

UNIVERSITA' DEGLI STUDI "ROMA TRE"

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Scienze Biologiche

Anno Accademico

2001-2002

Sindrome di Wolf-Hirschhorn: caratterizzazione del difetto

genetico di base e correlazioni

genotipo-fenotipo

Candidata

Ivana De Luca

Relatore interno

Prof.ssa Renata Cozzi

Relatore esterno

Dott.ssa Marcella Zollino

INDICE

<u>INTRODUZIONE</u>	<i>pag.</i> 1
IL FENOTIPO	<i>pag.</i> 7
STORIA NATURALE DELLA SINDROME	<i>pag.</i> 10
IL DIFETTO GENETICO DI BASE	<i>pag.</i> 12
I GENI CANDIDATI	<i>pag.</i> 13
<i>WHSC1</i>	<i>pag.</i> 14
<i>WHSC2</i>	<i>pag.</i> 20
<i>LETMI</i>	<i>pag.</i> 23
<u>SCOPO DELLA TESI</u>	<i>pag.</i> 27
<u>MATERIALI e METODI</u>	<i>pag.</i> 28
CASISTICA PERSONALE	<i>pag.</i> 28
SEGNII CLINICI	<i>pag.</i> 34
COLTURE DI LINFOCITI T PER LO STUDIO DELLE MAPPE CROMOSOMICHE	<i>pag.</i> 36
ANALISI CITOGNETICA	<i>pag.</i> 37
BANDEGGIO R	<i>pag.</i> 37
ANALISI CITOGNETICA-MOLECOLARE	<i>pag.</i> 38
ESTRAZIONE DEI COSMIDI	<i>pag.</i> 40
ESTRAZIONE DEI BAC	<i>pag.</i> 41
FISH	<i>pag.</i> 42
<u>RISULTATI</u>	<i>pag.</i> 50
<u>DISCUSSIONE</u>	<i>pag.</i> 59
RIASSUNTO	
BIBLIOGRAFIA	I - IX

INTRODUZIONE

La sindrome di Wolf-Hirschhorn (WHS), descritta per la prima volta indipendentemente da Wolf e Hirschhorn nel 1965 è una condizione con anomalie congenite multiple e ritardo mentale causata da delezione parziale, di estensione variabile, del braccio corto di un cromosoma 4 (Wolf et al. 1965).

La maggior parte dei pazienti finora descritti sono portatori di una lunga delezione, di diverse Mb, che risulta facilmente diagnosticabile con un esame cromosomico convenzionale. Il fenotipo associato a simili macrodelezioni è usualmente grave e include, oltre che un aspetto peculiare del volto, con profilo ad "elmetto di guerriero greco", malformazioni congenite multiple, quali difetti di chiusura della linea mediana, cardiopatie congenite, anomalie renali e scheletriche, grave ritardo di crescita, ipotonia congenita, ritardo mentale grave e convulsioni (de Grouchy e Turleau 1984). L'insieme di tutti questi segni realizza il fenotipo "classico", "completo" della WHS.

I recenti sviluppi delle tecniche di ibridazione *in situ* fluorescente (FISH), hanno consentito di individuare un numero più esiguo, anche se crescente, di microdelezioni su cromosomi apparentemente normali, attraverso l'uso di sonde molecolari specifiche per la regione 4p16.3 (Zackai et al. 1994). Il fenotipo associato a microdelezione è usualmente più lieve, e le malformazioni congenite sono in genere assenti.

In entrambe le situazioni i segni fenotipici ricorrenti, che in genere muovono l'accertamento diagnostico, sono la "facies" peculiare e il ritardo di crescita. (fig.1)

A)



B)



fig.1: **caratteristiche facciali della sindrome di Wolf-Hirschhorn.** Si noti il tipo di profilo realizzato dalle arcate sopraccigliari e dal dorso nasale alto. Gli occhi sono grandi, con apparente ipertelorismo.

A) Paziente portatore di un'estesa delezione: lo sguardo è assente

B) Paziente portatore di microdelezione: è evidente un'attiva partecipazione all'ambiente.

La WHS si delinea quindi come una sindrome da geni contigui, con numero e gravità variabile dei segni clinici in rapporto alla grandezza della delezione e quindi al tipo e al numero dei geni inclusi nell'intervallo di delezione. Alcuni dei segni clinici peculiari di questa condizione sono stati tentativamente attribuiti all'aploinsufficienza (insufficiente dosaggio genico per delezione, strutturale o funzionale, di uno o più loci vicini sullo stesso cromosoma) di specifiche regioni cromosomiche, e nel 1995 Estabrooks et al. hanno pubblicato una mappa fenotipica del braccio corto del cromosoma 4 (Estabrooks et al. 1995) (fig.2). Una mappa fenotipica prevede l'assegnazione di determinate caratteristiche fisiche a specifiche regioni cromosomiche e si ottiene correlando le informazioni cliniche e i dati molecolari. E', però, noto che uno sbilanciamento

cromosomico od una mutazione non sempre risultano in uno specifico fenotipo anomalo, in ragione del concetto di penetranza. Volendo costruire una mappa fenotipica una ridotta penetranza può indurre ad escludere erroneamente una particolare caratteristica da una data regione cromosomica, compromettendo l'accuratezza della mappa stessa. Nel caso in cui un particolare tratto presenti espressività variabile si possono interpretare erroneamente i dati clinici. Se l'espressività è molto blanda la caratteristica in questione rischia di essere trascurata, se, al contrario, è molto forte può causare effetti secondari che alterano indirettamente il fenotipo.

I fattori che si pensa contribuiscano ad una ridotta penetranza e ad un'espressività variabile includono effetti ambientali, genomici e stocastici. Si aggiungono, inoltre, ulteriori imprecisioni, qualora, per la costruzione di una mappa fenotipica, vengano presi in esame soggetti portatori di una delezione dovuta a traslocazione sbilanciata. Poiché questa condizione prevede il coinvolgimento di due cromosomi, uno parzialmente deleto e l'altro parzialmente duplicato, che avranno entrambi effetto sul fenotipo, risulta difficile ricavarne informazioni precise ai fini di una mappatura.

Nello studio condotto da Estabrooks et al. nel 1995 l'estensione di diverse delezioni parziali del 4p è stata indagata attraverso metodi molecolari e correlata al fenotipo presentato da 11 pazienti.

Per ogni anomalia fisica la più piccola regione deleta coincidente è stata determinata comparando il difetto del paziente con l'estensione della sua delezione nell'ambito della regione 4p16. Quando non è stato possibile identificare l'esatto punto di rottura (poiché molto spesso cadeva al limite fra due sonde) si è supposto che la delezione iniziasse o immediatamente dopo l'ultima sonda intatta o subito prima la prima sonda deleta. (tab.1).

4p Locus	Case Number										
	1	2	3	4	5	6+7	8	9	10	11	
D4S142	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D4F28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D4S90	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D4S111	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D4S166	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D4S43	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D4S127	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D4S126	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D4S10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D4S52	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D4S240	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D4S241	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Ra12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

tab. 1: **Estensione delle delezioni.** L'area in nero evidenzia la zona deleta. I loci sono ordinati dal più distale al più proximale alla regione 4p16.

Per minimizzare l'inaccuratezza dovuta ad un'eventuale bassa penetranza Estabrooks e colleghi hanno agito come segue: se una certa anomalia poteva essere assegnata ad una data regione in base all'osservazione di diversi pazienti, ma non si era riscontrata in tre o più pazienti con delezioni sovrapposte alla regione candidata, l'anomalia in questione non era esclusa da quella regione ma la discrepanza osservata veniva ritenuta effetto di una bassa penetranza.

Si è tenuto, inoltre, un ulteriore accorgimento, per quei casi in cui la delezione compariva in seguito ad una traslocazione bilanciata: ai fini della mappatura fenotipica non si è presa in esame alcun'anomalia presentata da questi pazienti che non fosse già stata riportata in letteratura a seguito di una delezione pura del 4p.

La mappa fenotipica che ne risulta è la seguente (fig.2):

Phenotypic Map

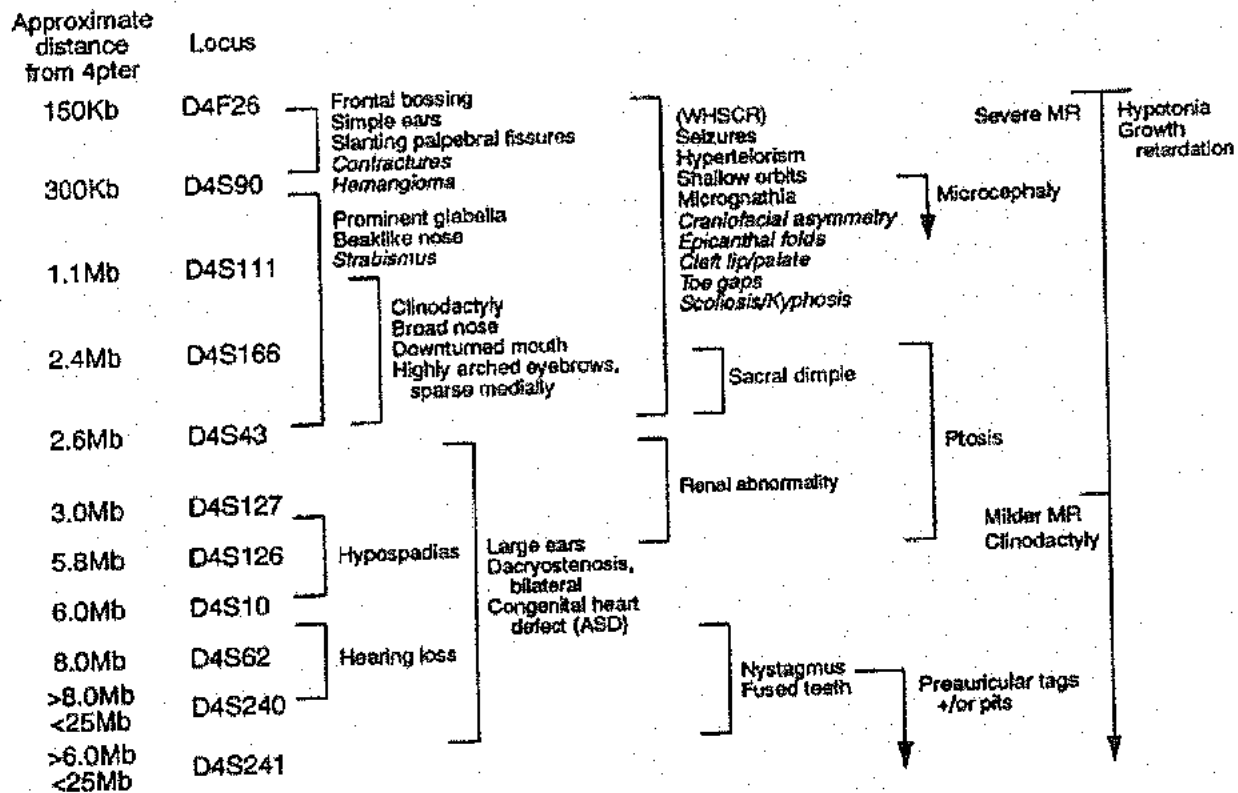


fig.2: Mappa fenotipica della regione 4p16. Ai caratteri scritti in corsivo si attribuisce bassa penetranza

In base ai dati raccolti da Estabrooks e colleghi sembra evidente che alcune manifestazioni tipiche della WHS, quali il ritardo mentale e di crescita, non sembrano attribuibili ad una specifica regione cromosomica. Probabilmente, nell'ambito del 4p, ci sono diversi geni la cui delezione porta ad esprimere questo fenotipo. Comunque, relativamente ai casi considerati, il ritardo mentale grave sembra essere associato ad una delezione distale; un ritardo mentale più lieve si riscontra invece nei pazienti portatori di una delezione interstiziale più prossimale. Similmente, l'ipotonia e la microcefalia non sono state attribuite ad una regione specifica. L'ipotonia, in base ai dati ottenuti

potrebbe mappare in due regioni differenti: una è la regione tra D4F26 e D4S90 e l'altra è quella prossimale a D4S127. Allo stesso modo la microcefalia potrebbe mappare in due regioni differenti: una è la medesima regione, prossimale a D4S127, considerata in merito all'ipotonìa, e l'altra è quella compresa fra i loci D4S90 e D4S93. Altre anomalie sembrano invece mappare in zone più discrete della regione 4p16. L'ipospadia, per esempio, mappa in una regione di approssimativamente 3 Mb, compresa fra i loci D4S127 e D4S10. I padiglioni auricolari semplificati, le fessure palpebrali oblique e la fronte prominente mappano in una regione di circa 150 Kb compresa fra i loci D4F26 e D4S90. In base all'osservazione di due pazienti con delezioni non sovrapponibili (n°5 e 8) si suppone che il carattere clinodattilia mappi in due regioni distinte del 4p16: una, di approssimativamente 1.5 Mb, fra i loci D4S111 e D4S43 ed un'altra prossimale a D4S127. Presumibilmente ci sono almeno due geni, nella regione 4p16, che contribuiscono all'espressione di questo carattere.

La prevalenza della WHS nella popolazione generale è bassa, con una stima di 1/50.000 nati vivi, anche se essa è verosimilmente sottostimata.

Il fenotipo

Il fenotipo largamente riconosciuto come tipico della WHS è quello associato ad una estesa delezione parziale 4p. I segni e i sintomi includono:

- **Aspetto particolare del volto ("facies" caratteristica).** La fronte è alta e spaziosa, c'è apparente ipertelorismo, gli occhi sono grandi e infossati. Il dorso nasale è alto e marcatamente disegnato, in continuità con le arcate sopraccigliari; per questo l'aspetto complessivo del volto richiama il profilo dell'elmetto da guerriero greco. La punta del naso è arcuata, si nota ipoplasia mediofaciale, micrognazia, bocca relativamente larga e angolata in basso. I padiglioni auricolari sono dismorfici, in quanto spesso antiversi, angolati posteriormente, e semplificati.
- **Ritardo di crescita, pre- e postnatale.** Il parto è spesso pretermine, il peso neonatale molto basso per l'epoca gestazionale. Il ritardo di crescita è marcato e costante durante tutte le fasi della vita postnatale.
- **Microcefalia.** La circonferenza cranica è inferiore al 2° percentile fin dall'epoca prenatale. La circonferenza cranica si valuta, in genere, in rapporto all'età e al sesso del soggetto, tuttavia, in presenza di ritardo di crescita, bisogna anche considerarla in rapporto all'altezza. La microcefalia nella WHS è una microcefalia vera in quanto la circonferenza cranica non è piccola solo perché i soggetti sono piccoli, ma è molto inferiore rispetto al percentile dell'altezza.
- **Ritardo mentale.** E' usualmente grave, con linguaggio assente e scarsa interazione con l'ambiente. Tuttavia il grado di ritardo psicomotorio dipende in larga misura dalla grandezza della delezione.

- **Difetti della linea mediana.** E' frequente l'occorrenza di labio-palatoschisi, ipospadia e coloboma dell'iride.
- **Cardiopatie congenite.** Interessano la maggior parte dei soggetti portatori di una estesa delezione. Si tratta di difetti aspecifici, che raramente mettono a repentaglio la possibilità di sopravvivenza. Più comunemente si osservano difetti interatriali o interventricolari e stenosi polmonare, più raramente sono stati descritti difetti più complessi, come tetralogia di Fallot.
- **Anomalie renali.** Si tratta più spesso di ipoplasia renale bilaterale o di reflusso vescico-ureterale, più rare sono le anomalie strutturali, quali il rene a ferro di cavallo.
- **Anomalie nelle mani e nei piedi.** Alcuni pazienti hanno presentato ectrodattilia, condizione relativamente comune e geneticamente eterogenea legata a più loci, di cui uno mappa in 4p15.1
- **Difetti dello scheletro.** Si osservano in circa il 70% dei casi, in forma di scoliosi, cifosi, anomalie vertebrali (vertebre fuse, malformate e bifide) e displasia congenita dell'anca.
- **Ipotonia.** E' congenita e grave, provoca un ritardo delle tappe motorie (il paziente deambula a 6-8 anni).
- **Epilessia.** Questo sintomo è presente nella pressochè totalità dei pazienti. L'età di insorgenza è compresa fra 5 e 15 mesi di vita, le crisi hanno una regressione spontanea intorno ai 10 anni. Clinicamente, l'epilessia si presenta in diverse forme, come crisi parziali, crisi generalizzate, crisi miocloniche e assenze. E' tipico il pattern EEGrafico delle crisi, che riproduce quello tipico della sindrome di Angelman: attività rapida "inusuale" a 13-18 Hz, diffusa su tutte le regioni,

frammista all'attività di base, presenza di parossismi ad attività lenta, ad ampio voltaggio, con superimposte figure di punta, soprattutto sulle regioni parieto-occipitali, favorita dalla chiusura degli occhi (Sgrò et al. 1995).

Il fenotipo associato a microdelezione è generalmente più lieve. Anche se le segnalazioni della letteratura sono scarse, esso si delinea come caratterizzato da aspetto peculiare del volto, ritardo di crescita, ritardo mentale e convulsioni. In particolare, le malformazioni congenite sono generalmente assenti, il grado di ritardo psicomotorio è sensibilmente più moderato. La definizione del fenotipo WH associato a microdelezione rappresenta uno degli scopi della tesi.

STORIA NATURALE DELLA SINDROME

Le informazioni sulla storia naturale della WHS non sono ancora moltissime. 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 a oggi.

Diventa perciò indispensabile stabilire le linee 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 maggiori è quella dell'alimentazione. Una labiopalatoschisi, 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 psicomotorio 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 microdelezioni.

Il difetto genetico di base

La delezione parziale 4p rappresenta una mutazione *de novo* in circa l'85% dei casi.

Nel restante 15% dei pazienti essa segrega da una traslocazione parentale bilanciata, con frequente interessamento dei cromosomi 8, 12 e 22 (Wheeler et al., 1995).

La delezione parziale 4p è usualmente terminale; citogeneticamente, la regione cromosomica costantemente inclusa nell'intervallo di delezione è la regione 4p16.3.

Una esigua minoranza di pazienti con WHS è portatrice di una delezione 4p interstiziale, con preservazione della regione telomerica. L'analisi comparata delle delezioni interstiziali associate a WHS ha consentito di stabilire, a livello molecolare, il minimo intervallo di delezione nella WHS, la cosiddetta "Wolf-Hirschhorn syndrome critical region" (WHSCR). La regione criticamente deleta si è ritenuta finora ristretta a sole 165 Kb nell'ambito della regione 4p16.3, delimitata dai loci D4S166 (cosmide 174g8 incluso) e D4S3327 (cosmide 19h1 incluso) (Wright et al., 1997). Essa è stata però recentemente ridefinita dal nostro gruppo di studio, come verrà esposto in seguito nel presente lavoro (Zollino et al. 2003).

Visto l'effetto pleiotropico, nei confronti del fenotipo, di una regione così ristretta, è stato ipotizzato che pochi geni situati nell'ambito di questa regione siano criticamente responsabili del fenotipo WH, agendo come regolatori centrali della trascrizione di numerosi altri geni.

Tre geni distinti sono stati finora descritti da ricercatori differenti come eccellenti candidati per essere criticamente responsabili del fenotipo.

I GENI CANDIDATI

La complessità e la variabilità del fenotipo suggeriscono che la WHS sia causata dall'alterazione di più geni. Tuttavia è verosimile che alcuni geni siano correlati prevalentemente con un sintomo o un segno specifico, quale la "facies" e l'epilessia.

Sono stati finora descritti tre geni candidati per questa condizione: *WHSC1*, *WHSC2* e *LETMI*. (fig.3).

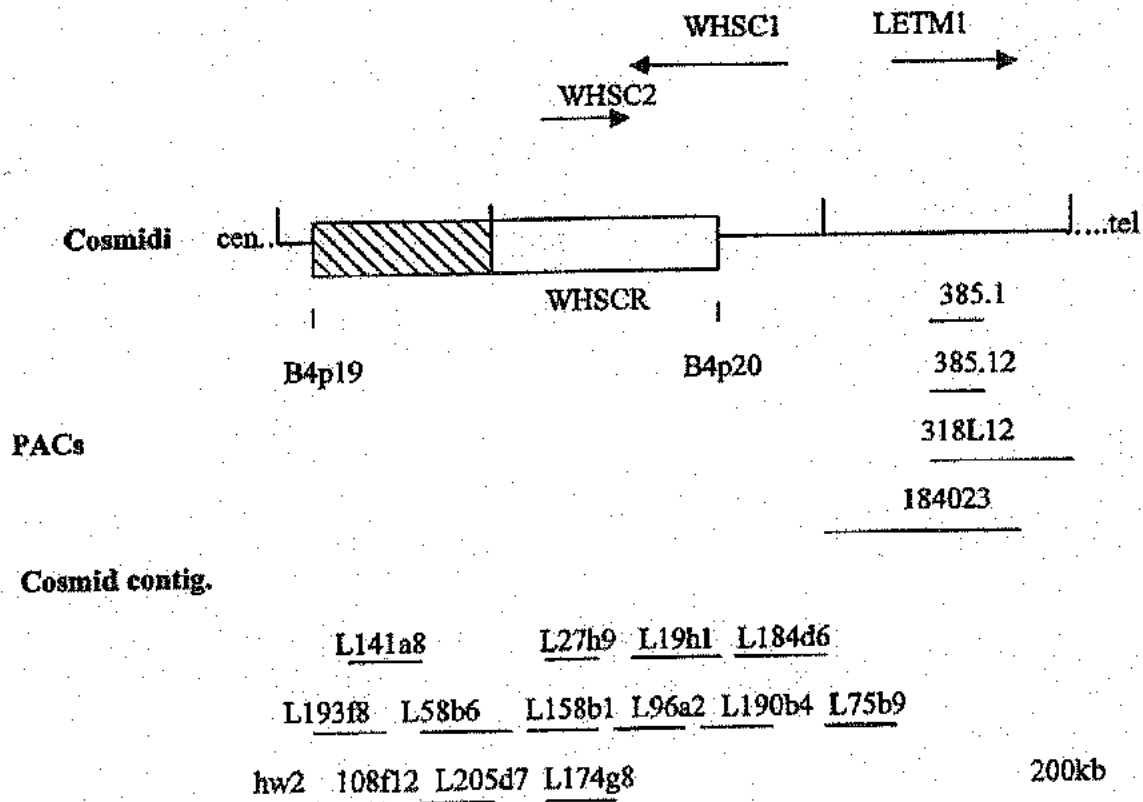


Fig 3: mappa della regione 4p16.1 La localizzazione di *WHSC1*, *WHSC2* e *LETMI* è mostrata dalle frecce.

WHSC1: 2/3 nella regione finora ritenuta WHSCR

WHSC2: tutto nella regione critica, contenuto nel cosmide 96a2

LETMI: al di fuori della regione critica, probabilmente interessato per effetto di posizione,

WHSCI

WHSCI (fig.3 e 4) è stato identificato inizialmente grazie alla forte somiglianza del prodotto di trascrizione di una sequenza contenuta nella *WHSCR* con il cosiddetto dominio SET della proteina *ASH1* (Absent or Small Homeotic discs) di *Drosophila* (Stec et al. 1998).

L'intero gene misura 90 Kb, è trascritto in direzione telomero → centromero e si estende per 60 kb entro l'estremo telomerico della regione critica di 165 Kb.

Contiene 25 esoni che, tutti insieme, codificano un cDNA di 8 Kb.

Il codone ATG di inizio della traduzione si trova nell'esone 4 ed è preceduto da una regione in 5' non tradotta (UTR) lunga più di 400 bp. La lunghezza degli esoni varia tra 82 e 3565 bp, quella degli introni tra 132 e 13718 bp. È stato trovato splicing alternativo per gli esoni 2 e 3, con RT-PCR tra gli esoni 1 e 4 si ottengono: un prodotto di 280 bp presente nell'RNA del sangue, del pancreas, dei testicoli e del cuore ed uno di 400 bp nel cervello. La sequenza di 400 bp contiene gli esoni dall'1 al 4 mentre quella di 280 bp manca degli esoni 2 e 3. Inoltre il database EST contiene un clone, EST 27266, in cui manca soltanto l'esone 2, quindi dovrebbero esistere perlomeno tre forme di splicing in questa regione di *WHSCI*.

La trascrizione degli esoni dal 10 al 13 è molto complessa. Nell'esone 12 ci sono due siti per splicing alternativo che danno un prodotto di 94 bp ed uno di 227bp e due siti per l'addizione della coda di poli(A).

L'espressione di questo esone è riscontrabile con PCR soltanto utilizzando un primer che si trovi al suo stesso interno, con PCR tra l'esone 7 e il 14 si riscontrano solo prodotti che mancano del 12. Uno splicing alternativo è stato trovato sequenziando il

cDNA del clone HFBEP10 che termina nell'introne 11 e contiene parte dell'esone 7, l'8, il 9 e undici basi del 10 per una lunghezza totale di 3613 bp.

Un altro clone, EST zv63h03, finisce con una coda di poli(A) 646 bp a monte dell'esone 11 che è preceduto, di 37 bp a valle, da un perfetto segnale AATAAA di poliadenilazione.

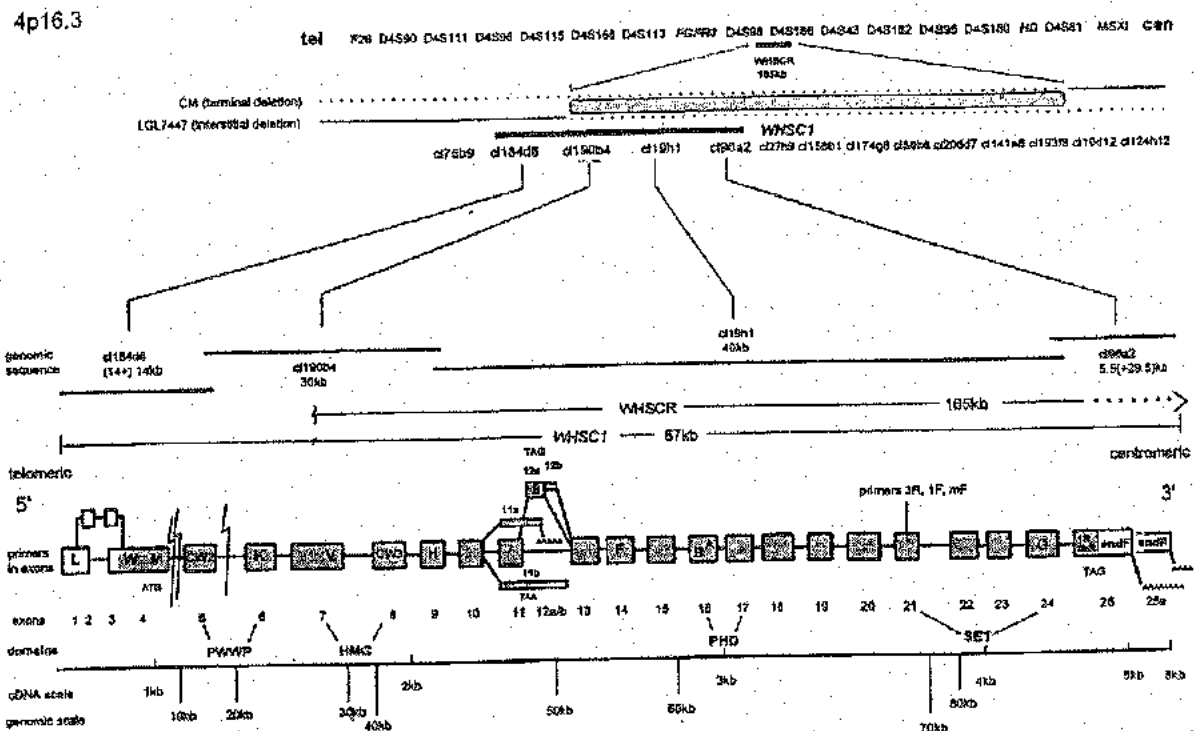


Fig 4: struttura del gene *WHSC1*

In alto: marcatori della regione 4p16.3 dal telomero al centromero. La WHSCR è localizzata tra il gene *FGF3* e il gene della malattia di Huntington (*HD*).

In mezzo: contig dei cosmidi della WHSCR. *WHSC1* comprende i cosmidi 196a2, 119h11, 190b4 e 184d6.

In basso: organizzazione in esoni ed introni di *WHSC1*. Gli esoni sono rappresentati dai riquadri, gli introni dalle linee.

La ORF è mostrata dalla linea su cui sono indicati anche i domini dell'ipotetica proteina.

Anche all'estremo 3' di *WHSC1* sembrano esserci due siti alternativi di poliadenilazione descritti in due contigs EST. Il primo comprende gli esoni dal 20 al 5 e finisce in un sito

di poliadenilazione localizzato a 32204 bp in 96a2 non preceduto da una sequenza consensus poli(A). Il secondo contig EST finisce 2.4 Kb più a valle, a 29796 bp in 96a2 ed è preceduto da un segnale AATAAA 31 bp a monte, non è interrotto da introni e sembra non avere potenzialità di codificazione.

Tra l'esone 4 ed il 5 *WHSCI* contiene una open reading frame (ORF) di 4095 bp, che codifica una proteina di 136 KDa, seguita da una UTR in 3' di 3294 bp. Lo splicing alternativo fra gli esoni 2 e 3 non sembra dare ulteriori prodotti proteici, ma l'utilizzo alternativo di due siti di poliadenilazione, che si trovano rispettivamente negli esoni 11a e 11b, porta a due proteine, una di 62 Kda e l'altra di 64 Kda con 20 amminoacidi in più. Il prodotto di 136 Kda, più studiato fin'ora rispetto agli altri due, rivela svariate omologie con i membri di una serie di famiglie proteiche che fanno pensare si tratti di una proteina che lega il DNA più che un fattore di trascrizione od un co-regolatore, come si era ipotizzato in principio.

Questa proteina presenta una regione molto conservata, dall'amminoacido 211 al 295, che codifica il cosiddetto dominio PWWP (prolina-triptofano-triptofano-prolina) presente anche nel prodotto del gene MSH6 del GT/DNA mismatch repair, che è all'origine del cancro colon-rettale non poliposo (HNPCC), e nel fattore di crescita derivato dall'epatoma (HDGF).

Gli amminoacidi dal 459 al 503 presentano omologia con l'HMG box (36% di identità, 52% di similitudine) che è un dominio di legame con il DNA che causa una distorsione di 130° della doppia elica. Il box HMG è presente in molte proteine strettamente correlate alla proliferazione cellulare come ad esempio il fattore di trascrizione UBF (upstream binding factor) dell'RNAPolimerasiI, il fattore di determinazione testicolare dei mammiferi SRY e la proteina cromosomica non istonica HMG. Le strutture che

maggiormente hanno contribuito all'identificazione del potenziale ruolo della proteina codificata dal gene *WHSC1* non sono però quelle fin qui elencate, ma due domini comuni alla stragrande maggioranza delle proteine che legano il DNA: il motivo zinc-finger (fig.5) e l'omeodominio SET (fig.6).

L'PHD-type zinc finger (plant homeodomain) è localizzato in posizione 833-875 ed è comune a molte proteine, tra cui ATRX (alpha talassemia mental retardation syndrom, X linked) di cui è conosciuto il meccanismo di interazione diretta con la cromatina, e il fattore umano TIF1 (transcriptional intermediary factor 1) che invece interagisce con proteine essenziali per la regolazione della trascrizione.

Il dominio zinc-finger è stato identificato per la prima volta proprio studiando i fattori di trascrizione e può essere considerato un'unità di ripiegamento autonoma rispetto al resto della proteina identificabile con una struttura "miniglobulare" caratterizzata da un core idrofobo e catene laterali idrofile. La struttura è formata da un motivo a forcina β antiparallela (residui 1-10), seguita da un'elica (residui 12-24). I 4 ligandi dello zinco, Cys 3, Cys 6, Hys 19 e Hys 23, ancorano un'estremità dell'elica ad un'estremità del foglietto β formando una sorta di "dito" che si insinua nel solco maggiore dell'elica del DNA.

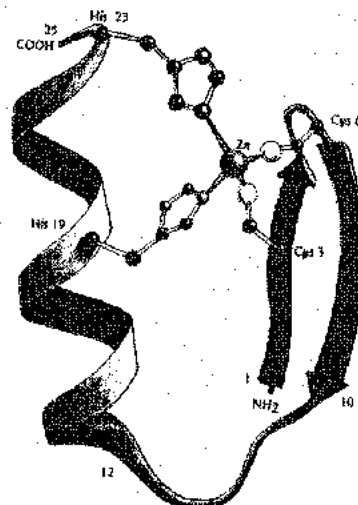


Fig 5:zinc-finger

L'omeodominio SET si trova in posizione 1074-1180, consiste di circa 140 amminoacidi ed è stato identificato in una vasta gamma di proteine inerenti alla trascrizione ed allo sviluppo, in diversi organismi. Si trova per esempio nella proteina umana ALL1 (acute lymphocytic leukaemia) e in ASH1 di *Drosophila*. I geni che codificano proteine contenenti l'omeodominio SET sono una famiglia altamente conservata, il cui prodotto influenza la trascrizione agendo sui meccanismi di regolazione della cromatina, avendo così un effetto secondario sui programmi di sviluppo. La sequenza di un omeodominio è stata scoperta per la prima volta proprio nel genoma di *Drosophila* nel corso di studi su mutazioni che causano bizzarre alterazioni del piano corporeo, dette mutazioni omeotiche; per esempio nella mutazione Antennapedia dalla testa si sviluppano zampe anziché antenne. Queste mutazioni omeotiche producono un errore di informazione circa il posizionamento nell'organismo di un intero raggruppamento di cellule e di conseguenza determinano la differenziazione di tali cellule in una struttura anatomica corretta che però normalmente occupa una diversa posizione anatomica. La comparazione tra le sequenze amminoacidiche degli omeodomini e quelle delle proteine procariotiche leganti il DNA ha suggerito che parte dell'omeodominio formi un motivo elica-loop-elica; più precisamente un omeodominio è costituito da 3 α eliche collegate da regioni di loop piuttosto brevi. L'omeodominio si lega al DNA in forma di monomero, in regioni specifiche con sequenza 5'ATTA 3' per le quali ha una costante di affinità circa 1nM. Tale dominio lega anche non specificamente frammenti di DNA con sequenze differenti ma con affinità circa 100 volte inferiore. L'estesa α elica 3, di riconoscimento, si lega specificamente al solco maggiore, al centro del frammento di DNA riconosciuto.

Tutti i domini omeo contengono 4 residui invariati, Asn 51, Arg 53, Trp 48 e Phe 49, al centro della lunga elica di riconoscimento. I primi due residui invariati, polari, instaurano forti interazioni con il DNA; gli altri due, che fanno parte del core idrofobo del dominio, sono invece importanti per un accurato posizionamento dell'elica di riconoscimento rispetto alle parti rimanenti della struttura del dominio.

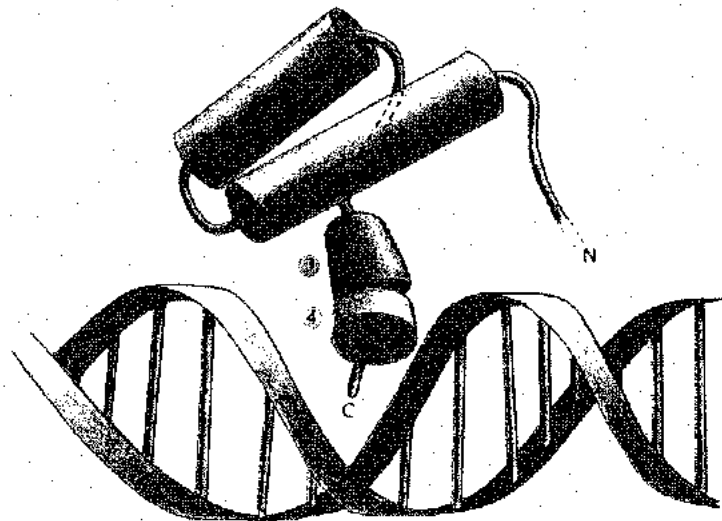


Fig 6: Legame tra l'omeodominio e il DNA

Tutte queste osservazioni suggeriscono che *WHSC1* codifichi una proteina che gioca un ruolo sostanziale nella regolazione della trascrizione di geni coinvolti nello sviluppo embrionale, forse attraverso la creazione di un gradiente morfogenetico. Il complesso pattern di trascrizione, splicing alternativo e poliadenilazione potrebbe essere alla base della ampia variabilità fenotipica osservata nella WHS.

WHSC2

All'interno della WHSCR è stata identificata la sequenza del clone a cDNA IMAGE (integrated molecular analysis of human genome and its expression) (Auffray et al. 1995) 53283, ed è stato dimostrato, in base alla sua sequenza e alla somiglianza del profilo di espressione fra l'uomo e il topo, che rappresenta un gene molto conservato. Questo gene è stato chiamato *WHSC2* (fig.7) (Wolf-Hischhorn syndrome candidate 2) (Wright et al., 1999) ed è stato caratterizzato tramite completo sequenziamento e analisi del trascritto, come per l'omologo murino. Sono stati identificati 11 esoni, per una lunghezza totale di 26.2 Kb che cadono interamente all'interno di quella che attualmente si ritiene WHS critical region. Il Northern blot di entrambe i geni, umano e murino, ha individuato un unico trascritto ubiquitario di 2.4 Kb ma non vi è stata associata ancora alcuna funzione. Nel tentativo di individuare, in base alla sequenza, una possibile struttura proteica all'interno della GenBank non è stata trovata alcuna somiglianza con geni o proteine conosciute. Successivamente si è capito che il cDNA del clone 53283 è però incompleto rispetto al gene, si è così esteso il sequenziamento, usando una cDNA library di cervello fetale ed un primer localizzato a 102-123 bp di 53283, ampliando così l'informazione di 100 bp, in direzione 5', e riuscendo ad identificare un possibile codone di start la cui A identifica la posizione +1. Un codone TAG di terminazione è stato trovato a 1585 bp, per un ORF complessiva di 1584 bp (528 amminoacidi). C'è una sequenza in 3' non tradotta, la cui sequenza è ricca in AT (52%) ed un segnale di poliadenilazione a 2161-2155 bp seguito, 17 bp a valle, da una coda poli(A). Il segnale di poliadenilazione, ATTAAA, è una variante del canonico AATAAA. La successioni di introni ed esoni del gene *WHSC2* è stata determinata

comparando la sequenza del cDNA con quella genomica, e si è visto che il gene è interamente contenuto nel cosmide 96a2.

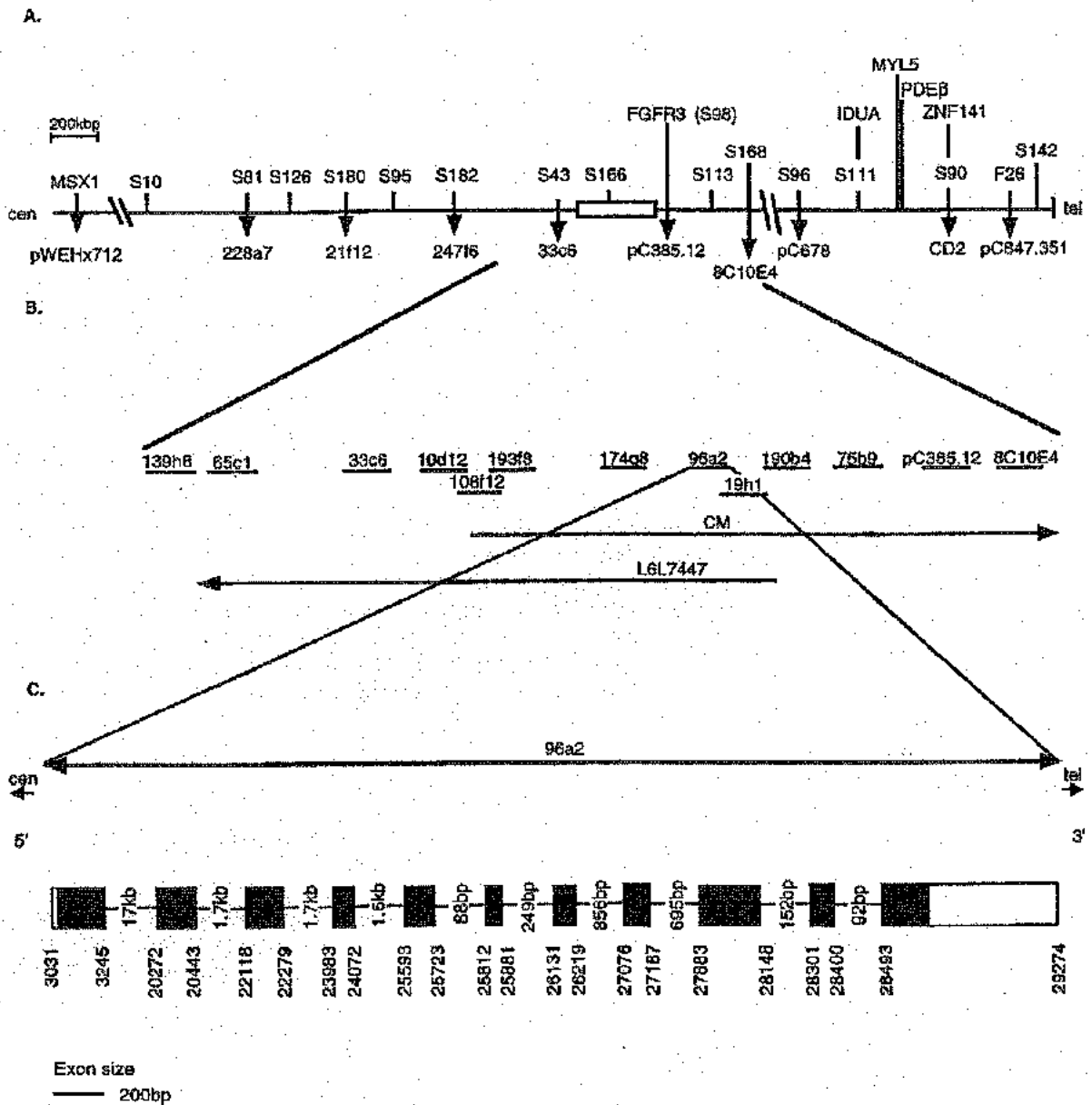


Fig 7: Struttura del gene *WHSC2*

In alto: mappa fisica della regione 4p16.

In mezzo: cosmidi che identificano la WHSCR

In basso: sequenza di esoni e introni del gene *WHSC2*, sono mostrate anche la direzione di trascrizione e l'orientamento cen→tel. Gli esoni sono rappresentati dai riquadri, gli introni dalle linee.

Sono state inoltre identificate la sostituzione di una base all'interno della regione codificante e la variazione di una coppia di basi, risultante da una inserzione/delezione (indel) nella UTR in 3'. La sostituzione è stata trovata nell'esone 9 ed è una transizione da T (cDNA) a C (DNA genomico), questo cambiamento non altera il codone dell'amminoacido. La indel identificata nell' UTR in 3' è l'inserzione di una A nella sequenza del cDNA di 53283, se comparata alla sequenza genomica. WHSC2 è trascritto in direzione centromero→telomero e contiene 11 esoni e 10 introni per una lunghezza genomica totale di 26.2 Kb. Tutti i siti donatori in 5' ed accettori in 3' per lo splicing hanno la sequenza consensus GT/AG. La lunghezza degli introni varia tra 88 bp, il più piccolo, localizzato fra gli esoni 5 e 6, e 17 Kb, il più grande, che si trova tra gli esoni 1 e 2. La lunghezza degli esoni varia fra 69 bp (esone 6) e 781 bp (esone 11), il possibile codone di start si trova nell'esone 1 e quello di stop nell'esone 11.

I risultati dell'ibridazione del cDNA del clone 53283 con RNA poli(A)⁺ di una serie di tessuti, fetali ed adulti, ha mostrato che *WHSC2* è espresso in maniera ubiquitaria e il trascritto ha una dimensione di circa 2.4 Kb. Sembra ci sia un ridotto livello di espressione nel polmone dell'adulto rispetto agli altri tessuti. La riduzione del segnale non sembra dovuta ad un ineguale caricamento ma ad un'effettiva riduzione dell'espressione, in quanto è stata confermata con una sonda controllo (actina β) in tre separati Northern blot.

WHSC2 codifica un ipotetica proteina di 528 amminoacidi con un peso molecolare prevedibile di 57 Kda. È stata ipotizzata una struttura che prevede un dominio transmembrana in cui il terminale amminico sia rivolto verso l'interno della cellula e quello carbossilico verso l'esterno. L'analisi della sequenza di entrambe le proteine, umana e murina, ha identificato, con una probabilità del 94.1%, un segnale di

localizzazione nucleare, la cui sequenza si trova a partire dall'amminoacido 166 al 272 ed è data da una combinazione di lisine e arginine. Non è stata trovata ancora alcuna somiglianza con proteine di cui sia conosciuta la funzione.

LETMI

Il gene *LETMI* è stato clonato e caratterizzato sia nell'uomo che nel topo. È localizzato ad 80 Kb dalla WHSCR in posizione distale (fig.3) tra *WHSC1* ed *FGFR3* ed è deletato in quasi tutti i pazienti WHS. È stato recentemente descritto come gene candidato per WHS (Endele et al., 1999). Consta di 14 esoni e 13 introni, il cDNA ha una lunghezza di 3907 bp nell'uomo e 3480 bp nel topo, comprende un codone di inizio della trascrizione, ATG, nell'esone 1, ed un codone di stop TAG, l'RNA probabilmente è sottoposto a poliadenilazione alternativa che porta a trascritti di grandezze diverse. *LETMI* è un gene ben conservato (83.8% di identità amminoacidica tra uomo e topo) e codifica un'ipotetica proteina di 738 amminoacidi con un peso molecolare di 83 KDa che contiene un dominio transmembrana con un orientamento $N_{in} \rightarrow C_{out}$. Dal carbossiterminale al dominio transmembrana la struttura è identificabile con una ripetizione di α eliche, alcune con la possibilità di formare coiled-coils. Il coiled-coil (fig.8) è un particolare motivo strutturale in cui 4 α eliche antiparallele si associano strettamente tra loro incastrando le catene laterali che si trovano nella zona di contatto, andando a formare un fascio con un core idrofobo.

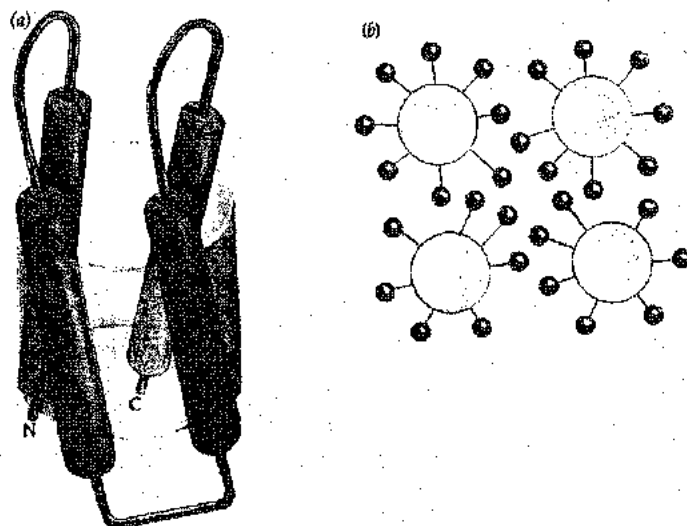


Fig 8: coiled-coil

(a): rappresentazione schematica nello spazio

(b): visione schematica della proiezione di (a) su un piano perpendicolare all'asse del fascio. I cerchi più grandi rappresentano le catene principali delle α eliche, i cerchi più piccoli sono le catene laterali.

All'interno della proteina codificata dal gene *LETMI* sono stati identificati anche siti di fosforilazione per la protein-chinasi C (PKC), la casein-chinasi (CK2) e la tirosin-chinasi, così come un possibile sito di glicosilazione. Inoltre la parte C terminale della proteina contiene un motivo a cerniera di leucina e due domini EF-hand (fig.9).

Questi ultimi meritano particolare attenzione in quanto sono caratteristici delle proteine che legano il Ca^{++} . L'EF hand è costituito da due eliche unite da un loop, lo ione Ca^{++} è legato a livello del loop posto tra le due α eliche.

Il legame con il calcio è mantenuto in particolare ad opera dei gruppi carbossilici delle catene laterali di Asp e Glu e di molecole di H_2O . Quindi, per espletare la sua funzione, questo motivo necessita sia di una specifica conformazione della catena principale, sia della presenza di un peculiare raggruppamento di catene laterali. Il motivo elica-loop-elica fornisce un'impalcatura che accoglie i ligandi nella posizione giusta per poter essere legati e liberati

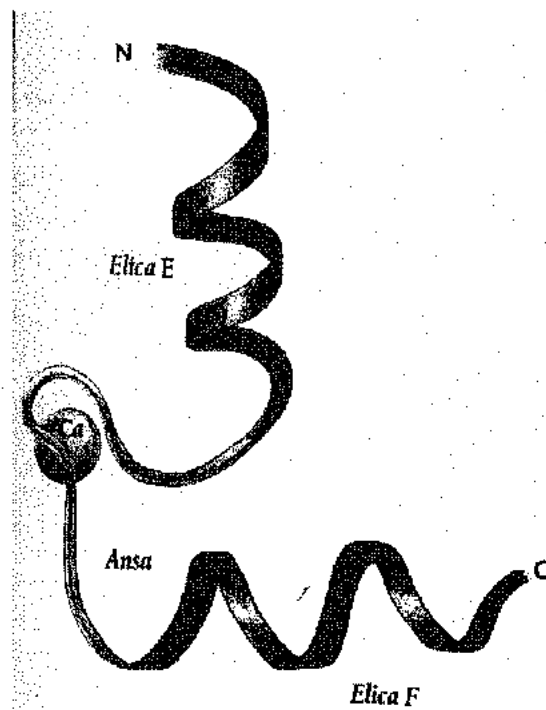


Fig 9: EF-Hand

La sequenza amminoacidica della seconda EF-Hand di *LETMI* corrisponde esattamente a quella canonica del dominio, si pensa quindi che sia effettivamente in grado di legare il calcio, contrariamente alla prima che differisce per tre residui nella regione del loop e dovrebbe di conseguenza aver perso questa capacità. Per studiare l'espressione della proteina di *LETMI* sono stati effettuati Northern blot con mRNA derivati da tessuti, fetali ed adulti, di vario tipo. Come sonda di ibridazione è stato usato un frammento comprendente gli esoni 1,2 e 3 del gene. *LETMI* è risultato presente in tutti i tessuti sia adulti che fetali analizzati, nella forma di 4 differenti trascritti di 5.5, 5.1, 3.8 e 2.8 Kb rispettivamente. La lunghezza di 2.8 Kb corrisponde abbastanza bene alla distanza fra il codone di start e il primo segnale di poliadenilazione; per quanto riguarda gli altri, invece, non ci sono indicazioni di splicing alternativo e potrebbero quindi risultare da diversi siti di poliadenilazione e di inizio trascrizione. Il gene *LETMI*, con molta

probabilità, codifica allora per una proteina in grado di legare il Ca^{++} , caratterizzata da una localizzazione transmembrana e dalla capacità di interagire con altre proteine per regolare la trasmissione di messaggi Ca-dipendenti e/o l'omeostasi.

Finora sono stati descritti solo pochi pazienti WHS con una delezione interstiziale che non comprenda *LETMI*. Tali pazienti non presentano epilessia, per cui l'aploinsufficienza di *LETMI* è molto probabilmente responsabile del sintomo "epilessia".

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della tesi è stato di definire i seguenti aspetti della WHS:

- 1) Caratterizzare, a livello molecolare, il tipo e la frequenza relativa dei vari riarrangiamenti associati alla WHS, cioè:
 - Delezioni *de novo*.
 - Delezioni segreganti da una traslocazione bilanciata parentale.
 - Doppio riarrangiamento cromosomico (duplicazione invertita 4p associata a delezione terminale sullo stesso cromosoma o delezione 4p associata ad altri riarrangiamenti).
- 2) Delineare i minimi criteri diagnostici per questa condizione, definendone quindi il fenotipo "basale".
- 3) Definire la regione criticamente deleta nella WHS.
- 4) Stabilire le linee di una corretta consulenza genetica in base all'analisi di correlazione genotipo-fenotipo.

MATERIALI e METODI

Casistica personale

L'analisi è stata condotta su 28 pazienti con fenotipo WH, che sono stati suddivisi nei seguenti gruppi:

1. Pazienti portatori di una macrodelezione diagnosticabile con esame cromosomico convenzionale (totale: 16) (Tab I).
2. Pazienti WH portatori di una microdelezione, in 4p16.3, diagnosticabile solo tramite FISH con sonde molecolari su cromosomi apparentemente normali (totale: 9) (TabII).
3. Pazienti portatori di un doppio riarrangiamento sullo stesso cromosoma 4p, consistente in una relativamente estesa duplicazione parziale, evidente ad un esame cromosomico convenzionale, associata ad una delezione terminale, diagnosticabile tramite FISH (totale: 3) (TabIII).

Gruppo I: pazienti WHS con macrodelezione (tab.I)

Paziente n°	SESSO	ETA' (anni)	NASCITA		R.C.	Facies WH	ipotonia	R.M.	Convulsioni	microcefalia	C.H.D.	Anomalie renali	Difetti della Linea Mediana
			S.G.	Peso (gr)									
1	F	1/12	36	1570	+	+	+	+	+	+	+	-	palatoschisi
41	F	15	37	1700	+	+	+	+	+	+	+	Reflusso Vesico-ureterale	-
2	F	5	34	1620	+	+	+	+	+	+	+	-	Coloboma dell'iride
18	M	15	40	2000	+	+	+	+	+	+	+	-	-
42	F	18	43	2050	+	+	+	+	+	+	+	-	Coloboma dell'iride
32	M	1	37	1670	+	+	+	+	+	+	+	Displasia renale	-
24	F	16	37	2220	+	+	+	+	+	+	-	-	-
3	M	3	39	2700	+	+	+	+	+	+	+	-	palatoschisi
4	M	2	39	2130	+	+	+	+	+	+	+	-	ipospadia
39	M	16	38	2050	+	+	+	+	+	+	+	Nefropatia midollare	Coloboma dell'iride Ipospadia
10	F	10	35	1525	+	+	+	+	+	+	+	-	palatoschisi
9	M	1	40	1900	+	+	+	+	+	+	+	Dilatazione renale	ipospadia
7	M	7	37	1680	+	+	+	+	+	+	+	Ipoplasia renale	palatoschisi
11	M	2	42	2090	+	+	+	+	+	+	-	-	ipospadia
8	M	9	36	1850	+	+	+	+	+	+	-	-	ipospadia
6	M	2	37	1680	+	+	+	+	+	+	+	-	palatoschisi

a: età all'ultima osservazione, b: settimane di gestazione, c: ritardo di crescita, d: ritardo mentale, e: difetti cardiaci congeniti.



Fig.10: pazienti portatori di macrodelezione.

Si nota un'espressione assente indice di un grave grado di ritardo mentale.

Gruppo II: pazienti WHS con microdelezione (tab.II)

Paziente n°	SESSO	*ETA* (anni)	NASCITA		°R.C.	Facies WH	ipotonia	°R.M.	Convulsioni	microcefalia	°C.H.D.	Anomalie renali	Difetti della Linea Mediana
			^b S.G.	Peso (gr)									
31	F	1	38	2080	+	+	+	+	+	+	+	-	-
43	F	1	38	2075	+	+	+	-	+	+	-	-	Palatoschisi
44	M	11	40	2430	+	+	+	+	+	+	-	-	-
12	M	15	37	2050	+	+	+	+	+	+	-	-	Palatoschisi Ipospadi Palatoschisi
46	F	1	40	2650	+	+	+	+	+	+	-	-	-
13	M	8	40	2230	+	+	+	+	+	+	-	-	-
26	F	7	39	2600	+	+	+	+	+	+	-	-	-
15	F	9	40	2600	+	+	+	+	+	-	-	-	-
MG	M	1	38	2500	+	+	+	+	+	-	-	-	-

a: età all'ultima osservazione; b: settimane di gestazione; c: ritardo di crescita; d: ritardo mentale; e: difetti cardiaci congeniti; *: traslocazione bilanciata (4p;10p) mat



Fig. 11: pazienti portatori di microdelezione.

E' evidente un espressione più vigile, indice di una migliore interazione con l'ambiente.

Gruppo III: pazienti WHS dup/del (tab.III)

Paziente n°	SESSO	ETA' (anni)	NASCITA		R.C.	Facies WH	ipotonia	R.M.	Convulsioni	microcefalia	C.H.D.	Anomalie renali	Difetti della Linea Mediana
			S.G.	Peso (gr)									
20	F	1, 1/2	37	1240	+	+	+	+	-	+	+	-	palatoschisi
22	F	1	37	1240	+	+	+	+	-	+	+	-	palatoschisi
14	M	6	39	2600	+	+	+	+	+	+	-	-	-

a: eta' all'ultima osservazione; b: settimane di gestazione; c: ritardo di crescita; d: ritardo mentale; e: difetti cardiaci congeniti

Segni clinici

Gruppo 1 (16 pazienti). Sono 10 maschi e 6 femmine di età compresa fra 1 e 18 anni. I

segni clinici ricorrenti sono rappresentati da:

- ritardo di crescita a insorgenza prenatale e marcato in epoca postnatale (16/16)
- aspetto caratteristico del volto, in accordo con i tratti patognomici di questa sindrome: fronte alta con prominenza della struttura metopica, occhi grandi e protrudenti con apparente ipertelorismo, dorso nasale alto, segni tutti che delineano un profilo ad "elmetto di guerriero greco", ipoplasia medio-facciale, micrognazia e bocca angolata verso il basso (16/16)
- ipotonia congenita, con acquisizione della deambulazione autonoma intorno a 7 anni (16/16)
- ritardo mentale grave, con linguaggio assente o limitato a poche parole acquisite intorno a 7 anni (16/16)
- epilessia (16/16): l'esordio è avvenuto spesso in forma di convulsioni febbrili, in età compresa tra 6 e 15 mesi; in seguito le convulsioni hanno avuto insorgenza autonoma, e hanno mostrato tendenza a risolversi con l'età; la risposta al trattamento anticomiziale, parziale nei primi anni di vita, è migliorata con l'età
- microcefalia vera (16/16): la circonferenza cranica era inferiore al 2° percentile in rapporto alla media della lunghezza corporea
- cardiopatia congenita (13/16): si sono osservati difetti cardiaci aspecifici e non gravi, in forma di difetto interventricolare, difetto interatriale e stenosi polmonare, che non hanno mai implicato un rischio di morte improvvisa

- anomalie renali (5/16): si è trattato di ipoplasia renale bilaterale in due occasioni, di una alterazione morfostrutturale (fusione renale ad un polo, che ha generato un aspetto ecografico simile a rene a ferro di cavallo) in un terzo paziente e di reflusso vescico-ureterale e dilatazione renale in altri due pazienti.
- difetti della linea mediana (12/16): si sono verificati in forma di palatoschisi (5 pazienti), ipospadia (4 pazienti) e coloboma dell'iride (3 pazienti).

Gruppo 2 (9 pazienti). Sono 4 maschi e 5 femmine di età compresa fra 1 e 15 anni. I segni clinici condivisi dalla totalità dei pazienti in questo gruppo sono stati ritardo di crescita pre- e postnatale, aspetto peculiare del volto, in accordo ai tratti patognomonic di questa condizione, ipotonia congenita, ritardo mentale di entità moderata-lieve e convulsioni. Un totale di 7 pazienti su 9 ha presentato microcefalia, mentre la circonferenza cranica era nei limiti normali, in rapporto alla lunghezza, nei rimanenti 2 pazienti. Malformazioni congenite maggiori si sono osservate sporadicamente, in forma di cardiopatia (1 caso), palatoschisi (3 casi) e ipospadia (1 dei 3 casi con palatoschisi).

Gruppo 3 (3 pazienti). Sono 2 femmine e 1 maschio, di 1, 1 e mezzo e 6 anni di età rispettivamente. Hanno presentato tutti ritardo di crescita, aspetto peculiare del volto, ipotonia, ritardo mentale e microcefalia. Solo in un caso si sono verificate convulsioni. I segni e sintomi aggiuntivi sono stati una cardiopatia congenita (2/3), palatoschisi (2/3) ed epilessia (1/3).

Culture di linfociti T per lo studio delle mappe cromosomiche:

Il sangue prelevato viene posto in un contenitore tipo Mc Carty sterile, contenete 1 mg di eparina e 1 ml di fisiologica; circa 0.3 ml di questo prelievo vengono messi in coltura, sterilmente, in 5ml di terreno RPMI completo preparato come di seguito.

In 100 ml di RPMI si aggiungono:

- 1 ml di L-Glutamina ($C_i = 200\text{mM}$)
- 1 ml di antibiotico, penicillina ($C_i = 5000\text{U/ml}$)/streptomicina ($C_i = 5000\mu\text{g/ml}$)
- 30 ml di siero fetale bovino
- fitoemoagglutinina (PHA, che stimola alla proliferazione preferenzialmente i linfociti T).

Le colture così allestite, sempre in contenitori tipo Mc Carty, vengono messe in un bagno termostato a 37°C per 72h.

Alla 65° h si aggiungono 0.25 ml di 5BrdU ($C_i = 300\mu\text{g/ml}$) in ogni coltura. La 5BrdU (5-bromodeossiridina) viene incorporata dal DNA, durante la replicazione, al posto della T ed è utilizzata in modo specifico per il bandeggio di tipo R.

Circa 1.5 h prima di raccogliere le colture si aggiungono 0.25 ml di colchicina ($C_i = 250\mu\text{g/ml}$) che avvelena il fuso mitotico e blocca le cellule in metafase.

Alla 72°h si trasferisce ogni coltura in tubi da centrifuga da 15 ml e si centrifuga a 1200 rpm per 10'. Alla fine della centrifuga si elimina il soprannatante e si procede alla shock ipotonico aggiungendo, in ogni provetta, circa 4 ml di soluzione ipotonica (KCl 0.075 M) e, dopo aver agitato delicatamente, si pone in bagno a 37°C per 15'.

Alla fine dello shock si aggiungono 4 ml di fissativo 3:1 (cioè composto da 3 parti di metanolo e 1 parte di acido acetico) e si agita.

Si lascia a +4°C per almeno 1h, dopodichè si procede ad una serie di lavaggi (almeno 3), con fissativo 1:1 (composto cioè da 1 parte di metanolo e 1 parte di acido acetico).

Alla fine il pellet viene risospeso in un'adeguata quantità di fissativo 1:1 e si procede con l'allestimento dei vetrini ponendo su ciascuno di essi una goccia di preparato.

A questo punto i vetrini sono pronti per il bandeggio.

Analisi citogenetica

Le indagini genetiche si sono avvalse sia di tecniche di citogenetica convenzionale sia di tecniche di citogenetica molecolare (ibridazione *in situ* fluorescente, FISH).

L'esame cromosomico standard è stato condotto su linfociti periferici stimolati con PHA, come precedentemente descritto, tramite tecnica di **bandeggio R (RBG)**, alla risoluzione di 850 bande per corredo aploide. Sono state analizzate un minimo di 20 metafasi per ogni paziente.

Bandeggio R

I vetrini da colorare sono posti in Coplin jars contenenti il colorante fotosensibile BISBENZIMIDE (Ci=5µg/ml) per 30'. Dopo aver sciacquato i vetrini con acqua corrente si pongono in SSC 2X (Citrato di Na 0.03M e NaCl 0.3M) per 2 o 3h e si espongono alla luce solare. Infine i vetrini vengono trattati ad alta temperatura in SSC 2X a 87°C per 10'. In questo modo si ottiene una denaturazione differenziale delle regioni cromosomiche che permetterà di evidenziare uno specifico pattern di bande su ogni cromosoma.

Dopo aver sciacquato nuovamente i vetrini con acqua corrente si può procedere ad una classica colorazione con GIEMSA, ponendo i vetrini per 10' in 100ml di liquido COMINGS (3ml $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2M, 3 ml EtOH) contenete 5ml di GIEMSA.

Analisi citogenetica-molecolare

Le analisi FISH sono state condotte su cromosomi di linfociti di sangue periferico con una serie di sonde molecolari (cosmidi e BACs) specifiche per la regione 4p15-4pter, opportunamente selezionate per ogni singolo paziente, secondo una procedura standard (Litcher et al. 1990). Sono state analizzate in media 20 metafasi per ogni indagine FISH.

I **cosmidi** sono vettori plasmidici in cui sono stati inseriti i siti *cos* (estremità coesive) del genoma di lambda (questi siti sono richiesti per impacchettare il DNA nel virione).

I plasmidi modificati possono essere impacchettati in vitro nel virione lambda e le particelle fagiche utilizzate per trasdurre E. Coli.

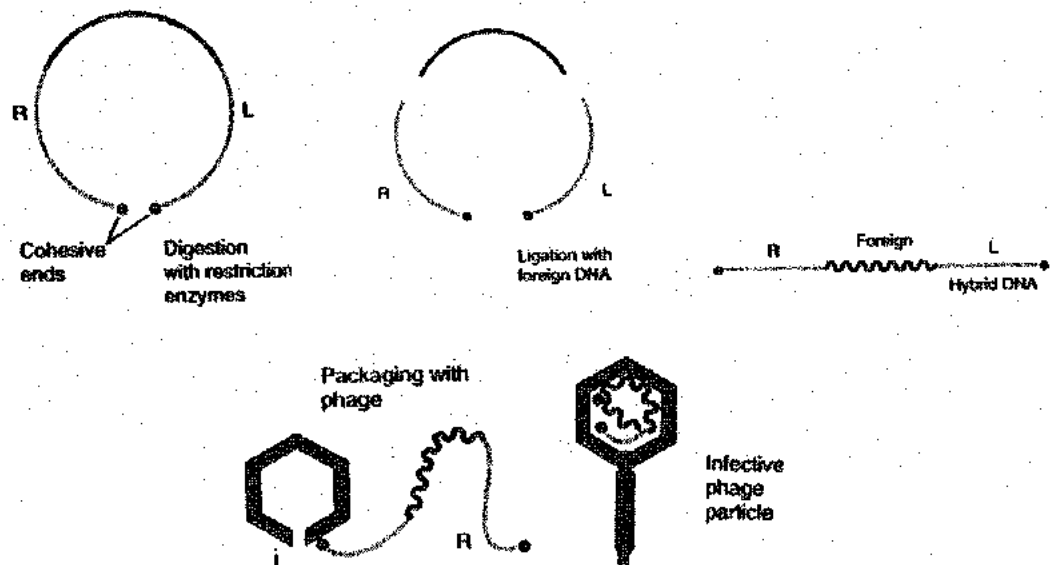


Fig.12: costruzione di un cosmide ed impacchettamento nel fago.

Quindi utilizzando i cosmidi non è richiesta la trasformazione di E. Coli che è un processo poco efficiente.

Uno dei vantaggi forniti dai cosmidi è dato dalla possibilità di clonare frammenti di DNA di discrete dimensioni (circa 30- 40 Kb); questo è utile soprattutto per il clonaggio di geni di eucarioti, dove sono presenti grandi quantità di DNA. Un altro vantaggio fornito dai cosmidi è dato dal fatto che il DNA può essere immagazzinato in una più stabile particella fagica invece che in un plasmide. In questo modo il DNA ricombinante può essere mantenuto per lunghi periodi di tempo (genoteca).

I **BACs (bacterial artificial chromosomes)** sono vettori basati su plasmidi con un basso numero di repliconi (viene spesso usato il plasmide della fertilità di E. Coli noto come fattore F) sui quali ci si è orientati avendo visto che vettori con un alto numero di repliconi mostrano facilmente instabilità strutturale dell'inserto, che causa delezioni o riarrangiamenti del DNA clonato, soprattutto se questo è di origine eucariotica e contiene sequenze ripetute.

Le dimensioni del segmento di DNA esogeno inseribile in un BAC (300 Kb) sono molto maggiori di quelle possibili per un cosmide, ed il costrutto che ne risulta può essere trasferito, in cellule batteriche, con una buon'efficienza, tramite elettroporazione (esponendo cioè le cellule ad una corrente ad alto voltaggio onde alterare la permeabilità selettiva della membrana plasmatica).

Le sonde da testare vengono individuate in alcune banche dati consultabili gratuitamente sul web e in seguito ordinate in base alle esigenze. BAC Cosmidi e YAC arrivano in laboratorio in stab agar e per prima cosa vengono messi in coltura, con procedure simili.

Messa in coltura:

I giorno:

La messa in coltura viene effettuata sterilmente prelevando una piccola quantità di agar con un'ansa e risospendendo in terreno di coltura LB (triptone 1%, estratto di lievito 0.5% e NaCl 1%) al quale si aggiunge una quantità di antibiotico (50µg/ml di Kanamicina per i PAC o 12.5ng/ml di Cloramfenicolo per i BAC). Si lasciano quindi incubare nell'agitatore a 37°C per 16-20h.

II giorno:

Una parte della coltura viene stoccata (850µl di batteri in 150µl di glicerolo) e congelata a -80°C e per la restante si procede con l'estrazione del DNA.

Estrazione dei cosmidi:

Si centrifugano le falcon per 15' a 25000 rpm, il pellet viene risospeso in 250µl di soluzione I GTE (glucosio 50mM, TRIS 25mM, EDTA 10mM a pH8) fredda contenente lisozima. Dopo aver agitato bene si trasferisce in tubi da 2.2ml e si aggiungono 200µl di soluzione II, di denaturazione (0.2ml NaOH 10N, 0.5ml SDS 20%), si agita bene e si mantiene a t.a. per 5'. Dopodiché si aggiungono 380µl di soluzione III (6 ml di Potassio-acetato 5M, 4ml di Acido Acetico) si agita bene finché la soluzione non floccula. Si centrifuga 15' a 12000 rpm e si trasferisce il sovrantante in delle nuove eppendorf, a questo punto si aggiunge un egual volume di fenolo-cloroformio-isoamilico 25:24:1. Si agita e si centrifuga per 5' a 12000 rpm. La fase superiore viene nuovamente trasferita in eppendorf pulite dove si aggiungerà un egual volume di cloroformio-isoamilico 24:1. Dopo aver centrifugato per 5' alle stesse

condizioni si preleva il sovrantante e si trasferisce in eppendorf nuove e si precipita il DNA aggiungendo un egual volume di isopropanolo, si centrifuga e si lava il pellet con EtOH al 70%. Dopo aver centrifugato ulteriormente si lascia essicare il DNA al liofilizzatore e si risospende in TE contenete RNAasi.

Estrazione dei BAC:

Si centrifugano le falcon per 7' a 4000 rpm, il pellet viene risospeso in 300µl di soluzione GTE fredda contenente il lisozima e si trasferisce in due eppendorf da 1.5ml, si aggiungono 300µl di soluzione di denaturazione fresca, si agita e si lascia lisare per 5' al massimo. il lisato dovrebbe apparire viscoso.

Si aggiungono 250µl di Ammonio-acetato 7.5M e si lascia incubare in ghiaccio per 10' invertendo diverse volte.

Si centrifuga a 13000 rpm per 20' e, dopo aver trasferito il sovrantante in eppendorf da 1.5ml, si aggiungono 350µl di isopropanolo e si centrifuga a 14000 rpm per 20', il pellet viene lavato con 250µl di EtOH al 70%, ricentrifugato a 14000 rpm per 5', asciugato al liofilizzatore e infine risospeso in 50 µl di una soluzione di RNAasi 100 µg/ml.

Precipitazione del DNA:

Si effettua con 1/10 vol di NaAc e 3Vol EtOh freddo, incubando a -20°C per 1h. Dopodichè si centrifuga per 15' a 14000 rpm, si lava con EtOh al 70% e si asciuga al liofilizzatoree si risospende in TE a pH 7.4 (Tris HCl 10mM, EDTA 0.1mM) dove può essere conservato a +4°C.

Dopo qualche giorno si può quantizzare sul gel.

Le sonde molecolari clonate in cosmidi o in BACs sono state utilizzate, nel presente studio, per indagini FISH.

FISH:

In breve, l'esecuzione di una FISH prevede i seguenti passaggi:

1. Marcatura della sonda da testare:

Con un sistema di **nick translation** vengono incorporate, a intervalli regolari, nel DNA della sonda nucleotidi modificati, cioè legati ad una molecola "reporter", come biotina o digossigenina.

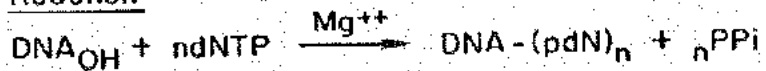
In breve, il DNA viene ripetutamente scisso, ad opera della DNAasi, e poi risintetizzato, ad opera della polimerasi, in un sistema che contenga un pool di nucleotidi trifosfato (dNTPs), uno dei quali è modificato, essendo legato a biotina o digossigenina.

La polimerasi utilizzata è la I di E. Coli, che consta di una singola catena polipeptidica ($M_r = 109,000$) con una triplice attività enzimatica:

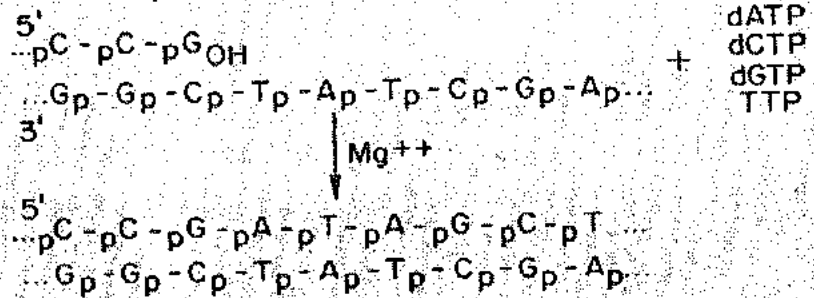
Activity

5' → 3'
Polymerase

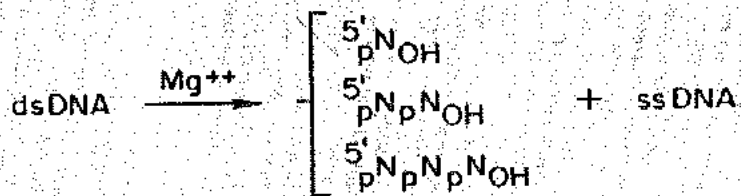
Reaction



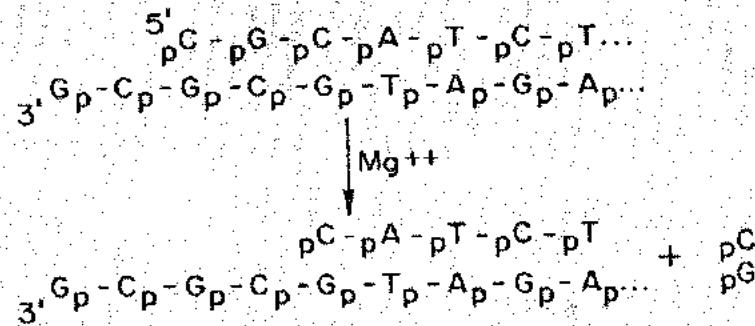
For example:



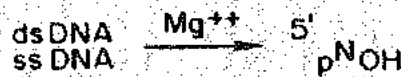
5' → 3'
Exonuclease



For example:



3' → 5'
Exonuclease



For example:

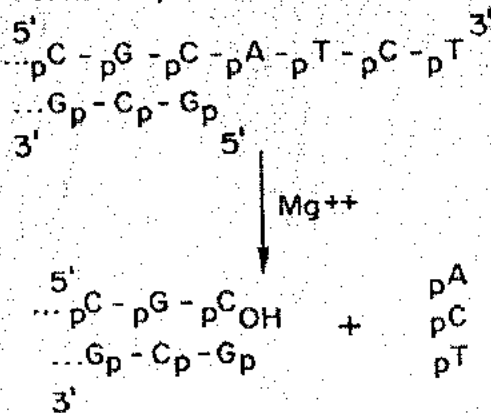


Fig 13: attività enzimatiche della DNA polimerasi I di E. Coli.

1. Attività polimerasica in direzione $5' \rightarrow 3'$: aggiunge nucleotidi al $3'OH$ terminale che si crea quando uno dei due strand della molecola di DNA viene scisso.
2. Attività esonucleasica in direzione $5' \rightarrow 3'$: elimina nucleotidi al $5'OH$ terminale che si crea in seguito alla scissione della molecola di DNA.
3. Attività esonucleasica in direzione $3' \rightarrow 5'$: degrada il DNA, a singolo e doppio filamento, a partire da un'estremità libera in $3'OH$; l'azione sulla molecola a doppio strand è bloccata dalla polimerasi.

Le attività 1 e 2 vengono sfruttate nella nick translation.

L'eliminazione di nucleotidi all'estremità $5'$ e l'aggiunta di nucleotidi all'estremità $3'$ si traducono in uno "spostamento del sito di scissione", da cui il nome di nick translation. La capacità di rimpiazzare i nucleotidi in $3'$ rende possibile la preparazione di DNA contenente molecole di biotina o digossigenina. Una reazione tipo prevede la diluizione di $1\mu g$ di DNA in volume finale di $50\mu l$, ma si può scalare fino ad un volume di $5\mu l$.

Nonostante la polimerasi I di *E. Coli* sia in grado di lavorare con concentrazioni di dNTPs basse fino a $2\mu M$, l'enzima sintetizza il DNA con una migliore efficienza se supportato da una maggior quantità di substrato.

In pratica, una **nick translation** prevede i seguenti passaggi:

Il giorno:

Si prepara la soluzione di reazione con un volume finale di $25\mu l$, che contenga: DNA della sonda da marcare ($1\mu g$), dNTPs (A, C, G) alla concentrazione $10mM$ ($1,9\mu l$), nucleotide modificato con biotina (Bio-dUTP, $0,2mM$, $0,7\mu l$) oppure con digossigenina

(Dig-dUTP, 0.1mM, 0.5 μ l), 2.5 μ l di buffer NT (5ml Tris 1M pH 7.4, 1ml MgSO₄ 1M, 10 μ l DTT, ditroreitololo 1M, 500 μ l BSA C_i=100mg/ml, 3.5ml H₂O) specifico per la reazione, la polimerasi (0,5 μ l, C_i=1000U/ml) , la DNA.asi (*sol. II, 2 μ l, C_i=10000U/ml), (entrambe gli enzimi vanno conservati in ghiaccio per non alterarne la stabilit ) e H₂O bidistillata sterile in quantit  tale da portare a V_f.

*La DNAasi viene diluita preparando una prima soluzione con 0,5 μ l di DNAasi in 500 μ l di H₂O bidistillata sterile (Sol I) e poi una seconda soluzione: 20 μ l di Sol I in 80 μ l di H₂O bidistillata sterile.

Si procede a incubazione per 1h e 15' a 15 C (bagno refrigerante). Se la reazione viene portata avanti ad una temperatura maggiore si possono verificare un considerevole numero di ripiegamenti (snapback) del DNA, probabilmente generati dalla polimerasi che va a copiare il filamento neosintetizzato.

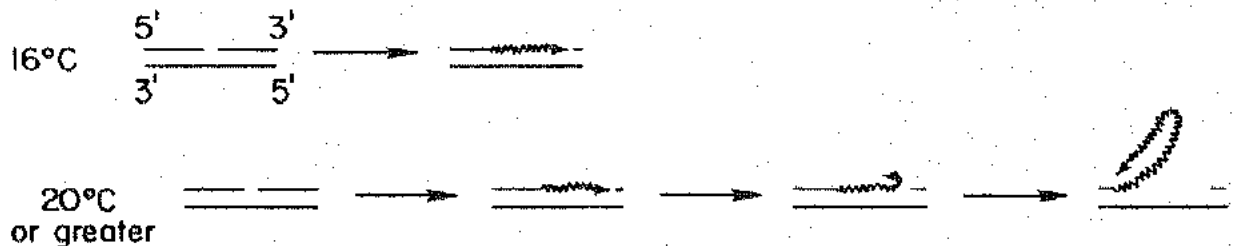


Figura 14: fenomeno dello snapback.

Al termine dell'incubazione, mantenendo le eppendorf in ghiaccio per impedire l'attivazione della polimerasi, si verifica l'efficienza della marcatura con elettroforesi del prodotto di reazione su gel: l'efficienza   ottimale se la sonda marcata   scomposta in frammenti di 200-400 bp.

Si blocca quindi la reazione con EDTA 0.5M a pH 8 (2,5µl), AcNa 3M (2,5µl) ed EtOH (250µl) e si lascia a -20° O.N.

Il giorno:

Si centrifuga a 12000 r.p.m. per 15', si aspira il sovrantante e si fa asciugare il pellet sotto vuoto; quindi si risospende in 6µl di tampone T.E. a pH 7,5.

2. Ibridazione della sonda marcata:

Il giorno:

Si lavano i vetrini con soluzioni progressive di EtOH al 70%, all' 80% e al 100% per circa 15' per ciascun passaggio a temperatura ambiente e si lasciano asciugare all'aria.

Si prepara intanto la miscela di ibridazione, che contiene: 4-5 µl di Cot 1 (Vysis) (DNA umano, necessario per bloccare le sequenze Alu che darebbero segnali di ibridazione aspecifici), 200 µg della sonda marcata, e il buffer VPF [5ml FA deionizzata, 2ml 30%destransolfato, 1ml 20X SSC, 577µl Na₂HPO₄ 0.5M, 433µl NaH₂PO₄ 0.5M, 100µl 100X DENARDT'S (10g BSA, 10g FICOLL 400, 10g PVP, 500ml H₂O), 1ml H₂O sterile] il cui volume deve essere almeno il 60% di quello dell'intera soluzione.

A questo punto bisogna denaturare la sonda, mettendo la mix sopraindicata per 10' in un bagno a 72° e successivamente da 30' ad 1h in un bagno a 37° per effettuare il reannealing.

Nel frattempo occorre anche denaturare il DNA cromosomico, ponendo i vetrini del caso da testare in una soluzione di Formamide (FA) al 70% ed SSC 2X, a 72°C, per 2' esatti.

La denaturazione deve poi essere bloccata con un lavaggio in soluzioni progressive di EtOH freddo al 70%, all'80% e al 100%.

Si procede quindi ad ibridazione. La soluzione contenete la sonda da testare si lascia a contatto con il vetrino tramite una pellicola di parafilm, in incubatore a 37° O.N.

Il giorno:

I vetrini vengono lavati in una soluzione di FA al 50% ed SSC 2X a 44° per 10' e poi in SSC 2X per 10' (2 volte): questo lavaggio elimina l'eccesso di sonda non ibridata al sito specifico.

L'ibridazione viene rivelata tramite uso di anticorpi fluorescenti diretti contro la molecola "reporter" (anti-digossigenina o anti-biotina), amplificando, se necessario, il segnale fluorescente con anticorpi-ponte.

I vetrini vanno poi colorati con una soluzione di propidio ioduro (colorante rosso che evidenzia i cromosomi) e antifade (stabilizzatore della fluorescenza emessa dalla sonda ibridata al sito specifico che si sta testando).

I vetrini, inclusi con un vetrino coprioggetto, sono così pronti per essere analizzati al microscopio a fluorescenza (la fluorescenza permane per circa 7 giorni se i vetrini sono conservati al buio in camera fredda a + 4°).

In alcuni casi è stata condotta anche un'indagine FISH a doppio colore con due sonde molecolari distinte, una marcata con biotina e l'altra con digossigenina, per ottenere due segnali distinguibili, uno rosso e l'altro verde, ed individuare la posizione reciproca delle due sonde. In questo caso i cromosomi sono stati colorati con un colorante blu (DAPI).

FISH a doppio colore sono state eseguite nei pazienti portatori del doppio riarrangiamento dup/del, allo scopo di stabilire l'orientamento della duplicazione in tandem (diretta o invertita). L'orientamento della delezione è stato indagato su preparati cromosomici, ma anche su nuclei in interfase, utilizzando sonde distanziate 1-1.5Mb.

Un esame citogenetico e citogenetico-molecolare è stato eseguito anche nei genitori di ogni paziente, su una media di 50 cellule, allo scopo di indagare per la presenza di una traslocazione bilanciata coinvolgente il braccio corto di un cromosoma 4 o per la presenza di un mosaicismo, a bassa percentuale, per la delezione 4p.

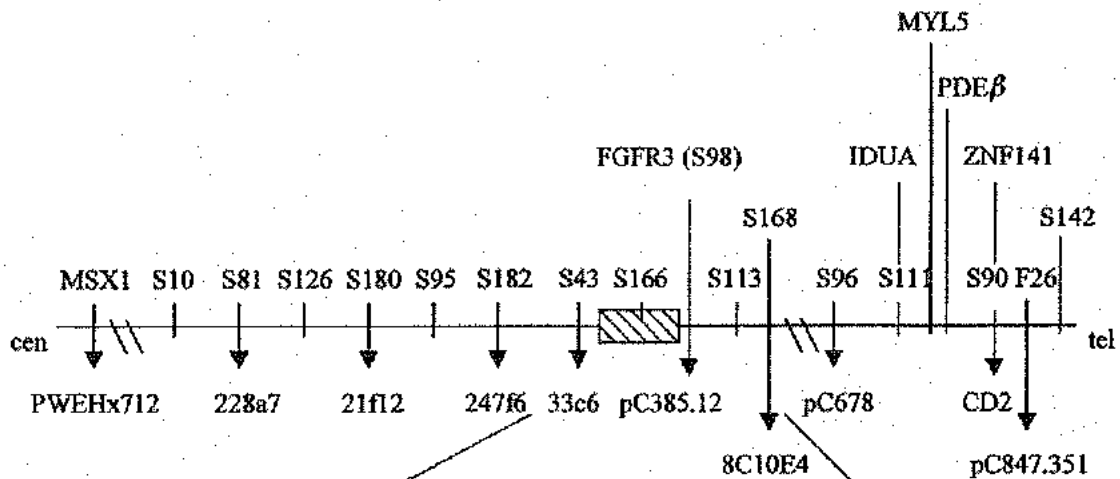
In tutti i pazienti, compresi quelli con delezione già accertabile citogeneticamente, sono state eseguite FISH con le seguenti sonde:

- pC847.351 (subtelomerica)
- 190b4 e 174g8 che delimitano rispettivamente il limite distale e quello prossimale di quella finora riconosciuta come WHSCR.

Tale strategia ha avuto lo scopo di dimostrare che la delezione fosse terminale e includesse effettivamente la regione critica per WHS. Sono note infatti delezioni interstiziali del braccio corto di un cromosoma 4 che esitano in un fenotipo completamente diverso rispetto a quello WH, in cui la regione critica per WHS è preservata, che non possono essere distinte dalle delezioni WH con tecniche di citogenetica convenzionale.

Nei pazienti WH con cromosomi apparentemente normali la presenza e l'estensione della microdelezione è stata indagata con una serie di sonde molecolari, opportunamente scelte per ogni singolo caso, fra le seguenti: MSX1, 228a7, 21f12, 247f6, 241c2, 185f6, 139h8, 212a9, 79f5, 95e6, 161c2, 33c6, 124h12 (10d12), 108f12, 141a8, 190b4, pC385.12, pC678, IS28, CD2, 27h9, 96a2, 190b4, 184d6, pC385.12 e pC678.

A.



B.

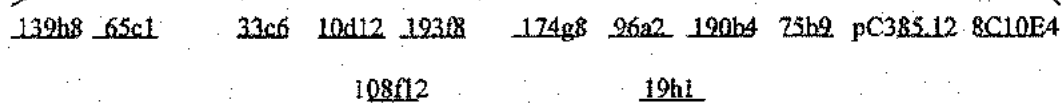


fig.15: (A) **Mappa fisica di 4p16.3.** I loci mostrati lungo la linea corrispondono ad una serie di cosmidi, intervallati da circa 500Kb, usati come sonde in una prima serie di analisi. Essi coprono una regione di circa 5Mb. La regione fin'ora ritenuta come WHSCR è indicata da un rettangolo tratteggiato.

(B) **Contig di cosmidi specifici per la WHSCR**

In una prima fase dell'analisi le sonde erano selezionate ad una distanza di circa 500 Kb, onde stabilire la regione di passaggio tra delezione-non delezione, quindi tale ristretto intervallo è stato testato con una serie di sonde contigue, spesso sovrappendenti.

Il livello prossimale della delezione è stato stabilito nell'ambito del locus in cui il segnale fluorescente era molto più debole su un cromosoma 4, rispetto all'intensità del segnale presente sul cromosoma omologo, a condizione che la sonda subito distale fosse deleta e quella immediatamente prossimale fosse invece normalmente presente.

RISULTATI

Gruppo I: In un totale di 16 pazienti la delezione parziale 4p è stata diagnosticata con un 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 variabile ricorrente, con alta frequenza, alla banda 4p16.1 (totale 6, pazienti n° 6, 7, 8, 9, 10 e 11) (tab 1.2).

Nella fig.14 sono mostrate le delezioni osservate sul cariotipo standard.

Paziente n°	Regione 4p deleta
1	p15.1 pter
41	p15.2 pter
2	p15.3 pter
18	p15.3 pter
42	p15.3 pter
32	p15.31 pter
24	p15.32 pter
3	p15.32 pter
4	p15.32 pter
39	p15.33 pter*
10	p16.1 pter
9	p16.1 pter
7	p16.1 pter
11	p16.1 pter
8	p16.1 pter
6	p16.1 pter

Tab2.1: limite prossimale delle delezioni riscontrate nei pazienti del gruppo I.

*la delezione è associata ad una traslocazione t (4p;8p) *de novo* sbilanciata.

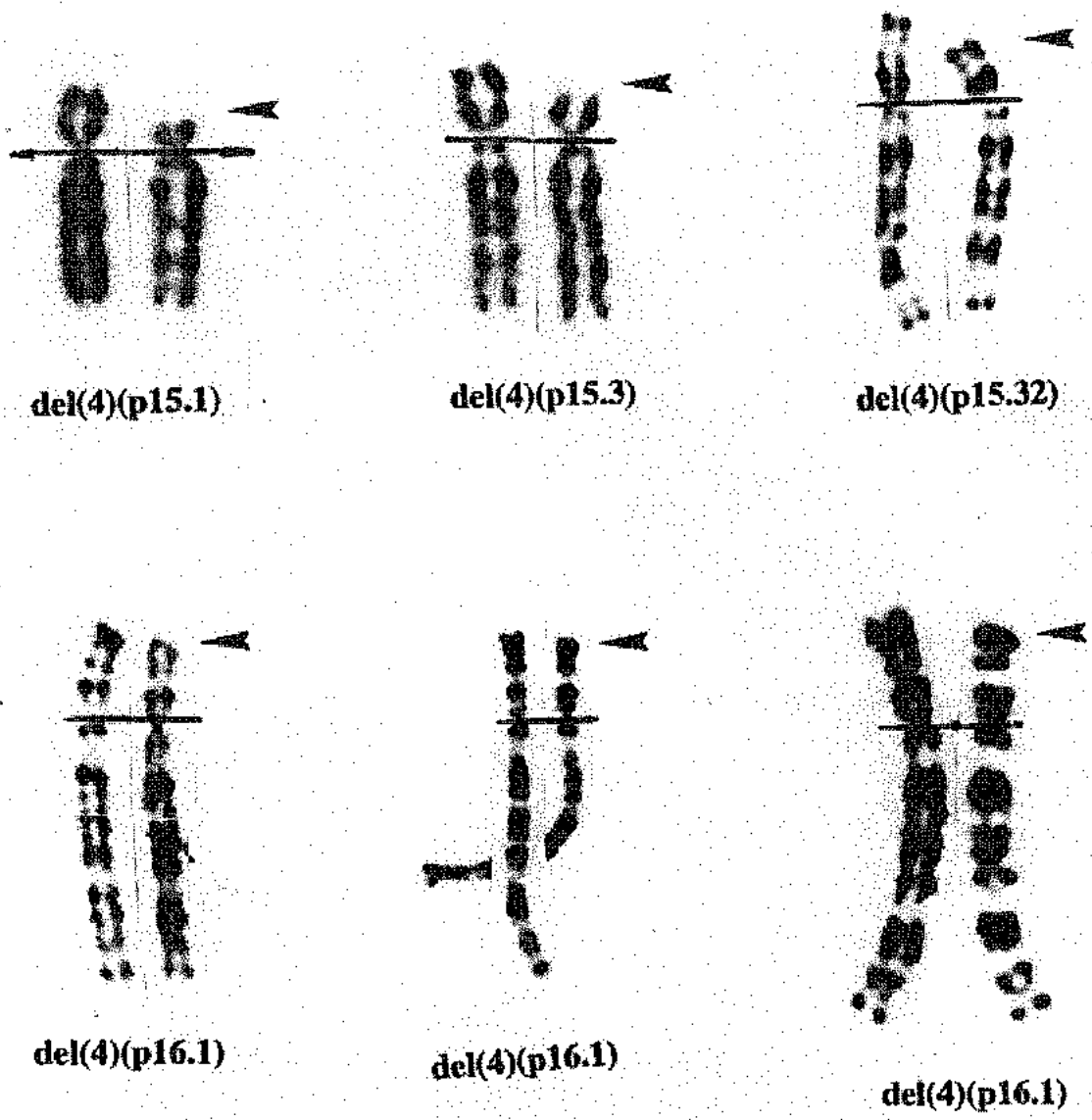


fig.16: esempi di delezioni diagnosticate con esame cromosomico convenzionale.

Si noti l'estensione molto variabile delle delezioni

Il paziente n°39 ha mostrato un difetto genetico alquanto peculiare; l'esame cromosomico aveva dato un risultato apparentemente normale, mentre la regione critica per WHS, in base alla FISH, aveva evidenziato una delezione 4p16.3, sembrava quindi

un caso di microdelezione. Tuttavia poiché il fenotipo era molto più grave di quanto atteso, prima di fare una diagnosi abbiamo voluto misurare con esattezza l'entità della delezione, rilevando, in effetti, una notevole discrepanza tra i dati citogenetici e molecolari. La delezione, infatti, attesa inferiore a 3 Mb, era di fatto compresa tra 10 e 15 Mb. Questo ci ha portato a supporre che un extrasegmento cromosomico sul cromosoma 4 delemo mascherasse l'esatta grandezza della delezione, correggendo la taglia finale del cromosoma 4 delemo. L'ipotesi si è dimostrata effettivamente corretta, quando, con il telomero 8p prima (fig.17), e con una sonda painting 8-specifica poi (fig.18), è stato evidenziato che sul 4p delemo si era traslocata la regione terminale del braccio corto di un cromosoma 8, come conseguenza di una traslocazione sbilanciata ((4p;8p) *de novo*).

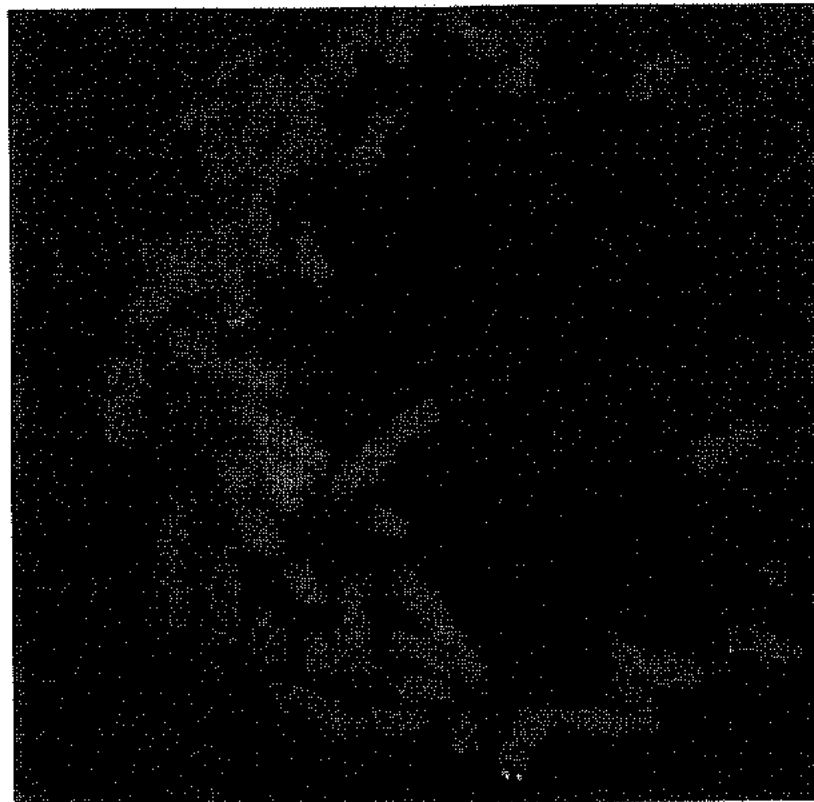


Fig.17: Telomero 8p (paziente n° 39) E' evidente che la sonda telomerica specifica per l'8p ibridizza anche su uno dei due cromosomi 4 (in alto a sinistra)

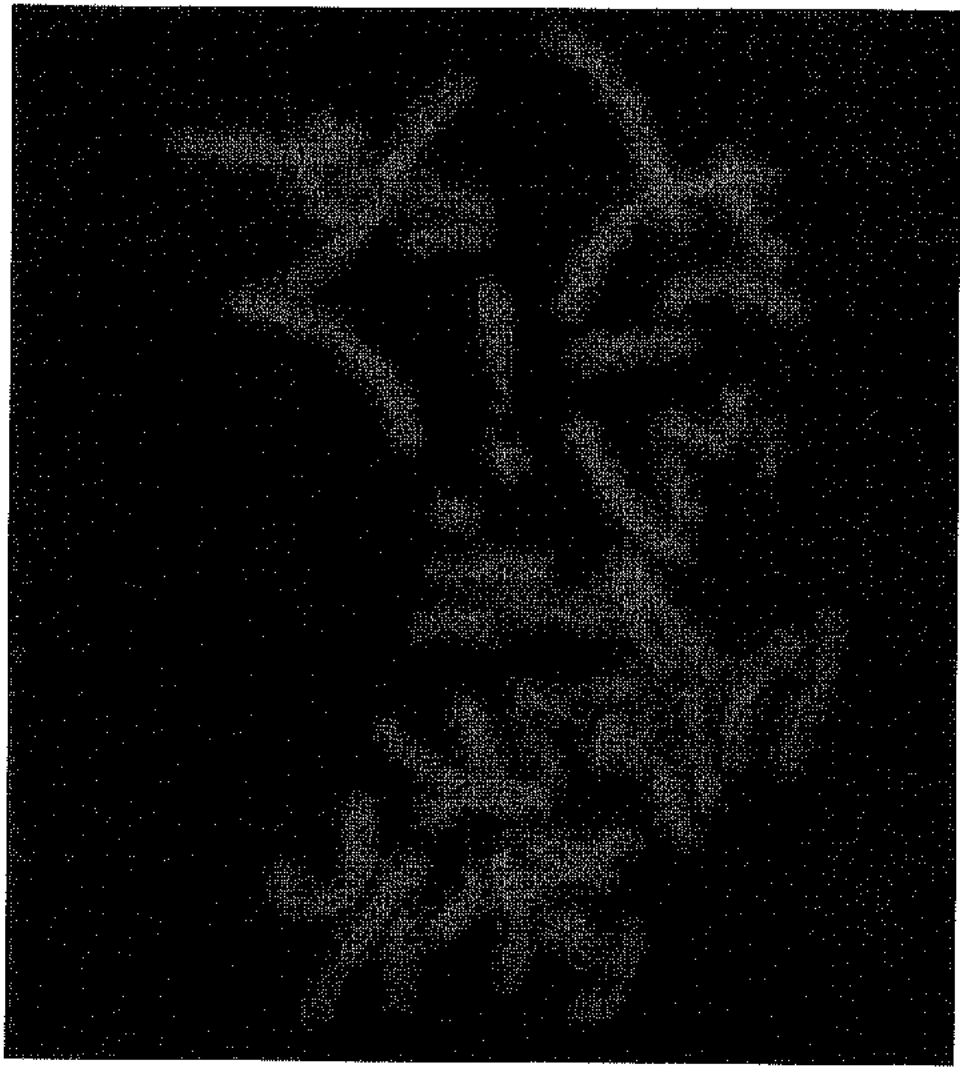


fig.18: **Painting 8** (paziente n°39). Si vede come, anche in questo caso, la sonda specifica per il cromosoma 8 ibridizza anche la zona telomerica di uno dei due cromosomi 4 (in basso a sinistra).

Gruppo 2: un totale di 9 pazienti presentano un cariotipo normale all'esame standard.

Tuttavia, tramite FISH con sonde cosmiche multiple è stata dimostrata la presenza di una microdelezione 4p16.3 di estensione variabile.(tab2.2)

Paziente n°	Grandezza della Delezione (Mb)
31	4
43	3.5
44	3.5
12	≥3
46	2.6
13	2.6
26	2.5
15	2.2
MG	1.9

Tab.2.2: ampiezza delle delezioni riscontrate nei pazienti del gruppo II.

Di notevole rilievo è il fatto che, contrariamente a tutti gli altri, il paziente MG conserva completamente quella che finora è ritenuta la regione critica per WHS. La microdelezione, in questo paziente, comincia subito distalmente al limite di questa regione e si estende fino al telomero.

La fig.19 mostra esempi di microdelezioni diagnosticate tramite FISH.

A)



B)

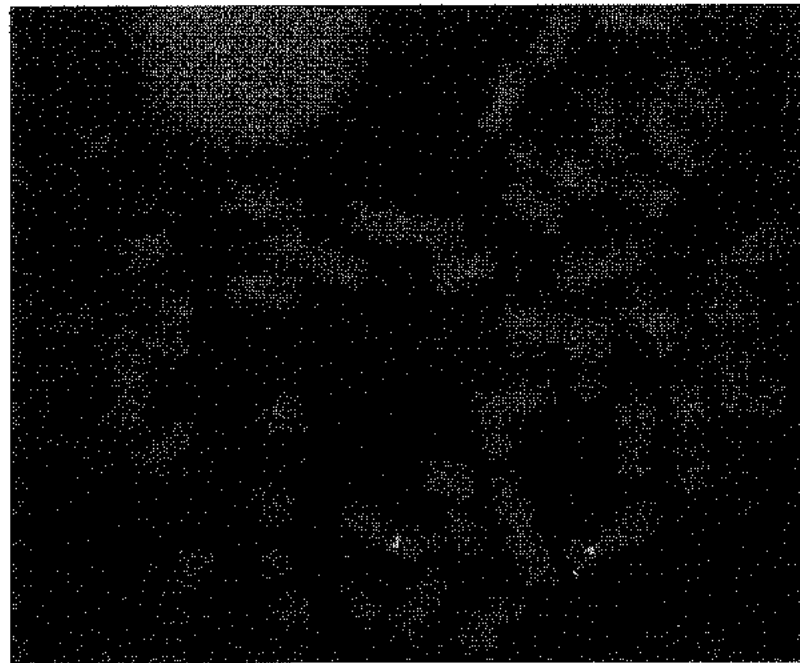


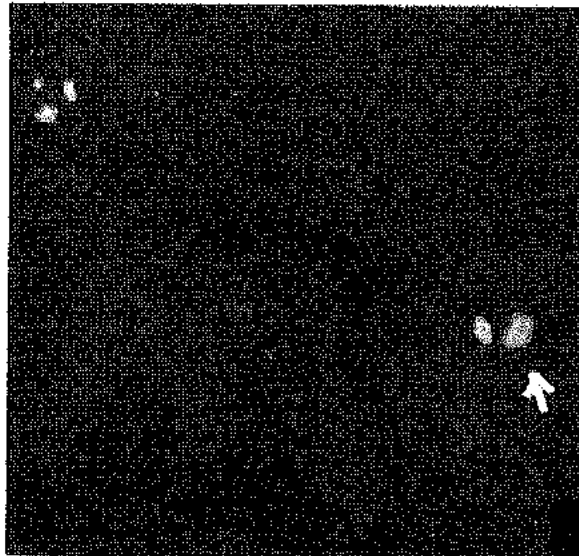
Fig.19: esempi di microdelezioni diagnosticate tramite FISH. A) cariotipo 46 XY; B) cariotipo 46 XX.
Il cromosoma 4 è evidenziato tramite una sonda specifica che ne ibrida il centromero. La diagnosi è stata condotta con la sonda pC678 (locus D4S96)

Gruppo 3: Un totale di 3 pazienti presenta un doppio riarrangiamento cromosomico in cui la delezione, di ampiezza variabile, risulta associata ad una duplicazione che coinvolge diverse regioni del cromosoma 4. (Tab. 2.3) (Fig.20)

Paziente n°	Grandezza della Delezione (Mb)	Regione 4p duplicata
20	≥8	p15.1p16.1
22	≥4	p15.32p16.1
14	2,5	p16.1p16.3

Tab 2.3: doppio riarrangiamento di tipo dup/del riscontrato nei pazienti del gruppo 3

A)



B)

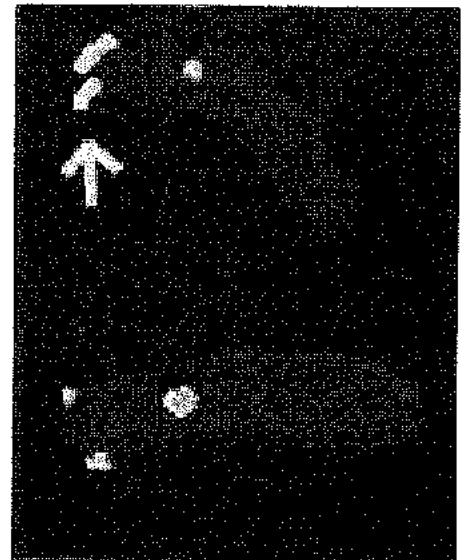
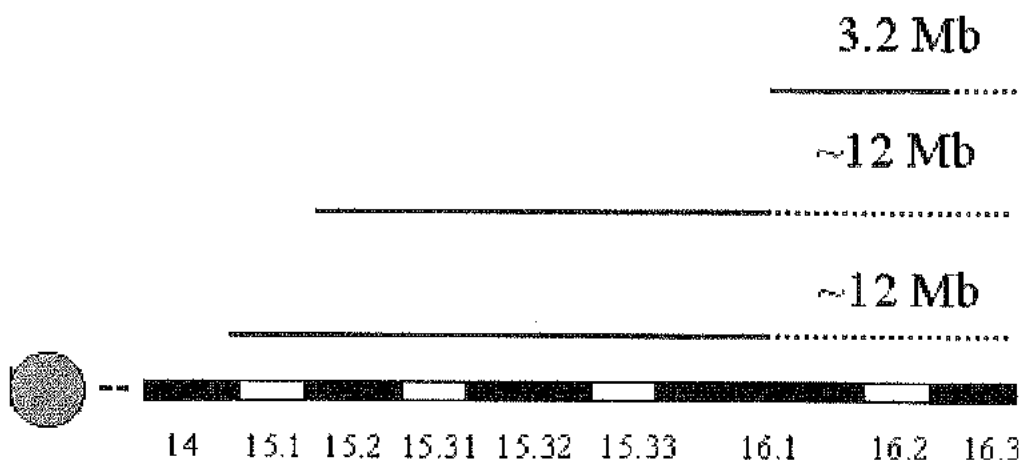


Fig.20: A) FISH con la sonda 850C11. Apparente duplicazione sul cromosoma delecto

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

Duplicazioni/delezioni breakpoints



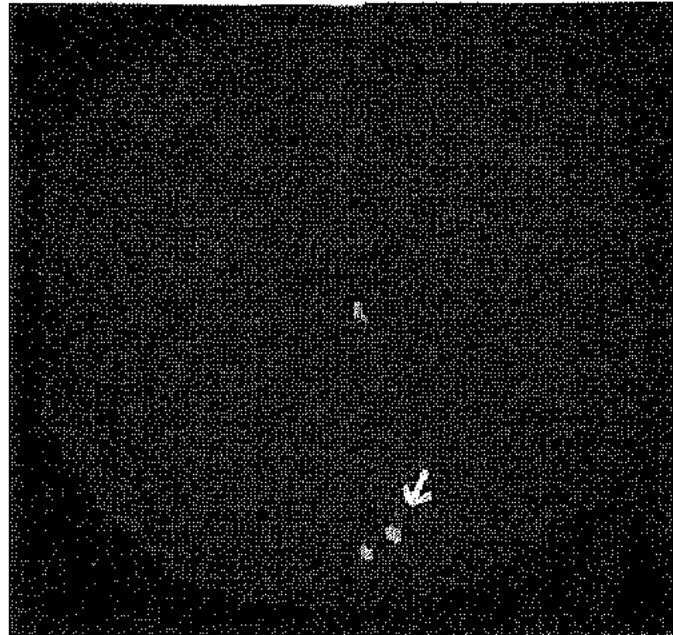
4p

fig.21: schema riassuntivo dei riarrangiamenti osservati nei pazienti del gruppo III

..... regione deleta
—— regione duplicata

In questi casi è stata eseguita una FISH a doppio colore per verificare l'orientamento della duplicazione (diretta o invertita) (fig.22).

A)



B)

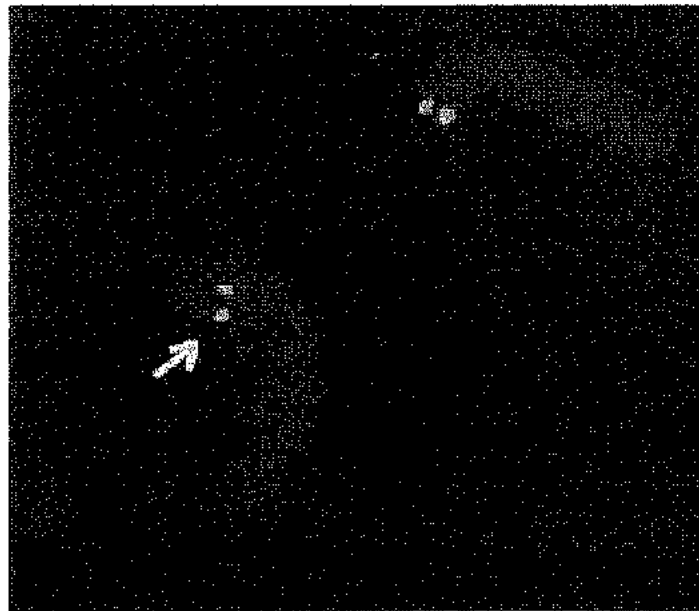


fig. 22: duplicazione invertita della regione 4p15.32p16.1 (paziente n°22).

- A) Interfase, FISH a doppio colore eseguita con la sonda 819f7 (prossimale, verde) e con la sonda 850C11 (distale, rossa). Si noti l'alternanza verde-rosso verde.
- B) Metafase, FISH a doppio colore eseguita con la sonda 850C11 (distale, verde) e con la sonda 787C10 (prossimale, rossa). La reciproca disposizione delle sonde è evidente sul cromosoma normale (a destra).

DISCUSSIONE

La sindrome di Wolf-Hirschhorn (WHS) è causata da delezione parziale del braccio corto del cromosoma 4, la cui ampiezza varia fortemente nei diversi pazienti, ed è associata ad una serie di sintomi per cui è ragionevole presumere un modello di sindrome da geni contigui.

La delezione, generalmente terminale, in molti pazienti si estende per diverse Mb e determina un fenotipo grave caratterizzato da un aspetto caratteristico del volto, a "elmetto di guerriero greco", ritardo mentale grave, grave ritardo di crescita a insorgenza prenatale, ipotonia congenita, malformazioni congenite multiple (difetti cardiaci, anomalie renali e difetti della linea mediana) e convulsioni.

In questi casi, in cui la delezione è estesa, la diagnosi, già fortemente suggerita dalla peculiarità del fenotipo, è facilmente confermabile con un esame cromosomico convenzionale.

Negli ultimi anni, grazie all'introduzione delle tecniche di citogenetica molecolare, si è individuato un numero crescente di microdelezioni limitate alla sola regione 4p16.3, tramite ibridazione in situ fluorescente (FISH) di sonde molecolari su cromosomi apparentemente normali. I pazienti che appartengono a questo gruppo presentano un fenotipo più lieve (mild) in cui sono spesso assenti le malformazioni congenite (Gandelman et al 1992; Johnson et al 1994; Lindeman-Kusse et al. 1996; Clemens et al. 1996; Flang et al. 1997; Partington et al. 1997; Wieczorek et al. 2000; Zollino et al. 2000).

Questi casi si rivelano di più difficile diagnosi, sia per la minore gravità e frequenza dei segni clinici, sia per la normalità dell'esame cromosomico convenzionale. E' quindi ragionevole pensare che la prevalenza della WHS da microdelezione sia sottostimata.

La facies caratteristica ed il ritardo di crescita, essendo invariabilmente presenti indipendentemente dalla grandezza della delezione, rappresentano la componente "gestaltica" della diagnosi di WHS e sono spesso i segni che inducono l'accertamento diagnostico, soprattutto nei casi di microdelezione.

Nonostante si osservi una generale correlazione tra gravità del fenotipo e grandezza della delezione, in segno distintivo della WHS è un'ampia variabilità fenotipica. Alcune apparenti microdelezioni si sono infatti associate ad un fenotipo grave, suggerendo che altri fattori genetici, tuttora sconosciuti, possano intervenire a modulare il fenotipo.

In base ad una analisi comparativa delle poche delezioni interstiziali finora descritte associate a WHS, la attuale regione minimamente deleta, considerata critica per la WHS (WHSCR) è ristretta ad un intervallo di 165 kb in 4p16.3 delimitata prossimalmente dal locus D4S166 (incluso il cosmide 174g8) e distalmente dal locus D4S3327 (incluso il cosmide 19h1) (Wright et al. 1997). Si pensa che uno o più geni ad effetto pleiotropico (presumibilmente con funzione di regolatori trascrizionali di altri geni), presenti in questa regione, siano criticamente responsabili del fenotipo. Tre geni, descritti indipendentemente da diversi ricercatori, sono considerati attualmente come buoni candidati per la WHS. *WHSC1* (Stec et al. 1998), identificato dai cosmidi 19h1, 190b4 ed, in parte, 184d6, è a cavallo del limite distale della WHSCR, mappando per la metà in questa regione e per l'altra metà al di fuori, distalmente. *WHSC2* (Wright et al. 1999) mappa interamente all'interno della WHSCR ed è identificato dal cosmide 96a2. *LETM1*, fiancheggiante la WHSCR in senso distale, è coinvolto nella omeostasi

intracellulare del Ca^{2+} ed è per questo un eccellente candidato per le disfunzioni neurologiche, in particolare per le convulsioni, della WHS (Endele et al. 1999). Questo gene è identificato dal cosmide 75b9 e dal clone PAC 184O23.

L'effetto pleiotropico di una regione così ristretta ha fatto supporre che la WHS possa essere un disordine monogenico, possibilmente causato da aploinsufficienza di uno dei geni candidati. Tuttavia finora non sono state riportate mutazioni in uno di questi geni in associazione a WHS. Inoltre non c'è un generale consenso a ritenere tale condizione un disordine monogenico; molti infatti sono inclini a considerare che geni multipli, magari correlati con specifici segni clinici, sono responsabili del fenotipo WH. Studi di correlazione genotipo-fenotipo potranno dirimere tale questione.

Un'altra importante lacuna è rappresentata dal fatto che ancora non sono noti i fattori genetici, oltre all'estensione della delezione, da cui dipende complessivamente il fenotipo. Per questo motivo, anche se la WHS rappresenta una distinta e ben caratterizzata entità clinica, a tutt'oggi le possibilità di una corretta consulenza genetica e di un'appropriata valutazione prognostica sono limitate dalla sua ampia variabilità fenotipica.

Gli scopi di questa tesi sono stati molteplici: 1) contribuire a chiarire il difetto genetico di base onde tentare di stabilire le linee di una corretta consulenza genetica (fenotipo "classico" o "mild") alla luce delle analisi di correlazione genotipo-fenotipo; 2) stabilire i minimi criteri diagnostici di questa condizione e mapparli più precisamente a livello genetico; 3) definire la nosologia della WHS (disordine monogenico o multigenico?).

È stata condotta un'analisi clinico-genetica comparativa su un gruppo di 28 pazienti affetti da sindrome di Wolf-Hirschhorn. In ogni paziente è stata stabilita la grandezza esatta della delezione, tramite analisi FISH con una serie di sonde contigue in grado di

coprire completamente l'intervallo 4p16.1p16.3, e la maggior parte della regione 4p15p16.1.

Una sostanziale differenza nella metodologia della diagnosi genetica, rispetto alla procedura utilizzata nella maggior parte dei laboratori ha riguardato proprio questo punto. Mediamente, infatti, la diagnosi si basa preliminarmente su un esame cromosomico convenzionale: se la delezione è già visibile con questa tecnica, la stima della delezione si pone in base al pattern di bandeggio. Anche in questo caso noi abbiamo aggiunto ulteriori conferme diagnostiche tramite FISH. Pur in presenza di una grande delezione 4p visibile citogeneticamente, abbiamo proceduto a confermare che la regione critica per WHS fosse effettivamente deleta, dal momento che delezioni interstiziali del braccio corto del cromosoma 4, che non includono quindi la regione critica per WHS, citogeneticamente non sono distinguibili dalle delezioni terminali WHS-associate, ma danno conseguenze cliniche radicalmente differenti, con assenza di ritardo di crescita e con una minore gravità del ritardo mentale.

Solo indagini di citogenetica molecolare possono consentire di porre una corretta diagnosi, e di conseguenza di formulare una prognosi appropriata. Le strategie diagnostiche da noi adottate sono state sensibilmente differenti, rispetto alla condotta di altri laboratori, soprattutto in merito alla valutazione delle microdelezioni. Usualmente, infatti, la diagnosi di microdelezione si pone ogniqualvolta i cromosomi sono apparentemente normali, a condizione che la regione critica per sindrome di Wolf-Hirschhorn risulti deleta. Deve essere specificato, a questo proposito, che la diagnosi molecolare di microdelezione si conduce in genere con una sola sonda. Nel nostro gruppo di pazienti con microdelezione, invece, abbiamo valutato l'esatta estensione del riarrangiamento genetico, tramite FISH con sonde multiple, selezionate fino a

evidenziare il limite prossimale della delezione, che è stata valutata, quindi, in megabasi nei singoli pazienti.

In relazione al difetto genetico di base i pazienti sono stati distinti in tre gruppi:

1. pazienti con **delezione "pura"** (24/28), ulteriormente divisibili in macrodeleti (15/28) e microdeleti (9/28)
2. pazienti con doppio riarrangiamento **dup/del** (3/28)
3. pazienti con delezione associata a **traslocazione *de novo* sbilanciata** (1/28)

Osservando i dati relativi al primo gruppo, è stata notata una correlazione tra la grandezza della delezione e la gravità del fenotipo.

Cardiopatie congenite, anomalie renali e difetti della linea mediana sono molto più frequenti nei pazienti macrodeleti (tab I) che non in quelli microdeleti (tabII).

Di notevole rilievo è l'assenza di microcefalia in due pazienti microdeleti (n°15 ed MG), portatori delle delezioni più piccole osservate in questo gruppo, rispettivamente di 2.2 Mb e 1.9Mb. Si è potuto pertanto stabilire che il dato "microcefalia" non è un segno obbligato di questa condizione. Notevoli sono state anche le differenze riguardo alla gravità del ritardo mentale e dell'ipotonìa congenita. I pazienti portatori di una estesa delezione hanno presentato tutti un grave ritardo mentale: il linguaggio era spesso assente entro gli 8 anni, l'interazione con l'ambiente molto povera. Anche le tappe dello sviluppo motorio sono state fortemente ritardate, con acquisizione della deambulazione autonoma dopo gli 8 anni; in alcuni pazienti la deambulazione autonoma non era stata affatto acquisita entro i 12 anni.

I dati clinici e genetici riguardanti i pazienti con doppio riarrangiamento dup/del (tabIII) suggeriscono che questo specifico riarrangiamento identifica una categoria fenotipica distinta, nell'ambito della WHS.

I segni fisici complessivi osservati in questi pazienti (presenza o no di malformazioni congenite) erano in accordo con la grandezza della delezione soltanto, secondo le correlazioni relative al gruppo precedente; invece il grado di ritardo mentale era più grave rispetto a quello di pazienti portatori della sola delezione, di grandezza simile. Si può quindi desumere che l'associata trisomia parziale 4p non influenza tanto il fenotipo fisico, ma aggrava l'entità del ritardo mentale.

In merito al doppio riarrangiamento duplicazione/delezione va precisato che c'è evidenza crescente che duplicazioni invertite a carico delle regioni distali di differenti cromosomi siano usualmente associate a delezioni terminali a carico dello stesso cromosoma. (Bonaglia et al. 2000).

I casi più estatamente caratterizzati sono state fin'ora 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 invertite (repliconi) localizzate sullo stesso cromosoma 8; tutte le madri sono portatrici di un'inversione paracentrica della stessa regione interessata dal riarrangiamento sbilanciato. (Giglio et al. 2001).

Del resto è ampiamente dimostrato che sequenze ripetute ed invertite, localizzate sullo stesso cromosoma a distanza di poche Mb, mediano microriarrangiamenti relativamente comuni, come delezioni, duplicazioni e inversioni.

Tali sequenze ripetute devono essere, quindi, 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.20).

La presenza di sequenze ripetute ed 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 poli opposti della cellula, il cromosoma si rompe. A seconda del punto di rottura si generano un cromosoma portatore di una duplicazione-delezione ed un cromosoma portatore di una delezione semplice.

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

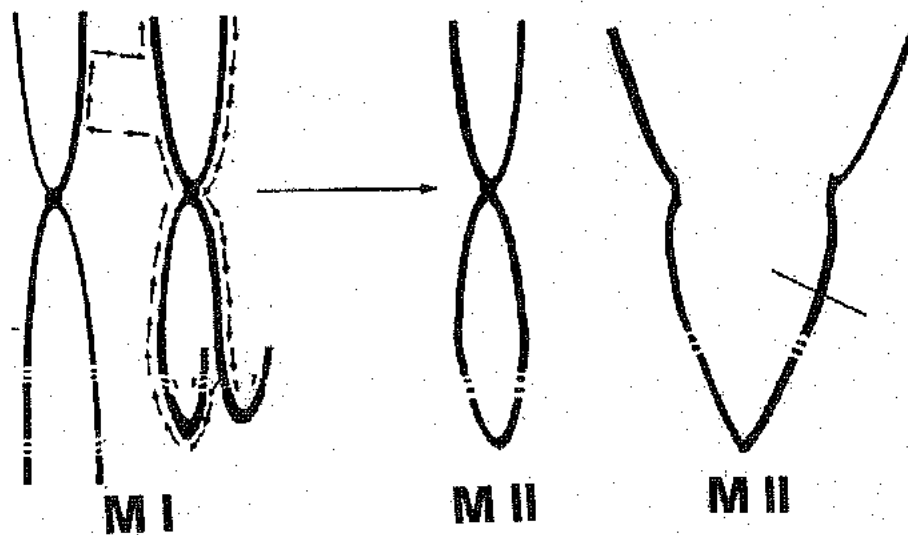


Fig.23: Meccanismo di origine del riarrangiamento risultante in una duplicazione invertita associata ad una delezione distale.

Prima divisione meiotica (M I): i due cromosomi omologhi subiscono una ricombinazione canonica, la presenza di sequenze ripetute (linee tratteggiate) e 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. La parte distale alle sequenze ripetute è quella che sarà deleta.

Alla seconda divisione meiotica (M II), 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)

Il paziente (n°39), portatore di traslocazione sbilanciata $t(4p;8p)$ *de novo*, ci ha consentito di fare delle osservazioni estremamente interessanti e innovative. Il paziente mostrava un fenotipo relativamente grave, con ritardo mentale grave e presenza di malformazioni congenite. L'esame cromosomico ad alta risoluzione (850 bande) aveva dato un risultato apparentemente normale, mentre la FISH, effettuata due sonde molecolari che delimitano distalmente e prossimalmente la regione critica, aveva evidenziato una delezione 4p16.3. Era quindi legittimo, come avviene regolarmente in altri centri non specificamente coinvolti nella ricerca su questa condizione, porre diagnosi di microdelezione. Ciò significa che, essendo appunto i cromosomi apparentemente normali, la delezione era attesa inferiore a 3 Mb, che è appunto il limite di risoluzione della citogenetica convenzionale. Tuttavia il fenotipo era fortemente in disaccordo, essendo molto più grave di quanto atteso. Questo caso sarebbe quindi stato annoverato come un caso di discordanza genotipo-fenotipo, e avrebbe aggiunto ulteriori incertezze nella consulenza genetica che intende valutare anche la prognosi in ogni singolo paziente. Grazie alle nostre strategie di indagine, che prevedono di misurare esattamente la grandezza della delezione, e non solo di diagnosticarne la presenza, abbiamo osservato una notevole discrepanza tra i dati citogenetici e molecolari. La delezione, infatti, attesa inferiore a 3 Mb, era di fatto compresa tra 10 e 15 Mb. Abbiamo quindi supposto che un extrasegmento cromosomico sul cromosoma 4 deleto mascherasse l'esatta grandezza della delezione, correggendo la taglia finale del cromosoma 4 deleto. L'ipotesi è stata poi confermata con ulteriori indagini molecolari. Questa osservazione suggerisce fortemente di indagare ulteriori pazienti, per la presenza della stessa o di altre traslocazioni sbilanciate. Dai dati della letteratura si evince infatti che una traslocazione $t(4;8)$ *de novo* è relativamente frequente nei pazienti WH

(Wieczorek et al, 2000), inizialmente diagnosticati come portatori della sola delezione. Riteniamo dunque di aver individuato il secondo (dopo la grandezza della delezione), importante fattore di variabilità fenotipica nella WHS. L'extrasegmento sul 4p deleto aggrava il fenotipo per due motivi: primo, perché maschera la reale grandezza della delezione, secondo perché implica un doppio sbilanciamento quantitativo.

Il presente studio di correlazione genotipo-fenotipo ci ha consentito ulteriori osservazioni di notevole rilevanza. Abbiamo potuto concludere che il fenotipo "basale" della WHS è definito dall'associazione di ritardo mentale, ritardo di crescita, facies caratteristica, ipotonia congenita e convulsioni.

Tutti questi segni sono proposti come criteri diagnostici minimi di questa condizione. Riteniamo che non può essere fatta una diagnosi di WHS in assenza di uno di questi segni.

Non è quindi ragionevole ritenere che una tipica WHS possa essere causata dalla mutazione di un singolo gene. La WHS è una condizione multigenica, in cui alcuni specifici geni correlano con specifici segni clinici.

Il paziente MG nel presente studio presentava un fenotipo WH, che includeva tutti i segni clinici ritenuti minimi criteri diagnostici, ma aveva completamente conservato quella che finora è ritenuta la regione critica per WHS.

La microdelezione, in questo paziente, cominciava subito distalmente al limite di questa regione e si estendeva fino al telomero. In letteratura è riportato un solo paziente (Rauch et al. 2001) con una piccola delezione interstiziale limitata a quella che finora è stata ritenuta WHSCR, ma clinicamente non aveva la WHS: la facies era poco caratteristica, di altezza normale, il ritardo mentale molto lieve, e, soprattutto, le convulsioni erano assenti.

Queste osservazioni ci hanno consentito di ridefinire la regione critica per WHS. Essa, pubblicata come WHSCR-2, è subito distale, e contigua, a quella precedentemente ritenuta regione critica (Zollino et al. 2003) (fig.24).

Un nuovo test diagnostico è necessario, con una sonda localizzata in questa regione. Ulteriori geni candidati per specifici segni clinici dovrebbero essere ricercati in questa nuova regione.

Ulteriori osservazioni delucideranno questi dati preliminari, e porteranno ad una migliore definizione nosologica della WHS.

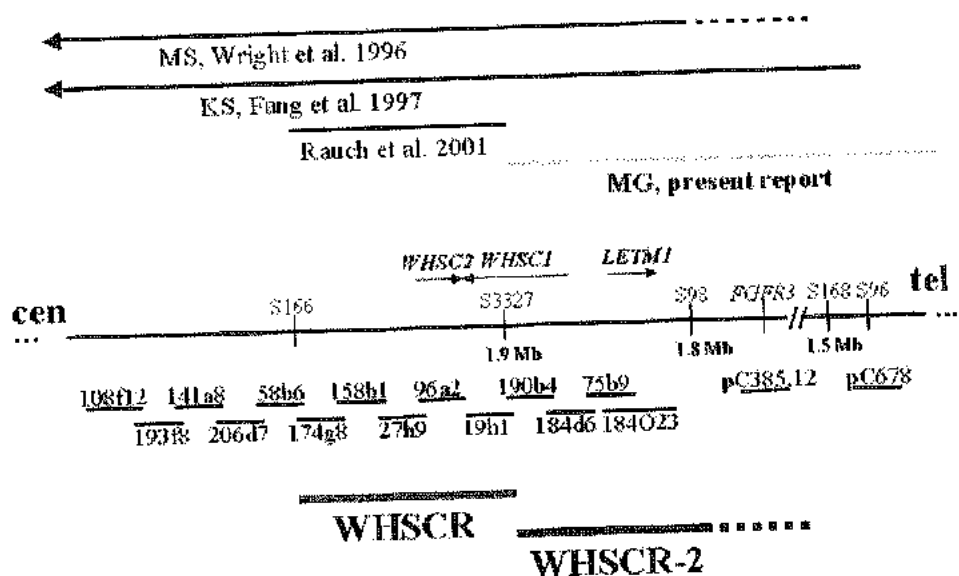


fig.24: Organizzazione genomica della WHSCR in 4p16.3.

Tutte le sonde riportate sono cosmidi ad eccezione del PAC 184O23. Il contig include tutti i geni candidati per la WHS (*WHSC2*, *WHSC1* e *LETM1*). Si nota che *WHSC2* è incluso nel cosmide 96a2; *WHSC1* nei cosmidi 19h1, 190b4 e, in parte, 184d6; *LETM1* nel cosmide 75b9 e nel PAC 184O23.

Con **WHSCR** si indica la regione critica per WHS attualmente riconosciuta, situata tra 174g8 prossimalmente e 19h1 distalmente. **WHSCR-2** si riferisce alla regione critica da noi definita. Quest'ultima è più distale e si trova all'esterno della WHSCR, con il limite prossimale al 190b4 e il limite distale a D4S98 e D4S168. Il gene *WHSC1* si sovrappone ad entrambe le regioni, con la sua porzione al 5' in WHSCR-2 e quella al 3' in WHSCR.

In alto: sono indicate le delezioni 4p determinanti per la definizione della nuova regione critica.

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

Auffray C, Behar G, Bois F, Bouchier C, Dasilva C, Devignes M, Duprat S, Houlgatte R, Jumeau M, Lamy B, Lorenzo F, Mitchell H, Mariagesamson R, Pietu G, Pouliot Y, Sebastiani-Kabaktchis C, Tessier A. 1995. IMAGE: integrated molecular analysis of the human genome and its expression. *C R Acad Sci III* 318: 263-272

Battaglia A, Carey JC. 1998. Wolf-Hirschhorn syndrome and Pitt-Rogers-Danks syndrome. *Am J Med Genet* 75: 541

Baxendale S, McDonald ME, Mott R, Francis F, Linn C, Kirby SF, James M, Zehetner G, Hummerich H, Valdes J, Collins FS, Deaven LJ, Gusella JF, Leharch 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

*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

*Budarf ML, Beverly SE. 1997. Progress in the autosomal segmental aneusomy syndromes (SASs): single or multi-locus disorders? *Hum Mol Genet* 6: 1657-1665

Chitayat D, Ruvalcaba RH, Babul R, Teshima IE, Posnick JC. 1995. Syndrome of proximal interstitial deletion 4p15: report of three cases and review of the literature. *Am J Med Genet* 55(2): 147-154

Clemens M, Martsof JT, Rogers JC, Mowery-Rushton P, Surti U, McPherson E. 1996. Pitt-Rogers-Danks syndrome: the result of a 4p microdeletion. *Am J Med Genet* 66: 95-100

Dallapiccola B, Mastroiacovo PP, Montali E, Sommer A. 1997. 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

Donnai D. 1986. A further patient with the Pitt-Rogers-Danks syndrome with mental retardation, unusual face and intrauterine growth retardation. *Am J Med Genet* 24: 29-32

*Endele S, Fuhry M, Sang-Jim Pac, Bernhard U, Zabel, Winterpacht A. 1999. LETM1, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca^{++} binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients. *Genomics* 60:218-225

*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 AS. 1995. Preliminary phenotypic map of chromosome 4p16 based on 4p deletions. *Am J Med Genet* 57: 581-586

*Flang YY, Bain S, Haan EA, Eyre HJ, Mac Donald 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

*Fryns JP, Lemmens F. 1989. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 4. A phenotype distinct from the Wolf-Hirschhorn syndrome. *Ann Genet* 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, Broman KW, Matsumoto N, Calvari W, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R, Weber JL, Ledbetter DH, Zuffardi O. 2001. Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphism and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 68: 874-883

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

*Glusman G, Yanai I, Rubin I, Lancet D. 2001. The complete human olfactory subgenome. *Gen Res* 11: 685-702

*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, Baverstock 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

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

Lurie I, Lazjuk G, Ussova Y, Presman E, Gurevic D. 1980. The Wolf-Hirschhorn syndrome*. *Clin Genet* 17: 375-384

Naf D, Wilson LA, Bergstrom LA, Smith RS, Goodwin NC, Verkerk A, Van Ommen GJ, Ackerman SL, Frankel WN, Schimenti JC. 2001. Mouse models for the Wolf-Hirschhorn deletion syndrome. *Hum Mol Genet* 10: 91-98

*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. Translocation 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

*Rauch A, Schellmoser S, Kraus C, Helmut G Dorr, Trautmann U, Altherr MR, Pfeiffer RA, Reis A. 2001. First known microdeletion within the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region refines genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet* 99: 338-342

*Ray MJ, Rockman-Greenberg C. 1984. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 4. *Am J Med Genet* 21: 223-225

Sebastio G, Perone L, Guzzetta V, Sebastio L, Vicari L, Della Casa R, Guerrieri F, Zappata S, Pomponi MG, Mazzei A, Neri G, Andria G, Brhae 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

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

*Shannon NL, Maltby EL, Rigby AS, Quarrel OWJ. 2001. An epidemiological study of Wolf-Hirschhorn syndrome: life expectancy and cause of mortality. *J Med Genet* 38: 674-679

*Stec I, Wright TJ, Van Ommen G-JB, de Boer PAJ, Van Heringen A, Moorman FM, Altherr MR, den Dunnen JT. 1998. WHSC1, a 90Kb set domain, containing gene express in early development and homologous to a *Drosophila* dismorphy 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

Syrrou M, Borghgraef M, Fryns JP. 2001. Unusual chromosomal mosaicism in Wolf-Hirschhorn syndrome: del(4)(p16)/der(4)(qter-q31.3::pter-qter). *Am J Med Genet* 104: 199-203

*Tupler R, Bortotto L, Buhler EM. 1992. Parental origin of de novo deleted chromosome 4 in Wolf-Hirschhorn syndrome. *J med Genet* 29: 53-55

Wheeler PG, Weaver DD, Palmer CG. 1995. Familial translocation resulting in Wolf-Hirschhorn syndrome in two related unbalanced individuals: clinical evaluation of 39-years-old man with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet* 55: 462-465.

White DM, Pillers De-Ann M. 1995. Interstitial deletion 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, Reiss O, Gillessen-Kaesbach G. 2000. Unexpected high frequency of de novo unbalanced translocation in patients with Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS). *J Med Genet* 37: 798-804

Wieczorek D, Krause M, Majewski F, Albrecht B, Horn D, Reiss 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: 526-529

Wolf U, Reinwein H, Porsch R, Schroter R, Baitsch H. 1965. Defizienzen 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* 53: 203-212

*Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Spinner N, 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, Pailotta R, Altherr MR, Neri G. 2000. Genotype-phenotype correlations and clinical diagnostic criteria in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet* 94: 254-261

*Zollino et al. 2003. *Am J Hum Genet* in press

* Gli articoli contrassegnati dall'asterisco sono stati consultati per intero.