

**UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE**

**Facoltà di Medicina e Chirurgia**

**ISTITUTO DI GENETICA MEDICA**

**Direttore: Ch.mo Prof. Giovanni Neri**

**Tesi di laurea**

**CORRELAZIONI GENOTIPO-FENOTIPO  
NELLA SINDROME DI WOLF-HIRSCHHORN**

**Laureando:**

**ALESSANDRO ZAPPALÀ**

**Relatore:**

**Dott.ssa Marcella Zollino**

**Correlatore:**

**Ch.mo Prof. Pierpaolo Mastroiacovo**

**Anno accademico 1999-2000**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	3
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	5
<b>SINDROME DI WOLF-HIRSCHHORN</b>	6
FENOTIPO	6
<i>Il fenotipo classico</i>	7
<i>Il fenotipo da microdelezione</i>	10
<i>Fenotipi Wolf-Hirschhorn non deleti</i>	10
STORIA NATURALE DELLA SINDROME	13
GENETICA DELLA SINDROME DI WOLF-HIRSCHHORN	14
<b>CASISTICA PERSONALE</b>	20
SEGNI CLINICI	26
SINDROME DA DELEZIONE PROSSIMALE 4P	38
ANALISI CITOGENETICA E MOLECOLARE	39
ANALISI CLINICO-GENETICO-COMPARATIVA	41
<b>RISULTATI</b>	42
CITOGENETICA	42
CORRELAZIONI GENOTIPO FENOTIPO	51
DUPLICAZIONE INVERTITA-DELEZIONE	57
IL MODELLO MURINO	60
<b>DISCUSSIONE</b>	63
<b>CONCLUSIONI</b>	70
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	71

## INTRODUZIONE

La sindrome di Wolf-Hirschhorn (WHS), descritta per la prima volta nel 1965 indipendentemente da Wolf (Wolf et al. 1965) e Hirschhorn (Hirschhorn, Cooper et al. 1965), è una sindrome cromosomica causata dalla delezione parziale delle braccia corte di un cromosoma 4. I segni clinici peculiari sono rappresentati da ritardo mentale, ritardo di crescita pre e post-natale, difetti della linea mediana, cardiopatie congenite, malformazioni renali, anomalie scheletriche e convulsioni.

La maggior parte dei casi noti è associata ad una estesa delezione 4p, della grandezza di diverse megabasi, diagnosticabile con un esame cromosomico convenzionale. Il fenotipo associato a grandi delezioni è usualmente "completo", con ritardo psicomotorio grave e malformazioni congenite multiple.

In una minoranza di pazienti finora noti, una microdelezione nell'ambito della regione 4p16.3 può essere evidenziata solo tramite ibridazione in situ fluorescente (FISH) di sonde molecolari, su cromosomi apparentemente normali. Il fenotipo associato a microdelezioni è usualmente più lieve, il ritardo psicomotorio più contenuto, e le malformazioni congenite sono rare.

L'analisi comparata delle diverse delezioni finora pubblicate ha consentito di stabilire il minimo intervallo di delezione nella WHS "Wolf-Hirschhorn syndrome critical region (WHSCR)", che è ristretto a sole 165 Kb nell'ambito della regione 4p16.3. L'effetto pleiotropico di una regione così ristretta fa supporre che pochi geni, o addirittura un solo gene, localizzati nella WHSCR, siano criticamente responsabile del fenotipo, agendo come regolatori centrali della trascrizione di numerosi altri geni. Sono stati finora identificati 3 nuovi geni nell'ambito della WHSCR: WHSC1; WHSC2; e LETM1, eccellenti candidati come geni criticamente responsabili di questa condizione.

Esistono in letteratura sporadiche segnalazioni di pazienti che presentano un fenotipo WH, ma senza alcuna apparente delezione, né citogenetica né molecolare. Tali soggetti rappresentano i pazienti ideali in cui verificare la presenza di una mutazione in uno dei geni candidati per sindrome di Wolf-Hirschhorn.

Anche se la WHS si configura come una sindrome da geni contigui, in cui la complessità del fenotipo dipende dall'estensione della delezione, un segno distintivo di questa condizione è l'ampia variabilità fenotipica: delezioni simili possono esitare in fenotipi diversi, almeno riguardo al grado di ritardo psicomotorio. Fattori diversi, oltre all'ampiezza della delezione, devono quindi intervenire a modulare il fenotipo.

## SCOPO DELLA TESI

E' stato condotto uno studio comparativo tra le manifestazioni cliniche e il rispettivo riarrangiamento genetico in 28 pazienti affetti da WHS. Lo scopo di questo lavoro è stato molteplice:

1. stabilire chiare correlazioni tra genotipo e fenotipo, al fine di acquisire elementi di valutazione prognostica nelle diagnosi precoci;
2. delineare il fenotipo da microdelezione. La maggior parte dei pazienti finora noti è infatti portatrice di una grande delezione, comprendente diverse Mb. Ampie delezioni esitano sempre in un fenotipo grave e caratteristico, riconoscibile con facilità fin dalla visita clinica. D'altra parte, invece, il fenotipo da microdelezione è più raro e sfumato e non ancora estesamente caratterizzato. E' verosimile quindi che la prevalenza della WHS sia sottostimata;
3. verificare, alla luce delle acquisizioni precedenti, se una diagnosi di WHS può ancora essere posta pur in assenza di ogni apparente microdelezione. I soggetti inseriti in questo sottogruppo sono i pazienti ideali in cui eseguire un'analisi mutazionale di geni candidati per WHS;
4. Valutare fattori genetici addizionali, oltre alla delezione, che influenzino il fenotipo.

## SINDROME DI WOLF-HIRSCHHORN

Nel 1961 Cooper e Hirschhorn descrissero per la prima volta un caso di delezione del braccio corto di un cromosoma del gruppo B associato ad una facies particolare ed a difetti della linea mediana.

Nel 1965 Wolf descrisse un altro caso simile. Da allora la sindrome è stata accettata come un'entità a sé stante e le è stato dato il nome di sindrome di Wolf-Hirschorn (WHS).

Nella maggior parte dei casi (85%) la sindrome è causata da una delezione 4p "de novo", a carico più frequentemente del cromosoma di derivazione paterna. Nel restante 15% dei casi essa segrega da una traslocazione bilanciata parentale tra il cromosoma 4 e, più spesso, i cromosomi 8, 12 o 22 (Wheeler P. e coll. 1995).

I dati clinici e genetici finora acquisiti nell'ambito della WHS si possono in qualche modo ascrivere a due epoche storiche subentranti: una fase citogenetica, propria degli anni '70-'80, nell'ambito della quale si inseriscono la maggior parte dei casi segnalati, che hanno contribuito a delineare il fenotipo cosiddetto "completo" e una fase più recente, pertinente alla genetica molecolare, nell'ambito della quale i casi sono meno numerosi e il fenotipo più subdolo. L'incidenza è di 1 su 50.000 nati vivi, tuttavia essa è verosimilmente sottostimata, soprattutto riguardo alla prevalenza del fenotipo da microdelezione.

C'è una lieve prevalenza di femmine affette rispetto ai maschi, per un rapporto di 2 a 1.

### FENOTIPO

La WHS si configura come una sindrome da geni contigui, in cui la costellazione di segni clinici dipende in larga misura dall'estensione della delezione. Tuttavia, un segno distintivo di questa condizione è un'estrema variabilità fenotipica, si da

suggerire che fattori diversi, oltre alla grandezza della delezione, ne influenzino la gravità.

I casi noti sono per la maggior parte portatori di un'estesa delezione, diagnosticabile con un esame cromosomico convenzionale.

Il fenotipo associato, usualmente grave, è definibile, in qualche modo, "classico", in quanto include i segni e i sintomi descritti nelle diagnosi originarie.

### Il fenotipo classico

Il fenotipo classico è caratterizzato da ritardo mentale, ritardo di crescita, microcefalia, ipotonia, facies caratteristica, difetti della linea mediana, difetti cardiaci, renali, scheletrici, oculari ed epilessia.

Il **ritardo mentale** è grave: scarsa attenzione all'ambiente circostante, sviluppo del linguaggio tardivo (dopo i 6 anni) e disorganizzato.

Il **ritardo di crescita** è parimenti molto grave, già evidente in epoca prenatale con ritardo di crescita intrauterino associato spesso ad un parto pretermine per sofferenza fetale. Il ritardo di crescita permane grave anche dopo la nascita ed è accompagnato da **microcefalia**.

L'**ipotonia** è congenita e severa, provocando ritardo delle tappe motorie. Il paziente deambula autonomamente solo dopo i 6-8 anni.

La **facies** è caratteristica e, insieme al ritardo di crescita, è quella che indirizza, di solito, all'accertamento diagnostico. Essa comprende fronte alta e prominente, occhi grandi con ipertelorismo, prominenza del dorso nasale che si continua con sopracciglia alte ed arcuate nel tipico aspetto a "elmetto greco". E' caratterizzata

inoltre da ipoplasia medio facciale con micrognazia, bocca ampia con labbro superiore sottile e angoli della bocca orientati verso il basso, orecchie dismorfiche, antiverse e con attaccatura bassa.

I **difetti della linea mediana** includono labio-palatoschisi, coloboma oculare ed ipospadia.

Le **cardiopatie congenite** sono presenti nel 33% dei casi e sono in genere di lieve-moderata entità. Si tratta essenzialmente di difetti interatriali o interventricolari associati a volte a stenosi polmonare.

I **difetti oculari** (30%) sono, oltre al coloboma dell'iride, glaucoma, cataratta, difetti del nervo ottico.

Le **anomalie renali** non sono frequenti. Si tratta di solito di ipoplasia renale, più raramente di patologie malformative, quali rene a ferro di cavallo.

Le **anomalie scheletriche** sono invece più comuni (70% dei casi). Consistono in scafocefalia, scoliosi e cifosi, vertebre anomale (fuse, malformate, bifide), malformazioni costali, iposviluppo dei rami pubici che può portare a separazione delle ossa pubiche (Cortina H. e coll. 1979), sinostosi radio-ulnare prossimale, displasia congenita dell'anca, clinodattilia con ipossificazione delle falangi distali e alluce dismorfico.

Alcuni pazienti hanno presentato anche **ectrodattilia**. L'ectrodattilia è una condizione relativamente comune, geneticamente eterogenea; più loci sono stati implicati nelle varie forme, autosomico-dominanti, autosomico-recessive o X-



linked. Uno di essi mappa in 4p15.1 (Nunes et al. 1995) e verosimilmente agisce in sinergia con un altro locus.

Tuttavia le segnalazioni di ectrodattilia in WHS sono estremamente rare, e potrebbero essere intese come un'associazione casuale.

Un sintomo comune nella WHS è l'**epilessia** (Sgrò e coll. 1995). L'età di insorgenza è compresa tra i 5 e i 15 mesi di vita con una maggiore frequenza intorno ai 10 mesi. Le crisi tendono a regredire spontaneamente intorno ai 10 anni.

L'epilessia nella WHS ha manifestazioni cliniche molto variabili, in forma di:

1. crisi febbrili, che spesso ne costituiscono l'esordio;
2. crisi parziali;
3. assenze atipiche, con o senza mioclono palpebrale;
4. crisi generalizzate tonico-cloniche;

Il pattern elettroencefalografico è alquanto peculiare, si da porre da solo, a volte, l'indicazione all'accertamento diagnostico di WHS.

E' caratterizzato da:

1. attività rapida (13-18 Hz), diffusa e alternata ad attività di base;
2. parossismi di attività lenta (diffusa o spesso limitata alla regione occipitale) di ampio voltaggio e associati a spikes superimposti, spesso scatenati dalla chiusura degli occhi;
3. parossismi punta-onda lenti e multifocali.

Tale pattern è molto simile a quello della sindrome di Angelman che si suppone provocata da un difetto del recettore del GABA. La subunità Beta-3 del recettore è mappata nella regione AS del cromosoma 14 umano ed è deleta nella sindrome

di Angelman. Le subunità Alfa-2 e Beta dello stesso recettore sono invece effettivamente mappate sul braccio corto del cromosoma 4 ma in posizione p12-p13, perciò al di fuori del tratto usualmente deletato nella WHS. E' stato quindi ipotizzato un effetto di posizione della mutazione genica, oppure la presenza di un altro riarrangiamento criptico più proximale rispetto alla delezione.

### **Il fenotipo da microdelezione**

Il gruppo di pazienti WH portatori di una microdelezione 4p16.3, diagnosticabile tramite FISH di sonde molecolari su cromosomi apparentemente normali, è molto piccolo.

Tuttavia i pazienti finora descritti presentano indubbiamente un fenotipo più lieve: il grado di ritardo psicomotorio è più moderato, le malformazioni congenite sono usualmente assenti, mentre permangono i segni: facies caratteristica, microcefalia ed epilessia.

E' verosimile che alcuni casi di WHS associati a microdelezione sfuggano alla diagnosi, sia per l'apparente normalità del cariotipo, sia per le più contenute manifestazioni cliniche.

### **Fenotipi Wolf-Hirschhorn non deleti**

Sono sporadicamente segnalati in letteratura pazienti con fenotipo WH ma apparentemente senza alcuna delezione in 4p16.3.

Il primo caso è stato descritto nel 1986 da D. Donnai.

Si trattava di una bambina nata di parto spontaneo a 41 settimane di gestazione. Pesava 2180gr. e presentava una circonferenza cranica di 31 cm. Ma, già a

quattro mesi dalla nascita, sia il peso che la circonferenza cranica erano al di sotto del 5° percentile.

Il fenotipo era caratteristico della WHS con occhi prominenti, fessure palpebrali rivolte verso il basso e labbro superiore sottile. Aveva un'ernia ombelicale mentre i genitali mostravano un'ipoplasia delle grandi labbra con assenza delle piccole labbra. La paziente era ipotonica all'esame neurologico.

Rivalutata ad 11 mesi la paziente presentava, oltre ai suddetti segni, anche una piega palmare in eccesso ed una piega accessoria alla base del quarto dito su entrambe le mani.

Riesaminata all'età di 2 anni e 9 mesi la bambina dimostrava un notevole ritardo di crescita e nello sviluppo psicomotorio, associato all'impossibilità di supinare od estendere i gomiti. Aveva acquisito la capacità di stare seduta senza appoggio ma non era ancora in grado di stare in piedi. Il linguaggio era assente e solo in un secondo momento è migliorato con l'ausilio di apparecchi acustici per l'udito. I test per l'infezione intrauterina di rosolia e citomegalovirus erano risultati negativi. La vista, alla visita oculistica, risultava normale. Anche la tomografia computerizzata del cranio era normale mentre la radiografia dello scheletro mostrava presenza di ossa wormiane nel cranio. L'EEG rilevava un'accentuata, lenta e generalizzata, attività ad alto voltaggio.

L'analisi citologica individuava un cariotipo 46,XX,13p+ risultato poi una variante polimorfica presente anche nella madre.

Un altro paziente non delecto (Zollino e coll. 1996) è incluso in questo lavoro (paziente n. 16).

Il bambino è nato a 38 settimane di gestazione. Pesava 3300gr ed era ipotonico alla nascita.

E' stato rivalutato a 10 mesi e poi più volte fino all'età di 10 anni. La deambulazione autonoma è iniziata all'età di 24 mesi mentre le prime parole

sono state dette a 16 mesi. La crescita è stata regolare ma con presenza di testicolo ritenuto corretto chirurgicamente a 3 anni di età.

Il fenotipo comprende: ritardo mentale lieve; facies caratteristica con fronte alta; prooptosi; prominenza della sutura metopica e della glabella; ipertelorismo apparente; rima palpebrale mongoloide con piega epicantica e conformazione generale della faccia a "elmetto greco".

Erano presenti inoltre labbro superiore sottile, micrognazia, piega palmare trasversa ad entrambe le mani, sinostosi radio-ulnare destra. La Tomografia del cranio è risultata nella norma. Il paziente non ha mai avuto convulsioni ed erano assenti malformazioni congenite.

Attualmente, all'età di 14 anni, ha un'ottima relazione con l'ambiente, il linguaggio è fluente, ma non ha appreso a leggere o a scrivere.

## STORIA NATURALE DELLA SINDROME

Le informazioni sulla storia naturale della WHS sono ancora limitate. Questi pazienti sono stati descritti come " sopravvissuti privi di personalità " avendo gravi problemi di ritardo mentale e di crescita.

E' comunque chiaro che alcuni individui sono in grado di avere uno sviluppo psicomotorio di gran lunga migliore di quanto si sia creduto fino ad oggi.

Diventa perciò indispensabile stabilire delle linee guida precise per la valutazione prognostica di ogni singolo paziente ed applicare i principi di sorveglianza della salute ai bambini che sopravvivono sino all'età adulta. In modo, perciò, da permettere loro di raggiungere il migliore sviluppo possibile.

Una delle difficoltà certamente più gravi è quella dell'**alimentazione**. Una labio-palatoschisi, ad esempio, può creare ovvi problemi all'alimentazione. Una deglutizione incoordinata può facilmente causare polmonite "ab ingestis". E' frequente, poi, il persistere di un reflusso gastro-esofageo. Gravi sono i danni, quindi, oltre che all'alimentazione, anche alla funzionalità respiratoria.

Le **convulsioni** iniziano generalmente tra i 5 e i 23 mesi (più frequentemente a 9-10 mesi) e si possono controllare con l'acido valproico.

Lo **sviluppo psico-motorio** è lento ma costante. E' comunque necessario un programma personalizzato per ogni paziente data la notevole variabilità interpersonale nell'ambito motorio, cognitivo e comunicativo.

E' tuttavia necessario distinguere la prognosi in base al cariotipo. La consulenza genetica deve infatti articolarsi in modo differente nel caso di microdelezione.

## GENETICA DELLA SINDROME DI WOLF-HIRSCHHORN

La Sindrome di Wolf-Hirschhorn è classicamente causata da delezione parziale del cromosoma 4p.

Nella gran parte dei casi si tratta di un'estesa delezione, diagnosticabile con esame cromosomico convenzionale, ma le nuove tecniche di citogenetica molecolare hanno consentito negli ultimi anni alcune diagnosi di microdelezione che ha avuto un'estensione variabile da 1.9 a 4.4 Mb (Fang et al. 1997, Wright et al. 1997, Zollino et al. 2000).

Tramite analisi comparata delle delezioni finora descritte, il minimo intervallo di delezione nella WHS è stato ristretto a 165 Kb, ed è stato per questo denominato "Wolf-Hirschhorn Syndrome Critical Region (WHSCR)"

La WHSCR è definita dai loci D4S166 (cosmide 174g8) prossimalmente e D4S3327 (cosmide 190b4) distalmente, e si trova, nell'ambito della regione 4p16.3, a circa 3 Mb di distanza dal telomero (figura 1). La sua sequenza è completamente nota; in essa risiedono alcuni geni che si configurano come fattori di trascrizione, potenzialmente responsabili dell'eziopatogenesi di questa condizione.

I geni mappati nella WHSCR, candidati ad essere criticamente responsabili del fenotipo sono 2:

1. WHSC1 (Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1);
2. WHSC2 (Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2);
3. Un terzo gene candidato, LETM1, mappa al di fuori della WHSCR, ma è stato ritenuto interessato da inattivazione per effetto di posizione.

WHSC1 (Stec I. e coll. 1998) è stato il primo gene identificato nella WHSCR. Esso è lungo 90 Kb, due terzi dei quali mappano nella parte distale della regione critica. Comprende i cosmidi 96a2, 19h1, 190b4 e 184d6 (fig. 2). Contiene 25

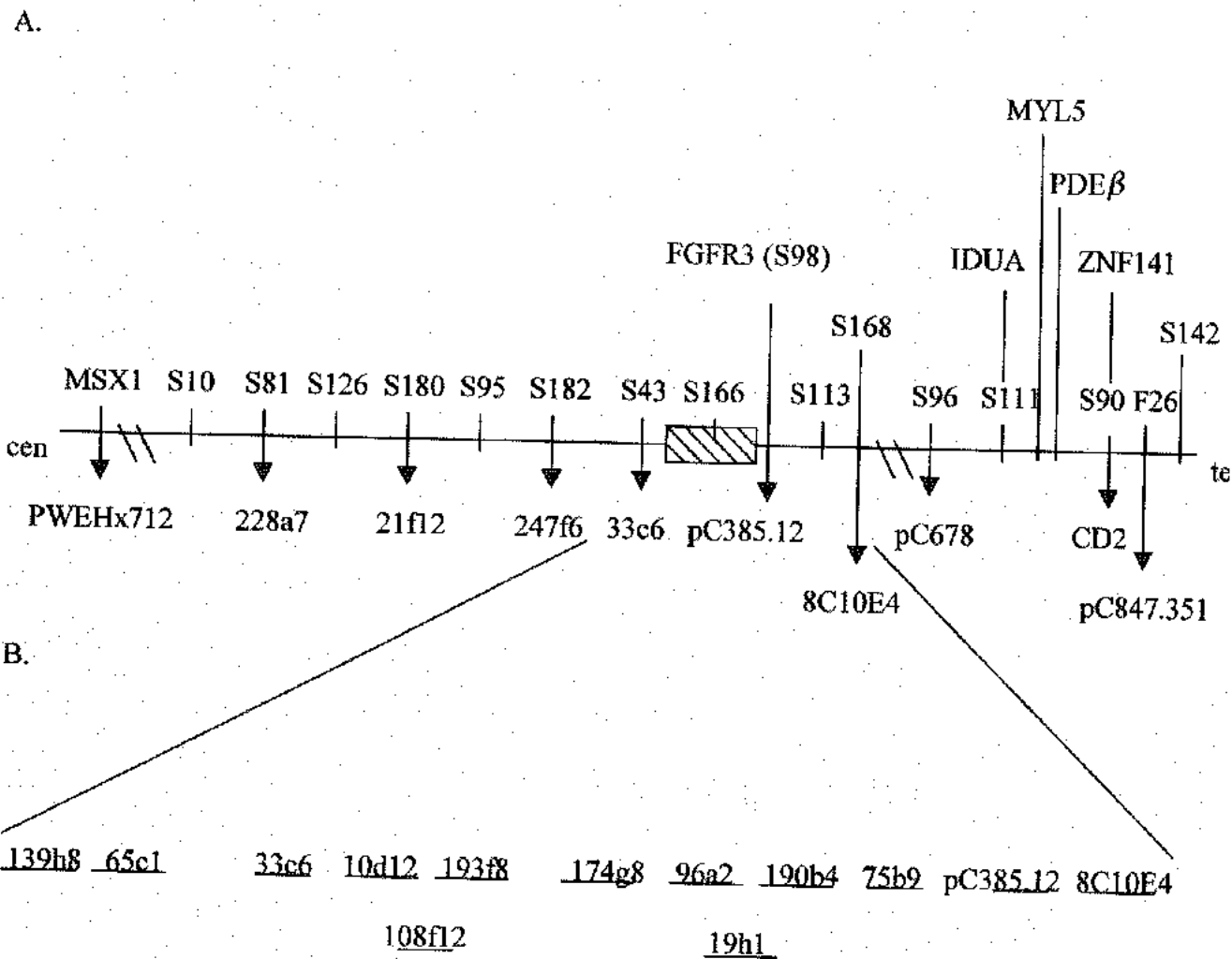


Figura 1: (A) Mappa fisica di 4p16.3. I loci mostrati lungo la linea corrispondono ad una serie di cosmidi, intervallati da circa 500Kb, usati come sonde in una prima serie di analisi. Essi coprono una regione di circa 5Mb. La regione critica per WHS (WHSCR) è indicata da un rettangolo tratteggiato. (B) Contiguo di cosmidi specifici per la WHSCR.

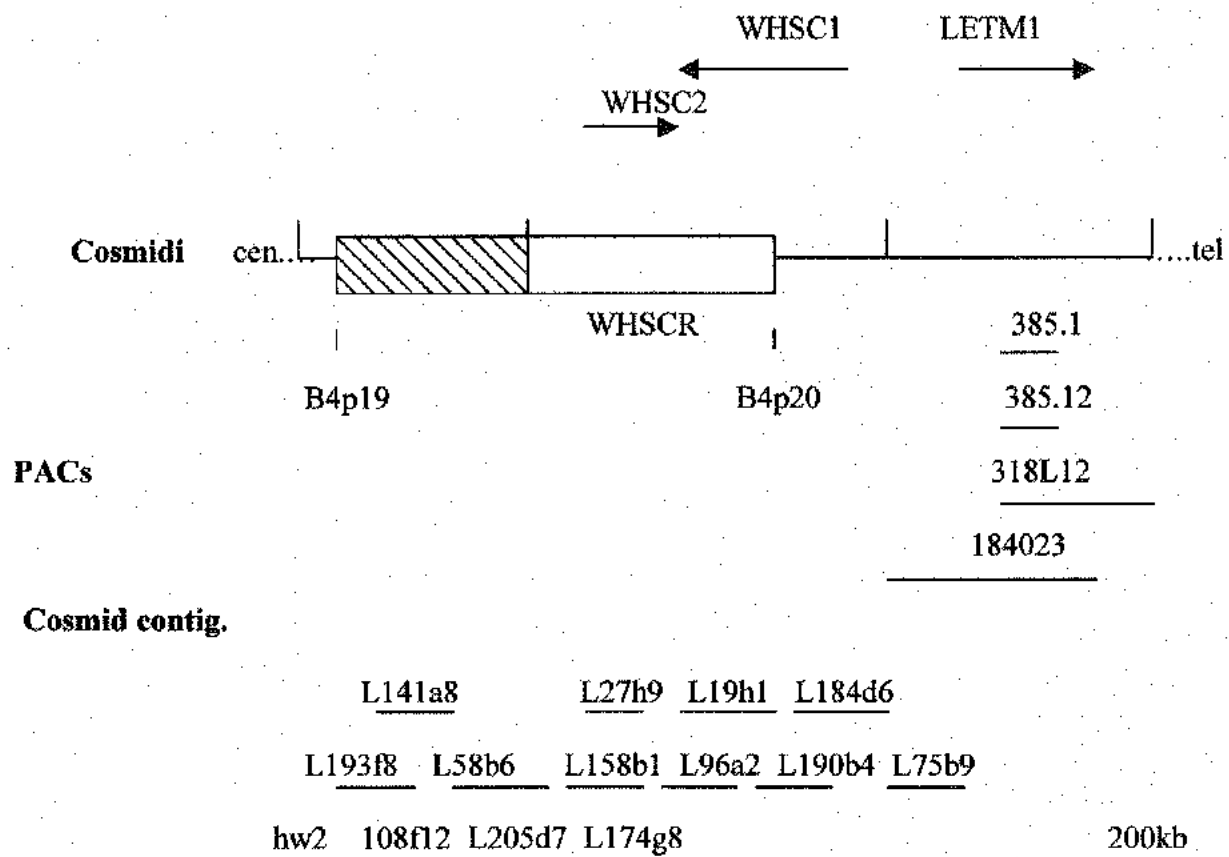


Figura 2: Mappa di 4p16.3. La localizzazione di WHSC1, WHSC2 e LETM1 è mostrata da frecce.

WHSC1: 2/3 nella WHSCR

WHSC2: Tutto nella regione critica

LETM1: Al di fuori della regione critica. Probabilmente interessato per effetto di posizione.



esoni e si trascrive in senso telomerico-centromerico. E' sottoposto ad un complesso splicing alternativo che porta a 3 trascritti di 9kb, 6kb e 3.5kb. Il trascritto di 9kb è presente in tutti i tessuti esaminati. Il trascritto intermedio di 6kb è presente invece solo nel rene e nel fegato fetali. Il trascritto di 3.5kb è presente infine in tutti i tessuti specialmente nelle primissime fasi dello sviluppo. L'espressione dei trascritti è preminente nei muscoli e nel cuore mentre è minore in altri tessuti come rene, pancreas, fegato e polmone.

La proteina prodotta da WHSC1 comprende 4 domini presenti in altre proteine dello sviluppo:

1. Un dominio del tipo HMG box legante il DNA e regolante la proliferazione cellulare;
2. Un dominio di tipo SET che regola il programma di sviluppo legandosi alla cromatina nucleare;
3. Un dominio tipo zinc-finger PHD (Plant-Homeo-Domain). Questo dominio è stato trovato in un gruppo di proteine di differenti specie, accomunate dall'essere tutte regolatrici della trascrizione, come la proteina ATRX (Alpha-Thalassemia mental Retardation syndrome X-linked)(Gibbons e coll. Nat.Genet.,17, 147-148);
4. Infine un dominio PWWP (Proline-Tryptophan-Tryptophan-Proline), posseduto anche dal gene MSH6 del cancro umano coloretale non poliposico (HNPCC).

WHSC1 sembra quindi un buon candidato a causa del suo pattern di espressione prevalentemente embrionario e nei tessuti a rapida crescita, ma soprattutto per le caratteristiche dei suoi domini riconosciuti. Inoltre, di questo gene, è stato trovato l'omologo murino. Ciò ha reso possibile la creazione di un modello sperimentale della delezione in topi knock-out, favorendo la ricerca sulla base genetica della patologia (Naf D. e coll. 2001). Prerequisito essenziale per questo tipo di studio è che l'organizzazione della regione interessata sia conservata nel passaggio dall'uomo al topo.

Il secondo gene candidato è il WHSC2 (Wright T.J. <sup>2</sup> coll.1999).

Questo gene si trova completamente all'interno della regione critica ed è identificato dal cosmide 96a2 (fig. 2). Si estende per 26.2Kb e comprende 11 esoni e 10 introni. Le dimensioni degli esoni variano dalle 69bp dell'esone 6, alle 781bp dell'esone 11; mentre gli introni variano da 88bp a 17kb.

WHSC2 codifica per una proteina, di 528 amminoacidi e peso di 57kD, la cui espressione è ubiquitaria con l'eccezione del polmone adulto. Sembra si tratti di una proteina transmembrana nucleare. Non è chiara la sua funzione né sono stati tuttora trovati domini funzionali simili ad altri domini conosciuti. Il suo pattern ubiquitario di espressione però, così come la sua localizzazione nucleare, ne fanno un buon candidato. Anche per WHSC2 è stato trovato l'omologo murino che mappa nella stessa regione dell'omologo di WHSC1. Non solo la posizione, ma anche la grandezza, l'orientamento e la direzione di trascrizione di questi geni sono uguali a quelli dell'uomo.

L'ultimo gene finora identificato come possibile candidato è LETM1 (Endele e coll. 1999).

In realtà esso mappa al di fuori della regione critica a poco meno di 80kb da questa tra il gene WHSC1 e FGFR3. E' identificato dal cosmide 75b9 (fig. 2). La proteina di 83.4kDa contiene 4 domini riconosciuti:

1. Un dominio EF-hand probabilmente legante il calcio;
2. un dominio transmembrana;
3. un leucine-zipper;
4. diversi domini alfa elica.

La proteina è espressa ubiquitariamente.

La sua capacità di legare il calcio, unitamente alla sua capacità di interagire con altre proteine, la coinvolge, probabilmente, nei segnali o nel controllo del metabolismo del calcio stesso.

E' stato ipotizzato che disordini di tipo neurovegetativo siano correlati a alterazioni dell'omeostasi del calcio-ione. Perciò LETM1 potrebbe essere alla base di alcune manifestazioni caratteristiche della WHS come il ritardo mentale e le convulsioni.

Il gene, pur se situato al di fuori della regione critica, è deletato nella quasi totalità dei pazienti. A tutt'oggi solo un paziente (Somer M. e coll. 1995) sembra portare una delezione interstiziale che non coinvolge LETM1. Comunque non sono ancora pervenuti i dati, di questo paziente, sullo stato neurologico, soprattutto in riguardo a eventuali convulsioni. La regione regolatrice del gene, in questo paziente, è a 80Kb dall'estremo distale della delezione. Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che riarrangiamenti a distanza dal gene potrebbero influire sulla regolazione del gene stesso (Klenjian D.-J. E coll. 1998).

## CASISTICA PERSONALE

E' stata condotta un'analisi genetica e clinica comparativa in un totale di 28 pazienti con fenotipo WH. Essi sono stati suddivisi nei seguenti gruppi:

1. Pazienti WH portatori di una delezione parziale 4p terminale, apparentemente isolata, accertata tramite esame cromosomico convenzionale (totale: 15) o tramite FISH con sonde molecolari (tot.: 3). Questo gruppo, in cui la diagnosi è indiscutibilmente sostenuta dalla presenza della delezione specifica, è ritenuto di riferimento per le speculazioni sia di carattere clinico-prognostico sia sperimentale che costituiscono l'argomento del presente lavoro (tab. I).
2. Pazienti portatori di un doppio riarrangiamento sullo stesso cromosoma 4p, consistente di una relativamente estesa duplicazione parziale, evidente ad un esame cromosomico convenzionale, e di una delezione terminale, diagnosticabile tramite FISH (dup/del 4p) (totale: 3). Questo specifico riarrangiamento è stato da noi osservato per la prima volta in pazienti WH (tab. II).
3. Pazienti non deleti. Questo gruppo include un totale di 7 pazienti con fenotipo WH e cromosomi normali, in cui non si è evidenziata alcuna microdelezione 4p16.3 ad indagini FISH con una serie di sonde cosmidiche specifiche per la WHSCR (tab. III).

Tabella I: Pazienti WHS portatori di delezioni parziali 4 pter.

Paziente N°	Sesso	Età dell'ultima visita clinica (anni)	Cariotipo	Grandezza microdelezione
<b>Delezione citogeneticamente accertata.</b>				
1	F	3	46,XX,del(4)(p15.1)	
2	F	3	46,XX,del(4)(p15.3)	
18	M	18	46,XY,del(4)(p15.3)	
3	M	3, 6/12	46,XY,del(4)(p15.32)	
4	M	2, 4/12	46,XY,del(4)(p15.32)	
5	F	5	46,XX,del(4)(p15.32)	
6	M	2	46,XY,del(4)(p16.1)	
7	M	2, 6/12	46,XY,del(4)(p16.1)	
8	M	9	46,XY,del(4)(p16.1)	
9	M	1	46,XY,del(4)(p16.1)	
10	F	1, 4/12	46,XX,del(4)(p16.1)	
11	M	1, 2/12	46,XY,del(4)(p16.1)	
24	F	2	46,XX,del(4)(p16.1)	
25	M	1	46,XY,der(4)t(4qter-p16.1::13p11-pter)	
26	F	1, 6/12	46,XX,del(4)(p16.1)	
<b>Microdelezione</b>				
12	M	11	46,XY,del(4)(p16.3)	4.4 Mb
13	M	8	46,XY,del(4)(p16.3)	3.4 Mb
15	F	10	46,XX,del(4)(p16.3)	2.8 Mb

Tabella II: Pazienti WH portatori di dup/del 4pter

Paziente N°	Ses so	Età dell'ultima visita clinica (anni)	Cariotipo	Grandezza delezione
22	F	1, 6/12	46,XX, Dup(4)(p15.32-p16.3) ish del(4p)(D4S43-; D4S96-)	>12 Mb
20	F	1, 10/12	46,XX, Dup(4)(p14-p16.1) ish del(4p)(MSX1-; D4S96-)	>8 Mb
14	M	6	46,XY, dup(4)(p16.1-16.3) del(4)(p16.3-pter). ish del(4p)(D4S43-; D4S96-)	3.2 Mb

Tabella III: Pazienti con fenotipo WH non deleti

Paziente N°	Sesso	Età dell'ultima visita clinica (anni)	Cariotipo
19	F	2	46,XX. Ish(4p16.3)(D4S43x2; D4S132x2; D4S166x2; D4S3327x2; D4S96x2)
23	M	5, 2/12	//
21	M	8	//
28	F	6, 9/12	//
16	M	15	//
17	F	2, 5/12	//
29	M	9	//

Per verificare uno degli scopi del presente lavoro, relativo alla consistenza della categoria "WHS senza delezioni" è stato valutato anche:

4. un gruppo di pazienti (tot. 3) portatori di una differente aneuploidia segmentale 4p, cioè di una delezione prossimale con preservazione della WHSCR (tab. IV).



Tabella IV. Pazienti portatori di delezione 4p prossimale (regione WH preservata)

Paziente N°	Sesso	Età dell'ultima visita clinica (anni)	Cariotipo
27	M	3	46, XY, del(4)(p15.2-p16.1), ish (4p16.3) (D4843x2; D4896x2)
30	M	15	46, XY, del(4)(p14-p15.3), ish (4p16.3) (D4843x2; D4896x2)
31	F	18	46, XX, del(4)(p14-p15.2), ish (4p16.3) (D4843x2; D4896x2)

## SEGNI CLINICI

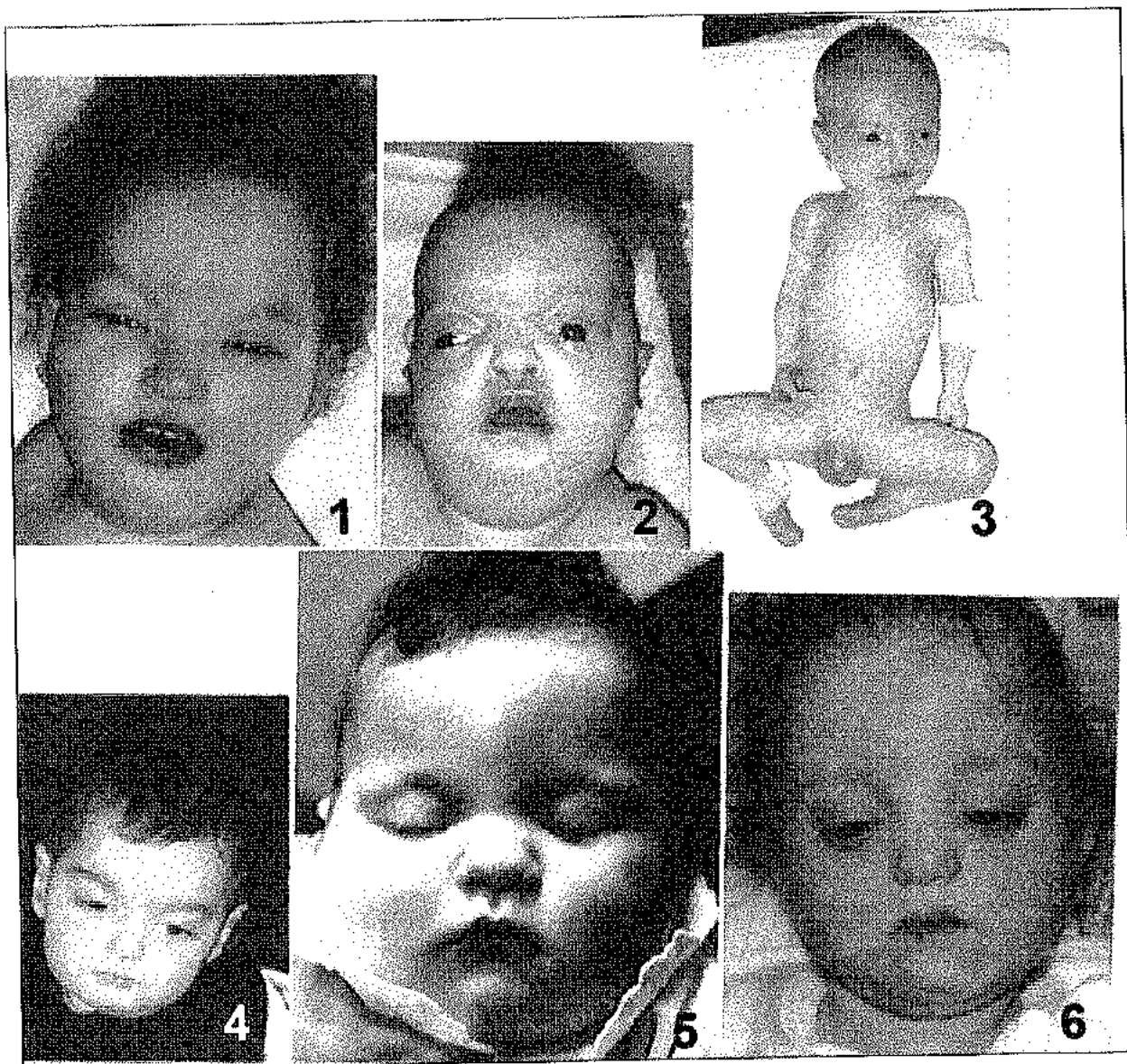
Gruppo 1) (18 pazienti) : 7 F/ 11 M, di età compresa tra 1 e 11 anni.

In breve, i 15 pazienti portatori di un'estesa delezione citogenetica, presentavano i seguenti segni clinici:

- ritardo mentale grave (15/15)
- ritardo di crescita pre e post-natale (15/15)
- ipotonia congenita (15/15)
- aspetto peculiare del volto, in accordo con i tratti patognomonici di questa condizione, con fronte alta con prominenza della sutura metopica, occhi grandi con apparente ipertelorismo, dorso nasale alto, ipoplasia medio-facciale, micrognazia, bocca angolata in basso (15/15) (fig. 3)
- microcefalia (15/15)
- cardiopatia congenita, in forma di difetto interatriale, difetto interventricolare, stenosi polmonare e pervietà del dotto di Botallo (10/15)
- difetti della linea mediana, rappresentati da palatoschisi (5/15), ipospadia (4/15), coloboma dell'iride (1/15)
- anomalie renali, in forma più spesso di ipoplasia renale (3/15) o di più rare anomalie morfostrutturali (4/15)
- epilessia (11/15), insorta in genere dopo i 6 mesi di vita, esordita il più delle volte come convulsioni febbrili.

I pazienti portatori di una microdelezione (tot 3) hanno presentato tutti ritardo mentale, anche se moderato-lieve, facies caratteristica, ipotonia congenita, ritardo di crescita, ma più contenuto (fig.4).

Malformazioni congenite, consistenti di ipospadia e palatoschisi erano presenti solo in un paziente (n. 12), epilessia in 2 pazienti (n. 12 e 15), microcefalia in 2 (n. 12 e 13).



**Fig. 3: Gruppo di pazienti portatori di un'estesa delezione, con limite prossimale compreso tra 4p15 e 4p16.1.**

**Si nota un'espressione assente, indice di un grado più serio di ritardo mentale.**



**Figura 4: Pazienti n. 12, 13 e 15, portatori di microdelezione 4p16.3. E' evidente un'espressione del volto più vigile, per una migliore interazione con l'ambiente.**

I dati clinici relativi alla totalità dei pazienti deleti (gruppo 1) sono riassunti nella tabella V.

### Gruppo 2

Come riassunto nella tabella VI, la totalità dei 3 pazienti in questo gruppo ha presentato solo un fenotipo WH. Pur essendo presente, infatti, una duplicazione parziale 4p relativamente estesa, i segni clinici peculiari di questa condizione, quali occhi piccoli e infossati, naso schiacciato, aspetto del volto tipo "boxer", erano assenti (fig. 5).

Come specificato in seguito, l'estensione della delezione in questo gruppo di pazienti è stata variabile, e il fenotipo ha correlato con essa. Il paziente n. 14, infatti, portatore di una microdelezione 4p16.3 (3.2 Mb), presentava un fenotipo sovrapponibile a quello dei pazienti che, nel gruppo 1, sono risultati portatori di microdelezione; mentre i pazienti N. 22 e 20, in cui la delezione era più estesa, a carico del segmento 4p16.1pter, presentavano un fenotipo simile a quello dei pazienti che nel gruppo 1 erano portatori di una delezione analoga.

### Gruppo 3

La quasi totalità dei pazienti di questo gruppo presentava una facies tipica della WHS (fig. 6), una lieve ipotonia congenita, un lieve ritardo mentale e di crescita. Erano usualmente assenti le malformazioni congenite, così come microcefalia ed epilessia (tab. VII).

Una descrizione più dettagliata è riservata al paziente n. 19.

Unico in questo gruppo, egli presentava un ritardo mentale grave e malformazioni congenite, in forma di fusione renale ed ipospadia.

TABELLA V: Pazienti WH portatori di delezione accertata con esame cromosomico convenzionale (tot. 15) o di microdelezione (tot. 3).

Paziente n°	Ritardo di crescita		Facies caratteristica	Ipotonia	Microcefalia	Difetti cardiaci congeniti	Difetti della linea mediana	Difetti renali	Convulsioni	RM
	Prenatale	Postnatale								
1	+	+++	+	+++	+	DIV, DIA, PDA	Palatoschisi	-	++	++++
2	+	++++	+	+++	+	DIV, DIA	Coloboma	Ipoplasia renale	++	++++
18	+	+++	+	+++	+	DIA	-	-	+	++++
3	+	++	+	++	+	DIA	Palatoschisi	-	+	+++
4	+	++	+	++	+	DIA, SP, PDA, VAB	Ipospadia	Ipoplasia renale	+	+++
5	+	++++	+	+++	+	DIA, SP	-	Fusione renale	+	++++
6	+	+++	+	+++	+	DIV	Palatoschisi	-	+	+++
7	+	+++	+	++	+	SP	Palatoschisi	Ipoplasia renale	++	+++
8	+	++	+	+	+	-	Ipospadia	Rene pelvico	+	+++
9	+	++	+	++	+	DIA, PDA	Ipospadia	Rene pelvico	++	++
10	+	++	+	++	+	DIA	Palatoschisi	Rene pelvico	-	+++
11	+	++	+	++	+	-	Ipospadia	-	+	++
24	+	++	+	++	+	DIA	Ipospadia	-	+	++
25	+	+	+	++	+	-	-	-	++	++
26	+	+	+	++	+	-	-	-	++	++
12	+	+	+	+	+	-	Palatoschisi	-	+	++
13 <sup>a</sup>	+/-	+	+	+	+	-	Ipospadia	-	+/-	+
15	-	+	+	++	+	-	-	-	+	+

I pazienti sono elencati secondo una grandezza decrescente della delezione.

\*DIV, difetto interventricolare; DIA, difetto interatriale; RM, ritardo mentale; PDA, pervietà del dotto arterioso; SP, stenosi polmonare; VAB, valvola aortica bicuspidale.

<sup>a</sup> Sinostosi radio-ulnare.

Tabella VI: Pazienti WH portatori di dup/del (4p) (tot: 3).

Paziente n°	Ritardo di crescita		Facies caratteristica	Ipotonia	Microcefalia	Difetti cardiaci congeniti	Difetti della linea mediana	Difetti renali	Convulsioni	RM
	Prenatale	Postnatale								
22*	+	+	+	+	+	DIA	Palatoschisi	-	+	++
20**	+	+	+	+	+	DIA, PDA, SP	Palatoschisi	-	+	++
14 <sup>a</sup>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	++

DIA, difetto inter-atriale; RM, ritardo mentale; PDA, pervietà del dotto arterioso; SP, stenosi polmonare.

<sup>a</sup> Simposi radio-ulnare.

\* Ipoplasi del corpo calloso e/o del cervelletto.



**Figura 5: Pazienti n. 14 e 20, portatori di dup/del 4p.**

**Si nota facies tipica della WHS e non della sindrome da trisomia parziale 4p.**





**Figura 6: Pazienti n. 16, 17, 21, 29 con fenotipo WH, apparentemente non deleti.**

Tabella VII: Pazienti con fenotipo WT/WT senza delezione in 4p16.3 (tot: 7).

Paziente n°	Ritardo di crescita		Facies caratteristica	Ipotonia	Microcefalia	Difetti cardiaci congeniti	Difetti della linea mediana	Difetti renali	Convulsioni	RM
	Prenatale	Postnatale								
19	+	+	+	+	+	-	Palatoschisi	-	•	+++
29	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
17	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
21	•	+	+	+	-	-	-	-	-	+
28	•	+	+	+	-	-	-	-	-	+
16	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
23	-	-	+	-	-	-	Ipospadi	-	-	+

RM, ritardo mentale.

Un cugino di I grado era affetto da WHS associata ad un'estesa delezione 4p. L'apparente ricorrenza familiare, tuttavia, non può essere sostenuta da due riarrangiamenti differenti (estesa delezione, in un caso, e probabile mutazione puntiforme nell'altro). Per questo motivo tale paziente rappresenta più ragionevolmente un fenocopia della WHS.

#### Gruppo 4

3 pazienti hanno presentato una sindrome con ritardo mentale e anomalie multiple del fenotipo, associata ad un'estesa delezione 4p.

Tale delezione era apparentemente terminale e quindi doveva associarsi ad un fenotipo WH.

Tuttavia i dati clinici erano compatibili non con una WHS, ma con la sindrome da delezione parziale 4p prossimale. Indagini FISH con sonde molecolari specifiche per la WHSCR hanno infatti dimostrato che tale regione era preservata.

Si sottolinea che la facies è alquanto differente da quella tipica della WHS, fatta eccezione per il paziente n. 27 (figura 7).

I segni clinici individuali sono raccolti nella tabella VIII.

E' evidente come la sindrome da delezione 4p prossimale tenda a caratterizzarsi con un eccesso di crescita, le malformazioni congenite sono usualmente assenti.

La descrizione di questa aneusomia segmentale 4p è inserita nel presente lavoro in quanto diventa rilevante per le considerazioni cliniche e nosologiche relative a WHS.



**Figura 7: Pazienti n. 27, 30 e 31, portatori di delezione prossimale 4p.**

Tabella VIII: Pazienti con delezione prossimale 4p con preservazione della WHSCR (tot: 3).

Caso	Ritardo di crescita		Facies caratteristica	Ipotonia	Microcefalia	Difetti cardiaci congeniti	Difetti della linea mediana	Difetti renali	Convulsioni	RM
	Prenatale	Postnatale								
27	-	-	+/-	++	+	-	-	-	-	++
30	-	-	-	++	+	-	-	-	-	++
31	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+

RM, ritardo mentale.

## SINDROME DA DELEZIONE PROSSIMALE 4p

La sindrome da delezione prossimale 4p è più rara della WHS ma ben caratterizzata (White D. e coll. 1995; Chitayat D. e coll. 1995; Estabrooks L. e coll 1993; Ishikawa T. e coll 1990; Uta Francke e coll. 1977).

E' provocata da una delezione interstiziale del braccio corto del cromosoma 4 in una regione più prossimale rispetto alla WHS.

Il fenotipo WHS è infatti assente mentre è presente un altro fenotipo particolarmente caratteristico: aspetto alto e magro tipo Marfan con associata ipotonia; lassità connettivale che porta a problemi di cifo-scoliosi; fratture; piede piatto; mani e piedi grandi; viso allungato con fronte alta e bozze prominenti; rima palpebrale mongolica con epicanto; ptosi palpebrale; strabismo; microcornea; naso a becco; ipoplasia medio facciale; micrognazia; labbra grosse e carnose; palato ogivale.

E' presente ritardo mentale medio-grave mentre invece non c'è ritardo di crescita né malformazioni o convulsioni.

## ANALISI CITOGENETICA E MOLECOLARE

In tutti i pazienti è stata eseguita un'analisi cromosomica su preparati prometafasici (850 bande per corredo aploide) proveniente da linfociti periferici stimolati con PHA.

Il cariotipo è stato valutato con tecnica di bandeggio R (RBG) su un minimo di 20 cellule per ogni singolo paziente.

Le analisi FISH sono state condotte su cromosomi di sangue periferico con una serie di sonde cosmiche specifiche per la regione 4p15pter, opportunamente selezionate per ogni paziente, secondo una procedura standard (Lichter et al. 1990).

In breve, 0.2 µg di sonda marcata con digossigenina o biotina, precedentemente denaturata in presenza di DNA umano Cot-1 veniva unita ad una sonda commerciale specifica per il centromero del cromosoma 4 (Oncor, Gaithersburg, MD) e quindi ibridata su metafasi.

In tutti i pazienti, compresi quelli con delezione accertata citogeneticamente, sono state eseguite analisi FISH con le seguenti sonde:

- pC847.351 (subtelomerica)
- 190b4 e 174g8, delimitanti, distalmente e prossimalmente, la WHSCR.

Questo era per dimostrare se la delezione fosse terminale, e se effettivamente includeva la WHSCR.

Per ogni indagine FISH sono state analizzate una media di 20 metafasi.

Nei pazienti WH con cromosomi normali la presenza e l'esatta estensione di una microdelezione è stata indagata con una serie di sonde molecolari opportunamente scelte, per ogni singolo paziente, tra le seguenti: CD2, IS92, c16Dp, A157.6, IS28, pC678, pC385.12, 19h1, 96a2, 141a8, 108f12, 10d12,

33c6, 161a2, 79f5, 212a9, 65c1, 139a8, 185e6, 241c2, 247f6, 2f10, 27f12, 21f12 e 228q7 (tutte specifiche per la regione 4p16.3), MSX1 (diretta alla regione 4p16.1) 787C10 e 850C11 (dirette alla regione 4p15).

In una prima fase dell'analisi, le sonde cosmiche erano selezionate ad una distanza di circa 500kb.

Queste indagini preliminari sono servite a stabilire la regione di passaggio tra delezione-non delezione, quindi questa regione è stata indagata completamente con una serie di cosmidi sovrapposti specifici per essa. Il livello prossimale della delezione è stato stabilito nell'ambito della sonda che mostrava un segnale molto debole su un cromosoma 4, rispetto al segnale più intenso visibile sull'omologo, a condizione che la sonda subito distale fosse deleta e quella subito prossimale fosse normalmente presente.

Ciò ha consentito di stabilire l'esatta estensione di ogni microdelezione.

In un gruppo selezionato di pazienti è stata condotta un'indagine FISH a doppio colore con due sonde molecolari distinte, una marcata con biotina e l'altra con digossigenina, si da ottenere un segnale rosso-verde distinto per le due sonde.

FISH a doppio colore sono state eseguite nei 3 pazienti portatori del doppio riarrangiamento dup/del (n. 14, 20 e 22), allo scopo di stabilire l'orientamento della duplicazione in tandem ( diretta o invertita? ) e in un gruppo di 5 pazienti portatori della sola delezione, allo scopo di indagare sulla presenza di una concomitante duplicazione criptica.

L'orientamento della duplicazione è stato indagato sia su preparati cromosomici sia su nuclei in interfase, utilizzando sonde distanziate 1-1.5 Mb.

Un esame citogenetico o citogenetico-molecolare è stato eseguito anche nei genitori di ogni paziente, su una media di 50 cellule.



## ANALISI CLINICO-GENETICO-COMPARATIVA

L'analisi comparativa tra tutti i pazienti WH è stata condotta assegnando un punteggio relativo al fenotipo di ogni paziente, variabile da 10 ( il più grave) a 2 ( il più lieve).

Il corrispettivo genotipo è stato valutato con un punteggio da 10 ( delezione più estesa) a 0 (delezione assente).

Va precisato che questi valori non possono essere proposti per una valutazione assoluta, i quanto esprimono semplicemente una valutazione relativa, interna la campione di pazienti in esame.

Nella valutazione del fenotipo sono stati considerati, comparativamente, i seguenti segni e sintomi, con la loro relativa gravità:

- ritardo mentale
- ritardo di crescita pre e post-natale
- cardiopatia congenita
- anomalie renali
- difetto della linea mediana
- convulsioni
- ipotonia
- microcefalia
- età della deambulazione
- età dello sviluppo e del linguaggio
- interazione con l'ambiente.

## RISULTATI

### CITOGENETICA

In un totale di 15 pazienti la delezione parziale 4p è stata diagnosticata con esame cromosomico convenzionale.

Come dimostrato tramite FISH con le sonde pC847.351 (subterminale) e 190b4 e 174g8 (delimitanti la WHSCR), ogni delezione è stata terminale ed ha incluso la WHSCR.

Il limite prossimale delle delezioni è stato variabile, ma è stato ricorrente con alta frequenza alla banda 4p16.1 (totale 9, paz. 6, 7, 8, 9, 10, 11, 24, 25, 26)( tab. I).

Nella figura 8 sono mostrate le delezioni da noi osservate sul cariotipo standard.

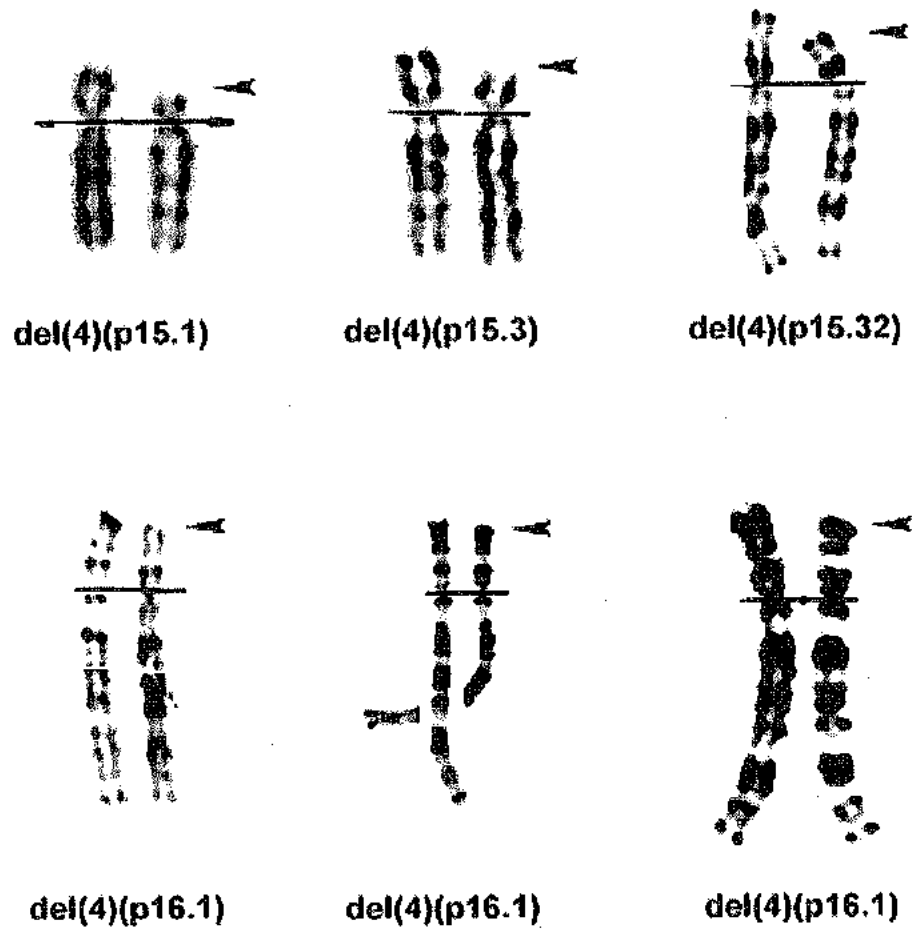
Tre pazienti avevano i cromosomi apparentemente normali. Tuttavia, tramite FISH con sonde cosmiche multiple, è stata dimostrata la presenza di una microdelezione 4p16.3, estesa 4.4, 3.4 e 2.8 Mb, rispettivamente (fig. 9).

Anche in questi tre pazienti la delezione è stata terminale ed ha incluso la WHSCR.

Il limite prossimale della microdelezione è stato differente in ogni paziente, essendo avvenuto nell'ambito del locus identificato dalle sonde 228a7, 26e12 e 79f5, rispettivamente per le microdelezioni di 4.4, 3.4 e 2.8 Mb.

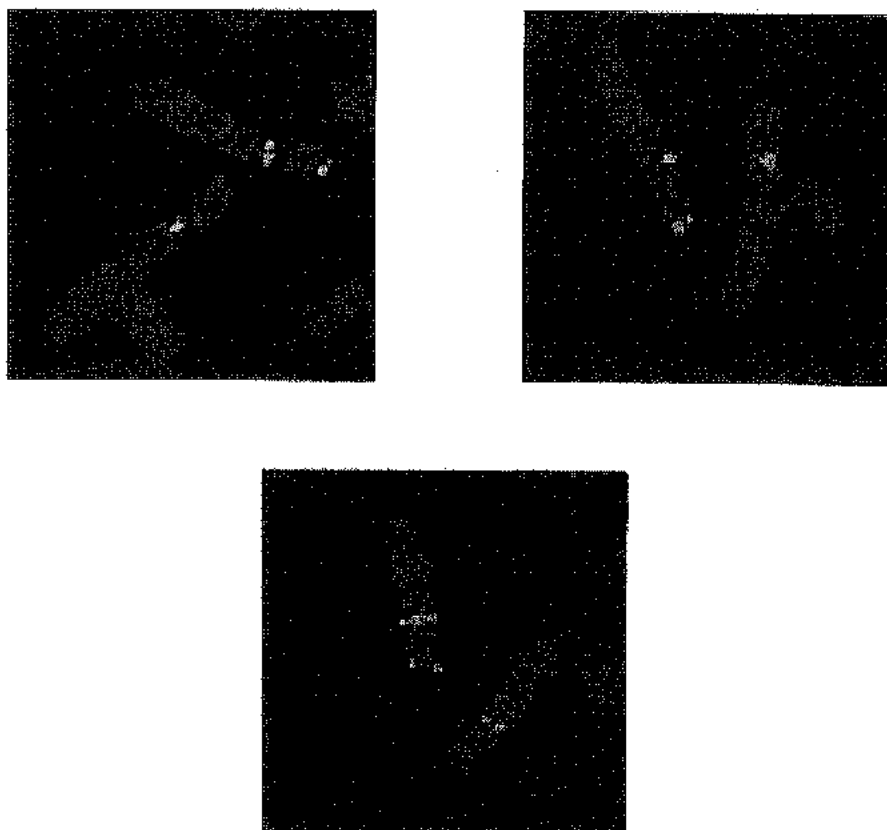
Un totale di 7 pazienti con fenotipo WH ha avuto un cariotipo normale; la presenza di una microdelezione è stata esclusa con una serie di sonde cosmiche (pC678, 190b4, 19h1, 96a2, 174g8, 108f12 e 33c6) che coprono una regione di circa 500 Kb a cavallo della WHSCR.

Questi pazienti sono quindi considerati pazienti WH non deleti.



**Figura 8: Esempi di delezione, in nostri pazienti, diagnosticate con esame cromosomico convenzionale.**

**Si noti l'estensione molto variabile delle delezioni.**



**Figura 9: Esempi di microdelezioni. La diagnosi è stata condotta con la sonda pc678 (locus D4S96), risultata deleta su cromosomi apparentemente normali.**

Un totale di 3 pazienti WH, ha presentato un doppio riarrangiamento 4p, consistente di una duplicazione parziale, visibile con esame cromosomico convenzionale, e di una contigua delezione terminale. Il doppio riarrangiamento dup/del ha interessato lo stesso cromosoma 4 (tab. II).

Come dimostrato da analisi FISH in doppio colore, la duplicazione era invertita (Fig. 10a) in due dei 3 pazienti che è stato possibile testare.

In tutti e 3 i pazienti la delezione, diagnosticabile solo tramite FISH, è stata terminale.

Tutti e 3 i pazienti hanno presentato un'estensione variabile del tratto duplicato (4p16.1p16.3, 4p14p16.1, 4p15.32p16.3) mentre il segmento deleto ha interessato il tratto 4p16.3pter (3.2Mb) nel paziente n.14 (Fig. 10b), e il tratto 4p16.1pter nei pazienti 20 e 22.

Un simile doppio riarrangiamento in 4p è stato osservato da noi per la prima volta in pazienti WH.

La dinamica di questo accertamento è stata alquanto peculiare.

Il primo paziente è stato descritto da noi nel 1999 (Zollino et al. 1999).

Immediatamente dopo questa segnalazione, ci sono stati riferiti, nell'arco di pochi mesi, due ulteriori pazienti con fenotipo WH in cui era stata diagnosticata apparentemente solo una duplicazione 4p parziale con esame cromosomico standard. Indagini FISH hanno tuttavia dimostrato la presenza di una concomitante delezione. Tramite FISH, è stato anche dimostrato che la duplicazione era invertita.

L'associazione dup/del 4p sembra quindi un fenomeno ricorrente, che verosimilmente esita da un frequente meccanismo meiotico; lo stesso meccanismo è probabilmente alla base del riarrangiamento "delezione" apparentemente isolato.

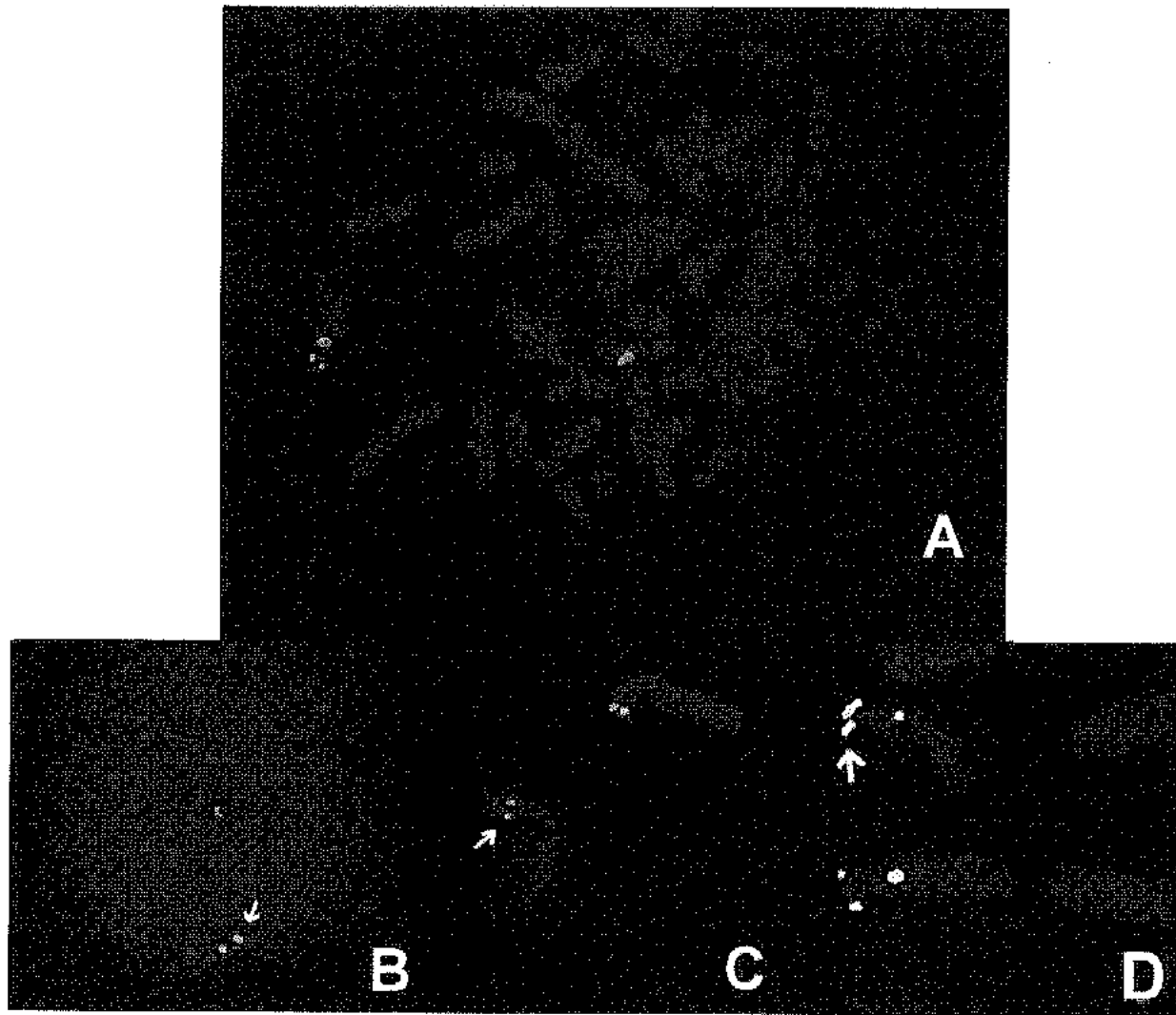
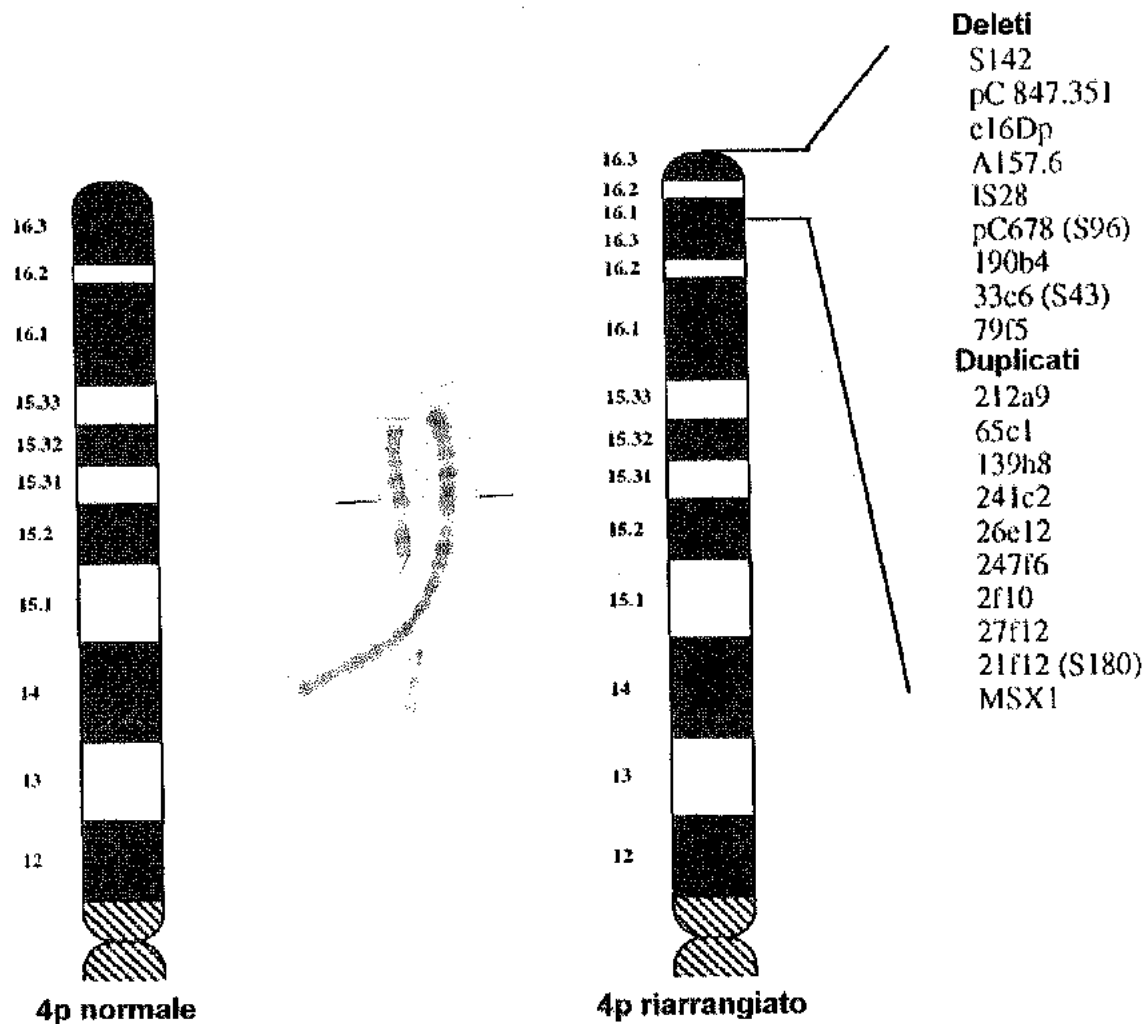


Figura 10a: A: Emizigosi per la regione 4p16.3: la sonda pC678 (D4S96) si ibridizza su un solo cromosoma 4.

B: Duplicazione invertita della regione 4p15.32 p16.3. Interfase. FISH a doppio colore con la sonda 819f7 (prossimale, verde) e con la sonda 850C11 (distale, rossa). Si noti l'alternanza verde-rosso-rosso-verde.

C: FISH a doppio colore con le sonde 850C11 (distale, verde) e 787C10 (prossimale, rossa). La reciproca disposizione delle sonde è evidente sul cromosoma normale (a destra).

D: FISH con la sonda 787C10 (4p15). E' visibile un doppio segnale su un cromosoma 4.



**Figura 10b: Paziente n. 14. Schema riassuntivo dei riarrangiamenti citogenetici e molecolari. La delezione non è visibile citogeneticamente. La duplicazione 4p16.14p16.3, visibile alla citogenetica, è stata confermata dalla FISH con la sonda MSX1, che mappa in 4p16.1, e la sonda 21f12, che mappa in 4p16.3.**

Abbiamo dunque ipotizzato che alcuni pazienti WH, portatori apparentemente di una delezione isolata, possono essere portatori anche di una duplicazione 4p criptica, contigua, in senso prossimale, alla regione deleta.

La presenza di una concomitante duplicazione criptica può influenzare il fenotipo.

Abbiamo quindi intrapreso l'accertamento sistematico di una duplicazione criptica nei pazienti WH portatori della sola delezione.

I dati preliminari relativi a un primo gruppo di 5 pazienti sembrano effettivamente evidenziare una duplicazione criptica in 2 di essi ( fig. 11).

Le sonde utilizzate per la ricerca di una duplicazione criptica sono state selezionate nei singoli pazienti in base all'estensione della delezione, cioè sono state scelte sonde che mappano in una regione subito prossimale, contigua e non deleta, del cromosoma.

Questi dati preliminari sono stati ottenuti con sonde relativamente estese, clonate in Yaacs (circa 500 Kb); per questo abbiamo programmato di confermarli con sonde più piccole (cosmidi).

In base ai meccanismi molecolari che generano il riarrangiamento dup/del su uno stesso cromosoma, che verranno illustrati in seguito, è attesa una doppia popolazione di pazienti WH, una portatrice della sola delezione, e l'altra portatrice di delezione/duplicazione criptica.

Se questa ipotesi verrà confermata, si individuerà un importante fattore di variabilità fenotipica, che implica un differente approccio diagnostico e prognostico ai pazienti WH. I riarrangiamenti osservati sono stati "de novo" in tutti i pazienti eccetto uno (paziente n. 25) in cui la delezione segregava da una traslocazione bilanciata  $t(4; 13)(p16.1;p11)$  presente nella madre (Fig. 12).



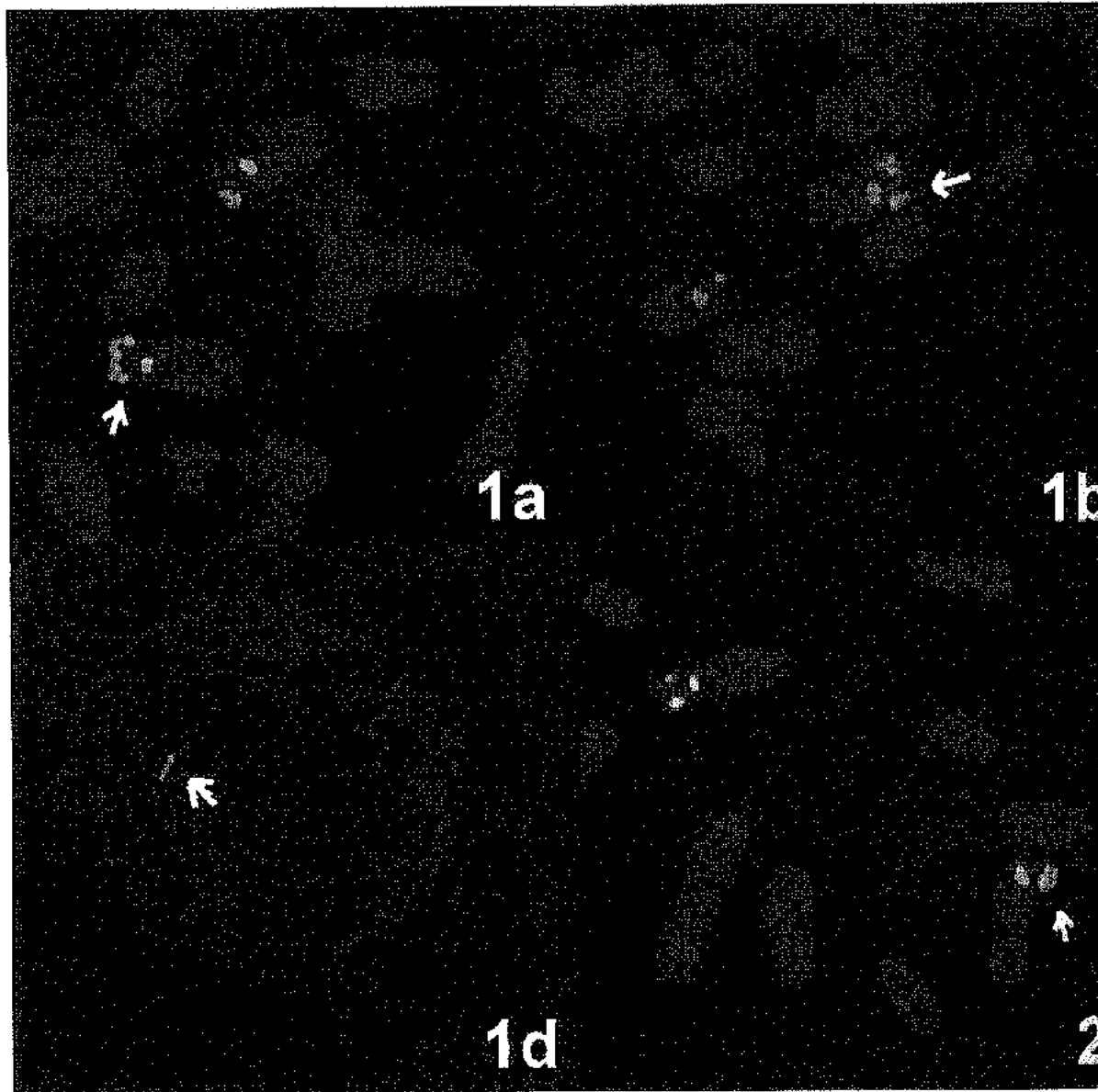


Figura 11: 1a,b,c: Paziente n. 8: del (4)(p16.1). FISH con la sonda 787C10 (4p15).

Apparente duplicazione criptica sul cromosoma 4 delecto.

2: Paziente 18: del (4)(p15.3). FISH con la sonda 850C11.

Apparente duplicazione sul cromosoma 4 delecto.

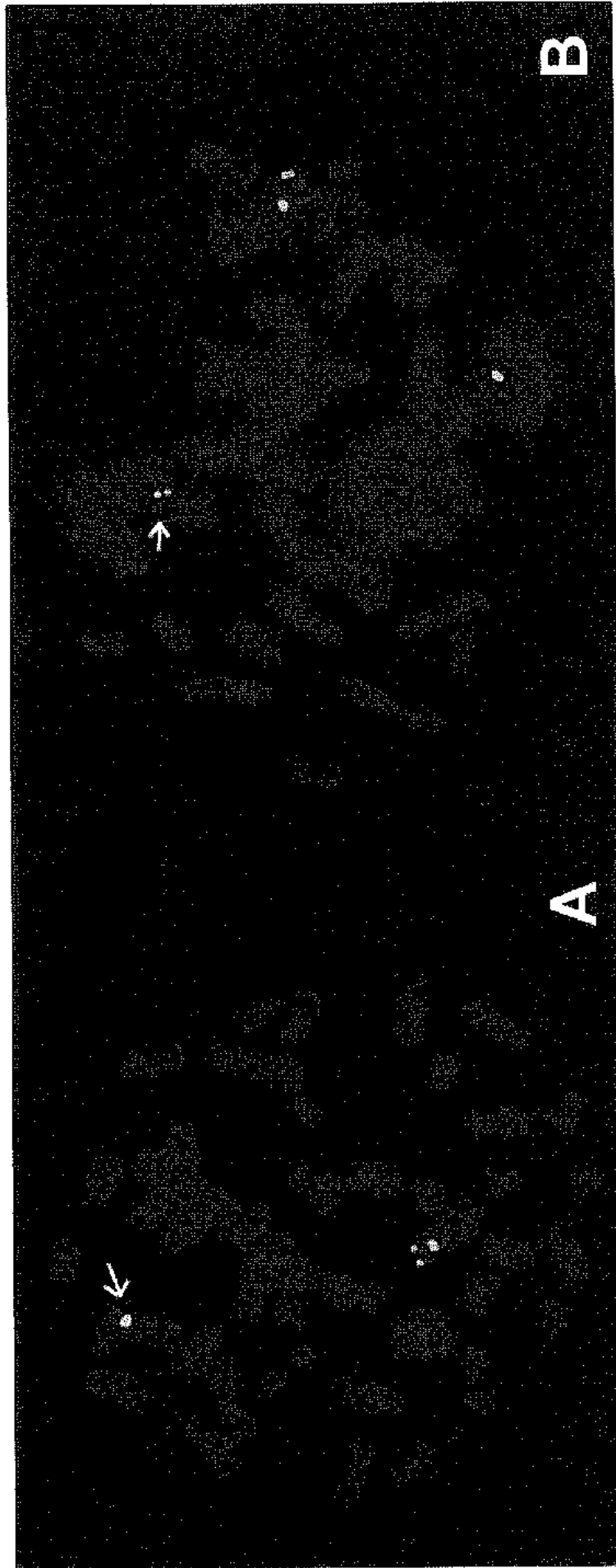


Figura 12. A: Paziente n. 25. Delezione 4p16.3 come dimostrato dalla FISH con la sonda pC678 (D4S96).

B: La madre è portatrice di traslocazione (4; 13) (p11 p16.1). La regione 4p16.3 (sonda pC678) è traslocata sui satelliti di un cromosoma 13.

## CORRELAZIONI GENOTIPO FENOTIPO

L'analisi comparativa di ogni riarrangiamento genetico e del corrispettivo fenotipo ha consentito alcune chiare correlazioni genotipo-fenotipo, rilevanti ai fini della consulenza genetica nelle diagnosi precoci.

1. Come è evidente nella tabella V, la gravità e la complessità del fenotipo è stata in media condizionata dalla grandezza della delezione.

I 15 pazienti portatori di una estesa delezione citogenetica, con limite prossimale compreso tra p15.1 e p16.1, hanno presentato ritardo mentale grave, ritardo di crescita pre e post-natale di notevole entità, ipotonia congenita, microcefalia, malformazioni congenite, in forma di difetti cardiaci, anomalie renali e difetti della linea mediana, e convulsioni. L'età media della deambulazione e dello sviluppo del linguaggio è stata di 7 anni.

I pazienti portatori di microdelezione hanno presentato tutti un fenotipo più lieve. Ad eccezione del paziente n. 12 portatore della microdelezione più estesa (4.4 Mb), che presentava palatoschisi ed ipospadia, le malformazioni congenite sono state assenti. Di notevole interesse è l'assenza di microcefalia nella paziente n. 15 portatrice della microdelezione più piccola (2.8 Mb), la cui circonferenza cranica era al 25° percentile. La grandezza discriminante della delezione, nei confronti della relativa benignità del fenotipo, è risultata essere nel nostro studio di 3.5 Mb: delezioni di grandezza simile o inferiori hanno dato esito sempre ad un fenotipo lieve (incluso quello del paziente n.14 portatore di una delezione di 3.2 Mb associata a duplicazione parziale 4p), con assenza di malformazioni congenite e possibile assenza di microcefalia.

2. Tuttavia, anche se in media la gravità del fenotipo è stata in rapporto con la grandezza della delezione, non si è osservata una correlazione genotipo-fenotipo perfettamente lineare; ad esempio, la delezione più ricorrente nel nostro studio, cioè del(4p16.1pter) si è associata a fenotipi di differente gravità.

Queste osservazioni sono esemplificate nella figura 13, relativa ad un gruppo campione di pazienti WH da noi studiati.

Da questo è evidente che fattori genetici differenti, oltre alla grandezza della delezione, devono intervenire a modulare il fenotipo.

3. I tre pazienti portatori di dup/del 4p hanno mostrato un fenotipo WH, con assenza dei segni clinici tipici della sindrome da trisomia 4p parziale.

La gravità del fenotipo è stata in media condizionata anche in questo gruppo dalla grandezza della delezione.

Tuttavia, questi pazienti, quando comparati con pazienti portatori della sola delezione, di grandezza simile, hanno manifestato un grado maggiore di ritardo mentale e dello sviluppo.

La duplicazione, quindi, anche se non influenza il fenotipo fisico, verosimilmente condiziona il fenotipo comportamentale e l'intelligenza.

La totalità dei pazienti non deleti, eccetto il paziente n. 21, che per le considerazioni precedenti va più ragionevolmente escluso da questo gruppo, ha presentato un fenotipo estremamente lieve, dal punto di vista fisico e mentale, le malformazioni congenite sono state in genere assenti, così come usualmente assenti sono stati i segni "convulsioni" e "microcefalia".

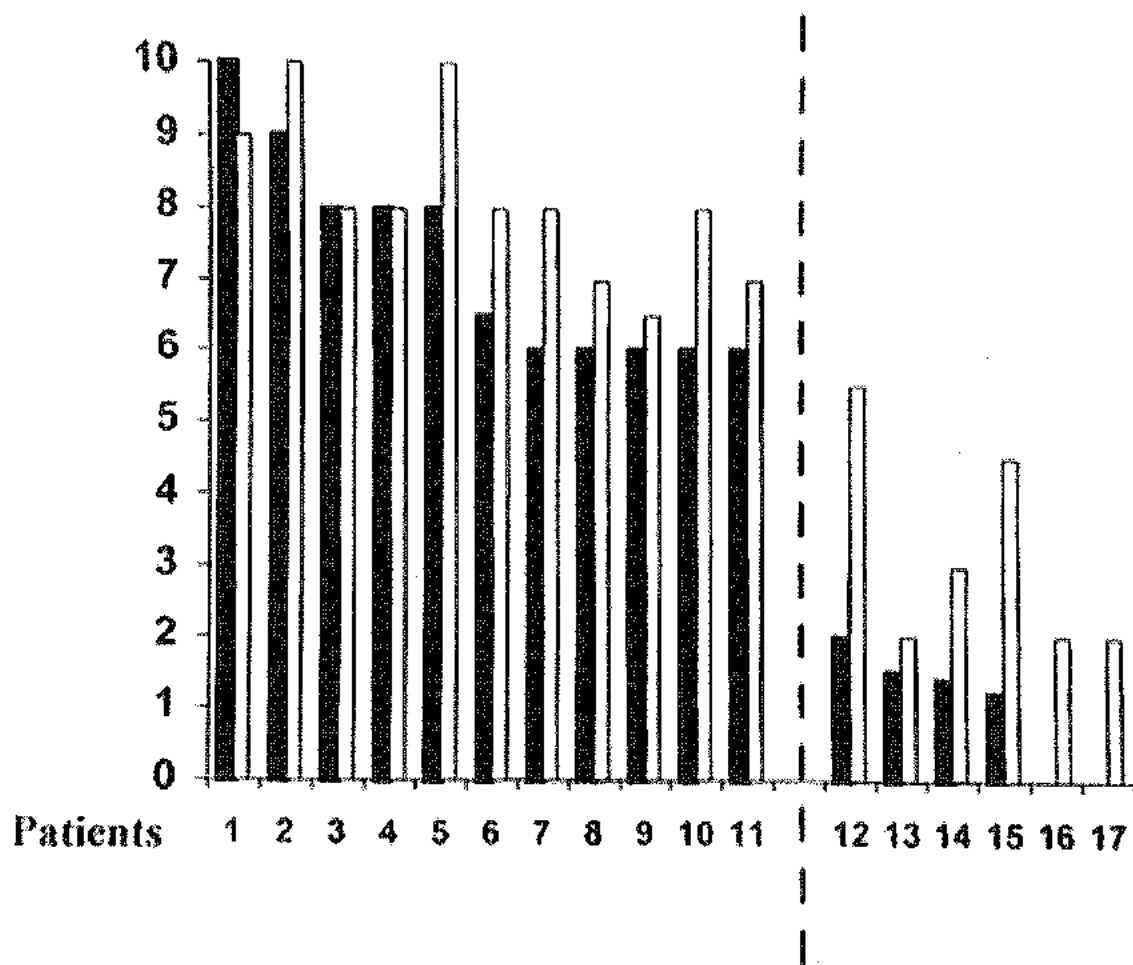


Figura 13: Istogramma delle correlazioni genotipo-fenotipo in un gruppo rappresentativo di pazienti WH. La barra scura rappresenta il punteggio della delezione, quella chiara il punteggio del fenotipo.

La valutazione clinico genetica comparativa della totalità dei pazienti da noi studiati ha consentito di individuare 3 classi cliniche a gravità decrescenti (tab. IX):

1. La I classe include i pazienti portatori di una delezione accertabile con esame cromosomico convenzionale, con limite prossimale dunque compreso tra le bande 4p15.1 e p16.1: il fenotipo è usualmente grave, e include una costellazione di segni e sintomi analoghi a quelli originariamente descritti come patognomonicici di questa condizione;
2. la II classe include i pazienti portatori di una microdelezione compresa tra 4.4 e 3.2 Mb: il fenotipo è indubbiamente più lieve, le malformazioni congenite sono usualmente assenti, ma è ancora presente microcefalia;
3. La III classe comprende la paziente portatrice della più piccola microdelezione (2.8 Mb) che, oltre a presentare un fenotipo più lieve con assenza di malformazioni congenite, non presenta microcefalia.  
Se dunque si ritiene che esista una popolazione di pazienti WH non deleti, il fenotipo di questa categoria deve ricadere in questa classe, la più lieve.  
Sono quindi solo i pazienti non deleti che presentano questo fenotipo i probabili pazienti portatori di mutazione in un singolo gene.

Tabella IX Correlazioni Genotipo-Fenotipo in WHS

Segni Clinici	Classe 1. Grosse delezioni: P15.1-p16.1-pter	Classe 2. "grosse" delezioni molecolari: 4.4 -3.2 Mb	Classe 3: "piccole" delezioni molecolari o non deleti: 2.8 -0 Mb
Facies caratteristica	+	+	+
Ritardo mentale	+	+	+
Ipotonia	+	+	+
Ritardo di crescita	+	+	+
Convulsioni	+	+	-
Microcefalia	+	+	-
Difetti della linea mediana	+	-	-
Difetti cardiaci congeniti	+	-	-
Anomalie renali	+	-	-

## DUPLICAZIONE INVERTITA-DELEZIONE

Prima di illustrare le considerazioni di carattere clinico-prognostico e di carattere nosologico che sono oggetto del presente studio, è necessario esporre alcuni recenti meccanismi molecolari che sono all'origine del doppio riarrangiamento duplicazione-delezione.

C'è evidenza crescente che duplicazioni invertite a carico delle regioni distali di differenti cromosomi sono usualmente associate a delezioni terminali, a carico dello stesso cromosoma (rivisto da Bonaglia et al., 2000).

Tale doppio riarrangiamento è stato descritto per un gran numero di cromosomi, escluso il 4p, che è stato da noi osservato per la prima volta.

I casi più estesamente caratterizzati sono finora le inv/dup (8p). La totalità delle duplicazioni invertite 8p sono associate ad una concomitante delezione terminale, che origina sempre sul cromosoma materno. Questo doppio riarrangiamento è mediato dalla presenza di sequenze ripetute e invertite ("repliconi") localizzate sullo stesso cromosoma 8; tutte le madri sono portatrici di una inversione paracentrica della stessa regione interessata dal riarrangiamento sbilanciato (Giglio et al. 2001, in press).

E' del resto largamente dimostrato che sequenze ripetute e invertite, localizzate sullo stesso cromosoma a distanza di poche Mb, mediano microriarrangiamenti relativamente comuni, come delezioni, duplicazioni, e inversioni, così come le invdup(15) e invdup(22) e la comune traslocazione costituzionale t(11q23;23q11) (Lupski. 1998; Ji et al. 2000 ; Kurahashi et al. 2000).

Tali sequenze ripetute devono quindi essere alla base di numerosi riarrangiamenti meiotici "de novo".

Per l'associazione duplicazione invertita-delezione, è stato recentemente proposto un meccanismo di origine alla meiosi (Bonaglia et al. 2000) (fig. 14).



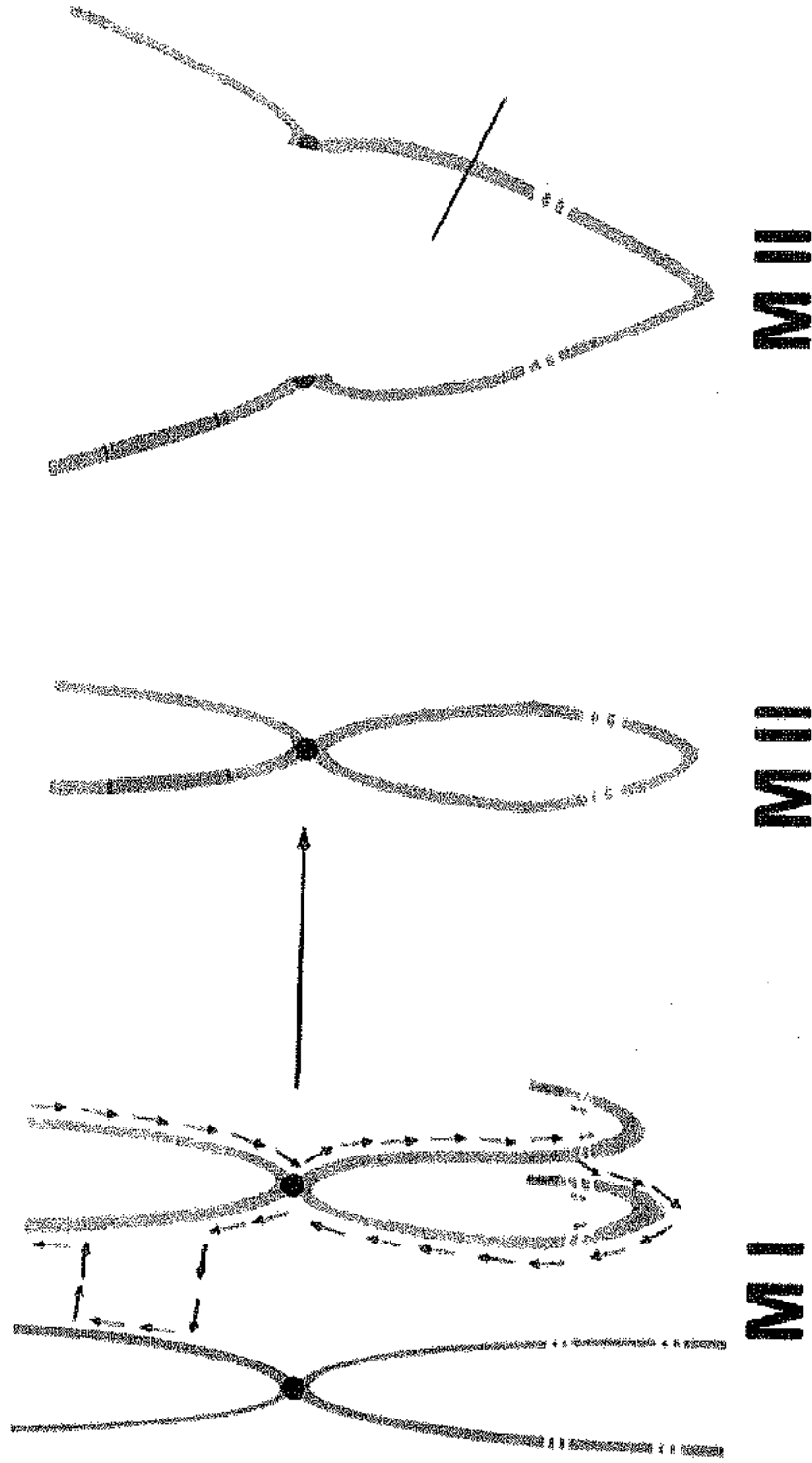


Figura 14: Meccanismo di origine del riarrangiamento risultante in una duplicazione invertita associata ad una delezione distale. Prima divisione meiotica (MI): I due cromosomi omologhi subiscono una ricombinazione canonica (un segmento verde passa sul cromosoma blu). La presenza di sequenze ripetute (linee tratteggiate e frecce rosse) e frecce invertite sullo stesso braccio, favorisce il ripiegamento parziale di un cromosoma su se stesso permettendo la formazione di una sinapsi intracromatidica e quindi di una ricombinazione ectopica. Le frecce nere mostrano come si forma il cromosoma ricombinante. La parte distale alle sequenze ripetute è la parte che sarà deleta. Alla seconda divisione meiotica (MII), quando il centromero si divide, il cromosoma ricombinante si rompe asimmetricamente (linea obliqua), generando un cromosoma invertito-duplicato/deleto (la parte di sinistra) e un cromosoma deleto (la parte di destra).

La presenza di sequenze ripetute e invertite sullo stesso cromosoma favorirebbe un ripiegamento del cromosoma su se stesso, con ricombinazione tra cromatidi fratelli.

Si formerebbe quindi un cromosoma che ha due cromatidi fusi alle estremità, con perdita del segmento distale al punto di ricombinazione intercromatidica.

Con la separazione longitudinale del centromero, si formerebbe un cromosoma dicentrico, e quando i due centromeri vengono sospinti ai due poli opposti della cellula, il cromosoma si rompe, generando, a seconda del punto di rottura, un cromosoma portatore di duplicazione-delezione, e un cromosoma portatore di una semplice delezione.

Se questo meccanismo è veramente comune, come è evidente, è probabile che esso operi anche nella genesi delle delezioni associate a WHS.

A seconda del livello a cui avviene il ripiegamento di un cromosoma su se stesso, favorito dalla presenza di sequenze ripetute, è possibile che si formi un cromosoma con duplicazione apparente e delezione criptica, o al contrario con delezione apparente e duplicazione criptica.

E' verosimile quindi che in gruppo di pazienti WH, portatori della sola delezione, sia in realtà presente una duplicazione criptica, che è in grado di influenzare il fenotipo.

Nell'ipotesi che i riarrangiamenti genomici associati a WHS siano mediati da sequenze ripetute e invertite localizzate sul 4p, sono attesi 2 tipi di cromosomi meiotici ricombinanti, uno portatore solo di delezione e l'altro portatore di delezione-duplicazione. La dimostrazione di questo meccanismo nella WHS implica un nuovo approccio diagnostico a questa condizione; la diagnosi andrà infatti diretta non solo all'accertamento della delezione, ma anche all'accertamento di una concomitante duplicazione. Questo individuerrebbe anche un importante fattore prognostico, utile per la consulenza genetica.

## IL MODELLO MURINO

Il modello del topo knock out è stato molto prodotto recentemente (Naf et al. 2001).

Esso è qui esposto in brevi linee per la rilevanza che assume nel nostro studio di correlazione genotipo-fenotipo. Gli omologhi murini dei geni *HD* (Corea di Huntington) e *FGFR3* (Recettore 3 per il fattore di crescita dei fibroblasti) mappano sul cromosoma 5 del topo, in una regione con alta omologia con la regione 4p16.3 umana. Per questo motivo, i due geni (*Hdh* e *Fgfr3*) demarcano, presumibilmente, la controparte murina della regione critica per la WHS.

Sottoponendo dei topi knock-out all'effetto di radiazioni ionizzanti, è stato possibile selezionare dei cloni portatori di delezioni di varia grandezza della regione di nostro interesse.

Cinque delezioni comprendevano la WHSCR. In tutti i 5 casi, sfruttando la presenza di un polimorfismo di restrizione all'interno del gene *Whscl*, è risultato che tale gene fosse deletato.

Tutti gli animali portatori di questa delezione dimostravano caratteristiche fenotipiche potenzialmente correlabili alla facies ad "Elmetto greco" umana. Le anomalie più evidenti erano il cranio a cupola (i pazienti WHS, in genere hanno un ponte nasale alto), le orecchie più piccole (assenza dei lobi alle orecchie nella WHS), ipertelorismo (tipico della WHS), e, nei casi più severi, una marcata asimmetria facciale (anch'essa tipica della WHS).

Le autopsie di due topi hanno rivelato malocclusione degli incisivi inferiori, palato malformato, asimmetria della mandibola, presenza di formazioni nodose sulla coda. Questi dati suggeriscono un'analogia con i difetti della line mediana della WHS.

La penetranza e l'espressività delle anomalie cranio-facciali erano variabili. Tali difetti si manifestavano sempre, invece, quando le cavie portatrici della delezione venivano incrociate con una particolare linea di cavie non delete (la linea b6), mentre lo stesso fenotipo era molto meno frequente nella progenie di incroci con cavie "Wild type". Ciò potrebbe far supporre che una delezione della WHSCR sia certamente necessaria, ma non sufficiente per l'estrinsecazione del fenotipo classico e che tale fenotipo sia dipendente non solo dall'ampiezza della delezione, ma anche da fattori inerenti al "background" genetico del paziente.

Sono state osservate anche convulsioni spontanee nelle cavie con delezione. Per valutare sistematicamente la suscettibilità alle convulsioni, gli animali sono stati testati per l'incidenza di convulsioni cloniche indotte da elettroshock. Anche in questo caso si è notato che la delezione della sola WHSCR non era sufficiente a provocare aumentata suscettibilità alle convulsioni. Tale delezione, però, era comunque necessaria, perché nessuno degli animali non deleti (o con delezioni al di fuori della regione critica) presentava variazioni di tale suscettibilità.

Il Coloboma e la Cataratta sono componenti tipici del fenotipo WHS. Alcuni animali deleti, infatti, esibivano opacità del cristallino e, all'esame alla lampada a fessura, furono svelati difetti dell'occhio nel 23% dei casi.

Le cavie portatrici delle delezioni più grosse sono state sottoposte al test del labirinto di Morris per identificare eventuali deficit nell'apprendimento. Non è stata notata nessuna differenza rispetto ai controlli. Comunque l'esame autoptico del cervello ha evidenziato una generalizzata ipoplasia della corteccia sia cerebrale che cerebellare. Inoltre, durante il test, i topi deleti nuotavano mantenendo una postura anormale.

Infine era presente ritardo di crescita in tutte le cavie portatrici della delezione.

La presenza di un modello murino affidabile della sindrome è un notevole passo avanti nello studio delle basi genetiche della malattia. Per esempio, provocando

delezioni "mirate" in segmenti diversi della regione 4p16.1, potrebbe essere possibile stabilire l'effetto posizionale di ogni delezione, fino ad identificare i geni responsabili del fenotipo "minimo".

Inoltre, la possibilità di generare un numero illimitato di topi con la stessa delezione, permetterà di studiare l'influenza del "background" genetico incrociando queste cavie con diverse linee non delete.

## DISCUSSIONE

La sindrome di Wolf-Hirschhorn (WHS) è causata da delezione parziale del braccio corto del cromosoma 4.

La delezione, usualmente terminale, ha estensione diversa in diversi pazienti, e si associa ad una costellazione di segni e sintomi che seguono un modello di sindrome da geni contigui.

La maggior parte dei pazienti finora noti presenta un'ampia delezione, di diverse megabasi, diagnosticabile con un esame cromosomico convenzionale. Il fenotipo associato è grave, e include tutta la complessità delle manifestazioni cliniche che sono state originariamente descritte come distintive di questa condizione: ritardo mentale grave, grave ritardo di crescita, ipotonia congenita, malformazioni congenite multiple (difetti cardiaci, difetti della linea mediana e anomalie renali), epilessia e anomalie scheletriche minori.

La diagnosi, in questi casi, già fortemente suggerita dalla peculiarità del fenotipo, è agevolmente confermata da un semplice esame cromosomico.

L'introduzione delle tecniche di citogenetica molecolare, ha consentito negli ultimi anni la diagnosi di alcune microdelezioni limitate alla sola regione 4p16.3, tramite ibridazione in situ fluorescente (FISH) di sonde molecolari su cromosomi apparentemente normali.

Il fenotipo associato a microdelezione è usualmente più lieve, le malformazioni congenite sono spesso assenti, è più contenuto il ritardo delle tappe psicomotorie. Esso è pertanto più subdolo e può sfuggire alla diagnosi, sia per la minore gravità e frequenza di segni clinici, sia per la normalità dell'esame cromosomico convenzionale.

E' verosimile quindi che la prevalenza della WHS da microdelezione sia sottostimata.

Entrambe le categorie, da delezione citogenetica e da delezione molecolare, sono accomunate dalla peculiarità dell'aspetto del volto, che realizza un profilo ad elmetto greco, con fronte alta e prominenza della sutura metopica, occhi grandi con apparente ipertelorismo, dorso nasale pronunciato, ipoplasia medio-facciale e bocca angolata verso il basso.

L'aspetto peculiare del volto rappresenta la componente "gestaltica" della diagnosi di WHS, e spesso è il segno principale che induce l'accertamento diagnostico, soprattutto nei casi da microdelezione.

In letteratura sono sporadicamente riportati pazienti con fenotipo WH ma senza apparenti delezioni, né macroscopiche né molecolari (Romain et al. 1995; Zollino et al. 2000). Anche in questi casi è stato l'aspetto peculiare e distintivo del volto a consentire di porre, tentativamente, una diagnosi di WHS pur in assenza di delezioni.

La regione criticamente deleta (nella WHS) Wolf-Hirschhorn syndrome critical region (WHSCR) è limitata a sole 165 Kb in 4p16.3; in essa risiedono alcuni geni regolatori della trascrizione, che sono potenzialmente critici, da soli, per il determinismo del fenotipo.

Sono stati in effetti descritti finora 3 geni candidati per essere criticamente responsabili del fenotipo: WHSC1, WHSC2 e LETMI, anche se non sono state mai riscontrate mutazioni di uno di essi nella WHS.

Pazienti WH non deleti potrebbero essere portatori di mutazioni in un singolo gene, e rappresentano dei pazienti ideali in cui verificare ipotesi che un singolo gene, ad effetto pleiotropico, sia cruciale nella patogenesi di questa condizione.

Anche se la WHS rappresenta una distinta e ben caratterizzata entità clinica e genetica, allo stato attuale esistono due lacune nell'ambito della sua caratterizzazione nosologica.

La prima è rappresentata dalla sua ampia variabilità fenotipica, che limita la possibilità di una corretta consulenza genetica e di un'appropriata valutazione

prognostica; anche se esiste, infatti, una correlazione tra ampiezza della delezione e gravità del fenotipo, analoghe delezioni possono esitare in fenotipi differenti; la variabilità fenotipica è infatti un segno peculiare della WHS.

La seconda è rappresentata dall'incertezza nel ritenere questa condizione criticamente causata da un singolo gene: mentre è bene caratterizzato il fenotipo da estesa delezione, e si va delineando anche il fenotipo da microdelezione, non è stato mai suggerito, finora, il fenotipo più verosimilmente associato a mutazione di un singolo gene.

Una definizione il più possibile corretta della categoria è fondamentale per la selezione dei pazienti in cui eseguire uno screening mutazionale di geni candidati.

Lo scopo di questa tesi è stato sostanzialmente quello di contribuire a chiarire entrambe le lacune.

Abbiamo condotto una valutazione clinica e genetica comparativa in un gruppo di 28 pazienti affetti da sindrome di Wolf-Hirschhorn: 15 sono risultati portatori di un'estesa delezione, diagnosticabile con esame cromosomico convenzionale; 3 sono risultati portatori di microdelezione, estesa 4.4, 3.4 e 2.8 Mb, rispettivamente; in 3 è stato diagnosticato un doppio riarrangiamento sullo stesso cromosoma 4p, con una duplicazione parziale invertita e una delezione terminale; 7 pazienti sono risultati non deleti.

Il doppio riarrangiamento dup/del 4p, da noi osservato in 3 circostanze, non è stato mai riportato in associazione a WHS.

Abbiamo osservato che, in media, la gravità del fenotipo dipende dall'entità della delezione.

I pazienti portatori di un'estesa delezione, il cui limite prossimale più ricorrente, nella nostra casistica, è stato nella metà distale della regione 4p16.1, hanno presentato tutti un grave ritardo mentale e della crescita, usualmente associato a malformazioni congenite ed epilessia. Una sorta di taglia discriminante della



delezione, nei confronti di un fenotipo lieve, è stata di 3.5 Mb. Pazienti portatori di una microdelezione inferiore a 3.5 Mb hanno tutti presentato infatti un più contenuto grado di ritardo psicomotorio, le malformazioni congenite sono state costantemente assenti. Di particolare rilevanza è l'osservazione che la paziente n. 15 portatrice della più piccola microdelezione (2.8Mb) non presentava microcefalia.

Come è evidente dalla tabella V, parallelamente al decrescere della delezione, si riduce sia la frequenza dei segni e sintomi, sia la loro gravità.

Abbiamo pertanto individuato 3 categorie cliniche, a gravità decrescente: nella I categoria si colloca la maggior parte dei pazienti, portatori di delezione macroscopica: il fenotipo è grave, con microcefalia costante, e rispecchia quello originariamente descritto come distintivo di questa condizione; nella II categoria sono inclusi i pazienti portatori di microdelezione compresa tra 4.4 e 3.2 Mb: il fenotipo è indubbiamente più lieve, le malformazioni congenite sono usualmente assenti, ma è ancora presente microcefalia. Nella terza categoria si colloca un unico paziente delecto, ma portatore della più piccola microdelezione (2.8 Mb): il fenotipo è più lieve, le malformazioni congenite sono assenti, ed è anche assente microcefalia. In accordo alle chiare correlazioni genotipo-fenotipo osservate nei pazienti delecti, i pazienti WH senza delezione devono collocarsi nella III categoria.

Queste considerazioni hanno consentito di delineare il presunto fenotipo WH senza delezione.

Esso consiste di lieve ipotonia congenita, lieve ritardo mentale, lieve ritardo di crescita, che interessa il peso più che l'altezza, e facies caratteristica per WHS, mentre la circonferenza cranica è normale, e sono assenti malformazioni congenite ed epilessia.

Solo pazienti con questo fenotipo rappresentano pazienti ideali in cui eseguire un'analisi mutazionale dei geni candidati per WHS.

Tuttavia questo aspetto merita alcune considerazioni.

Ciò che ha indotto la probabile diagnosi di WHS in questo gruppo di pazienti, pur in assenza di una delezione accertabile, è stato l'aspetto del volto. E' giunto alla nostra osservazione ed è descritto nel presente lavoro (paziente N. 27), un paziente con una facies in parte reminiscente della WHS (fig. 5), ma portatore di una delezione 4p prossimale, mentre la WHSCR era conservata. Questo dato ha inizialmente inficiato la localizzazione del fenotipo WH non deleto in 4p16.3.

Tuttavia la revisione critica di un totale di 3 pazienti portatori di delezione 4p prossimale ci ha consentito di delineare i tratti fenotipici cruciali che, oltre alla facies, estremamente differente, eccetto che per il paziente 27, rispetto a quella della WHS, sono rappresentati da crescita normale o in eccesso (tab. VIII).

Quindi la categoria "WHS senza delezioni" si configura effettivamente come categoria a sé stante, verosimilmente localizzata in 4p16.3.

Tuttavia è arduo considerare questi pazienti come affetti da WHS. In più, se anche si dimostrasse in essi il coinvolgimento di uno dei geni WH candidati, questo non avrebbe alcuna rilevanza per la categoria dei pazienti WH portatori di delezione.

Proponiamo quindi di considerare il gruppo di pazienti non deleti come entità nosologica distinta, comunque di incerta nosologia.

In base alle nostre osservazioni, si sono delineati dunque due fenotipi osservabili nell'ambito della WHS: un fenotipo "classico", completo, che è quello associato ad estesa delezione, e un fenotipo "mild", associato a microdelezione; in aggiunta, si potrebbe considerare, pur con molte incertezze, l'esistenza di un fenotipo WH senza delezioni.

Dal momento che i due fenotipi "classico" e "mild" sono nettamente distinti tra di loro, proponiamo di considerare non una diagnosi di WHS unitaria, in presenza di delezione, ma distinta nelle due forme classica o "mild".

Questa distinzione è utile ai fini di una consulenza genetica appropriata e di una corretta valutazione prognostica.

Le correlazioni genotipo-fenotipo si sono distinte in modo chiaro per queste due classi di grandezza, cioè delezione macroscopica o molecolare.

Tuttavia all'interno di esse la correlazione genotipo-fenotipo non è stata lineare. L'ampia variabilità fenotipica è del resto un segno distintivo di questa condizione, e suggerisce che altri fattori genetici possano intervenire a modulare il fenotipo.

E' stata ipotizzata una variazione allelica nell'allele residuo, come causa di tale variabilità, e questa ipotesi sembra confermata dal modello murino (Naf et al. 2001).

Noi abbiamo posto un'altra ipotesi, e cioè che le delezioni apparentemente isolate possano associarsi, in una parte dei pazienti, ad una duplicazione criptica 4p più prossimale.

Questo suggerimento è venuto dalla osservazione di 3 pazienti WH portatori di dup/del 4p (n.14, 20 e 22). L'orientamento invertito della duplicazione li accomuna ad altri riarrangiamenti analoghi, a carico di differenti cromosomi, in particolare alle inv/dup 8p, costantemente associate a delezione terminale (Giglio et al. 2000). C'è evidenza che tutte le duplicazioni invertite siano associate a delezione terminale (Bonaglia et al. 2000), come conseguenze di un comune riarrangiamento meiotico mediato da sequenze ripetute localizzate sullo stesso cromosoma, a distanza di poche Mb.

Tali sequenze ripetute causerebbero il ripiegamento del cromosoma su se stesso, con crossing-over tra cromatidi fratelli e conseguente perdita di un segmento terminale. Si formerebbe quindi un cromosoma dicentrico, che, sotto la spinta dei centromeri che alla meiosi segregano ai poli opposti della cellula, darebbe origine a due tipi di cromosomi anormali, uno solo delecto, e uno duplicato e delecto.

A seconda del livello a cui avviene il ripiegamento del cromosoma su se stesso, è verosimile che una delezione apparentemente isolata si associ ad una duplicazione criptica.

Uno studio preliminare da noi condotto su 5 pazienti deleti sembra in effetti dimostrare la presenza di una duplicazione in due di essi (figura 9).

Se si conferma questo dato, si sarà individuato un importante fattore genetico di variabilità fenotipica, che è appunto la presenza concomitante di una duplicazione. L'analisi dei 3 pazienti portatori di dup/del 4p ha infatti mostrato che la duplicazione non influenza il fenotipo fisico, ma peggiora il grado di ritardo mentale.

La conferma di questo dato implicherebbe anche un diverso approccio diagnostico alla WHS, che accerti non solo la presenza della delezione, ma anche quella della duplicazione.

## CONCLUSIONI

- Nella valutazione prognostica della WHS, è risultata discriminante un'ampiezza di delezione di sole 3.5 Mb. Delezioni inferiori esitano costantemente in un fenotipo più lieve
- Proponiamo di distinguere la WHS in due categorie diagnostiche: 1) fenotipo classico, che è quello associato a delezione diagnosticabile con esame cromosomico standard, e 2) fenotipo "mild", associato a microdelezione
- Abbiamo tuttavia osservato che i due fenotipi, se pur distinti, mostrano al loro interno una variabilità fenotipica
- Si è delineato il fenotipo WH non delecto, che è caratterizzato da un grado lieve di ritardo mentale e ritardo di crescita, e da assenza di malformazioni congenite, assenza di microcefalia e di epilessia. Anche se i pazienti in questo gruppo sono i pazienti ideali in cui eseguire un'analisi mutazionale di geni candidati per WHS, riteniamo questa categoria a sé stante, molto lontana, clinicamente e eventualmente fenotipicamente, dall'entità "WHS associata a delezione"
- Abbiamo osservato 3 pazienti WH portatori di dup/del 4p. questo doppio riarrangiamento non è stato mai descritto in precedenza in pazienti WH. Abbiamo preliminarmente osservato una duplicazione criptica 4p associata a delezione apparentemente isolata in 2 di 5 pazienti testati.  
Se questo dato sarà confermato, si sarà individuato un importante fattore genetico addizionale che, oltre all'ampiezza della delezione condiziona la gravità del fenotipo.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Altherr MR, Bengtsson U, Elder FFB, Ledbetter DH, Wasmuth JJ, McDonald ME, Gusella JF, Greenberg F. 1991. Molecular confirmation of Wolf-Hirschhorn syndrome with a subtle translocation of chromosome 4. *Am J Hum Genet* 49:1235-1242.
- Bamshad M, O'Quinn Janis R, Carey JC. 1998. Wolf-Hirschhorn syndrome and a split hand malformation. *Am J Med Genet* 74: 351-54.
- Battaglia A., Carey JC. 1998. Wolf-Hirschhorn syndrome and Pitt-rogers-Danks syndrome. *Am J Med Genet* 75:541.
- Battaglia A, Carey JC, Cederholm P, Viskochil DH, Brothman AR, Galasso C. 1999. Natural History of Wolf-Hirschhorn syndrome: experience with 15 cases. *Pediatrics* 103: 830-836.
- Battaglia A, Carey JC, Viskochil DH. et al. 2000. Wolf-Hirschhorn syndrome: a history in pictures. *Clin. Dysmorphol.* 9(1): 25-30.
- Baxendale S, MacDonald ME, Mott R, Francis F, Lin C, Kirby SF, James M, Zehetner G, Hummerich H, Valdes J, Collins FS, Deaven LJ, Gusella JF, Lebrach H, Bates GP. 1993. A cosmid contig and high resolution restriction map of the 2 megabase region containing the Huntington's disease gene. *Nat Genet* 4:181-186.

- Boles RG, Prober BR, McGrath J. et al. 1993. Interstitial deletion of 2q24.2-q31.1 causes characteristic distal limb malformations. *Am J Hum Genet (Suppl)*53: 406.
- Bonaglia MC, Giorda R, Poggi G, Raggi ME, Rossi E, Baroncini A, Giglio S, Borgatti R, Zuffardi O. 2000. Inverted duplications are recurrent rearrangements always associated with a distal deletion: description of a new case involving 2q. *Eur J Hum Genet* 8: 597-603.
- Bourouillou G, Colombies P, Blanc P. 1978. Trisomy 1q secondaire à une translocation réciproque maternelle. *C R* 172:359-362.
- Budarf ML, Beverly SE. 1997. Progress in the autosomal segmental aneusomy syndromes (SASs): single or multi-locus disorders? *Hum Mol Genet* 6: 1657-65.
- Cheng SV, Martin GR, Nadeau JH, Haines JL, Bucan M, Kozak CA, MacDonald ME, Lockyer JL, Ledley FD, Woo SI, et al. 1989. Synteny of mouse chromosome 5 of homologs for human DNA loci linke to the Huntington disease gene. *Genomics* 4: 419-426.
- Chitayat D, Ruvalcaba RH, Babul R, Teshima IE, Posnick JC. et al. 1995. Syndrome of proximal interstitial deletion 4p15: report of three cases and review of ther literature. *Am J Med Genet* 55(2): 147-54.
- Clemens M, Martsolf JT, Rogers JC, Mowery-Rushton P, Surti U, McPherson E. 1996. Pitt-Rogers-Danks syndrome: the restult of a 4p micro-deletion. *Am J Med Genet* 66:95-100.

- Cooper H, Hirschhorn K. 1961. Apparent deletion of short arms of one chromosome (4 or 5) in a child with defects of midline fusion. *Mamm Chrom Nwsl* 4:14.
- Cortina H. 1979. The non-ossified pubis. *Pediatrics Radiol.* 8: 87.
- Curry CJR, Ying KL, O'Lague P, Tsai J. 1982. Elucidation of the cytogenetic abnormality in a 4p- "phenocopy." *Birth defects* 18(3B):275-286.
- Dallapiccola B, Mastroiacovo PP, Montali E, Sommer A. 1977. Trisomy 4p: five new observation and overview. *Clin Genet* 12:344-356.
- Dallapiccola B, Mandich P, Bellone E. 1993. Parental origin of chromosome 4p deletion in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet* 47: 921-924.
- de Grouchy J, Turleau C. 1984. *Clinical atlas of human chromosomes.* New York: Wiley.
- Devriendt K, Matthijs G, Van Dael R, Gewillig M, Eyskens B, Hjalgrim H, Dolmer B, McGaughran J, Brondum-Nielsen K, Marynen P, Fryns JP, Vermeesch JR. 1999. Delineation of the critical deletion region for congenital heart defects, on chromosome 8p23.1. *Am J Hum Genet* 64: 1119-1126.
- Donnai D. 1986. A further patient with the Pitt-Roger-Danks syndrome of mental retardation, unusual face, and intrauterine growth retardation. *Am J Med Genet* 24: 29-32.
- Dunbar RD. 1975. Radiologic signs of the 4p (Wolf) syndrome. *Radiology.* 117: 395.



- El-Rifai W, Leisti J, Kahkonen M, Pietarinen A, Alther MR, Knuutila S. 1995. A patient with Wolf-Hirschhorn syndrome originating from translocation t(4;8)(p16.3,q24.3)pat. *J Med Genet* 32:65-67.
- Endele S, Fuhry M, Sang-Jim Pac, Bernhard U, Zabel B, Winterpacht A. 1999. LETM1, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca<sup>++</sup>-binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients. *Genomics* 60: 218-225.
- Endele S, Fuhry M, Maringer M, Hermanns P, Zabel B, Winterpacht A. 2000. Comparative mapping of human Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region: conservation of genomic organization between man and mouse. *Medizinische Genetik* 1:104.
- Estabrooks LL, Rao KW, Korf B. 1993. Interstitial deletion of distal chromosome 4p in a patient without classical Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet* 45: 97-100.
- Estabrooks LL, Rao KW, Driscoll DA, Crandall BF, Dean JCS, Ikonen E, Korf B, Aylsworth S. 1995. Preliminary phenotypic map of chromosome 4p16 based on 4p deletions. *Am J Med Genet* 57:581-586.
- Fang YY, Bain S, Haan EA, Eyre HJ, MacDonald M, Wright TJ, Altherr MR, Riess O, Sutherland G, Callen DF. 1997. High resolution characterization of an interstitial deletion of less than 1.9 Mb at 4p16.3 associated with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet* 71:453-457.

- Fayaz-ul-Haque M, Uhlhass S. et al. 1993. X-chromosome split-hand/split-foot anomaly maps to Xq26. *Am J Hum Genet (Suppl)* 51: 189.
- Florida G, Piantanida M, Minelli A, Dellavecchia C, Bonaglia C, Rossi E, Gimelli G, Croci G, Franchi F, Gilgenkranz S, Grammatico P, Dalpra L, Wood S, Danesino C, Zuffardi O. 1996. The same molecular mechanism at the maternal meiosis I produces mono and dicentric 8p duplications. *Am J Hum Genet* 58: 785-796.
- Fryns JP, Lemmens F. et al. 1989. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 4. A phenotype distinct from the Wolf-Hirschhorn syndrome. *Ann. Génét* 32: 59-61.
- Gandleman KY, Gibson L, Meyn S, Yang-Feng TL. 1992. Molecular definition of the smallest region of deletion overlap in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Hum Genet* 51:571-578.
- Giglio S, Graw SL, Gimelli G, Pirola B, Varone P, Voullaire L, Lerzo F, Rossi E, Dellavecchia C, Bonaglia MC, Digilio MC, Giannotti A, Marino B, Carrozzo R, Korenberg JR, Danesino C, Sujansky E, Dallapiccola B, Zuffardi O. 2000. Deletion of a 5-cM region at chromosome 8p23 is associated with a spectrum of congenital heart defects. *Circulation* 102: 432-437.
- Giglio S, Broman KW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R, Weber JL, Ledbetter DH, Zuffardi O. 2001. Olfactory receptor (OR) gene clusters, genomic inversion polymorphisms and common chromosome rearrangements.

- Glusman G, Sosinski A, Ben-Asher E, Avidan N, Sonkn D, Bahar A, Clifton S, Roe B, Ferraz C, Demaille J, Lancet D. 2000. Sequence, structure, and evolution of a complete human olfactory receptor gene cluster. *Genomics* 63: 227-245.
- Gonzales CH, Sommer A, Meisner LF, Elejalde BR, Opitz JM. 1977. The trisomy 4p syndrome: case report and review. *Am J Med Genet* 1:137-156.
- Grosson CL, MacDonald ME, Duyao MP, Ambrose CM, Roffler-Tarlov S, Gusella JF. 1994. Synteny conservation of the Huntington's disease gene and surrounding loci on mouse Chromosome 5. *Mamm Genome* 5: 424-428.
- Guerrieri F, Prinos P, Tackels D, Kilpatrick MW, Allanson J, Genuardi M. et al. A split hand-split foot (SHSFM3) gene is located at 10q24-q25. *Am J Med Genet* 62: 427-36.
- Hewitt JE, Clark LN, Ivens A, Williamson R. 1991. Structure and sequence of the human homeobox gene HOX7. *Genomics* 11:670-678.
- Hirschhorn K, Cooper HL, Firschein IL. 1965. Deletion of short arms of chromosome 4-5 in a child with defects of midline fusion. *Humangenetik* 1: 479-482.
- Ishikawa T, Sumi S, Fujimoto S, Shima Y, Wada Y. 1990. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 4 in a boy with mild psychomotor retardation and dysmorphism. *Clin Genet* 38(4): 314-7.

- Ji Y, Eichler EE, Schwarts S, Nicholls RD. 2000. Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. *Genome Res* 10: 597-610.
- Johnson WP, Altherr MR, Blake JM, Keppen LD. 1994. FISH detection of Wolf-Hirschhorn Syndrome: exclusion of D4F26 as critical site. *Am J Med Genet* 52:70-74.
- Kant SG; Van Haeringen A, Bakker E, Stec I, Donnai D, Mollevanger P, Beverstock GC, Lindeman-Kusse MC, Van Ommen G-JB. 1997. Pitt-Rogers-Danks syndrome and Wolf-Hirschhorn syndrome are caused by a deletion in the same region on chromosome 4p16.3. *J Med Genet* 34:569-572.
- Kleinian DJ, van Heyningen V. 1998. Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet* 7: 1611-18.
- Kurahashi H, Shaikh TH, Zackai EH, Celle L, Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS. 2000. Tightly clustered 11q23 and 22q11 breakpoints permit PCR-based detection of the recurrent constitutional t(11;22). *Am J Hum Genet* 67: 763-8.
- Lazjuk GI, Lurie IW, Ostrowskaja TI, Kirillova IA, Nedzved MK, Cherstvoy ED, Silyaeva NF. 1980. The Wolf-Hirschhorn syndrome. II. Pathologic anatomy. *Clin Genet* 18: 6-12.
- Lejeune J, Réthoré O, Dutrillaux D. 1975. 4p- syndrome due to paternal translocation t(4;20)(p15;p12). *Lyon Med* 233:271-275.

- Lichter P, Chang CJ, Call K, Hermanson G, Evans GA, Housman D, Ward DC. 1990. High resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* 247:64-69.
- Lindeman-Kusse MC, Van Haeringen A, Hoorweg JJG, Brunner HG. 1996. Cytogenetic abnormalities in two new patients with Pitt-Rogers-Danks phenotype. *Am J Med Genet* 66:104-112.
- Lupski JR. 1998. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends in Genet* 14: 417-422.
- Lurie I, Lazjuk G, Ussova Y, Presman E, Gurevich D. 1980. The Wolf-Hirschhorn syndrome. *Clin Genet* 17: 375-384.
- Martsoff JT, Chase TR, Jalal SM, Wasdahl WA. 1987. Familial transmission of wolf syndrome resulting from specific deletion 4p16 from t(4;8)(p16;p21)mat. *Clin Genet* 31:366-369.
- Mombaerts P. 1999. Odorant receptor genes in humans. *Curr Opin Genet Dev* 9: 315-320.
- Murray JC. 1990. Wolf-Hirschhorn syndrome, 4p- syndrome. In *The Eye in the Systemic Disease*. D. Gold, T. Weingeist, eds. Philadelphia: J.B. Lippincott. 16-18.
- Naf D, Wilson LA, Bergstrom RA, Smith RS, Goodwin NC, Verkerk A, van Ommen GJ, Ackerman SL, Frankel WN, Schimenti JC. 2001. Mouse models for the Wolf-Hirschhorn deletion syndrome. *Human Mol Genet* 10: 91-98.

- Nielsen J, Rasmussen K. et al. 1977. A 13-year-old girl with Wolf's syndrome and karyotype 46,XX,del(4)(pter---p15::p12---qter),9qh+. Increased risk of structural chromosome abnormalities in the progenie of mothers with 9qh+. J Ment Defic Res 21: 119-126.
- Nunes ME, Schutt G, Kaper RP, Evans JP. 1995. A second autosomal split hand/split foot malformation. Hum Mol Genet 4: 2165-2170.
- Opitz MJ. 1995. Twenty-seven-year follow-up in the Wolf-Hirschhorn syndrome. Am J Med Genet 55: 459-461.
- Partington MW, Fagan K, Soubjaki V, Turner G. 1997. Translocations involving 4p16.3 in three families: deletion causing the Pitt-Rogers\_danks syndrome and duplication resulting in a new overgrowth syndrome. J Med Genet 34:719-728.
- Petek E, Wagner K, Steiner H, Kroisel PM. 2000. Prenatal diagnosis of partial trisomy 4q26-qter and monosomy for the Wolf-Hirschhorn critical region in a fetus with split hand malformation. Prenatal Diagnosis 20: 349-352.
- Ray MJ, Rockman-Greenberg C. et al. 1984. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 4. J Med Genet 21: 223-225.
- Rolland M, Bourouillou G, Elana G, Colombies P, Regnier C. 1977. Trysomie 10p partielle d'origine paternelle, deux nouvelles observations dans deux familles différentes. Ann Genet 20:209-213.

- Romain DR, Parfitt RG. et al 1985. A complex structural rearrangement of chromosome 4 in a woman without phenotypic features of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Clin Genet* 28: 166-172.
- Roulston D, Altherr M, Wasmuth JJ, Christian C, Graham J, Schreck RR. 1991. Confirmation of a suspected deletion of 4p16 by fluorescent in situ hybridization (FISH) with a cosmid probe. *Am J Hum Genet* 49:274.
- Schaumann B, Alter M, 1976. *Dermatoglyphics in medical disorders*. Frankfurt: Springer-Verlag.
- Scherer SW, Poorkaj P, Allen T. et al. 1994. Fine mapping of the autosomal dominant split hand/split foot locus on chromosome 7. *Am J Hum Genet* 55: 12-20.
- Schimenti J, Libby B, Bergstrom R, Wilson L, Naf D, Tarantino L, Alavizadeh A, Lengeling A, Bucan M. 2000. Interdigitated deletion complexes on mouse chromosome 5 induced by irradiation of embryonic stem cells. *Genome Res* 10: 1043-1050.
- Schmickel Roy D. 1986. Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes. *The Journal of pediatrics*. 109(2): 231-41.
- Sebastio G, Perone L, Guzzetta V, Sebastio L, Vicari L, Della Casa R, Gurrieri F, Zappata S, Pomponi MG, Mazzei A, Neri G, Andria G, Brahe C. 1996. Molecular and cytogenetic characterization of a recurrent unbalanced translocation (4;21)(p16.3;q22.1): relevance to the Wolf-Hirschhorn and Down syndrome critical regions. *Am J Med Genet* 63:366-372.

- Small K, Iber J, Warren ST. 1997. Emerin deletion reveals a common X-chromosome inversion mediated by inverted repeats. *Nat Genet* 16: 96-99.
- Stec I, Wright TJ, van Ommen G-J B, de Boer PAJ, van Haeringen A, Moorman FM, Altherr MR, den Dunnen JT. 1998. WHSC1, a 90kb SET domain-containing gene, expressed in early development and homologous to a *Drosophila* dysmorphism gene maps in the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region and is fused to IgH in t(4;14) multiple myeloma. *Hum Mol Genet* 7:1071-1082.
- Stengel-Rutkowski S, Warkotsch A, Schimanek P, Stene J. 1984. Familial Wolf's syndrome with a hidden 4p deletion by traslocation of an 8p segment. Unbalanced inheritance from a maternal traslocation (4;8)(p15.3;p22). Case report, review and risk estimates. *Clin Genet* 25:500-521.
- Sgrò V, Riva E, Canevini PM, Colamaria V, Rottoli A, Minotti L, Canger R. 1995. 4p- syndrome: a chromosomal disorder associated with a particular EEG pattern. *Epilepsia* 36(12): 1206-1214.
- Stec I, Wright TJ, van Ommen G-JB, de Boer PAJ, van Haeringen A, Moorman AFM, Altherr MR, den Dunnen JT. 1998. WHSC! A 90 kb SET Domain-containingn gene, expressed in early development and Homologous to *Drosophila* dysmorphism gene maps in the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region and is fused to IgH in t(4;14) multiple myeloma. *Hum Mol Genet* 7: 1071-1082.



- Somer M, Peippo M, Keineinen M. 1995. Controversial findings in two patients with commercial available probe D4S96 for the Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Hum Genet* 57(Suppl): 127.
- Tranebjaerg L, Petersen A, Hove K, Rehder H, Mikkelsen M. 1984. Clinical and cytogenetic studies in a large (4;8) translocation family with pre and postnatal Wolf syndrome. *Ann Genet* 27:224-229.
- Trask BJ, Massa H, Brand-Arpon V, Chan K, Friedman C, Nguyen OT, Eichler E, vanden Engh G, Rouquier S, Shizuya H, Giorgi D. 1998. Large multi-chromosomal duplications encompass many members of the olfactory receptor gene family in the human genome. *Hum Mol Genet* 7: 2007-20.
- Tupler R, Bortotto L, Buhler EM. 1992. Paternal origin of de novo deleted chromosome 4 in Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Med Genet* 29: 53-55.
- Uta Francke MD, Arias DE, Nyhan W. 1977. Proximal 4p deletion: Phenotype differs from classica 4p- syndrome. *The J of Pediatrics* 90(2): 250-52.
- Viljoen DL, Smart R. 1993. Split foot anomaly, microphthalmia, cleft lip and cleft palate and mental retardation associated with a chromosome 6:13 translocation. *Clin Dysmorphol* 2: 274-277.
- Wheeler PG, Weaver DD, Palmer CG. 1995. Familial translocation resulting in Wolf-hirschhorn syndrome in two related unbalanced individuals: clinical evaluation of 39-year-old man with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet* 55:462-465.

- White DM, Pillers De-Ann M et al. 1995. Interstitial deletions of the short arm of chromosome 4 in patients with a similar combination of multiple minor anomalies and mental retardation. *Am J Med Genet* 57: 588-597.
- Wieczorek D, Krause M, Majewski F, Albrecht B, Meinecke P, Riess O, Gillessen-Kaesbach G. 2000. Unexpected high frequency of de novo unbalanced translocations in patients with Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS). *J Med Genet* 37: 798-804.
- Wieczorek D, Krause M, Majewski F, Albrecht B, Horn D, Riess O, Gillessen-Kaesbach G. 2000. Effect of the size of the deletion and clinical manifestation in Wolf-Hirschhorn syndrome: analysis of 13 patients with a *de novo* deletion. *Eur J Hum Genet* 8: 529-526.
- Wilson MG, Towner JW, Coffin GS, Ebbin AJ, Siris E, Brager P. 1981. Genetic and clinical studies in 13 patients with the Wolf-Hirschhorn syndrome (del (4p)). *Hum Genet* 59:297-307.
- Wolf U, Reinwein H, Porsch R, Schroter R, Baitsch H. 1965. Defizienz an den kurzen Armen eines Chromosoms nr. 4. *Humangenetik* 1: 397-413
- Wright TJ, Ricke DO, Denison K, Abmayr S, Cotter PD, Hirschhorn K, Keinanen M, McDonald-McGinn D, Somer M, Spinner N, Yang-Feng T, Zackai E, Altherr MR. 1997. A transcript map of the newly defined 165 kb Wolf-Hirschhorn syndrome critical region. *Hum Mol Genet* 6(2): 317-324.

- Wright TJ, Clemens M, Quarrel O, Altherr MR. 1998. Wolf-Hirschhorn and Pitt-Rogers-Danks syndromes caused by overlapping 4p deletions. *Am J Med Genet* 75:345-350.
- Wright TJ, Costa JL, Naranjo C, Francis-West P, Altherr MR. 1999. Comparative analysis of a novel gene from the Wolf-Hirschhorn/Pitt-Rogers-Danks syndrome critical region. *Genomics* 59:203-212.
- Wyandt HE, Milunsky J, Lerner T, Gusella JF, Hou A, MacDonald M, Adekunle S, Milunsky A. 1993. Characterization of a duplication in the terminal band of 4p by molecular cytogenetics. *Am J Med Genet* 46:72-76.
- You Y, Bergstrom R, Klemm M, Lederman B, Nelson H, Ticknor C, Jaenisch R, Schimenti J. 1997. Chromosomal deletion complexes in mice by radiation of embryonic stem cells. *Nature Genet.* 15: 285-288.
- Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Spinner M, Altherr MR, Bengtsson U, Wasmuth JJ. 1994. Classical Wolf-Hirschhorn syndrome confirmed molecularly despite normal results using commercially available probes: redefinition of critical region. *Am J Hum Genet* 55:A11.
- Zollino M, Bova R, Neri G. 1996. From Pitt-Rogers-Danks syndrome to Wolf-Hirschhorn syndrome. And back? *Am J Med Genet* 66:113-115.
- Zollino M, Wright TJ, Di Stefano C, Tosolini A, Battaglia A, Altherr MR, Neri G. 1999. "Tandem" duplication of 4p16.1p16.3 chromosome region associated with 4p16.3pter molecular deletion resulting in Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype. *Am J Med Genet* 82:371-375.

Zollino M, Di Stefano C, Zampino G, Mastroiacovo PP, Wright TJ, Sorge G, Selicorni A, Tenconi R, Zappalà A, Battaglia A, Di rocco M, Palka GD, Pallotta R, Altherr MR, Neri G. 2000. Genotype-Phenotype correlations and Clinical Diagnostic Criteria in Wolf-Hirschhorn syndrome.