/144	98/104	102/116	176 (UI)	244 (UI)	<b>164 (LOH)</b>	152 (UI)	198/202	218 (UI)	184/198
	2	CIA		132/144	98/104	102/116	176 (UI)	244 (UI)	<b>164 (LOH)</b>	152 (UI)	198/202	218 (UI)	184/198
157	P			136/140	96/98	114/122	178	244	150/162	152	190/206	218	194/198
	M			136/142	96/98	112/122	176	230/256	146/162	152	200	232	194/198
	1	CIV	Membranosa	140/142	98/98	122 (UI)	<b>178 (LOH)</b>	<b>244 (LOH)</b>	146/162	152 (UI)	<b>200 (LOH)</b>	<b>218 (LOH)</b>	198 (UI)
100	2	EP		<b>140 (LOH)</b>	96 (UI)	122 (UI)	<b>178 (LOH)</b>	<b>244 (LOH)</b>	162 (UI)	152 (UI)	190/200	218/232	194 (UI)
	P			140	96/98	108/114	174/176	260	158	150/154	206	220/234	180/200
	M			126/142	94/98	106/112	174/176	244/256	158	154	202/206	220/234	188
297	1	CIV	Canal	<b>140 (LOH)</b>	96/98	108/112	174/176	256/260	158 (UI)	154 (UI)	206 (UI)	220 (UI)	188/200
	2		auriculovertricular	140/142	96/98	106/114	174/176	256/260	158 (UI)	<b>150 (LOH)</b>	206 (UI)	220 (UI)	<b>200 (LOH)</b>
	3			<b>142 (LOH)</b>	96/98	<b>114 (LOH)</b>	176 (UI)	244/260	158 (UI)	150/154	206 (UI)	220/234	<b>200 (LOH)</b>
201	P			174/184	98	114/120	178	244	156/158	152	200/204	218/230	194
	M			184	98	112/114	174	240/244	158	152	204/208	218/232	196
	1	CIV	Subpulmonar	184 (UI)	98 (UI)	112/120	<b>178 (LOH)</b>	240/244	<b>156 (LOH)</b>	152 (UI)	200/204	218/232	<b>196 (LOH)</b>
204	2			174/184	98 (UI)	114 (UI)	174/178	244 (UI)	158 (UI)	152 (UI)	204 (UI)	218/232	<b>194 (LOH)</b>
	3			174/184	98 (UI)	114 (UI)	<b>178 (LOH)</b>	244 (UI)	158 (UI)	152 (UI)	204 (UI)	218/232	<b>194 (LOH)</b>
	P			134/136	94/98	106/114	172/176	230/244	164/168	148/152	190/206	218/230	186/196
201	M			132/140	98/102	112	172/176	230/244	162/164	148/152	190/204	228/230	186/196
	1	CIV	Membranosa	132/136	98/102	106/112	176 (UI)	244 (UI)	162/168	152 (UI)	204/206	218/230	186/196
	2			134/140	98/102	112/114	176 (UI)	244 (UI)	162/164	152 (UI)	204/206	228/230	186/196
204	P			130/138	98/102	110	172	244/256	162	150/154	200/202	218/234	194/198
	M			132/138	96/98	114/120	172/176	N/A	160/164	148/152	200/204	218/230	186/188
	1	CAP		132/138	96/102	110/120	172/176	N/A	160/162	150/152	202/204	218/234	188/194
204	2			132/138	96/102	<b>110 (LOH)</b>	172/176	256/262	162/164	148/150	200/202	218/234	186/194
	P			138	96/102	112/118	172/176	N/A	164	152	198/204	218	186/192
	M			134/142	94/98	108/116	172/176	230	162	152	198/200	218/230	182/186
204	1	TdF		138/142	98/102	108/118	172/176	230 (UI)	162/164	152 (UI)	198 (UI)	218/230	182/186
	2			134/138	94/102	112/116	176 (UI)	244 (UI)	162/164	152 (UI)	198/204	218/230	182/186

CAP: conducto arterioso permeable; CIA: comunicación interauricular; CIV: comunicación interventricular; CPC: cardiopatía congénita; EP: estenosis pulmonar; TdF: tetralogía de Fallot.

ªGenotipos de microsatélites: número, tamaño de alelo (alelo); UI, no informativo; LOH, pérdida de heterocigosis en comparación con los genotipos de los progenitores; N/A, muestra de ADN no disponible.

<sup>b</sup>ID: P, padres; M, madre, los números indican el orden de los hijos en la familia.

el análisis de LOH para diferentes tipos de CPC. En 42 (49,4%) de 85 pacientes con CPC se identificó la existencia de al menos una LOH en la región HSA22q11.

Aunque los dos hijos de la familia 352 presentaban una CIV membranosa, la determinación del genotipo de microsatélites no permitió identificar ninguna LOH en la región HSA22q11. Se identificaron LOH de HSA22q11 claramente definidas en la familia 102 con 2 pacientes con subtipos de CIV diferentes y en la familia 106 con dos CPC diferentes (tabla 3). Se identificó la

LOH de D22S944 en los pacientes con CIV y con CIA de la familia 260. No se encontró ninguna LOH de HSA22q11 en dos de cuatro familias con más de un hijo afectado. Sin embargo, en las otras dos familias (157 y 201) se identificaron también LOH de HSA22q11 en individuos no afectados (tabla 3). De los tres hijos de la familia 157, tan sólo uno estaba afectado por una CIV, y sus dos hermanos mostraban una LOH de HSA22q11. De igual modo, en la familia 201, se detectó una LOH de HSA22q11 en el otro hijo no afectado (tabla 3).

## Identificación de genes candidatos

Un total de 75 genes se identificaron inicialmente mediante la intersección de tres buscadores de genoma en la región HSA22q11. Las anotaciones genéticas del NCBI indicaron que sólo 20 de ellos estaban relacionados con la embriogénesis, la diferenciación del mesodermo o el desarrollo del corazón (datos no presentados). Con el empleo de la información sobre especificidades tisulares de la base de datos Swiss-Prot, se identificaron cinco genes (*CLTCLI*, *DGCR2*, *DGCR14*, *GNBIL* y *TUBA8*), y se verificó que se expresaban de manera específica en el corazón. Se observó que otro gen, el *HIRA*, era idéntico al *TBX1* al nivel 5 de los términos de ontología génica en la función molecular, el componente y el proceso biológico. El *TBX1* es un gen que codifica el factor de transcripción de caja T, que sufre una delección hemicigota en el HSA22q11, y se ha observado que es un claro gen candidato para el síndrome de DiGeorge<sup>25</sup>. En consecuencia, con la inclusión del *TBX1*, se identificaron siete genes candidatos dentro de la región de LOH de HSA22q11.

## Análisis de dosis génica

Se representaron gráficamente los ensayos de eficiencia de PCR para cada gen candidato con el logaritmo de concentración de aporte para cada dilución de las plantillas de ADN en el eje *x*, y la diferencia de *DCt* (gen candidato: *ACTB*) para cada dilución en el eje *y* (datos no presentados). Con un valor absoluto de la pendiente de la curva inferior a 0,1, el método de *Ct* comparativo sería apropiado<sup>24</sup>. Como se muestra en la tabla 1, todos los grupos de cebadores de este estudio tenían valores de pendiente < 0,1.

A continuación se establecieron los perfiles de dosis genómica del gen *PFKFB1* en el sexo masculino (*n* = 12) y en el femenino (*n* = 12). Dado que el *PFKFB1* es un gen ligado al cromosoma X, el múltiplo medio de cambio relativo ( $2^{-\text{DDCt}}$ ) en los genomas masculino y femenino corresponde a las dosis génicas relativas de una copia y dos copias. Mediante PCR cuantitativa, las medias de dosis génicas (es decir, los múltiplos de cambio relativos,  $2^{-\text{DDCt}}$ ) de una copia (*PFKFB1* en el sexo masculino) y de dos copias (*PFKFB1* en el sexo femenino) se detectaron con valores (media  $\pm$  DE) de  $0,52 \pm 0,15$  y  $1 \pm 0,17$ , respectivamente. Así pues, los márgenes de cobertura del 95% (media  $\pm$  2 DE en una distribución bilateral) de las dosis génicas con una y dos copias fueron de  $0,22 \pm 0,82$  y  $0,66 \pm 1,34$ . Se consideró que el resultado era «no informativo» (UI) cuando las dosis génicas estaban por debajo de 0,22, entre 0,66 y 0,82 o por encima de 1,34 (datos no presentados).

Las dosis genómicas de siete genes candidatos (*TUBA8*, *DGCR2*, *DGCR14*, *CLTCLI*, *HIRA*, *TBX1* y *GNBIL*, de centrómero a telómero) en la región HSA22q11 identificados mediante estrategias bioinformáticas, se analizaron con mayor detalle mediante PCR cuantitativa. Dado que las muestras de ADN eran insuficientes en el paciente 119-1, se examinaron en total 16 CIV que incluían al menos una LOH en la región HSA22q11. Se compararon las dosis genómicas de los genes candidatos con los márgenes del múltiplo de cambio estándar ( $2^{-\text{DDCt}}$ ) antes indicados. No se detectó ninguna delección génica en 6 pacientes con CIV (102-1, muscular apical; 101-1, 105-1, 194-1, 202-1 y 260-1, tipo membranoso; datos no presentados). Los pacientes 138-1 (subpulmonar) y 106-1 (membranosa) se identificaron como deleciones heterocigotas de los genes candidatos 6 y 5, respectivamente. Un total de 16 pacientes con CIV examinados conservaban las dos copias del gen *TBX1*. El *HIRA* y el *TUBA8* se examinaron como los únicos genes con delección heterocigota en 2 pacientes (115-1, subpulmonar; 102-2, membranosa) y 1 paciente (233-1, subpulmonar), respectivamente (fig. 2). De entre los siete genes candidatos, predominó la delección heterocigota de *TUBA8*, que se encontró en 8 de los casos índice analizados. El segundo lugar en cuanto a prevalencia lo ocuparon las deleciones de los genes *HIRA* y *GNBIL* (6 casos en cada gen) (fig. 2).

## DISCUSIÓN

La región HSA22q11 es propensa a las reordenaciones que conducen a trastornos de anomalías congénitas, debido a su organización genómica de repeticiones con copias escasas. La reordenación más frecuente es la de las deleciones hemicigotas de 3 y 1,5 Mb, detectada en pacientes con síndrome velocardiofacial/síndrome de DiGeorge<sup>26</sup> (fig. 1). Estas deleciones se producen por mecanismos de combinación homóloga tanto intracromosómicos como intercromosómicos<sup>27</sup>. Sin embargo, las deleciones atípicas son más frecuentes de lo que se ha descrito<sup>28</sup>. En consecuencia, planteamos la hipótesis de que la región HSA22q11 incluya genes asociados a anomalías cardíacas y craneofaciales. Anteriormente se habían observado deleciones de HSA22q11 en 12 (10%) de 125 pacientes con CIV mediante exámenes de FISH, utilizando la sonda de cósmido Oncor N25(D22S75)<sup>10</sup>. Con este grupo de sondas Vysis dirigido al *TUPLE1* (es decir, *HIRA*), Beauchesne et al<sup>12</sup> (2005) identificaron a 6 (5,8%) pacientes con deleciones de HSA22q11 (3 con tetralogía de Fallot, 2 con atresia pulmonar/CIV y 1 conducto arterioso). Con la combinación de varias sondas (100c10, 48F8, KI-506 y Sc11.1), se detectaron 50 (48%) de 104 recién nacidos

con defectos conotruncales y deleciones de HSA22q11<sup>29</sup>. La mayor parte de estos casos eran de CPC sindrómicas. Son pocos los estudios que han utilizado microsatélites polimórficos que cubren la región HSA22q11 para detectar microdeleciones<sup>5,8,13</sup>. La determinación del genotipo de microsatélites ha detectado 10 (48%) de 21 pacientes con tetralogía de Fallot y 10 (100%) de 10 pacientes con síndrome velocardiofacial o síndrome de DiGeorge, que presentaban deleciones de HSA22q11 en nuestro estudio previo<sup>13</sup>. En el presente estudio, alcanzamos también una eficiencia de identificación superior a la de los resultados previos de FISH<sup>2,10</sup>. Las posibles explicaciones eran las siguientes: *a*) mayor resolución de la determinación del genotipo de microsatélites en comparación con el análisis de FISH, y *b*) algunos de nuestros pacientes eran casos de CPC sindrómica. Resultaba difícil determinar si se trataba de pacientes con CPC sindrómica, puesto que las manifestaciones no cardíacas sutiles podrían no ser apreciables en un niño pequeño. Algunas de estas modificaciones dependen de la edad. Además, el diagnóstico de dismorfia facial es más subjetivo<sup>30</sup>. Las CPC sindrómicas podrían estar presentes en nuestros pacientes. Sin embargo, nuestra hipótesis es que el número de casos probable es bajo, puesto que se había realizado una evaluación inicial de las posibles dismorfias faciales por al menos un cardiólogo. En consecuencia, señalamos que la tecnología de determinación del fenotipo de microsatélites proporciona una resolución superior a la del análisis de FISH tradicional para estos diagnósticos.

Tras la determinación del fenotipo, no se identificó ninguna LOH de HSA22q11 en 43 pacientes con CPC (incluida una familia con dos pacientes con CIV), lo cual indicaba que otras regiones cromosómicas podrían ser la causa de sus anomalías. En cambio, se identificaron LOH de HSA22q11 en los 2 pacientes de tres de cuatro familias con 2 individuos afectados por CPC, lo cual indica que los genes de esta región podrían explicar más de un fenotipo de CPC y que estas CPC podrían no ser esporádicas, sino básicamente de carácter familiar. En contra de lo que esperábamos, se identificaron también LOH de HSA22q11 en 3 hijos no afectados de las familias de 2 pacientes, lo cual nos llevó a examinar cuidadosamente la incidencia de CPC. Estos resultados indican la importancia clínica de los exámenes de detección en todos los hermanos del caso índice, para el establecimiento de un diagnóstico precoz y el diseño de estrategias de tratamiento.

Las estrategias de bioinformática permitieron identificar, además, siete genes candidatos situados en la región de LOH de HSA22q11. Con objeto de delimitar mejor el gen o los genes específicos que causan las CIV, se examinaron las dosis genómicas

de siete genes candidatos en 16 casos índice mediante PCR cuantitativa. Los resultados obtenidos mostraron una deleción heterocigota recurrente de los genes *GNB1L*, *HIRA* y/o *TUBA8* en los casos de CIV membranosa y subpulmonar. En la región HSA22q11, se consideró que el *TBX1* era un gen candidato principal para el fenotipo cardíaco o su gravedad en los pacientes portadores de microdeleciones de HSA22q11<sup>31</sup>. Aunque los ratones mutantes heterocigotos *Tbx1*+/*Tbx1*- sobrevivieron en unas proporciones mendelianas normales y presentaron tan sólo defectos cardiovasculares leves, los ratones homocigotos *Tbx1*-/*Tbx1*- murieron al nacer y presentaron paladar hendido, aplasia tímica, infundíbulo de salida cardíaca único y CIV<sup>25</sup>. En contra de lo esperado, en este estudio no se identificó ninguna deleción heterocigota ni homocigota de *TBX1* en 16 casos índice con CIV que tenían una LOH de HSA22q11. En cambio, se observaron deleciones heterocigotas recurrentes de los genes *GNB1L*, *HIRA* y/o *TUBA8*. Estos genes sufren con frecuencia una deleción en la región crítica del síndrome de DiGeorge, lo cual indica que la deleción heterocigota podría ser crucial en el desarrollo de la CIV. Otra posibilidad procede de la identificación de mutaciones del gen *TBX1* en pacientes con síndrome de deleción de HSA22q11 pero sin microdeleciones de 22q11 ni ninguna otra reordenación detectable en esta región<sup>32,33</sup>. En nuestro examen de detección de dosis génicas, no se observó una deleción heterocigota de ningún gen candidato en 6 de 16 casos índice de CIV con LOH de H22q11, lo cual implica que podrían coexistir posibles mutaciones del gen *TBX1* u otros genes en estos pacientes; sin embargo, serán necesarios nuevos experimentos para validar estas suposiciones.

De los tres genes con deleción recurrente, el *HIRA* es un homólogo de los correpresores transcripcionales de la levadura, *Hir1p* y *Hir2p*, que poseen siete motivos dipeptídicos WD y un motivo LXXLL en sus regiones terminales N y C, respectivamente<sup>34</sup>. La hibridación *in situ* combinada completa indicó que el ARNm de *HIRA* se expresa con un patrón temporal y espacial durante la fase inicial de la embriogénesis, con un alto grado de expresión en el neuroepitelio durante la neurulación<sup>35</sup>. Al exponer una parte de la cresta neural del pollo premigratoria a oligonucleótidos antisentido con protección de extremo con fosforotioato, *ex ovo*, tras un retrotrasplante ortotópico a los embriones no tratados, Farrell et al<sup>36</sup> (1999) demostraron que la atenuación funcional del *HIRA* del pollo en la cresta neural cardíaca da lugar a un aumento significativo de la incidencia de conducto arterioso persistente, una alteración fenotípica que es característica del síndrome de DiGeorge. Pero esto no afecta al establecimiento de nuevos patrones de las arterias del



cayado aórtico, la función ventricular ni la alineación del infundíbulo de salida<sup>36</sup>. Se ha detectado una elevada cantidad de transcritos de *HIRA* del ratón en los pliegues neurales craneales, la masa frontonasal, los primeros dos arcos faríngeos, la cresta neural cincunfaríngea y los primordios de las extremidades<sup>37</sup>. El *TUBA8* es una isoforma con especificidad tisular de la alfatubulina que está muy conservada en el ser humano y en el ratón. En el estudio de PCR de transcripción inversa realizado con un panel de 16 ADNc de tejido humano diferentes, utilizando cebadores específicos para la isoforma *TUBA8*, se observó una expresión preferente en el corazón, el músculo esquelético y los testículos. Además, la comparación de secuencias del *TUBA8* con las de otras alfatubulinas conocidas indica que el *TUBA8* es el miembro de la familia de alfatubulinas de mamíferos con una mayor divergencia. La peculiaridad de secuencia del *TUBA8* en el ser humano y en el ratón indica que podría tener trascendencia funcional y, según la hipótesis de multitubulinas, podría desempeñar un papel funcional específico en el citoesqueleto celular<sup>38</sup>. El *GNBIL* codifica un polipéptido similar a la subunidad  $\beta$  de la proteína G. El análisis de inmunotransferencia *Northern blot* realizado por Gong et al<sup>39</sup> (2000) reveló su alto grado de expresión en el corazón, pero con escasa expresión en el cerebro, la placenta, el pulmón y el páncreas, lo cual indica que podría ser un candidato claro para el desarrollo cardiaco. En nuestro laboratorio se está desarrollando un modelo en el pollo que utiliza una interferencia de ARN basada en un vector, para producir una inhibición de los genes *TUBA8* y *GNBIL* en la fase inicial de la embriogénesis, que tal vez aporte interpretaciones funcionales de estos genes candidatos para la CIV en un futuro próximo.

### Limitaciones

Las manifestaciones no cardiacas menores podrían no diagnosticarse en una fase temprana en los pacientes con CPC. Esto podría hacer que no se planteara la determinación del cariotipo o la detección de una delección de HSA22q11, lo cual comportaría limitaciones en la potencia del consejo genético. En los pacientes sin delección de HSA22q11, las CPC podrían ser el resultado de otras anomalías/delecciones/mutaciones cromosómicas o génicas.

### CONCLUSIONES

Mediante la aplicación de la determinación del genotipo de microsatélites en la región HSA22q11 a familias con CPC, junto con un análisis de LOH, identificamos una LOH de HSA22q11 en varios tipos de CPC. La delección heterocigota recurrente

de tres genes candidatos (*HIRA*, *TUBA8* y *GNBIL*) puede ser la causa de algunos casos de CIV. La presencia de más de un individuo afectado en dos familias con LOH de HSA22q11 indica claramente que las CPC son una enfermedad familiar. El examen sistemático de detección de las LOH de HSA22q11 en los hermanos del caso índice será útil para el diagnóstico precoz y para el diseño de estrategias de tratamiento eficaces.

### AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestra especial gratitud por el apoyo económico recibido del Kaohsiung Veterans General Hospital (VGHKS) (subvención número VGHKS94-78; concedida a CL Lee) y el respaldo por parte de la National Sun Yat-sen University-Kaohsiung Medical University Joint Research Center, Kaohsiung (concedido a YL Shiue).

### BIBLIOGRAFÍA

- Hoffman JI. Incidence of congenital heart disease: II. Prenatal incidence. *Pediatr Cardiol*. 1995;16:155-65.
- Pierpont ME, Basson CT, Benson DW Jr, Gelb BD, Giglia TM, Goldmuntz E, et al. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*. 2007;115:3015-38.
- Hofbeck M, Rauch A, Buheitel G, Leipold G, Von der Emde J, Pfeiffer R, et al. Monosomy 22q11 in patients with pulmonary atresia, ventricular septal defect, and major aortopulmonary collateral arteries. *Heart*. 1998;79:180-5.
- McElhinney DB, McDonald-McGinn D, Zackai EH, Goldmuntz E. Cardiovascular anomalies in patients diagnosed with a chromosome 22q11 deletion beyond 6 months of age. *Pediatrics*. 2001;108:E104.
- Shi YR, Hsieh KS, Wu JY, Lee CC, Tsai CH, Yu MT, et al. Genetic analysis of chromosome 22q11.2 markers in congenital heart disease. *J Clin Lab Anal*. 2003;17:28-35.
- Worthington S, Bower C, Harrop K, Loh J, Walpole I. 22q11 deletions in patients with conotruncal heart defects. *J Paediatr Child Health*. 1998;34:438-43.
- Schiaffino S, Dallapiccola B, Di Lisi R. Molecular genetics of congenital heart disease. A problem of faulty septation. *Circ Res*. 1999;84:247-9.
- Kessler-Icekson G, Birk E, Weintraub AY, Barhum Y, Kotlyar V, Schlesinger H, et al. Association of tetralogy of Fallot with a distinct region of del22q11.2. *Am J Med Genet*. 2002;107:294-8.
- Khositseth A, Tocharoentanaphol C, Khowsathit P, Ruangdaraganon N. Chromosome 22q11 deletions in patients with conotruncal heart defects. *Pediatr Cardiol*. 2005;26:570-3.
- McElhinney DB, Driscoll DA, Levin ER, Jawad AF, Emanuel BS, Goldmuntz E. Chromosome 22q11 deletion in patients with ventricular septal defect: frequency and associated cardiovascular anomalies. *Pediatrics*. 2003;112:e472.
- Voigt R, Maier-Weidmann M, Lange PE, Haaf T. Chromosome 10p13-14 and 22q11 deletion screening in 100 patients with isolated and syndromic conotruncal heart defects. *J Med Genet*. 2002;39:e16.

12. Beauchesne LM, Warnes CA, Connolly HM, Ammash NM, Grogan M, Jalal SM, et al. Prevalence and clinical manifestations of 22q11.2 microdeletion in adults with selected conotruncal anomalies. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:595-8.
13. Shi YR, Hsieh KS, Wu JY, Lee CC, Tsai CH, Tsai FJ. Molecular analysis of syndromic congenital heart disease using short tandem repeat markers and semiquantitative polymerase chain reaction method. *Pediatr Int.* 2002;44:264-8.
14. Vittorini S, Sacchelli M, Iacone MR, Collavoli A, Storti S, Giusti A, et al. Molecular characterization of chromosome 22 deletions by short tandem repeat polymorphism (STRP) in patients with conotruncal heart defects. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39:1249-58.
15. Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol.* 2002;11:2453-65.
16. Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant S H, Canese K, Chetvernin V, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:D173-80.
17. Birney E, Andrews D, Caccamo M, Chen Y, Clarke L, Coates G, et al. Ensembl 2006. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:D556-61.
18. Hinrichs AS, Karolchik D, Baertsch R, Barber G P, Bejerano G, Clawson H, et al. The UCSC Genome Browser Database: update 2006. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:D590-8.
19. Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter M C, Estreicher A, Gasteiger E, et al. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:365-70.
20. Al-Shahrouf F, Minguez P, Vaquerizas JM, Conde L, Dopazo J. BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:W460-4.
21. Buza TJ, McCarthy FM, Wang N, Bridges SM, Burgess SC. Gene ontology annotation quality analysis in model eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:e12.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
23. Batra RS, Hatchwell E, Rider S, Brown R, Brown GK, Craig IW. Localization of human liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB1) within a YAC contig in Xp11.21. *Genomics.* 1997;40:358-61.
24. Senchenko V, Liu J, Braga E, Mazurenko N, Loginov W, Seryogin Y, et al. Deletion mapping using quantitative real-time PCR identifies two distinct 3p21.3 regions affected in most cervical carcinomas. *Oncogene.* 2003;22:2984-92.
25. Liao J, Kochilas L, Nowotschin S, Arnold JS, Aggarwal VS, Epstein JA, et al. Full spectrum of malformations in velocardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome mouse models by altering *Tbx1* dosage. *Hum Mol Genet.* 2004;13:1577-85.
26. Lindsay EA. Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome. *Nat Rev Genet.* 2001;2:858-68.
27. Saitta SC, Harris SE, McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Tonnesen MK, Zackai EH, et al. Independent de novo 22q11.2 deletions in first cousins with DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *Am J Med Genet A.* 2004;124:313-7.
28. Rauch A, Zink S, Zweier C, Thiel CT, Koch A, Rauch R, et al. Systematic assessment of atypical deletions reveals genotype-phenotype correlation in 22q11.2. *J Med Genet.* 2005;42:871-6.
29. Iserin L, De Lonlay P, Viot G, Sidi D, Kachaner J, Munnich A, et al. Prevalence of the microdeletion 22q11 in newborn infants with congenital conotruncal cardiac anomalies. *Eur J Pediatr.* 1998;157:881-4.
30. Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, Jawad AE, Cuneo BF, Reed L, et al. Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:492-8.
31. Williams NM, Owen MJ. Genetic abnormalities of chromosome 22 and the development of psychosis. *Curr Psychiatry Rep.* 2004;6:176-82.
32. Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, et al. Role of *TBX1* in human del22q11.2 syndrome. *Lancet.* 2003;362:1366-73.
33. Zweier C, Sticht H, Aydin-Yaylagul I, Campbell CE, Rauch A. Human *TBX1* missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions. *Am J Hum Genet.* 2007;80:510-7.
34. Ahmad A, Takami Y, Nakayama T. WD dipeptide motifs and LXXLL motif of chicken HIRA are necessary for transcription repression and the latter motif is essential for interaction with histone deacetylase-2 in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312:1266-72.
35. Roberts C, Daw SC, Halford S, Scambler PJ. Cloning and developmental expression analysis of chick Hira (Chira), a candidate gene for DiGeorge syndrome. *Hum Mol Genet.* 1997;6:237-45.
36. Farrell MJ, Stadt H, Wallis KT, Scambler P, Hixon RL, Wolfe R, et al. HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is required for cardiac outflow tract septation. *Circ Res.* 1999;84:127-35.
37. Wilming LG, Snoeren CA, Van Rijswijk A, Grosveld F, Meijers C. The murine homologue of HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is expressed in embryonic structures affected in human CATCH22 patients. *Hum Mol Genet.* 1997;6:247-58.
38. Stanchi F, Corso V, Scannapieco P, Ievolella C, Negrisol E, Tiso N, et al. TUBA8: A new tissue-specific isoform of alpha-tubulin that is highly conserved in human and mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;270:1111-8.
39. Gong L, Liu M, Jen J, Yeh ET. *GNB1L*, a gene deleted in the critical region for DiGeorge syndrome on 22q11, encodes a G-protein beta-subunit-like polypeptide. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1494:185-8.