

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Pediatria

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: MEDICINA DELLO
SVILUPPO E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE
INDIRIZZO: GENETICA BIOCHIMICA E MOLECOLARE
CICLO 23°

**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE MEDIANTE
ARRAY-CGH E ORIGINE PARENTALE DI ANOMALIE
CROMOSOMICHE STRUTTURALI IN PAZIENTI CON
RITARDO MENTALE/PSICOMOTORIO/AUTISMO E/O
ANOMALIE COMPORTAMENTALI**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Dott. Maurizio Scarpa

Supervisore: Ch.mo Prof. Maurizio Clementi

Dottorando: Chiara Rigon

INDICE

ABSTRACT	1
1) INTRODUZIONE	5
1.1 Anomalie cromosomiche strutturali	5
1.2 Instabilità genomica e variabilità genetica	6
1.2.1 Disordini genomici	7
1.3 Meccanismi di formazione delle anomalie strutturali	8
1.3.1 Non allelic Homologous Recombination-NAHR	8
1.3.2 Non Homologous End Joining-NHEJ	10
1.3.3 Fork Stalling And Template Switching Model-FoSTes	11
1.4 Origine parentale delle anomalie cromosomiche strutturali	12
1.5 Sviluppo e potenzialità della tecnologia array-CGH nell'analisi delle anomalie cromosomiche	14
2) SCOPO DELLA TESI	17
3) POPOLAZIONE IN STUDIO	19
4) MATERIALI E METODI	21
4.1 Estrazione di DNA genomico da campioni	21
4.2 Array Comparative Genomic Hybridization	21
4.3 Analisi dei microsatelliti	25
4.4 RFLP e PCR quantitativa	28
4.5 Analisi bioinformatica	37
5) RISULTATI	39
6) DISCUSSIONE	95
BIBLIOGRAFIA	99

ABSTRACT

Lo studio delle anomalie cromosomiche strutturali si è affermato negli ultimi anni come un potente mezzo per l'identificazione delle cause molecolari alla base di disordini genomici responsabili di quadri fenotipici complessi quali ritardo mentale, autismo, epilessia, disordini psichiatrici e anomalie congenite multiple.

Da circa 10 anni è emerso sempre più chiaramente che l'analisi citogenetica convenzionale non è in grado di rilevare anomalie cromosomiche inferiori a 5-10 Mb che, seppur di dimensioni submicroscopiche, possono associarsi a ritardo mentale e anomalie fenotipiche.

Questo limite è stato da qualche anno superato dall'introduzione di una tecnica di citogenetica molecolare, l'array-CGH, che permette un'analisi completa e precisa delle variazioni del numero di copie delle sequenze di DNA e consente di valutare contemporaneamente e con alta specificità più regioni cromosomiche in modo da poter evidenziare sbilanciamenti.

Nell'ultimo decennio con l'introduzione di array *genome wide*, è risultato evidente che i meccanismi molecolari alla base dei disordini genomici sono correlati a riarrangiamenti di particolari regioni del genoma, suscettibili più di altre ad andare incontro a ricombinazioni aberranti.

Diversi studi hanno evidenziato infatti la presenza di alcuni segmenti (sequenze SINE, LINE, LCRs) che causano un alto grado di instabilità genomica portando a riarrangiamenti cromosomici.

L'origine parentale delle anomalie cromosomiche è di considerevole interesse in quanto potrebbe aiutare a capire il loro meccanismo di formazione.

Gli studi fatti fino ad ora riportano nella gametogenesi maschile c'è una maggiore tendenza alla formazione di riarrangiamenti cromosomici conseguente a un maggior numero di divisioni premeiotiche delle cellule germinali maschili rispetto a quelle femminili.

In questo studio sono stati valutati mediante array CGH 66 soggetti che presentano ritardo mentale e/o dello sviluppo, autismo, anomalie congenite multiple e dimorfismi con lo scopo di verificare la presenza di riarrangiamenti

criptici e caratterizzare in modo più preciso le anomalie identificate grazie all'esame cromosomico ad alta definizione.

E' stata quindi determinata l'origine parentale dei riarrangiamenti mediante l'utilizzo di marcatori polimorfici (STR o RFLP) per definire se esiste un diverso tasso di mutazione nei due sessi; infine sono stati analizzati i *breakpoints* per verificare la presenza di regioni di omologia che possano aver predisposto al riarrangiamento.

I risultati ottenuti in questo studio mostrano che il 16% dei pazienti con fenotipo patologico e cariotipo normale è portatore di una delezione/duplicazione criptica; inoltre nel 20 % dei pazienti in cui erano state precedentemente individuate alterazioni del cariotipo, l'array-CGH ha evidenziato ulteriori anomalie.

L'analisi dei *breakpoints* ha evidenziato la presenza di regioni di omologia che possono aver favorito il riarrangiamento confermando che l'architettura del genoma agisce come catalizzatore dell'instabilità cromosomica causando riarrangiamenti genomici, tuttavia al contrario di quanto riportato in letteratura non ci sono differenze significative tra i due sessi nella formazione di riarrangiamenti cromosomici.

The study of structural chromosomal abnormalities has emerged in recent years as a powerful tool for the identification of molecular causes underlying disorders responsible for genomic complex phenotypes such as mental retardation, autism, epilepsy, psychiatric disorders and multiple congenital anomalies.

For nearly 10 years it has increasingly become clear that the conventional cytogenetic analysis is unable to detect chromosomal abnormalities less than 5-10 Mb, that may be associated with phenotypic abnormalities and mental retardation. This limit has been exceeded in recent years by the introduction of a molecular cytogenetic technique, array-CGH, which allows complete and precise analysis of DNA copy number variations and allows to evaluate with high specificity many chromosomal regions in order to detect chromosomal imbalances.

Over the last decade with the introduction of genome wide array, it became clear that the molecular mechanisms at the basis of the genomic disorders are related to

rearrangements of some regions of the genome, particularly predisposed to aberrant recombination.

Several studies have indeed revealed the presence of some segments (SINE, LINE, LCRS) that cause a high degree of genomic instability leading to chromosomal rearrangements.

The parental origin of chromosome abnormalities is of considerable interest because it may help to understand their formation mechanism.

Many studies show that male gametogenesis appears susceptible to the formation of structural chromosome abnormalities. This is generally attributed to the much larger number of premeiotic cell divisions undergone by male germ cells in comparison with female germ cells.

In this study 66 subjects with mental retardation and / or development, autism, multiple congenital anomalies and dimorphisms were assessed by array CGH, in order to verify the presence of cryptic chromosomal rearrangements and to characterize more precisely the chromosomal abnormalities identified by high-resolution chromosome examination.

It was then analyzed the parental origin of chromosome rearrangements by use of polymorphic markers (RFLP or STR) to determine whether there is a different mutation rate in both sexes. Finally the breakpoints were analyzed to verify the presence of homologous regions which may predisposed to rearrangements.

The results obtained in this study show that 16% of patients with clinical signs and a normal karyotype have a cryptic deletion / duplication. In 20% of patients with karyotypic alterations, previously identified by standard cytogenetic, array-CGH detected other abnormalities.

The analysis of the breakpoints revealed the presence of homologous regions that may have predisposed the rearrangement confirming that the architecture of the genome play a major role for genomic instability causing chromosomal rearrangements.

In contrast to the literature there are no significant differences between the sexes in the formation of chromosomal rearrangements.

1. INTRODUZIONE

1.1 Anomalie cromosomiche strutturali

Intorno agli anni Settanta, con l'introduzione di tecniche di bandeggio si è iniziato ad analizzare e quindi a comprendere il ruolo svolto dalle anomalie cromosomiche nell'insorgenza o nello sviluppo di varie sindromi.

Fu presto chiaro che la perdita o l'acquisizione di materiale genetico poteva spesso essere associato a ritardo mentale e anomalie congenite multiple.

Negli ultimi anni lo sviluppo di tecniche di citogenetica molecolare ad alta risoluzione come l'*array-CGH*, ha messo in evidenza numerosi casi di sbilanciamenti cromosomici criptici in soggetti con fenotipo cromosomico (ritardo mentale/dismorfismi/anomalie congenite) e cariotipo normale (Vissers et al., 2003; Shaw-Smith et al 2004).

Studi sulle cause molecolari dei disordini genomici hanno quindi identificato un importante ruolo svolto dalle anomalie cromosomiche strutturali.

Esse possono essere distinte in quattro categorie principali: delezioni, duplicazioni, inversioni e traslocazioni

1. Le delezioni consistono nella perdita di un frammento di cromosoma e vengono classificate come terminali, se avvengono nella parte finale del cromosoma, e interstiziali, quando, in seguito alla rottura di un cromosoma in due punti, avviene la perdita del frammento intermedio e i punti di rottura vengono saldati tra di loro. A livello fenotipo le conseguenze di una delezione dipendono dal gene o dai geni che si perdono.
2. Le duplicazioni consistono nella presenza di due copie di uno stesso frammento di cromosoma; si dicono in tandem quando il segmento è ripetuto nello stesso orientamento, inverse quando la duplicazione ha una direzione opposta. Normalmente le duplicazioni sono meno dannose delle delezioni
3. Le inversioni derivano dalla rotazione di 180 gradi di un tratto cromosomico. Esse non comportano perdite di materiale genetico ma possono determinare la perdita di funzionalità di geni importanti se i punti

di rottura da cui hanno origine ricadono all'interno della struttura di un gene o nelle regioni regolatrici della trascrizione. Le inversioni possono essere di due tipi: pericentriche, se il segmento che subisce la rotazione include il centromero, e paracentriche, se non lo comprende.

4. Le traslocazioni implicano un cambiamento nella localizzazione di un segmento cromosomico. Possono essere di due tipi: reciproche o Robertsoniane. La traslocazione reciproca consiste in uno scambio bidirezionale di materiale genetico tra due cromosomi non omologhi e avviene sempre in seguito a rotture del DNA, in seguito alle quali si formano dei frammenti di cromosoma liberi che per errori nel processo di riparazione, vengono saldati in maniera errata ad un altro cromosoma non omologo, dando così origine, a due cromosomi derivati. Nella traslocazione Robertsoniana, invece, due cromosomi acrocentrici non omologhi si rompono a livello dei centromeri e i bracci lunghi si ritrovano attaccati a un unico centromero. I bracci corti si uniscono a loro volta a formare il prodotto reciproco, che generalmente contiene geni non essenziali e viene abitualmente perduto entro poche divisioni cellulari.

1.2. Instabilità genomica e variabilità genetica

Diversi studi hanno evidenziato la presenza nel genoma di alcuni segmenti particolarmente suscettibili a riarrangiamenti cromosomici che causano un alto grado di instabilità genomica a livello di specifiche regioni cromosomiche. Si ipotizza che ciò sia uno dei meccanismi responsabili dell'introduzione di variabilità genetica all'interno della specie. I meccanismi che generano tali riarrangiamenti e le conseguenze fenotipiche che determinano, sono stati oggetto di numerosi studi negli ultimi anni (Lee et al. 2007; Lupski 1998; Lupski & Stankiewicz 2005; Gu et al. 2008).

Il genoma umano ha una proporzione molto elevata di sequenze di DNA ripetute (es. sequenze *SINE*, *LINE*, *Low copy repeats* etc), facilmente soggette a variazioni nel numero di copie e a indurre scambi tra sequenze. Certe regioni cromosomiche, in particolare quelle subtelomeriche e quelle pericentromeriche, contengono

lunghi tratti di DNA duplicato e l'instabilità di queste regioni può predisporre a patologie (Eichler 1998)

E' probabile quindi che l'architettura stessa del genoma agisca come catalizzatore dell'instabilità cromosomica causando riarrangiamenti genomici.

1.2.1 Disordini genomici

Il concetto di disordini genomici è stato proposto per la prima volta da Jim Lupski nel 1998, e si riferisce a grossi riarrangiamenti mediati dalla struttura del DNA, che portano alla completa perdita o duplicazione di geni dose-sensibili o alternativamente alla rottura dell'integrità strutturale di un gene (Lupski 1998).

Questi disordini rappresentano un ampio *range* di entità cliniche distinte, e includono molte malattie che coinvolgono le funzioni del sistema nervoso. Parecchi disordini neurodegenerativi e dello sviluppo nervoso sono causati da riarrangiamenti genomici che sono mediati o stimolati dalla complessa architettura del genoma umano (es. CMT1A, *Charcot-Marie-Tooth1A*; HNPP, *Hereditary Neuropathy with liability to pressure palsies*; SMS, *Smith-Magenis syndrome*) (Lee & Lupski 2006).

Nell'ultimo decennio con l'introduzione di array genomici, l'identificazione di nuove sindromi, nonché l'individuazione degli sbilanciamenti cromosomici è stato notevolmente facilitato. Inoltre è risultato evidente che i meccanismi molecolari alla base dei disordini genomici sono correlati a riarrangiamenti di particolari regioni del genoma, suscettibili più di altre ad andare incontro a ricombinazioni aberranti. Questo presuppone, quindi, che le regioni implicate nei disordini non siano casuali, ma il loro coinvolgimento sia determinato dall'architettura stessa del genoma umano.

1.3 Meccanismi di formazione delle anomalie strutturali

Le alterazioni cromosomiche strutturali sono il risultato di una o più rotture del DNA a cui fa seguito un ripristino erroneo della continuità dei filamenti nucleotidici coinvolti. Tali alterazioni possono derivare sia da un errore nel processo di riparazione che da un difetto del sistema di ricombinazione. I principali meccanismi che sono stati proposti per spiegare i riarrangiamenti cromosomici strutturali sono: la ricombinazione omologa non allelica (*Non Allelic Homologous Recombination* – NAHR -), l'unione non omologa delle estremità (*Non Homologous End Joining* – NHEJ -) e il modello FoSTeS (*Fork Stalling and Template Switching*) (Gu et al. 2008).

1.3.1 *Non Allelic Homologous Recombination* (NAHR)

I difetti nel processo di ricombinazione costituiscono uno dei principali meccanismi responsabili delle alterazioni strutturali dei cromosomi.

Molti riarrangiamenti genomici strutturali derivano da un evento di ricombinazione omologa non allelica (*Non Allelic Homologous Recombination*, NAHR) tra *low copy repeats* (LCRs) ossia blocchi di sequenze ripetute di 200-400 Kb che presentano un'elevata omologia di sequenza (>95%).

La NAHR avviene esattamente con lo stesso meccanismo della ricombinazione omologa (appaiamento filamenti omologhi, formazione del chiasma, risoluzione del crossing-over) con l'eccezione che, nella NAHR, l'alta omologia di sequenza dei segmenti cromosomici che costituiscono ad esempio le LCRs, fa sì che il meccanismo cellulare di controllo della ricombinazione non sia in grado di riconoscere l'appaiamento di segmenti non perfettamente identici (Shaffer & Lupski 2000). L'appaiamento può avvenire fra LCRs su cromosomi omologhi (*intercromosomico*), su cromatidi fratelli (*intracromosomico*), o all'interno di un singolo cromatidio (*intracromatide*) (Stankiewicz & Lupski 2002).

In base al meccanismo di appaiamento, all'orientamento e alla complessità delle LCRs, la NAHR può risolversi in delezioni, duplicazioni, inversioni o altri

riarrangiamenti più complessi che possono anche coinvolgere cromosomi non omologhi (Figura 1).

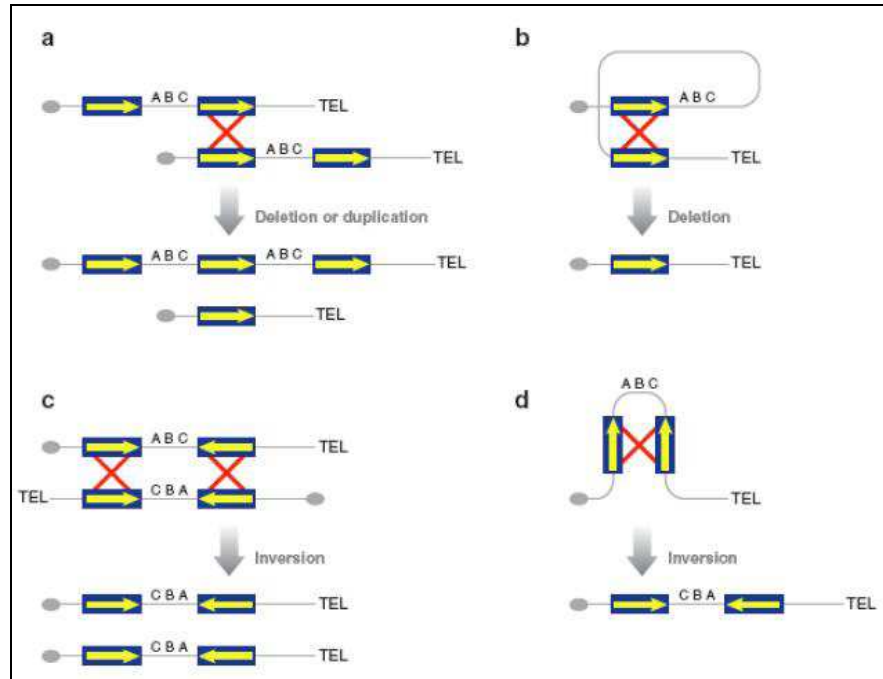


Figura 1: Esempi di ricombinazione omologa non allelica : le *Segmental duplications* fungono da substrato per la NAHR. (a e b) NAHR intercromosomale, intracromosomale, o intracromatidica tra sequenze ripetute orientate nello stesso senso causa delezioni e/o duplicazioni. (c e d) NAHR intercromosomale, intracromosomale o intracromatidica tra sequenze ripetute orientate in senso opposto causa inversioni. [Le sequenze ripetute sono rappresentate dalle box blu con l'orientamento indicato dalla freccia gialla. L'evento di ricombinazione è rappresentato da una croce rossa].

Per la ricombinazione omologa non allelica sembra sia necessaria la presenza di segmenti di DNA di lunghezza minima (300-500 bp) chiamati *minimal efficient processing segment* (MEPS) con un'identità di sequenza estremamente alta (>90%) (Reiter et al. 1998). Waldman e Rubnitz hanno dimostrato che l'introduzione di un mismatch anche di soli due nucleotidi riduce di circa 20 volte la frequenza di ricombinazione (Rubnitz & Subramani 1984; Waldman & Liskay 1988). La maggior parte delle LCRs che sono state identificate ai punti di rottura di riarrangiamenti cromosomici hanno dimensioni comprese tra 10 e 400Kb e hanno un'omologia di sequenza >95% (Lupski 1998; Sharp et al. 2005)

Altri studi hanno osservato il verificarsi di NAHR anche in corrispondenza di sequenze ripetute e intersperse che, complessivamente, rappresentano circa il 45% del genoma. In particolare, sono stati osservati eventi di NAHR fra sequenze *Alu*

(classe principale di *Short Interspersed Elements*, SINEs) e meno frequentemente fra sequenze L1 (classe principale di *Long Interspersed Elements*, LINEs) (Burwinkel & Kilimann 1998; Kolomietz et al. 2002).

Tuttavia i tratti di omologia tra due sequenze ripetute intersperse hanno dimensioni molto minori rispetto a quelli presenti nelle LCRs ciò potrebbe spiegare una più bassa frequenza di eventi di ricombinazione mediati da tali sequenze (Gu et al. 2008).

1.3.2 Non Homologous End Joining (NHEJ)

Il meccanismo di NHEJ prevale durante la fase G1 del ciclo cellulare, quando non è ancora disponibile una seconda copia del genoma, necessaria per il processo di ricombinazione omologa.

Si basa sulla ligazione fra due segmenti di DNA in cui si è verificata una rottura del doppio filamento (*double strand break-DSB-*), in assenza di una sequenza di riferimento (Lupski & Stankiewicz 2005), e può essere descritto in 4 passaggi: identificazione di un DSB, formazione di un ponte molecolare che tenga unite le due estremità libere del DNA, processamento delle estremità danneggiate, unione e ligazione (Weterings & van Gent 2004).

Il riconoscimento della regione interessata dalla rottura è realizzato da una proteina nota come Ku, un eterodimero formato dalle subunità Ku70 e Ku80. In seguito al legame di Ku con le estremità rotte del DNA, la formazione del ponte molecolare si realizza attraverso il legame di una proteina chinasi DNA-dipendente (DNA-PK). Questi due processi, tuttavia, possono realizzarsi solamente se le estremità rotte del DNA sono tra loro compatibili, se non lo sono vengono processate fino ad ottenere regioni di micro-omologia (corte sequenze di DNA omologhe da 1 a 4 paia di basi).

Una volta terminati questi processi, al ponte molecolare assemblatosi sul DNA, si lega il complesso XRCC4-DNA ligasi IV che media il ricongiungimento delle estremità. (Lieber et al. 2003) (figura 2).

La riparazione è accurata se le estremità sono perfettamente compatibili. Una NHEJ inappropriata può essere fonte di aberrazioni cromosomiche.

Perciò questo meccanismo che non sfrutta l'omologia con il cromatidio fratello, viene detto *error prone* cioè introduce mutazioni rispetto alla sequenza originaria.

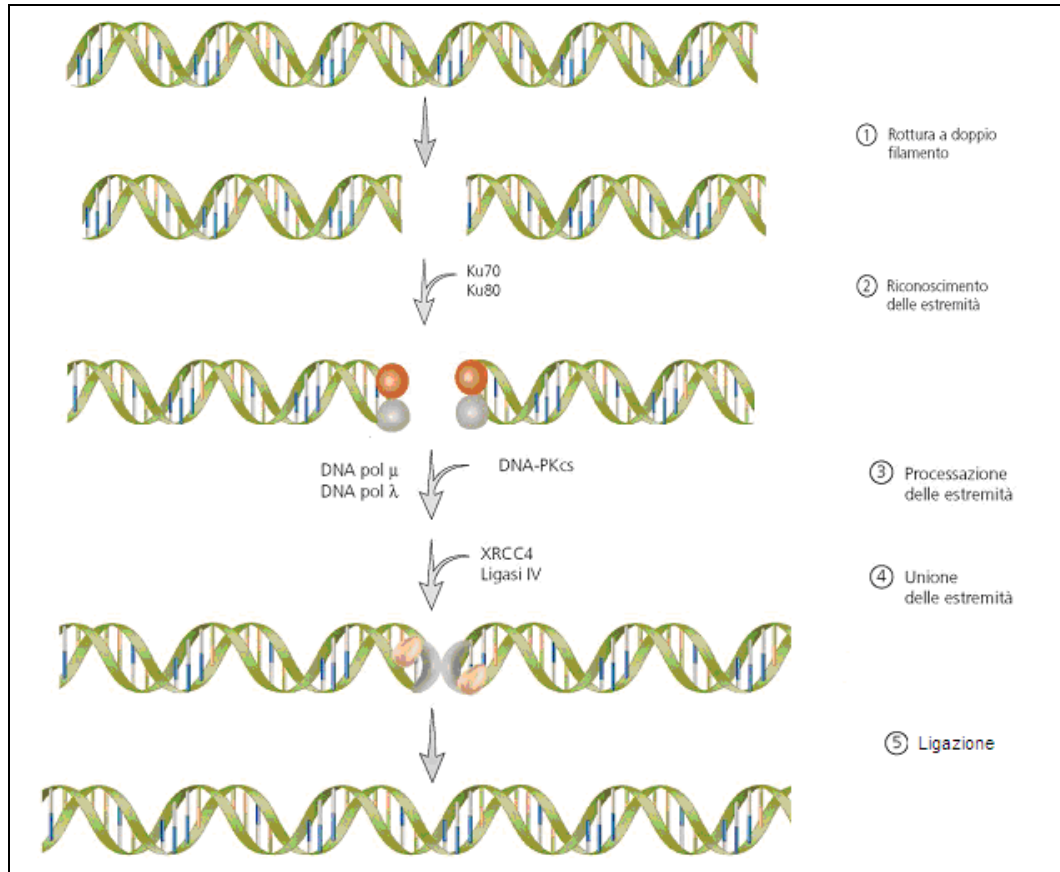


Figura 2: Nel processo NHEJ l'estremità rotte vengono riconosciute dall'eterodimero Ku70-Ku80, che ne impedisce la degradazione ed il coinvolgimento in riarrangiamenti; la proteina DNAPKcs si lega all'eterodimero ed al DNA solo in un momento successivo e va a costituire una piattaforma proteica che può essere riconosciuta dalla XRCC4-Ligasi4, che salderà infine le molecole di DNA.

1.3.3 Fork Stalling and Template Switching Model (FoSTeS)

Recentemente è stato proposto un modello per spiegare alcuni complessi riarrangiamenti genomici non ricorrenti.

Secondo questo modello, durante la replicazione, la forza replicativa si ferma quando incontra un danno al DNA; il filamento lento si libera dal filamento stampo, si appaia, in virtù di microomologie in 3' ad un'altra forza replicativa, e ricomincia la sintesi del DNA (figura 3). L'invasione di una forza replicativa localizzata a valle risulterà in una delezione, mentre l'invasione di una forza

localizzata a monte risulterà in una duplicazione. A seconda se è il filamento lento o il filamento guida ad essere invaso e copiato nella nuova forca, e a seconda della direzione di progressione della forca, il frammento incorporato erroneamente dalla nuova forca di replicazione sarà orientato in modo diretto o inverso rispetto alla sua posizione originale. Questo meccanismo di invasione/*annealing* e sintesi/estensione può avvenire numerose volte in serie, riflettendo probabilmente la scarsa processività della DNA polimerasi coinvolta e causando così complessi riarrangiamenti (Lee et al. 2007).

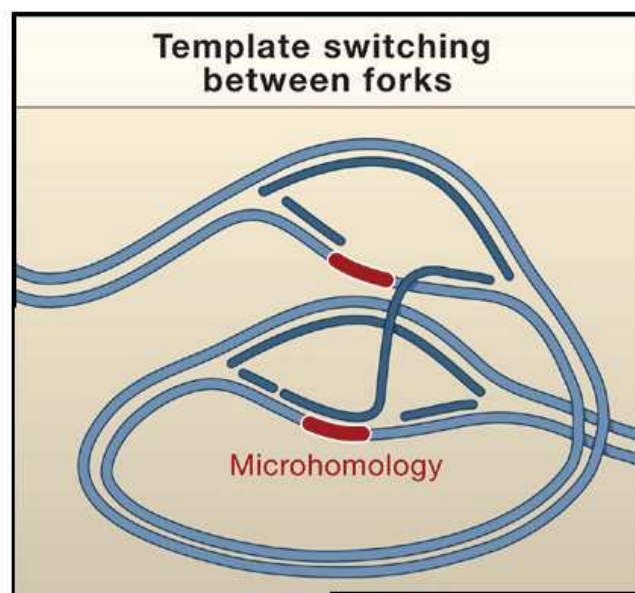


Figura 3: modello FoSTes

1.4 Origine parentale delle anomalie cromosomiche strutturali

L'origine parentale delle anomalie cromosomiche è di considerevole interesse in quanto potrebbe aiutare a capire il loro meccanismo di formazione.

Nell'uomo sono stati realizzati numerosi studi per indagare l'origine (materna o paterna) delle principali trisomie e la fase del ciclo cellulare in cui si generano.

Pochi studi invece sono stati condotti sull'origine parentale delle anomalie cromosomiche strutturali.

Nel 1980, Chamberlin e Magenis pubblicarono i loro risultati su 19 anomalie strutturali de novo e altre 23 riportate in letteratura. Gli autori conclusero che c'era una forte predisposizione nelle cellule della linea germinale maschile a creare anomalie cromosomiche strutturali (Chamberlin & Magenis 1980). Gli autori proseguirono i loro studi e nel 1988 (Olson & Magenis 1988; (Magenis 1988) pubblicarono le loro osservazioni su altre 32 anomalie strutturali: di queste 27 erano di origine paterna e 5 di origine materna confermando le osservazioni iniziali.

Recentemente è stato pubblicato uno studio sull'origine parentale di 115 anomalie cromosomiche strutturali de novo in cui è riportata una maggiore tendenza nella gametogenesi maschile alla formazione di sbilanciamenti criptici associati a riarrangiamenti cromosomici (Thomas et al. 2006).

Egli conclude che gli spermatozoi presentano una più alta frequenza di riarrangiamenti strutturali rispetto agli oociti soprattutto a causa di una grande differenza tra i due sessi nel numero di divisioni premeiotiche delle cellule germinali (Chandley 1991).

Nelle femmine il numero di divisioni cellulari necessarie per generare il gamete maturo, è costante, perché tutti gli oociti si formano durante lo sviluppo embrionale e poi sono necessarie solo altre due divisioni per produrre ciascuna cellula uovo. Si è stimato che vi siano circa 24 divisioni cellulari successive, dallo zigote al gamete maturo.

Nel maschio invece sono necessarie circa 30 divisioni cellulari per produrre gli spermatogoni staminali e poi altre 6 divisioni per dare origine agli spermatozoi, inoltre dalla pubertà il ciclo della spermatogenesi si ripete approssimativamente ogni 16 giorni.

Quindi l'oogenesi avviene prevalentemente nella vita fetale e comporta un numero di divisioni cellulari considerevolmente inferiore rispetto alla spermatogenesi che continua per tutta la vita. Il maggior numero di divisioni cellulari nel maschio spiegherebbe il fatto che il tasso di mutazione nella linea germinale maschile sia circa sei volte superiore rispetto a quello femminile (Hurst & Ellegren 1998).

1.5 Sviluppo e potenzialita' della tecnologia array-CGH nell'analisi delle anomalie cromosomiche

La citogenetica tradizionale, pur utilissima nell'identificare un gran numero di anomalie cromosomiche, numeriche e strutturali, è limitata nelle sue possibilità diagnostiche dal potere di risoluzione del microscopio (Bruce R. K. 2000,2001).

Lo sviluppo della *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH), che consente di individuare specifiche sequenze di DNA a livello cromosomico, ha sicuramente costituito un passo in avanti nello *screening* dei riarrangiamenti genomici, tuttavia essa ha il grosso limite di rilevare solo particolari mutazioni a livello di precisi loci cromosomici.

La messa a punto di una nuova tecnica, di citogenetica molecolare, definita "Ibridazione Genomica Comparata" (*Comparative Genomic Hybridization-CGH*) ha risolto la necessità di avere un mezzo di analisi in grado di valutare la presenza di eventuali anomalie cromosomiche a livello dell'intero genoma, senza sapere in anticipo cosa cercare.

La CGH è una tecnica che inizialmente è stata applicata allo studio di cellule tumorali ma che si è poi rivelata di utile impiego nella diagnosi di aberrazioni cromosomiche costituzionali, sia in epoca postnatale che, prenatale (Lapierre et al. 1998).

La metodica si basa su una ibridazione in situ modificata, che sfrutta la competizione tra due campioni di DNA genomico marcati con fluorocromi diversi: un campione è quello del paziente, l'altro è costituito da un pool di DNA genomico di riferimento. Nella tecnica convenzionale i DNA marcati vengono coibridati simultaneamente su preparati metafasici normali.

Il vantaggio di tale tecnica è che in un'unica ibridazione si possono ottenere informazioni sulla dimensione e sulla localizzazione di tutti gli sbilanciamenti cromosomici, tuttavia, ha un basso potere di risoluzione (5-10 Mb).

L'avvento dell'*array-CGH* descritta per la prima volta nel 1997, ha aperto la strada alla possibilità di una più alta e più ampia risoluzione nella rilevazione delle anomalie cromosomiche strutturali.

E' basata sugli stessi principi della CGH classica, ma anzichè utilizzare matrici su cui sono ibridati preparati metafasici normali, utilizza piattaforme in cui sono spottati cloni BAC (di 150-160 Kb, BAC arrays) o oligo (di 10-100 bp, oligo arrays) corrispondenti a loci specifici di ogni singolo cromosoma, fino a comprendere l'intero genoma umano. L'utilizzo di queste piattaforme permette l'immediata correlazione tra l'eventuale alterazione e una precisa posizione del riarrangiamento nel genoma, grazie alla scomparsa di un segnale corrispondente alla sonda contenente la sequenza deleta, o, viceversa, all'aumento di segnale dovuto ad una duplicazione della sequenza. La risoluzione genomica dipende dalla lunghezza delle sonde utilizzate e dalla distanza tra una sonda e l'altra.

Dai dati riportati in letteratura, l'*array-CGH* si presenta come il metodo più utile per rilevare e localizzare simultaneamente perdita o guadagno di materiale genetico, per tale motivo la sua applicazione è in rapido incremento nello studio di malattie genetiche (Pinkel et al. 1998).

Infatti sbilanciamenti cromosomici possono essere la causa di diverse patologie quali, ad esempio, sindromi malformative, ritardo mentale, autismo, epilessia e vari tipi di tumori.

Negli ultimi anni la tecnica *array-CGH* ha dimostrato che circa il 15% di soggetti con fenotipo cromosomico (ritardo mentale/dismorfismi/anomalie congenite) e cariotipo normale sono portatori di uno sbilanciamento cromosomico criptico responsabile per la loro condizione (Vissers et al. 2003; Shaw-Smith et al. 2004).

Inoltre è stato possibile individuare la presenza nel genoma di un numero inaspettatamente grande di varianti strutturali di dimensioni intermedie (1Kb-3Mb) che sono state trovate anche in individui sani, perciò non possono rappresentare una causa diretta di malattia. Studi recenti stanno mettendo in luce il loro possibile coinvolgimento come fattori di suscettibilità di malattie complesse ad eziologia ignota quali ad esempio la schizofrenia o l'autismo (Buckley et al. 2005).

L' applicazione di questa tecnica permette quindi di ottenere una rapida analisi di tutto il genoma in un unico esperimento con un notevole aumento della risoluzione nella mappatura dell'anomalia rispetto alle tecniche di citogenetica convenzionali, tuttavia non è in grado di rilevare anomalie cromosomiche bilanciate. Perciò le tecniche citogenetiche convenzionali saranno sempre

fondamentali e non potranno essere sostituite in toto, ma indubbiamente l' *array-CGH* apre le porte verso analisi sempre più accurate e precise a fronte di una maggiore semplicità e tempi di risposta molto più veloci.

2. SCOPO

Gli scopi di questo progetto sono:

- mettere a punto le condizioni sperimentali e definire le potenzialità, la sensibilità e l'accuratezza dell'*array-CGH* per la ricerca di anomalie cromosomiche strutturali;
- valutare il possibile utilizzo di tale metodica nella diagnostica e quindi definire correttamente l'entità e la qualità delle anomalie trovate;
- stabilire l'origine parentale del riarrangiamento mediante l'utilizzo di marcatori polimorfici (STR o RFLP) che mappano all'interno della regione coinvolta;
- definire se esiste un diverso tasso di mutazione nei due sessi;
- verificare la presenza ai *breakpoints* di regioni di omologia che possano aver predisposto al riarrangiamento.

3. POPOLAZIONE IN STUDIO

Sono stati valutati 66 soggetti afferenti al servizio di Genetica Clinica ed Epidemiologica del Dipartimento di Pediatria dell'Università degli studi di Padova che presentano ritardo mentale e/o dello sviluppo, autismo, anomalie congenite multiple e dimorfismi. In 10 pazienti su 66 l'*array-CGH* è stato effettuato per definire una anomalia cromosomica già identificata tramite esame cromosomico ad alta definizione (tabella 1); nei rimanenti 56 pazienti, l'esame cromosomico ad alta definizione e tutti gli accertamenti previsti dal protocollo per lo studio del ritardo mentale erano nella norma.

Tutti i soggetti candidati allo studio sono stati informati delle potenzialità di questo studio ed è stato quindi chiesto loro il consenso a procedere alle analisi ed al trattamento dei loro dati genetici, secondo le più recenti indicazioni del garante della *privacy* (novembre 2007).

Caso #	Caratterizzazione mediante bandeggio e/o FISH	FENOTIPO
4973	46 XX FISH: del (1)(p36)	Ritardo psicomotorio, microcefalia e dismorfismi
5095	46 XY FISH: del (1)(p36)	Ritardo psicomotorio, epilessia, ipotonia generalizzata, ipoacusia neurosensoriale, criptorchidismo
4461	46 XY dup (9)(p13.1p24.2)	Ritardo psicomotorio, macrocefalia, dilatazione tetraentricolare, dismorfismi
5116	46,XX,der(17)	Ritardo psico-motorio, ipotonia, dismorfismi
4509	46 XX del (18)(p11.21-->pter)	Ritardo mentale microcefalia, dimorfismi,
4904	46 XY, t(1; 18) (p36.1; q22)	Difficoltà nell'apprendimento, lieve ginecomastia, ridotto volume testicolare
5007	46, XX, der(18)	Microcefalia, ritardo psicomotorio, dimorfismi cranio-facciali
4512	46 XY, t(4;20) (q21;q12) FISH: del(22)(q11.21)	Difficoltà di apprendimento, ugola bifida, lievi dismorfismi, anomalie vascolari
4603	46 XX FISH: del (22)(q11. 21)	Dimorfismi facciali, ugola bifida, cardiopatia congenita complessa
5072	46 XX FISH: del (22)(q11. 21)	Difficoltà di apprendimento, deficit di attenzione ed iperattività, ugola bifida.

Tabella 1: pazienti caratterizzati mediante bandeggio e/o FISH.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Estrazione del DNA genomico

Il DNA è stato estratto da prelievi di sangue periferico trattati con EDTA alla concentrazione finale di 50 mM. L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita seguendo il protocollo del kit commerciale *High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)*.

La concentrazione e la qualità del DNA sono state misurate tramite uno spettrofotometro *NanoDrop ND-1000 UV-Vis*. Caricando 1 μ l di DNA lo strumento fornisce sia la concentrazione del campione, espressa in ng/ μ l, sia i rapporti di assorbanza 260/230 e 260/280 nm; questi ultimi parametri permettono di stimare la purezza del DNA da vari contaminanti quali proteine, polisaccaridi e fenoli: un valore prossimo o superiore a 2 per entrambi è indice di una purezza soddisfacente per il successivo impiego del campione in *array-CGH*.

4.2 Array Comparative Genomic Hybridization

L'array-CGH è stato eseguito utilizzando microarray 44K (Agilent Human Genome CGH Microarray Kit 44A) con una risoluzione media di circa 75 Kb.

Il protocollo utilizzato per l'array-CGH è costituito da 7 step (figura 4).

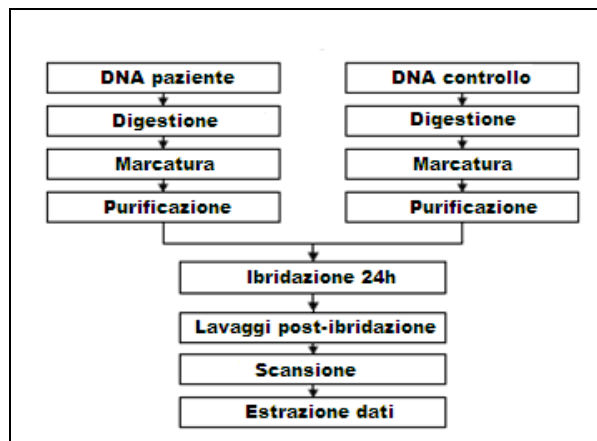


Figura 4: workflow array-CGH

Step 1. Digestione del DNA

800 ng di DNA del paziente e del controllo (dello stesso sesso) sono stati digeriti utilizzando la seguente mix di reazione:

Mix di reazione	Quantità x1 (μ l)
H ₂ O	2
Buffer 10X (Promega)	2.6
BSA (10 μ g/ μ l) (Promega)	0.2
AluI (10U/ μ l)(Promega)	0.5
RsaI (10U/ μ l) (Promega)	0.5
TOTALE	5.8 μ l

Tabella 2: mix di digestione

I due enzimi di restrizione creano estremità piatte tagliando in corrispondenza delle sequenze 5'-AG↓CT-3' 3'-TC↓GA-5' (AluI) e 5'-GT↓AC-3' 3'-CA↓TG-5' (RsaI)

La reazione avviene a 37°C per 2 ore. Successivamente si inattivano le attività enzimatiche ponendo i campioni a 65°C per 20 min.

Step 2. Marcatura del DNA

Ciascun campione digerito viene mescolato con 5 μ l di random primers (Agilent Technologies) e incubato a 95°C per 3 min. Viene quindi preparata la seguente mix di marcatura per i pazienti (tabella 3) e per i controlli (tabella 4)

Mix di reazione	Quantità x1 (μ l)
Buffer 5X (Agilent)	10
dNTPs 10X (Agilent)	5
Cyanine 5-dUTP (1 mM)(Agilent)	3
Exo Klenow fragment	1
TOTALE	19 μ l

Tabella 3: mix di marcatura usata per i pazienti.

Mix di reazione	Quantità x1 (µl)
Buffer 5X (Agilent)	10
dNTPs 10X (Agilent)	5
Cyanine 3-dUTP (1 mM)(Agilent)	3
Exo Klenow fragment	1
TOTALE	19 µl

Tabella 4: mix di marcatura usata per i controlli.

La reazione di marcatura avviene per 2 ore a 37°C ed inattivata a 65°C per 10 min.

Step 3. Purificazione del DNA marcato

La purificazione del prodotto marcato avviene mediante l'uso di colonnine *Microcon YM-30* (Millipore).

Il DNA marcato e purificato viene controllato al nanodrop per determinarne la concentrazione finale (A_{260nm}) e l'incorporazione del fluorocromo ($A_{550 nm}$ per Cy3 e $A_{650 nm}$ per Cy5).

Quindi viene calcolata l'attività specifica per ogni campione utilizzando la seguente formula:

[1]

$$\text{Attività specifica} = \frac{\text{pmol/ } \mu\text{l di Cy3 o Cy5}}{\mu\text{g/}\mu\text{l di DNA}}$$

Questo valore deve essere compreso tra 25 e 40 per Cy3 e tra 20 e 35 per Cy5.

Step 4. Ibridazione

L'ibridazione è stata eseguita a partire da 5 µg di DNA marcato del paziente e del controllo che vengono mescolati. Successivamente sono stati aggiunti 5 µl di *COT-1 DNA* (1 mg/ml) (Invitrogen), 11 µl di *Blocking Agent 10X* (Agilent) e 55 µl di *Hybridization Buffer 2x* (Agilent).

I campioni così preparati vengono denaturati a 95°C per 3 min e poi incubati a 37°C per 30 min per permettere al *COT-1 DNA* di saturare le sequenze ripetute presenti nel genoma e ridurre così i segnali aspecifici.

L'ibridazione viene quindi effettuata su vetrini 4x44K che vengono incubati in rotazione (20 rpm) per 24 ore a 65°C.

Step 5. Lavaggi post-ibridazione

Questo passaggio consente di eliminare l'eccesso di DNA non ibridato. A questo scopo si utilizzano due diverse soluzioni di lavaggio: *Oligo aCGH Wash Buffer 1*, a temperatura ambiente per 5 minuti, e *Oligo aCGH Wash Buffer 2*, scaldata a 37°C, per 1 minuto.

Step 6 e 7. Scansione degli array e analisi dei risultati

La scansione degli array è stata eseguita con uno scanner Agilent (G2505C) che è in grado di rilevare i livelli di fluorescenza (Cy5 e Cy3) di ogni spot e fornisce l'immagine su cui poi si effettuerà l'elaborazione dei dati grazie all'utilizzo del software *Feature Extraction V.10.1.1.1*.

Esso elabora per ogni spot il logaritmo in base 2 del rapporto tra le intensità di fluorescenza emesse da Cy5 e Cy3 ($\log_2 \text{Cy5/Cy3}$) inoltre sottopone l'informazione ottenuta dalla scansione del vetrino ad un processo di normalizzazione globale (sottrazione del background e correzione mediana) in grado di rimuovere le distorsioni sistematiche presenti.

Il rapporto delle intensità di fluorescenza tra i due fluorofori sono proporzionali al rapporto di quantità di materiale genomico tra campione e controllo. Se le intensità dei fluorofori sono uguali la regione analizzata non presenta alterazioni: avrò 2 copie di DNA da testare e 2 copie del DNA di controllo, per cui il rapporto tra i 2 fluorocromi è pari a 1 ($\log_2 2/2 = 0$). Se invece il rapporto Cy5/Cy3 è alterato si è in presenza di amplificazioni o delezioni: in caso di trisomia il rapporto sarà pari a 1,5 e cioè $3/2$ ($\log_2 3/2 = 0,5$), viceversa in caso di monosomia il rapporto sarà pari a 0,5 e cioè $1/2$ ($\log_2 1/2 = -1$)

I dati elaborati da *Feature Extraction* vengono visualizzati grazie al software *DNA Analytics V.4.0.76*.

Per la valutazione dei dati si è fatto riferimento al *Genome Assembly* del 2006 (hg18, NCBI Build 36.1) e sono stati consultati il *Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation/>), il *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER) (<http://decipher.sanger.ac.uk/>) e il sito *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

4.3 Analisi dei microsatelliti

I microsatelliti o STR (Short Tandem Repeats) hanno un modulo fondamentale costituito da 2 a 6 basi, ripetuto consecutivamente (testa-coda) in un numero variabile di volte.

In una popolazione generale gli individui si differenziano tra loro per il numero di repeats presenti in un dato locus. L'insieme di tutti i loci polimorfici in un individuo rappresenta così una sorta di impronta genetica inequivocabile. Per il loro elevato grado di polimorfismo e poiché sono trasmessi alla progenie con le modalità della eredità mendeliana semplice i microsatelliti rappresentano un validissimo strumento per l'identificazione individuale.

L'analisi dei microsatelliti è stata quindi utilizzata per determinare l'origine parentale delle delezioni.

Tali markers cromosomici (tabella 6) sono stati opportunamente selezionati consultando l'*UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), che fornisce le sequenze dei *primers*, e il database *CEPH* (*Centre d'Etude du Polymorphisme Humain*) (<http://www.cephb.fr/en/cephdb/>) che consente di analizzare l'eterozigosità percentuale di ciascun marcatore (percentuale che stabilisce la presenza, in tratti corrispondenti di due cromosomi omologhi, di alleli differenti).

Sul DNA estratto è stata effettuata una reazione di PCR (tabella 5,6,7) con 2 *primers* che fiancheggiano la regione delle *repeats*. Utilizzando uno dei 2 *primers* marcato in 5', è stato possibile ottenere dei frammenti di PCR fluorescenti che sono stati successivamente separati elettroforeticamente su un capillare (ABI 310 genetic Analyzer, Applied Biosystem). L'analisi mediante il software *GeneScan v*

3.7.0 .ha permesso di calcolare con precisione la grandezza dei frammenti ottenuti in PCR.

Il confronto degli alleli del paziente con quelli dei genitori ha permesso di stabilire l'origine parentale della delezione.

STR	Chromosome position bp	Repeat	Het	Primers	Range bp	Ta (°C)
D1S243	2,129,145 - 2,129,416	GT	0.81	FOR: [6FAM]CACACAGGCTCACATGCC REV: GCTCCAGCGTCATGGACT	130-170	58
D1S171	2,530,151 - 2,530,401	CA	0.75	FOR: [TET]GTTTCCAGGCTGCAGGAAGAC REV: CCCACATGTACACATGCACA	242-266	59
D1S2870	6,212,351 - 6,212,560	CA	0.81	FOR: [HEX]GATCATGCCAATGCACTAT REV: CCAGGGTGACACAGCA	190-212	59
D3S1311	198,502,504 - 198,502,647	CA	0.89	FOR: [6FAM]GGAAGTTTCAGCCAACG REV: TTAGTCCCCTGATGTTACATTT	134-152	58
D3S1272	198,500,532 - 198,500,795	CA	0.85	FOR:[TET]TCACAAGGGAAATAACTGTTTTAC REV: TTCCTGTAACCCTCCAAAAT	260-276	55
D4S2981	144,513,600 - 144,513,746	CA	0.78	FOR:[6FAM]GGTTATTTAATTTTAGTAACGCATC REV: GAACAGAAGTGCTGGAGAC	128-156	60
D4S1515	143,947,308 - 143,947,552	GAAA	0.80	FOR: [TET]CTGCACTCGAGCCTGAGCA REV: CCTGGAAATGAGGCTGCTC	218-246	62
D4S1565	142,080,185 - 142,080,336	CA	0.75	FOR: [HEX]TGCAAAGTGTCACTCAAAAG REV: GCCAAGGCTGATCCTC	134-146	61
D6S264	166,629,240 - 166,629,361	CA	0.74	FOR: [6FAM]AGCTGACTTTATGCTGTTTCT REV: TTTCCATGCCCTTCTATCA	108-122	58
D6S297	167,156,768 - 167,156,985	CA	0.71	FOR: [TET]CAAGAAGTGTCTCTAAAGATAAGG REV: CAACCAACCACGGTATATG	210-224	57
D6S281	169,739,769 - 169,739,977	CA	0.74	FOR: [HEX]CTGGTAGTGTGAGGCATGGC REV: CCTATGTTTCAGGCAAAGGC	202-220	60
D8S520	10,593,772 - 10,593,964	CA	0.75	FOR: [6FAM]CTGAAGAGCAAATGGCCCT REV: TAAGATCACATGGCCCCCT	179-199	57
D8S1721	10,177,982 - 10,178,151	CA	0.71	FOR: [TET]GACTTTCCTAAAAGCCCAGC REV: GCATCTTGCATGGTGTATTG	170-212	57
D8S550	10,918,965 - 10,919,233	CA	0.86	FOR: [HEX]CCCAAAGTCATGAAATGAGA REV: ACAACATACCTGTTAGGAGGTG	94-130	57
D16S485	70,292,497 - 70,292,791	TAGA	0.84	FOR: [6FAM]TGAAAAGTAATAATGTACCTGG REV: CTAATCAGGCCTTCAGATG	266-294	57
MAPT-17	41328173-41328344	GT	0.80	FOR: [6FAM]CTTCACTCTCGACTGCAGCCT REV: CCCGATCCACGTCTTTCTTA	150-180	64

STR	Chromosome position bp	Repeat	Het	Primers	Range bp	Ta (°C)
D17S612	41,094,544 - 41,094,699	CA	0.75	FOR: [TET]CCTGGGAGTTCACCTGGTGTTC REV: CTGAGTAGGGGAAGGAGGTTGCA	154-284	64
D18S63	3,428,521 - 3,428,775	CA	0.75	FOR: [6FAM]AGCTCATGTTGGATGTATCA REV: GTCAGACTACGCGCCTT	255-279	61
D18S71	12,586,972 - 12,587,243	CA	0.89	FOR: [TET]ACCCGCTCAAAGCCT REV: TTAATGGATTATCAAGAGTGGTTCT	248-282	58
D18S59	636,461 - 636,616	CA	0.67	FOR: [HEX]AGCTTCTATCCAACAGGGGC REV: ACCAGAATGTGAACGACCTT	146-164	57
D18S483	61,065,895 - 61,066,105	CA	0.77	FOR: [6FAM]TTCTGCACAATTTCAATAGATTC REV: GAACTGAGCAAACGAGTATGA	193-225	57
D18S465	61,046,915 - 61,047,153	CA	0.85	FOR: [TET]ATATTCCCCTATGGAAGTACAG REV: AAAGTTAATTTTCAGGCACTCT	232-251	57
D18S857	62,328,772 - 62,328,867	TAA	0.77	FOR:[HEX]TAAATAAAATAACGTTGAAGTCTGC REV: CTTAGATTCAGGGGGACAT	220-232	57
D22S944	17,990,406 - 17,990,571	CA	0.64	FOR: [6FAM]CATGTGAAAGATGCTACTTCC REV: ATCCCATGCTCCTCCCAT	157-165	58
D22S873	18,320,453 - 18,320,725	AAAT	0.76	FOR: [TET]GACAGAGTGACAGCCCGTCT REV: CTCTCCTCAAGGCTGAGTGG	256-272	61
22D_4_4	18,027,170 - 18,031,886	CTTC	0.73	FOR: [HEX]GAGTAGGCAGGGGCCATAAG REV: TGCTTTAGCCAAGGAGTTTCG	204-236	56

Tabella 5: STR, posizione cromosomica, repeat, eterozigosità, sequenza dei *primers* utilizzati per la PCR, dimensioni dell'amplificato, temperatura di *annealing*.

Mix di reazione	Quantità x1 (µl)
H ₂ O	15.85
Buffer 10X Gold	2.5
MgCl ₂ 25µM Gold	1.5
dNTPs 10mM	0-5
pForward 10µM	1.25
pReverse 10µM	1.25
Taq Gold	0.15
TOTALE	23 + 2 µl DNA (80ng/µl)

Tabella 6: mix della reazione di amplificazione

Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
95	10'	1
95	30"	40
Ta	40"	
72	1'	
72	30'	1

Tabella 7: profilo termico.

4.4 RFLP e PCR quantitativa

Per determinare l'origine parentale delle duplicazioni è stata utilizzata l'analisi RFLP unita alla PCR quantitativa.

I *Restriction Fragment Length Polymorphism* o RFLP sono dei polimorfismi di lunghezza dei frammenti di DNA generati mediante digestione con enzimi di restrizione.

Essi sono endonucleasi in grado di riconoscere una specifica sequenza di DNA, detta sito di restrizione, e di tagliare a livello di quella sequenza o in prossimità di essa idrolizzando l'ossatura zucchero-fosfato e producendo frammenti di DNA a doppio filamento di dimensioni esattamente definite.

Gli enzimi di restrizione, consentono di distinguere facilmente due sequenze di DNA che differiscono per uno o più nucleotidi, qualora tale differenza sia in grado di modificare il sito bersaglio riconosciuto dall'enzima.

I polimorfismi possono introdurre o eliminare un nuovo sito di restrizione nel segmento di DNA che li contiene, in questo modo attraverso l'analisi del *pattern* di restrizione del campione si potranno distinguere gli aplotipi dei soggetti in esame. Perciò la caratteristica variazione individuale e la trasmissione mendeliana fanno degli RFLP dei marcatori genetici.

Sfruttando questo principio, sono stati selezionati dal *NCBI Variation Database* (dbSNP), degli SNPs, all'interno della regione duplicata, con un'elevata

percentuale di eterozigotità in modo da riuscire a distinguere nel paziente l'allele materno da quello paterno.

I polimorfismi selezionati sono stati amplificati con specifiche coppie di *primers* disegnate utilizzando il *software*, disponibile *online*, *Primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3_www.cgi).

In tabella 8 sono riportati i polimorfismi, la loro posizione cromosomica, l'eterozigotità, le sequenze delle coppie di *primers* (*forward e reverse*) con la relativa temperatura di *annealing* e le dimensioni dell'amplificato.

Il protocollo di amplificazione e il profilo termico utilizzato sono riportati in tabella 9 e 10 rispettivamente.

SNP	Chromosome Position (bp)	Het	Primer s	bp	Ta (°C)
rs11887292 C>T	chr 2: 60845360	0.5	FOR: TGATAGAGACGGGGTTTTGC REV: GCCCACTGTTTAAAAGAACCA	204	58
rs35217978 A>G	chr 2: 61100052	0.5	FOR: TTCACTGTGTGGCTTCTCCT REV: CAAAGTCAGTTCCATGTGGATT	216	58
rs7557230 A>T	chr 2: 61590156	0.5	FOR: GAGACCAGCCTGACCAACAT REV: TAGCCCAATGAGCATTTCT	240	55
rs4664207 C>T	chr 2: 157028440	0.460	FOR: TCGCAGAGCAAGTTAGTGGA REV: AAAGGGTTCGACTCAATATCC	199	54
Rs716615 A>G	chr 2: 160845236	0.473	FOR: TGATGCAAATGGGAATCCT REV: CCTGTTATCCCTGGATTGCT	192	57
rs582447 G>T	chr 2: 165074838	0.444	FOR: CATCAGTGGACAGGAATGGTT REV: CACCATTGGAGAATAAGACAGGA	199	57
rs35237407 A>G	chr 6: 118006364	0.5	FOR: CTTCTTCCTGCCTGAAATGC REV: TGCCCTACTGTATCAGTTGGATT	247	60
rs35957877 A>T	chr 6: 118109060	0.5	FOR: TGGCTGTATGCCTACCAAGA REV: TGGATAGCATCTGTGGAGCTT	241	60
rs11153780 C>G	chr 6: 119283533	0.5	FOR: AGGAGGTGTCTGGATCATGC REV: TGGTGCAGACATAGGCTCAG	241	60
rs62522177 C>T	chr 8: 142209697	0.5	FOR: CTGGCCAGTGGTGCATTC REV: ATCCATCCCCTAACGCTCCT	201	60
rs7841697 A>G	chr 8: 142442331	0.487	FOR: CTCAAACCTCTGGCCTCAAG REV: AAGTCCCAGGTGAGGGAAC	204	59
rs62525626 G>T	chr 8: 143852336	0.5	FOR: GGGTTTCTCAGGACACCAGA REV: CAGCTGGGTGTGTGGACTC	221	60
rs4961491 C>T	chr 9: 16431707	0.474	FOR: TCTTCTGTGAAGGTAACGACCTC REV: TACTGTTTGCAAGGAGGACTAGTTT	240	60

SNP	Chromosome Position (bp)	Het	Primer s	bp	Ta (°C)
rs2779772 G>T	chr 9: 17137191	0.477	FOR: AATGGCCAAAACTGCATTC REV: AAGGTTTGCCTATGGGCTTT	205	60
rs1028932 C>G	chr 9: 32381784	0.461	FOR: TGCAAGTTGTGGCATAGTTCA REV: TTTCAAATGTCCACCCATCA	161	61
rs2042405 C>G	chr 16: 57085908	0.464	FOR: ATGTTAGTCACGCCACCTC REV: ACAAGGGTGAGGCTCAGAGA	179	60
rs12446607 A>G	chr 16: 60254103	0.5	FOR: AATGGGCCGATCAGTATCAA REV : CATGGGTGCACAAAGTCTCTT	249	61
rs74705268 C>G	chr 16: 65164354	0.5	FOR: TGTTTGAAAAAGGGGTGAGG REV: TATGGGTCCATCCTCTGTCC	158	55
rs11652704 C>T	chr 17: 7525125	0.444	FOR: CAGGTCCAAGCAATTCTCCT REV: GGAAGAAATAAAACACATTCACAGC	253	61
rs7225306 C>T	chr 17: 9773963	0.444	FOR: CACTGTGCCCGACGATATTA REV: GGAAGCAAAGAGAGCGAGAG	214	60
rs231021 C>G	chr 17: 15100165	0.428	FOR: TGCCATGAGGCAGTCTAACA REV: TCCCCACACTAAGCCTCTCT	221	60
rs513978 C>G	chr 18: 591087	0.5	FOR: CTACCCAATGGCCTCATCTG REV: TGGGGCTATCAGCACAAGAT	216	61
rs3786347 A>G	chr 18: 733226	0.476	FOR: GTGGTTCCATTCCATGTTCC REV: CCTCGAGAATCTTTGCGACT	245	60
rs11876370 C>G	chr 18: 6957402	0.5	FOR: TAAGCCTGTGGCTTCTAGC REV: AAGGAAAGGGCACACAGAGA	178	60

Tabella 8: polimorfismi analizzati, posizione cromosomica, eterozigotità, sequenze dei *primers* utilizzati per la PCR, dimensioni dell'amplificato e temperatura di *annealing*.

Mix di reazione	Quantità x1 (µl)
H ₂ O	15.2
Buffer 5X	5
MgCl ₂ 25µM	0.5
dNTPs 10mM	0.5
pForward 10µM	0.75
pReverse 10µM	0.75
Taq Takara	0.3
TOTALE	23 + 2 µl DNA

Tabella 9: mix della reazione di amplificazione.

Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
95	5'	1
95	20"	35
Ta	20"	
72	20''	
72	5'	1

Tabella 10: profilo termico della reazione.

La resa della reazione, sia qualitativa che quantitativa, è stata valutata sottoponendo 5 µl di prodotto di amplificazione a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,5% colorato con *SYBR-safe*.

Successivamente con l'ausilio del *software NEBcutter V2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) si sono potuti individuare gli enzimi di restrizione più appropriati da utilizzare nell'analisi di restrizione e i specifici siti di taglio (tabella 11).

SNP	Enzima di restrizione	Sito di riconoscimento dell'enzima	Numero siti di riconoscimento	Dimensione frammenti di restrizione (bp)
rs2042405 C>G	HinfI	5'... G [▼] A N T C ... 3' 3'... C T N A [▲] G ... 5'	1	129 50
rs12446607 A>G	AluI	5'... A G [▼] C T ... 3' 3'... T C [▲] G A ... 5'	1	128 121
rs74705268 C>G	AluI	5'... A G [▼] C T ... 3' 3'... T C [▲] G A ... 5'	1	81 77
rs11876370 C>G	MspI	5'... C [▼] C G G ... 3' 3'... G G C [▲] C ... 5'	1	66 112
rs513978 C>G	HinfI	5'... G [▼] A N T C ... 3' 3'... C T N A [▲] G ... 5'	1	75 141
rs3786347 A>G	DdeI	5'... C [▼] T N A G ... 3' 3'... G A N T [▲] C ... 5'	1	144 101
rs7841697 A>G	MspI	5'... C [▼] C G G ... 3' 3'... G G C [▲] C ... 5'	1	78 126
rs62525626 G>T	ApoI	5'... R [▼] A A T T Y ... 3' 3'... Y T T A A [▲] R ... 5'	1	92 129

SNP	Enzima di restrizione	Sito di riconoscimento dell'enzima	Numero siti di riconoscimento	Dimensione frammenti di restrizione (bp)
rs62522177 C>T	BstNI	5'... C C W G G ... 3' 3'... G G W \blacktriangle C C ... 5'	1	53 148
rs231021 C>G	HinfI	5'... G A N T C ... 3' 3'... C T N A \blacktriangle G ... 5'	1	117 104
rs7225306 C>T	MspI	5'... C C G G ... 3' 3'... G G C \blacktriangle C ... 5'	1	158 56
rs11652704 C>T	MspI	5'... C C G G ... 3' 3'... G G C \blacktriangle C ... 5'	1	98 136
rs35957877 A>T	DdeI	5'... C T N A G ... 3' 3'... G A N T \blacktriangle C ... 5'	1	126 115
rs11153780 C>G	HinfI	5'... G A N T C ... 3' 3'... C T N A \blacktriangle G ... 5'	1	133 108
rs35237407 A>G	MspI	5'... C C G G ... 3' 3'... G G C \blacktriangle C ... 5'	1	134 113
rs1028932 C>G	BstNI	5'... C C W G G ... 3' 3'... G G W \blacktriangle C C ... 5'	1	68 93
rs4961491 C>T	ApoI	5'... R A A T T Y ... 3' 3'... Y T T A A \blacktriangle R ... 5'	1	121 119
rs2779772 G>T	AluI	5'... A G C T ... 3' 3'... T C \blacktriangle G A ... 5'	1	130 75
rs11887292 C>T	MspI	5'... C C G G ... 3' 3'... G G C \blacktriangle C ... 5'	1	116 88
rs35217978 A>G	RsaI	5'... G T A C ... 3' 3'... C A \blacktriangle T G ... 5'	1	47 169
rs7557230 A>T	DdeI	5'... C T N A G ... 3' 3'... G A N T \blacktriangle C ... 5'	1	92 147
rs582447 G>T	HindIII	5'... A A G C T T ... 3' 3'... T T C G A \blacktriangle A ... 5'	1	105 94
rs4664207 C>T	XbaI	5'... T C T A G A ... 3' 3'... A G A T C \blacktriangle T ... 5'	1	50 149
rs716615 A>G	DraI	5'... T T T A A A ... 3' 3'... A A A \blacktriangle T T T ... 5'	1	134 58

Tabella 11: enzimi di restrizione utilizzati per riconoscere i polimorfismi, siti di riconoscimento e dimensioni dei frammenti di restrizione.

In tabella 12 sono riportate la mix e il profilo termico utilizzato per gli enzimi di restrizione.

Mix di reazione	Quantità x1 (μ l)
H ₂ O	16
Buffer	3
Enzima	1
Totale	30
Incubazione	37°C 2h

Tabella 12: mix della reazione enzimatica e profilo termico.

I frammenti di restrizione sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide al 10% colorato con *SYBR-safe*.

Il prodotto della digestione è stato quindi sottoposto a RTq-PCR (*Real time quantitative PCR*) per determinare quale dei 2 alleli sia duplicato e di conseguenza la sua origine parentale.

Utilizzando i *primers* riportati in tabella 8 è stato messo a punto il seguente protocollo:

Mix di reazione	Quantità x1 (μ l)
H ₂ O	12.95
Buffer 5X	5
MgCl ₂ 25 μ M	0.5
dNTPs 10mM	0.5
pForward 10 μ M	0.75
pReverse 10 μ M	0.75
Eva Green	1.25
Taq Takara	0.3
TOTALE	23 + 2 μ l DNA (50 pg/ μ l)

Tabella 13: mix della reazione di amplificazione

Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
95	5'	1
95	10"	35
Ta	20"	
72	5'	1

Tabella 14: profilo termico della reazione.

La quantificazione dei campioni amplificati in RTq-PCR è stata effettuata utilizzando il *Comparative Quantitation software* (Corbett Research).

Esso calcola il tasso di amplificazione sulla base dell'aumento della fluorescenza nella fase esponenziale della PCR e determina il punto di *take off* che viene definito come il ciclo nel quale la derivata seconda della fluorescenza è al 20 % del suo livello massimo indicando la fine del rumore di fondo e la transizione nella fase esponenziale (Herrmann, 2002).

La pendenza della retta che va dal punto di *take off* alla fine della fase esponenziale è usata per calcolare l'efficienza di amplificazione (figura 5).

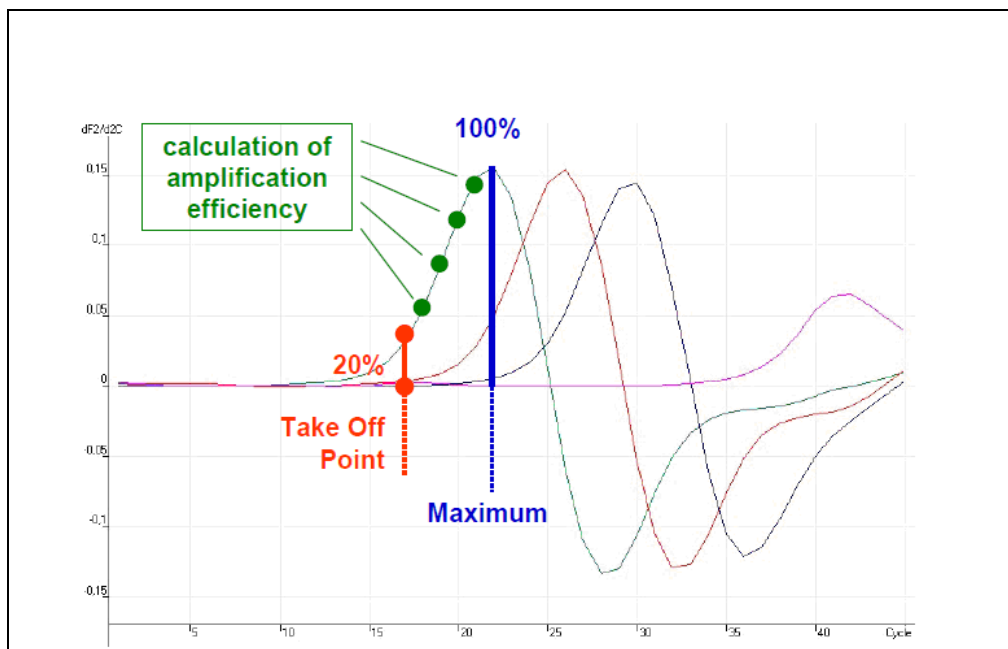


Figura 5: punto di *take off* ed efficienza di amplificazione determinata dal *Comparative Quantitation Analysis software*.

Il *software* quindi fornisce la *comparative concentration* che è la quantità relativa del gene *target* in un campione, rispetto a un altro campione scelto come calibratore ossia:

[2]

$$\text{Comparative concentration} = (E)^{[(\text{control take-off point}) - (\text{sample take-off point})]}$$

dove (E) è l'efficienza di amplificazione.

In questo modo potrà poi essere calcolata la quantità relativa del gene *target* rispetto a un gene di riferimento con la formula:

[3]

$$\frac{(E_{\text{gene target}})^{[(\text{control take-off point}) - (\text{sample take-off})]}}{(E_{\text{gene riferimento}})^{[(\text{control take-off point}) - (\text{sample take-off})]}}$$

Il gene della β -actina (ACTB) è stato utilizzato come gene *housekeeping* di riferimento (*primer forward*: 5'-TCGTGCGTGACATTAAGGAG-3'; *primer reverse*: 5'-GTCAGGCAGCTCGTAGCTCT-3').

Ogni analisi di RTq-PCR è stata ripetuta tre volte caricando in triplicato il paziente, i genitori e campioni di DNA genomico di controllo precedentemente digeriti. Per ciascun campione è stata considerata la media dei valori ottenuti e questi sono stati valutati tenendo conto di una tolleranza del 10%, in accordo con dati di precedenti pubblicazioni. (Laccone, 2004).

Come campione calibratore è stato utilizzato un controllo sano omozigote non taglio per il polimorfismo analizzato in modo da ottenere i seguenti rapporti:

Pattern di restrizione	Gene target/gene riferimento
Omozigote non taglio (Omo NT)	2/2
Eterozigote (het)	1/2
Omozigote taglio (Omo T)	0/2

Tabella 15: *pattern* di restrizione e rapporti gene test/gene riferimento.

Perciò avendo verificato l'eterozigosità del paziente, in caso di duplicazione dell'allele non tagliato si avrà un rapporto gene target/gene riferimento pari a 2/2, se invece è duplicato l'allele tagliato si avrà un rapporto pari a 1/2.

4.5 Analisi bioinformatica

Per l'analisi dei punti di rottura sono stati consultati l'*UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) e lo *Human Genome Segmental Duplication Database* (<http://projects.tcag.ca/humandup/>), mentre mediante il software *Pipmaker* (<http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/>) è stato possibile allineare le sequenze di DNA che costituiscono i *breakpoints* in modo da verificarne la percentuale di identità e identificare la presenza di sequenze ripetute intersperse.

5. RISULTATI

Caso # 4973

L'array-CGH ha evidenziato una delezione di 1.49 Mb a livello del cromosoma 1p36.33p36.32 [1039874 bp→2532312 bp] confermando il risultato ottenuto con la FISH.

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* non ha evidenziato la presenza duplicazioni segmentali che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

Per cui le sequenze di DNA che costituiscono i *breakpoints* sono state allineate mediante il software *Pipmaker* che ha evidenziato un'omologia di sequenza media pari a ~ 75%.

All'interno della regione deleta sono stati analizzati i seguenti marcatori microsatelliti: D1S243, D1S171.(figura 6).

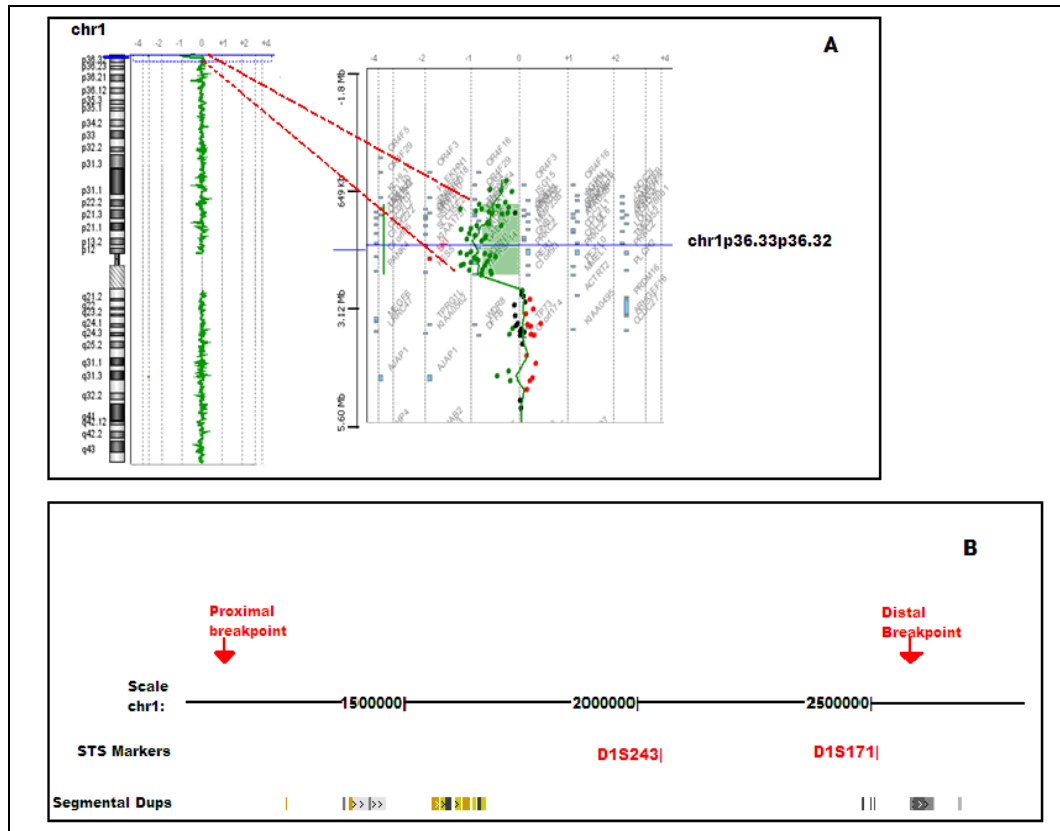


Figura 6: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In tabella 16 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di microsatelliti mentre in figura 7 sono riportati i grafici ottenuti dall'analisi con il *software Genescan* per il marcatore che è risultato informativo.

STS	Probando	Padre	Madre	Origine
D1S243	NI	NI	NI	paterna
D1S171	250/-	246/252	246/250	

Tabella 16: risultato analisi microsatelliti. NI = non informativo

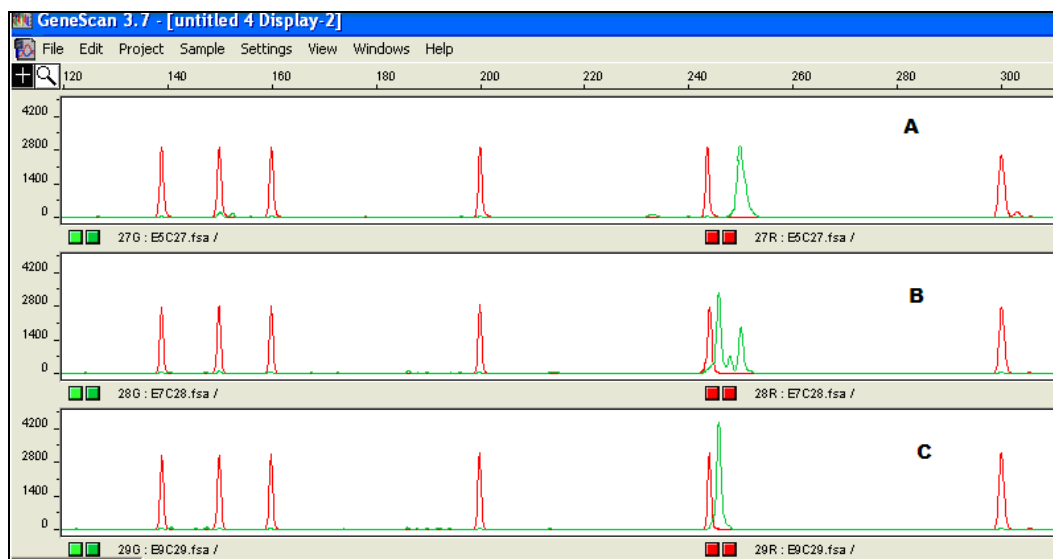


Figura 7: risultato microsatellite D1S171 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

Caso # 5095

L'array-CGH ha evidenziato una delezione di 6.1 Mb a livello del cromosoma 1p36.33p36.32 [1039874 bp→2532312] bp confermando il risultato ottenuto con la FISH.

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* non ha evidenziato la presenza duplicazioni segmentali che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

Per cui le sequenze di DNA che costituiscono i *breakpoints* sono state allineate mediante il software *Pipmaker* che ha evidenziato un'omologia di sequenza media pari a ~ 75%.

All'interno della regione deleta sono stati analizzati i seguenti marcatori microsatelliti: D1S243, D1S171, D1S2870.(figura 8).

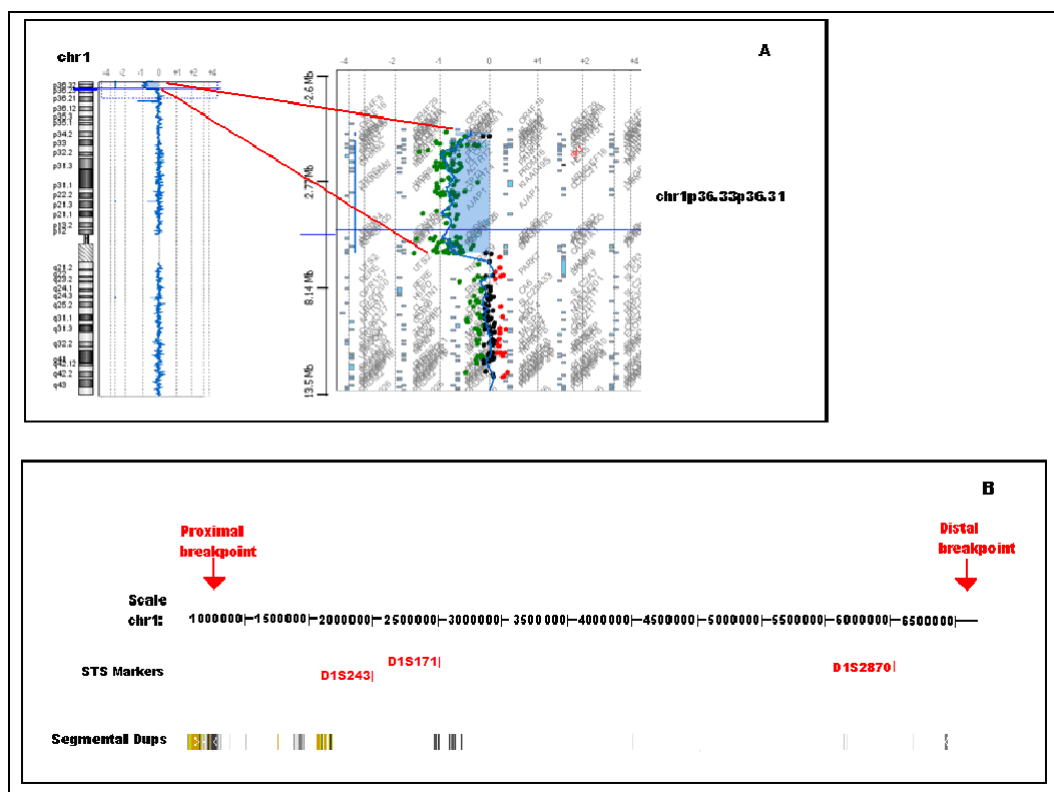


Figura 8: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In tabella 17 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di microsatelliti mentre in figura 9 sono riportati i grafici ottenuti dall'analisi con il *software Genescan* per il marcatore che è risultato informativo.

STS	Probando	Padre	Madre	Origine
D1S243	146/-	144/146	130/144	materna
D1S171	NI	NI	NI	
D1S2870	NI	NI	NI	

Tabella 17: risultato analisi microsatelliti. NI = non informativo.

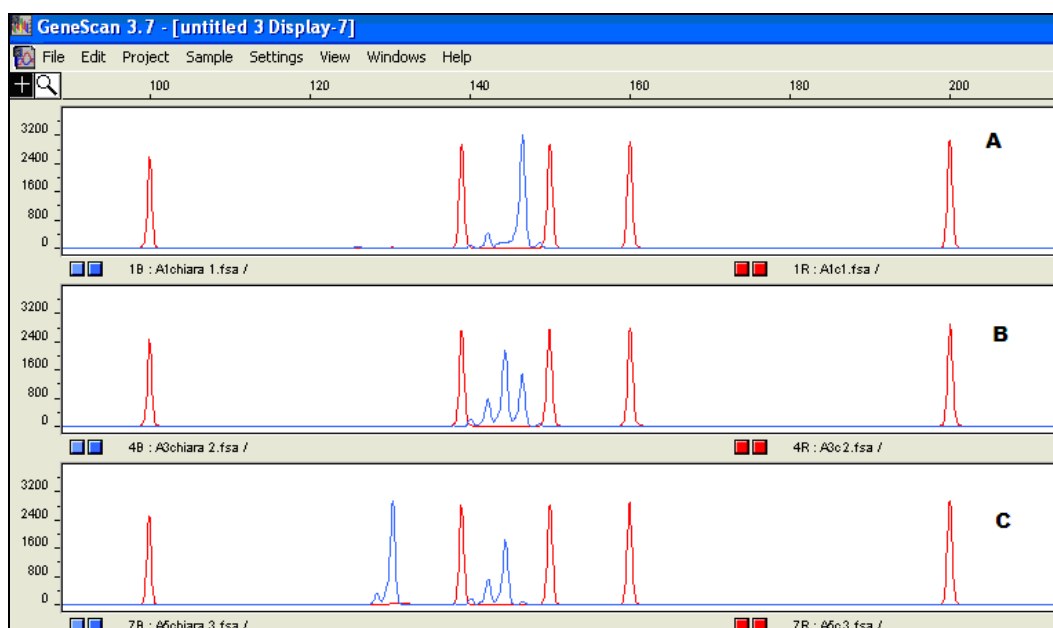


Figura 9: risultato microsatellite D1S243 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

Caso # 4461

L'array-CGH ha evidenziato una duplicazione di 39 Mb a livello del cromosoma 9p24.2p13.1 [204367 bp→39277118 bp] confermando il risultato ottenuto con la citogenetica classica.

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplication Database* ha evidenziato la presenza di una duplicazione segmentale con un'omologia di sequenza di ~ 98% che potrebbe aver mediato il riarrangiamento.

All'interno della regione duplicata sono stati analizzati i seguenti polimorfismi: rs2779772 G>T, rs4961491 C>T e rs1028932 C>G (figura 10).

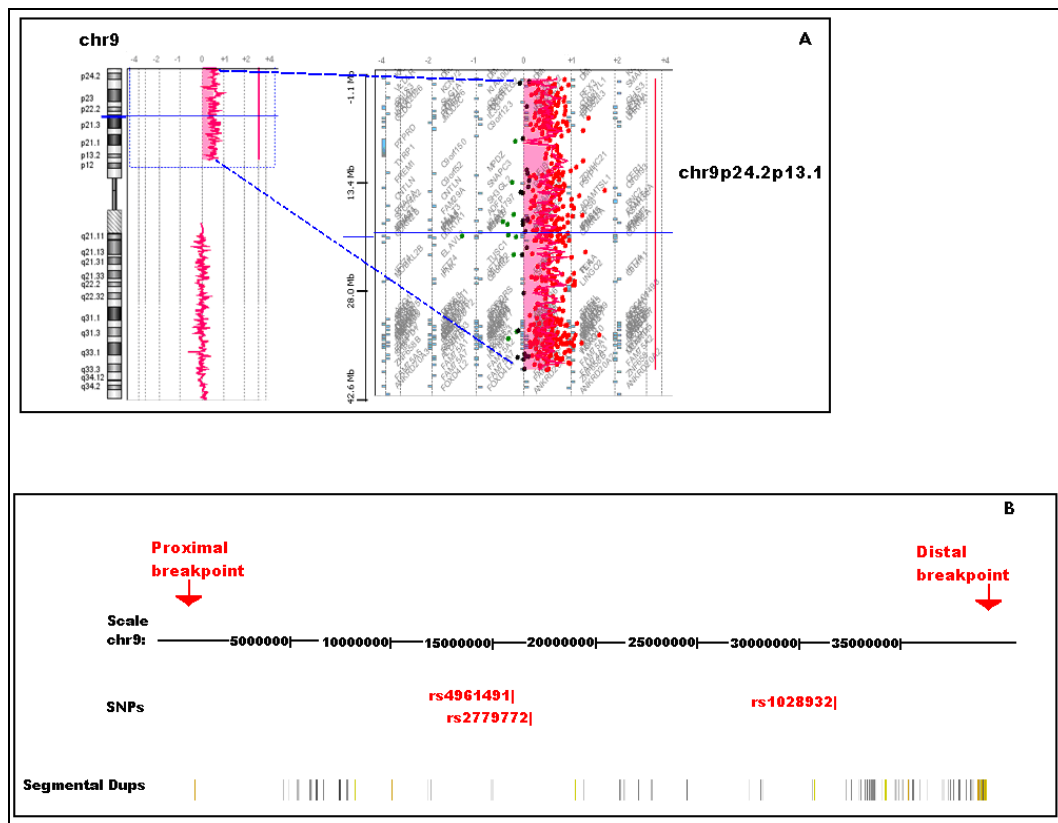


Figura 10: grafico array CGH (A); SNPs analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In figura 11 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi RFLP.



Figura 11: risultati analisi RFLP; foto gel di acrilammide per la separazione elettroforetica dei frammenti di restrizione del polimorfismo rs2779772. (NI = Non Informativo).

Il polimorfismo rs2779772 G>T è l'unico ad essere risultato informativo.

Per cui il prodotto della digestione è stato successivamente sottoposto a RTq-PCR (*Real time quantitative PCR*) per determinare quale dei 2 alleli sia duplicato e di conseguenza la sua origine parentale.

I risultati sono riportati in tabella 18.

Campione	rs 2779772 G>T			ACTB			Gene test/gene rif
	Take off	E	Comp. Conc.	Take off	E	Comp. Conc.	
C1 (calibratore) OmoNT	11	1,75	1,00E+00	10,8	1,83	1,00E+00	1,00
4461 het	12,39	1,84	4,29E-01	11,1	1,74	8,31E-01	0,52
Padre OmoNT	10,46	1,83	1,39E+00	10,3	1,85	1,33E+00	1,05
Madre het	11,53	1,73	7,49E-01	10,3	1,86	1,36E+00	0,55
C2 het	11,14	1,74	9,26E-01	9,88	1,9	1,80E+00	0,51
C3 OmoT	nd	-	-	12,3	1,91	3,78E-01	0,00
C4 OmoNT	11,18	1,73	9,08E-01	11	1,88	9,00E-01	1,01

Tabella 18: risultato analisi RTq-PCR. Sono riportati per ogni campione *take off*, efficienza di amplificazione (E), *comparative concentration* (Comp. Conc.) - ottenuti per il gene test (rs2779772) e per il gene di riferimento (ACTB) - e il rapporto gene test/gene di riferimento (gene test/gene rif.). (nd = non definito)

Il valore gene test / gene riferimento per il paziente è pari a 0.52. Questo significa che l'allele duplicato è quello tagliato ossia quello materno (tabella 15).

Caso # 5116

L'array-CGH ha evidenziato una duplicazione di 11.44 Mb a livello del cromosoma 17p13.1p11.2 [7401533 bp→18845678 bp] definendo il risultato ottenuto con la citogenetica [46, XX, der(17)], inoltre ha rilevato una duplicazione criptica di 1.67 Mb sul cromosoma 6q22.2q22.31 [117844129 bp→119512023 bp].

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* non ha evidenziato la presenza duplicazioni segmentali che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

Per cui le sequenze di DNA che costituiscono i *breakpoints* sono state allineate mediante il *software Pipmaker* che ha evidenziato un'omologia di sequenza media pari a ~80%.

I polimorfismi analizzati sono rs513978 C>G, rs11876370 C>G, rs3786347 A>G per la regione 17p13.1p11.2 e rs35237407 A>G, rs35957877 A>T. rs11153780 C>G per la regione 6q22.2q22.31 (figura 12, 13).

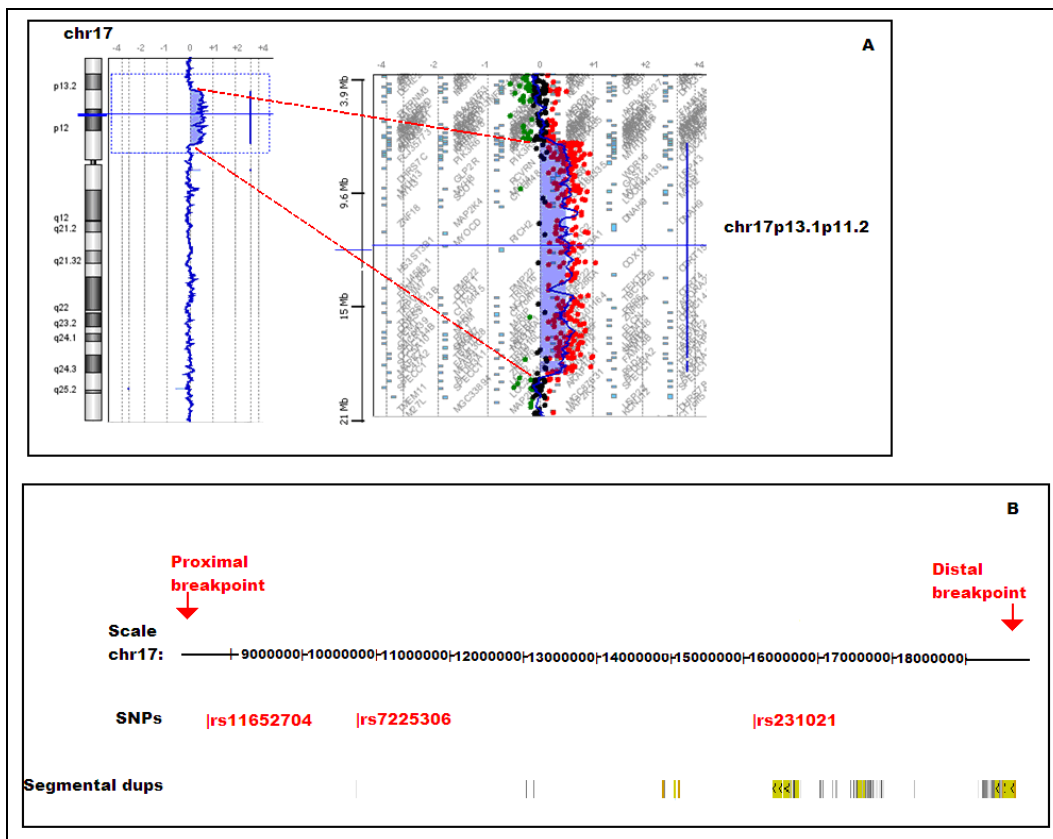


Figura 12: grafico array CGH (A); SNPs analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

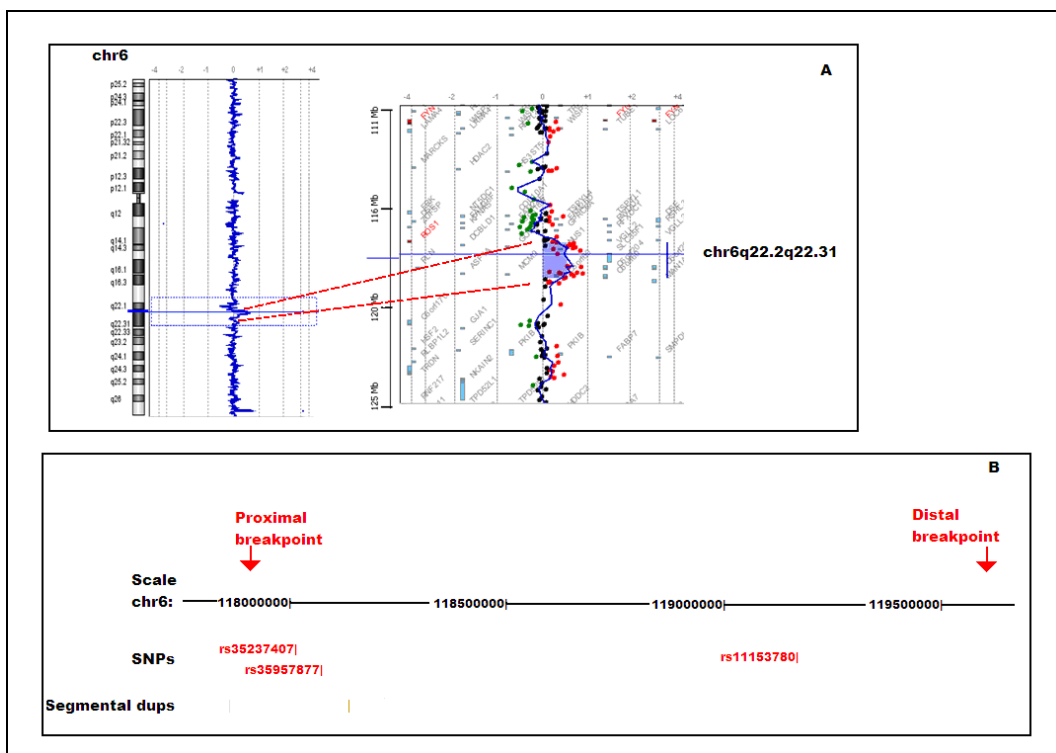


Figura 13: grafico array CGH (A); SNPs analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In figura 14 e in tabella 19 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi RFLP per le duplicazioni in 17p13.1p11.2 e 6q22.2q22.31 rispettivamente.

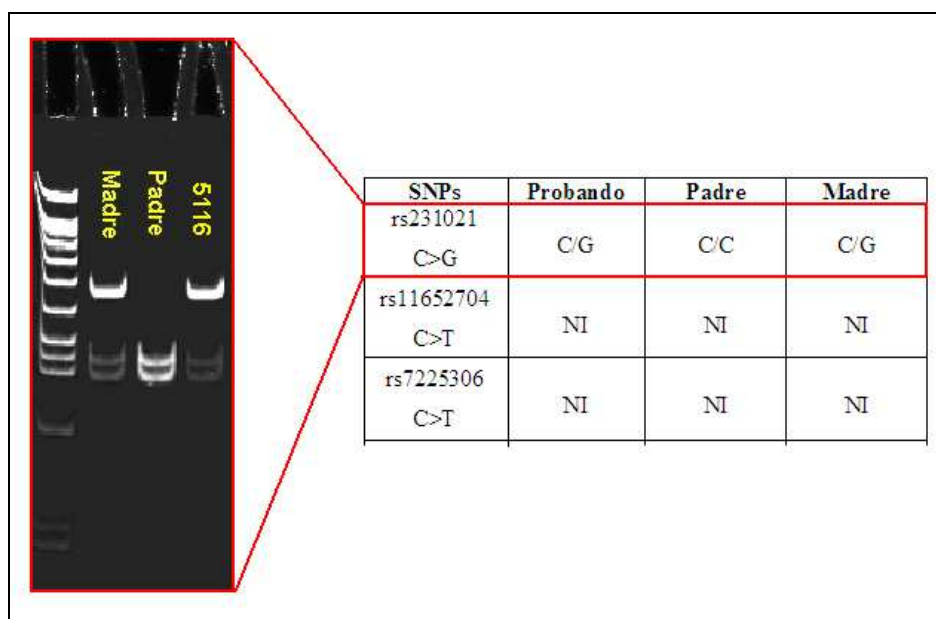


Figura 14: risultati analisi RFLP; foto gel di acrilammide per la separazione elettroforetica dei frammenti di restrizione del polimorfismo rs231021. (NI = Non Informativo).

SNPs	Probando	Padre	Madre
rs35237407 A>G	NI	NI	NI
rs35957877 A>T	NI	NI	NI
rs11153780 C>G	NI	NI	NI

Tabella 19: risultato analisi RFLP. NI = non informativo.

Il polimorfismo rs231021 C>G è l'unico ad essere risultato informativo.

Quindi il prodotto della digestione è stato successivamente sottoposto a RTq-PCR (*Real time quantitative PCR*) per determinare quale dei 2 alleli sia duplicato e di conseguenza la sua origine parentale. I risultati sono riportati in tabella 20.

Per la duplicazione in 6q22.2q22.31 non è stato possibile definire l'origine parentale in quanto nessuno degli SNPs analizzati è risultato informativo.

Campione	rs231021 C>G			ACTB			Gene test/gene rif
	Take off	E	Comp. Conc.	Take off	E	Comp. Conc.	
C1 (calibratore) Omo NT	13,9	1,75	1,00E+00	11,8	1,87	1,00E+00	1,00
5116 het	13,8	1,75	1,06E+00	11,82	1,84	9,90E-01	1,07
Padre Omo T	nd	-	-	12,34	1,85	7,19E-01	0
Madre het	14,66	1,76	6,49E-01	11,51	1,88	1,20E+00	0,54
C2 het	15,61	1,77	3,76E-01	12,3	1,86	7,34E-01	0,51
C3 Omo T	nd	-	-	12,2	1,86	7,81E-01	0
C4 Omo NT	14,2	1,76	8,44E-01	12,03	1,86	8,65E-01	0,98

Tabella 20: risultato analisi RTq-PCR. Sono riportati per ogni campione *take off*, efficienza di amplificazione (E), *comparative concentration* (Comp. Conc.) - ottenuti per il gene test (rs231021) e per il gene di riferimento (ACTB) - e il rapporto gene test/gene di riferimento (gene test/gene rif.). (nd = non definito)

Il valore gene test / gene riferimento per il paziente è pari a 1.07. Questo significa che l'allele duplicato è quello non tagliato ossia quello materno (tabella 15).

Caso # 4509

L'array-CGH ha evidenziato una delezione di 13.7 Mb a livello del cromosoma 18p11.32p11.21 [17276972 bp→13875315] confermando il risultato ottenuto con la citogenetica classica.

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplication Database* non ha evidenziato la presenza duplicazioni segmentali che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

Per cui le sequenze di DNA che costituiscono i *breakpoints* sono state allineate mediante il software *Pipmaker* che ha evidenziato un'omologia di sequenza media pari a ~ 70%.

All'interno della regione deleta sono stati analizzati i seguenti marcatori microsatelliti: D18S59, D18S62, D18S71 (figura 15).

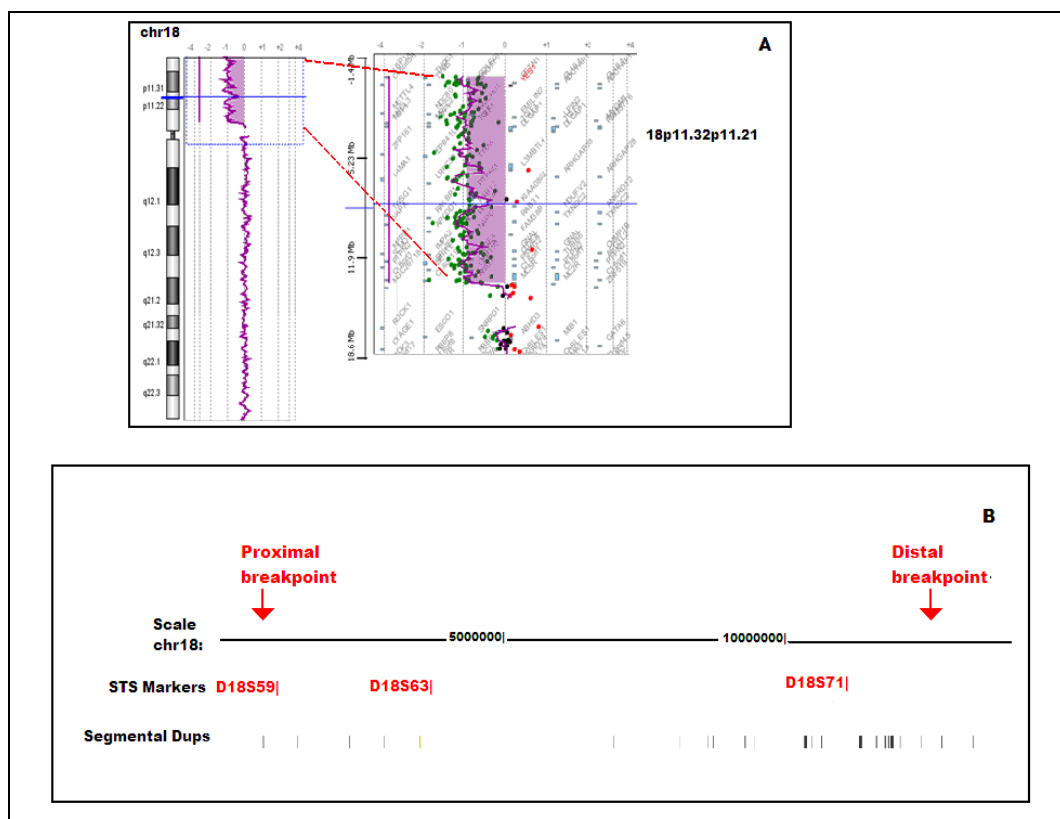


Figura 15: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In tabella 21 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di microsatelliti mentre in figura 16 e 17 sono riportati i grafici ottenuti dall'analisi con il *software Genescan* per i marcatori che sono risultati informativi.

STS	Probando	Padre	Madre	Origine
D18S63	NI	NI	NI	paterna
D18S59	154/-	152/160	146/154	
D18S71	272/-	248/250	272/275	

Tabella 21: risultato analisi microsatelliti. NI = non informativo.

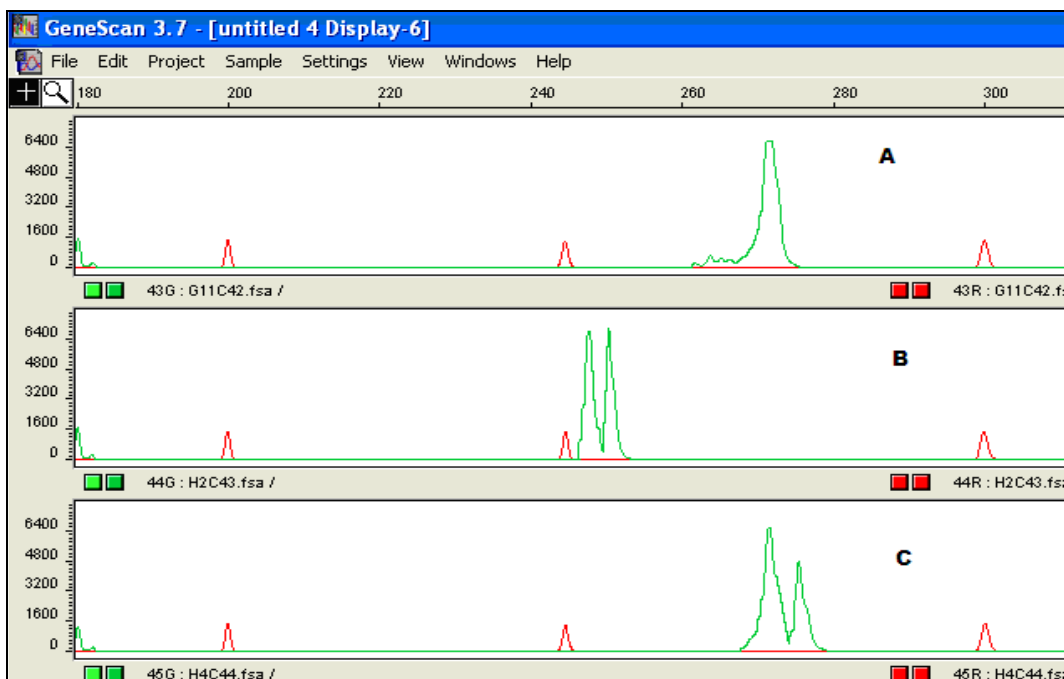


Figura 16: risultato microsatellite D18S71 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

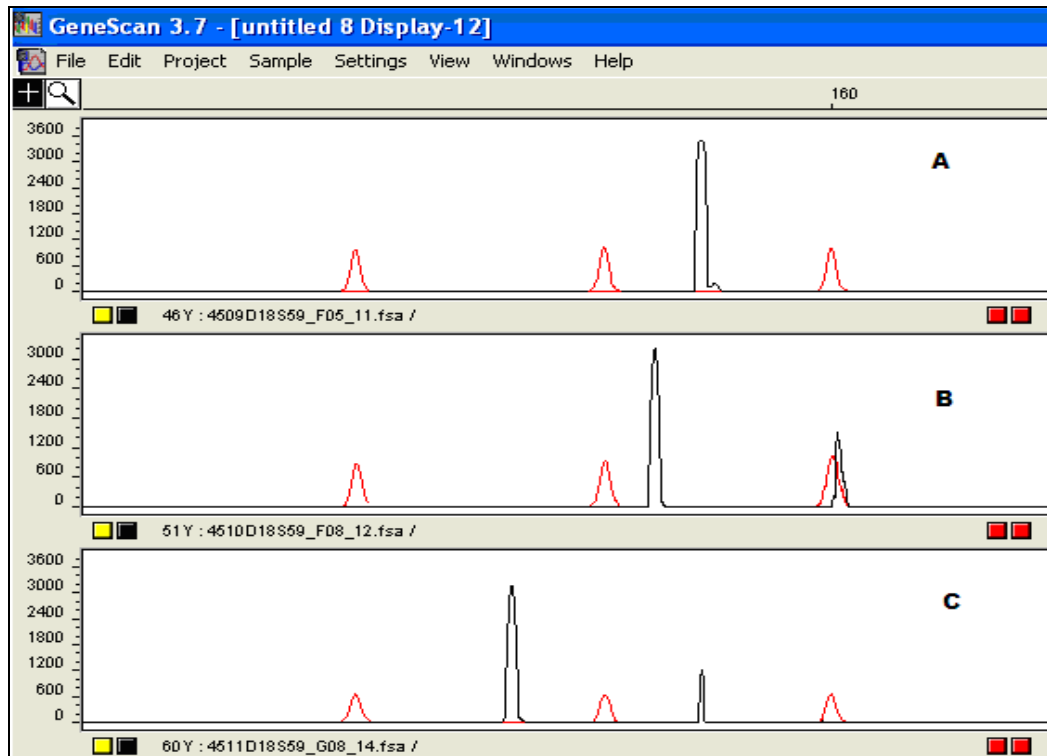


Figura 17: risultato microsatellite D18S59 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

Caso # 4904

L'array-CGH ha evidenziato una delezione di 6.57 Mb a livello del cromosoma 18q21.33q22.2 [58324742 bp→64985021 bp] rivelando che la traslocazione (1:18) (p36.1;q22) definita con la citogenetica classica è in realtà sbilanciata.

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* non ha evidenziato la presenza duplicazioni segmentali che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

Per cui le sequenze di DNA che costituiscono i *breakpoints* sono state allineate mediante il software *Pipmaker* che ha evidenziato un'omologia di sequenza media pari a ~ 75%.

All'interno della regione deleta sono stati analizzati i seguenti marcatori microsatelliti: D18S465, D18S483, D18S857 (figura 18).

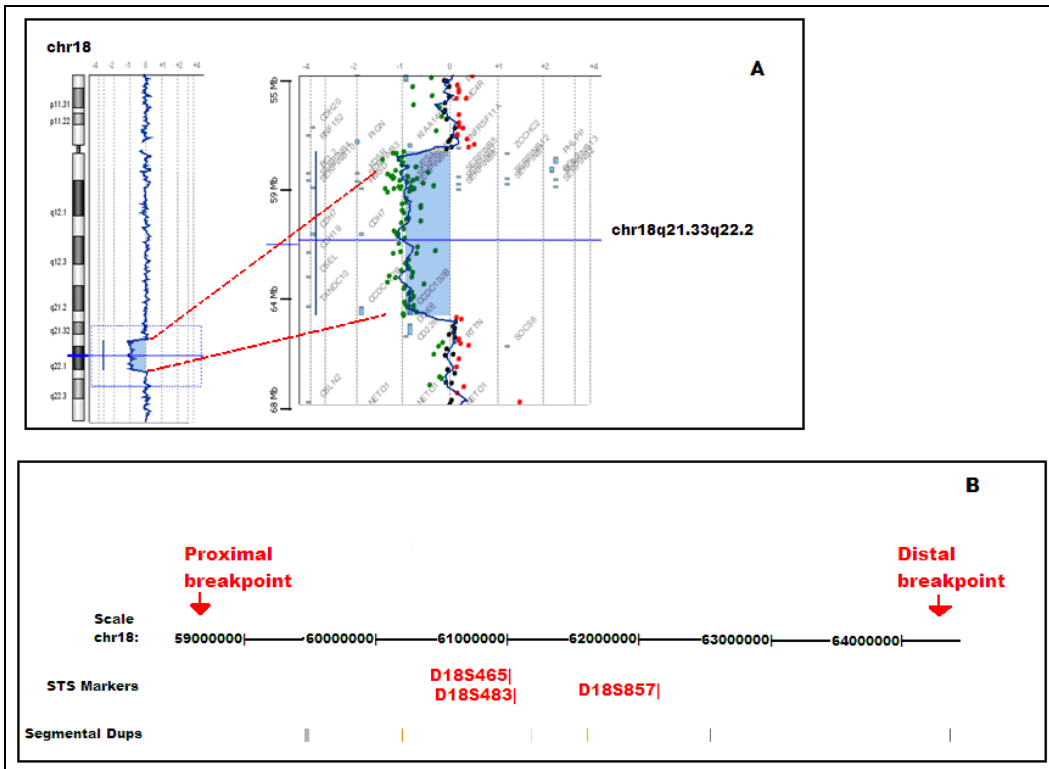


Figura 18: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In tabella 22 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di microsatelliti mentre in figura 19 e 20 sono riportati i grafici ottenuti dall'analisi con il *software Genescan* per i marcatori che sono risultati informativi.

STS	Probando	Padre	Madre	Origine
D18S465	NI	NI	NI	paterna
D18S483	212/-	194/216	212/214	
D18S857	226/-	220/229	220/226	

Tabella 22: risultato analisi microsatelliti. NI = non informativo.

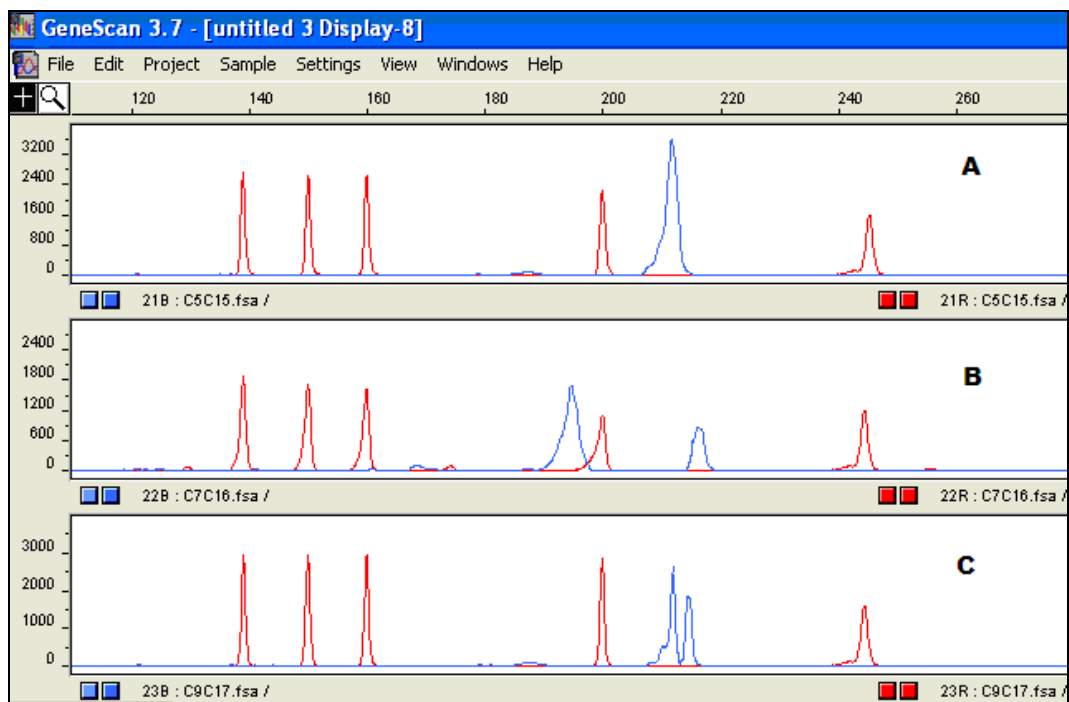


Figura 19: risultato microsatellite D18S483 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

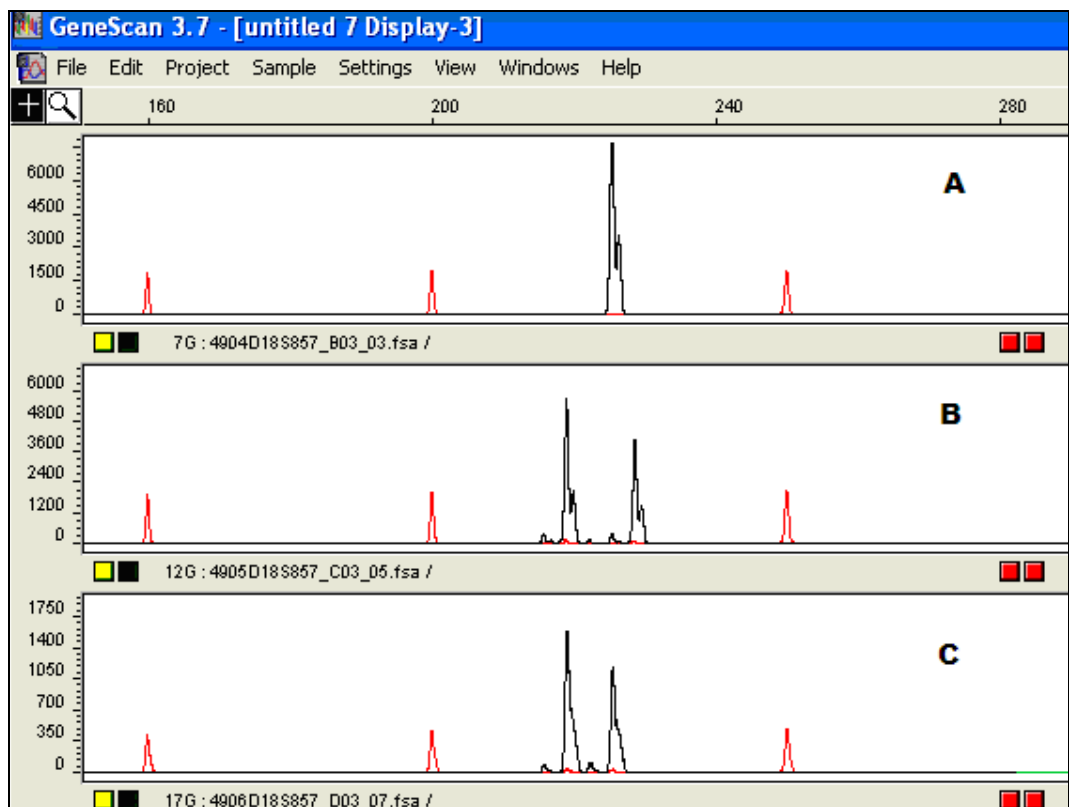


Figura 20: risultato microsatellite D18S857 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

Caso # 5007

L'array-CGH ha evidenziato una duplicazione di 14,74 Mb a livello del cromosoma 18p11.32p11.21 [170229 bp→14918854 bp] definendo il risultato ottenuto con la citogenetica [46,XX, der(18)].

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* non ha evidenziato la presenza duplicazioni segmentali che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

Per cui le sequenze di DNA che costituiscono i *breakpoints* sono state allineate mediante il software *Pipmaker* che ha evidenziato un'omologia di sequenza media pari a ~ 65%.

All'interno della regione duplicata sono stati analizzati i seguenti polimorfismi: rs513978 C>G, rs11876370 C>G e rs3786347 A>G (figura 21).

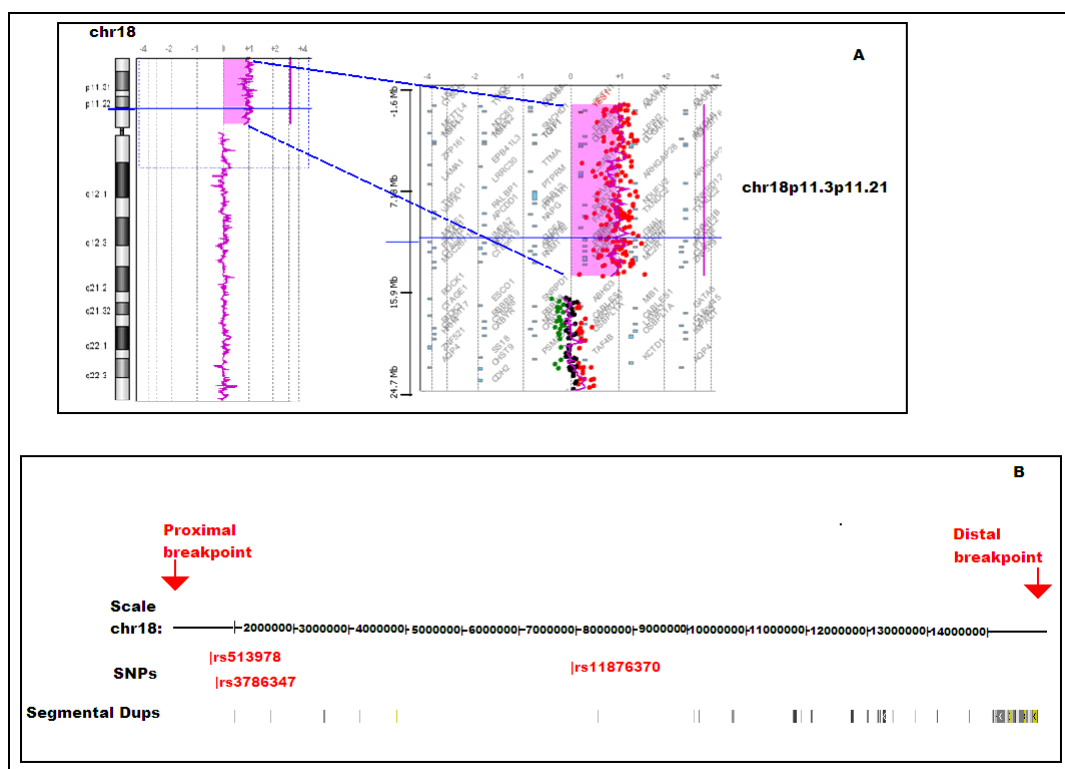


Figura 21: grafico array CGH (A); SNPs analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In figura 22 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi RFLP.

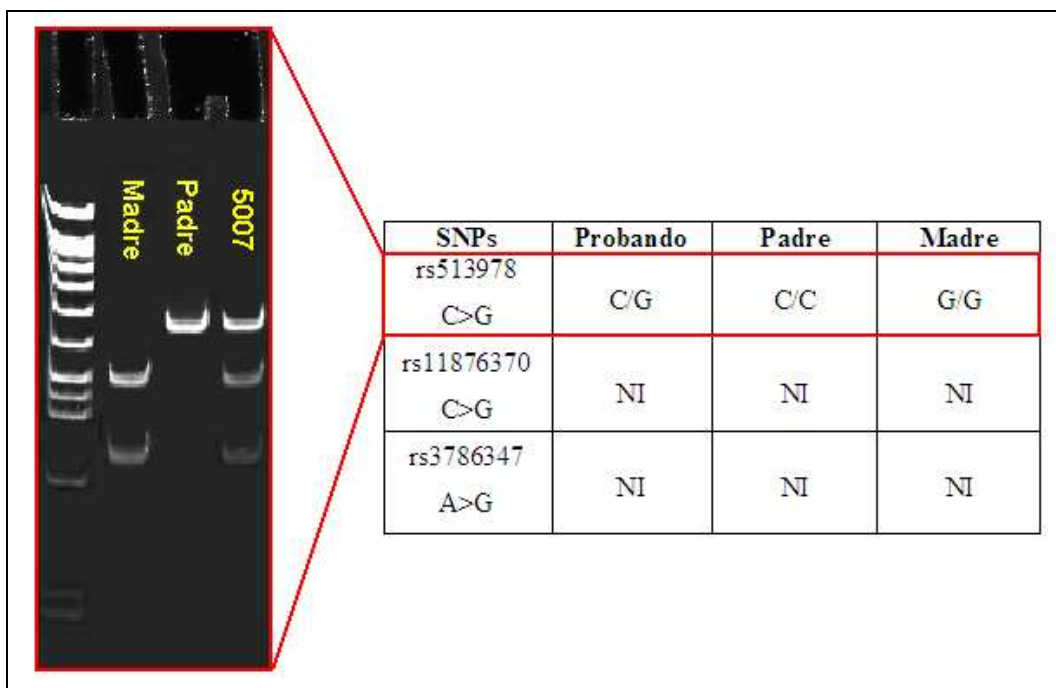


Figura 22: risultati analisi RFLP; foto gel di acrilammide per la separazione elettroforetica dei frammenti di restrizione del polimorfismo rs513978. (NI = Non Informativo).

Il polimorfismo rs513978 C>G è l'unico ad essere risultato informativo.

Per cui il prodotto della digestione è stato successivamente sottoposto a RTq-PCR (*Real time quantitative PCR*) per determinare quale dei 2 alleli sia duplicato e di conseguenza la sua origine parentale. I risultati sono riportati in tabella 23.

Campione	rs 513978 C>G			ACTB			Gene test/gene rif
	Take off	E	Comp. Conc.	Take off	E.	Comp. Conc.	
C1 (calibratore) Omo NT	15,4	1,84	1,00E+00	13	1,87	1,00E+00	1,00
5007 het	16,73	1,87	4,36E-01	13,36	1,84	8,02E-01	0,54
Padre OmoNT	15,08	1,86	1,22E+00	12,76	1,86	1,16E+00	1,05
Madre OmoT	nd			12,74	1,87	1,18E+00	0,00
3614 het	15,46	1,85	9,64E-01	12,1	1,87	1,76E+00	0,55
3599 OmoT	nd			13,6	1,87	6,87E-01	0,00
3618 OmoNT	15,61	1,85	8,79E-01	13,16	1,91	9,03E-01	0,97

Tabella 23: risultato analisi RTq-PCR. Sono riportati per ogni campione *take off*, efficienza di amplificazione (E), *comparative concentration* (Comp. Conc.) - ottenuti per il gene test (rs513978) e per il gene di riferimento (ACTB) - e il rapporto gene test/gene di riferimento (gene test/gene rif.). (nd = non definito).

Il valore gene test / gene riferimento per il paziente è pari a 0.54. Questo significa che l'allele duplicato è quello tagliato ossia quello materno (tabella 15).

Caso # 4512

L'*array-CGH* ha evidenziato una delezione di 2.43 Mb a livello del cromosoma 22q11.21 [17276972 bp → 19712953 bp] confermando il risultato ottenuto con la FISH.

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplication Database* ha evidenziato la presenza di numerose duplicazioni segmentali con omologia di sequenza di ~ 97 % che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

All'interno della regione deleta sono stati analizzati i seguenti marcatori microsatelliti: 22D_4_4, D22S944, D22S873 (figura 23).

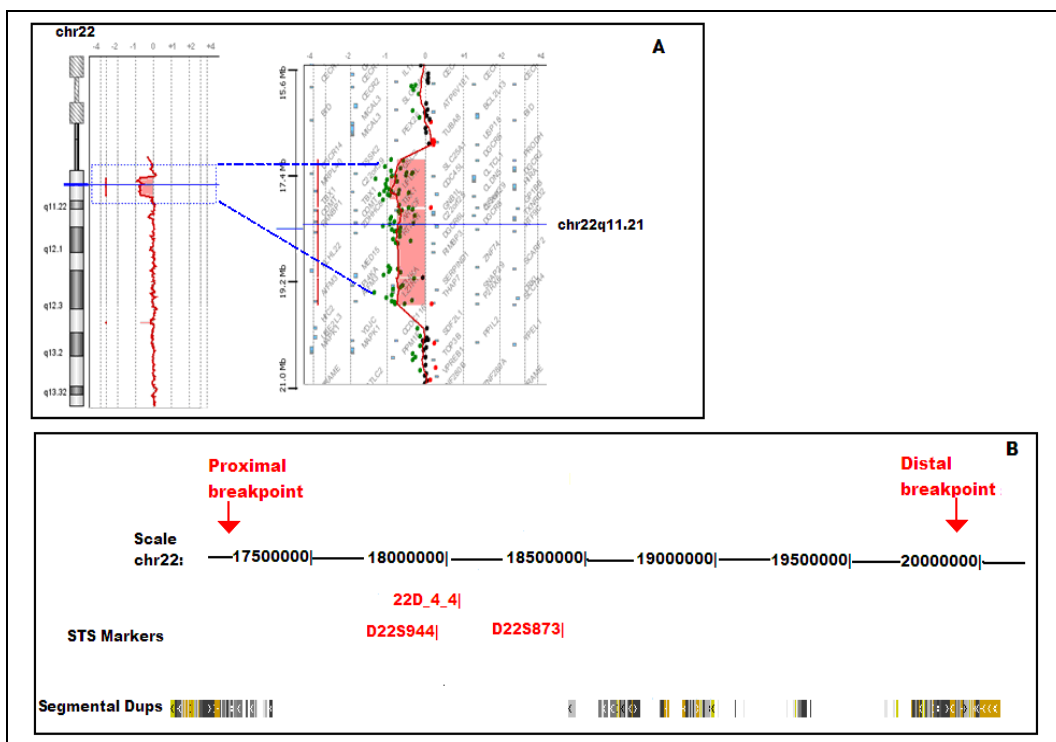


Figura 23: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In tabella 24 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di microsatelliti mentre in figura 24 e 25 sono riportati i grafici ottenuti dall'analisi con il *software Genescan* per i marcatori che sono risultati informativi.

STS	Probando	Padre	Madre	Origine
D22S944	160/-	160/160	158/158	materna
D22S873	NI	NI	NI	
22D_4_4	226/-	226/226	206/219	

Tabella 24: risultato analisi microsatelliti. NI = non informativo.

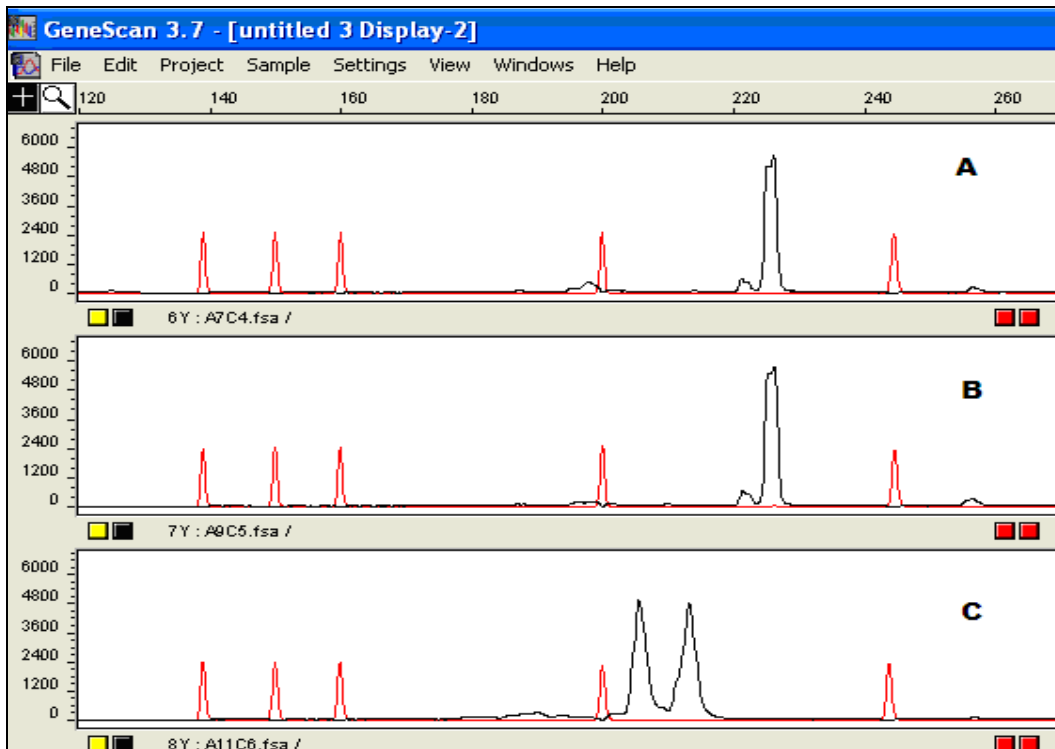


Figura 24: risultato microsatellite 22D_4_4 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).



Figura 25: risultato microsatellite D22S944 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

Caso # 4603

L'array-CGH ha evidenziato una delezione di 2.43 Mb a livello del cromosoma 22q11.21 [17276972 bp → 19712953 bp confermando il risultato ottenuto con la FISH.

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* ha evidenziato la presenza di numerose duplicazioni segmentali con omologia di sequenza di ~ 97 % che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

All'interno della regione deleta sono stati analizzati i seguenti marcatori microsatelliti: 22D_4_4, D22S944, D22S873 (figura 26).

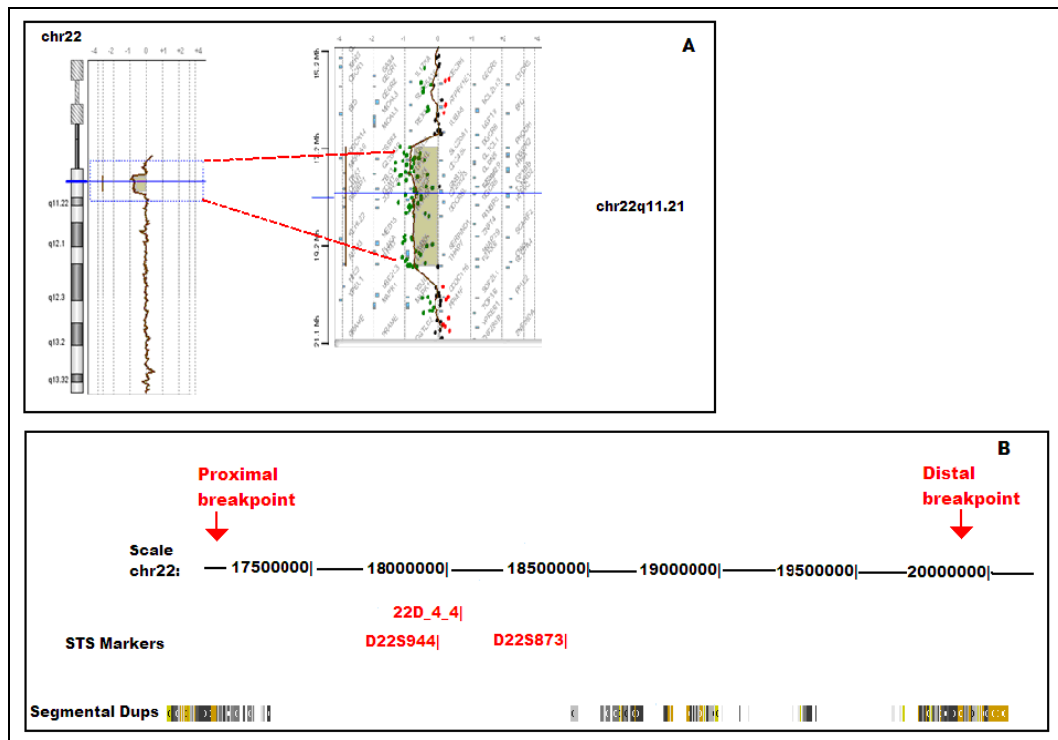


Figura 26: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In tabella 25 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di microsatelliti mentre in figura 27 è riportato il grafico ottenuto dall'analisi con il *software Genescan* per il marcatore che è risultato informativo.

STS	Probando	Padre	Madre	Origine
D22S944	NI	NI	NI	materna
D22S873	NI	NI	NI	
22D_4_4	226/-	218/226	214/222	

Tabella 25: risultato analisi microsatelliti. NI= non informativo.

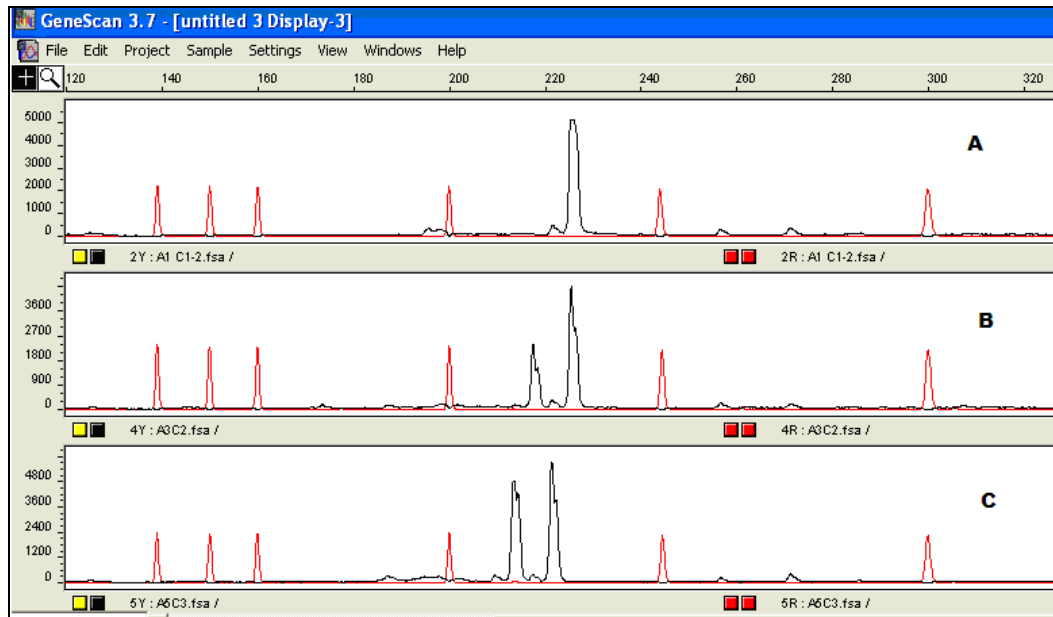


Figura 27: risultato microsatellite 22D_4_4 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

Caso # 5072

L'array-CGH ha evidenziato una delezione di 2.85 Mb a livello del cromosoma 22q11.21 [17276972 bp→20128755 bp confermando il risultato ottenuto con la FISH.

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* ha evidenziato la presenza di numerose duplicazioni segmentali con omologia di sequenza di ~ 97 % che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

All'interno della regione deleta sono stati analizzati i seguenti marcatori microsatelliti: 22D_4_4, D22S944, D22S873 (figura 28).

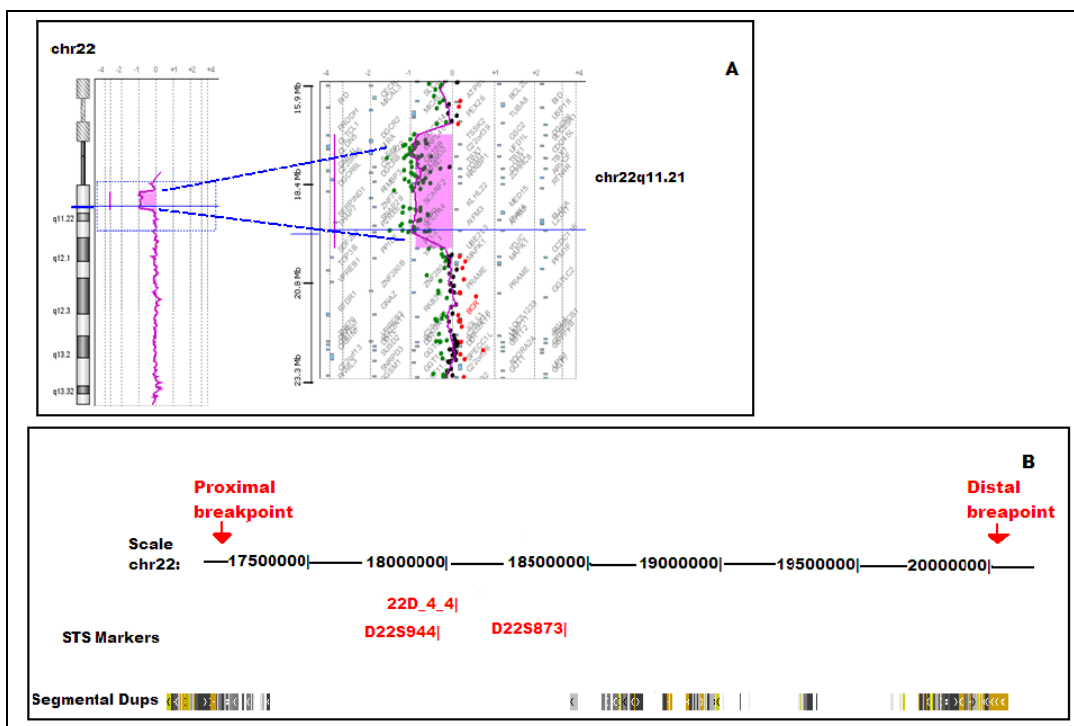


Figura 28: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In tabella 26 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di microsatelliti mentre in figura 29 e 30 sono riportati i grafici ottenuti dall'analisi con il *software Genescan* per i marcatori che sono risultati informativi.

STS	Probando	Padre	Madre	Origine
D22S944	NI	NI	NI	paterna
D22S873	257/-	209/261	257/261	
22D_4_4	218/-	214/226	210/218	

Tabella 26: risultato analisi microsatelliti. NI = non informativo.

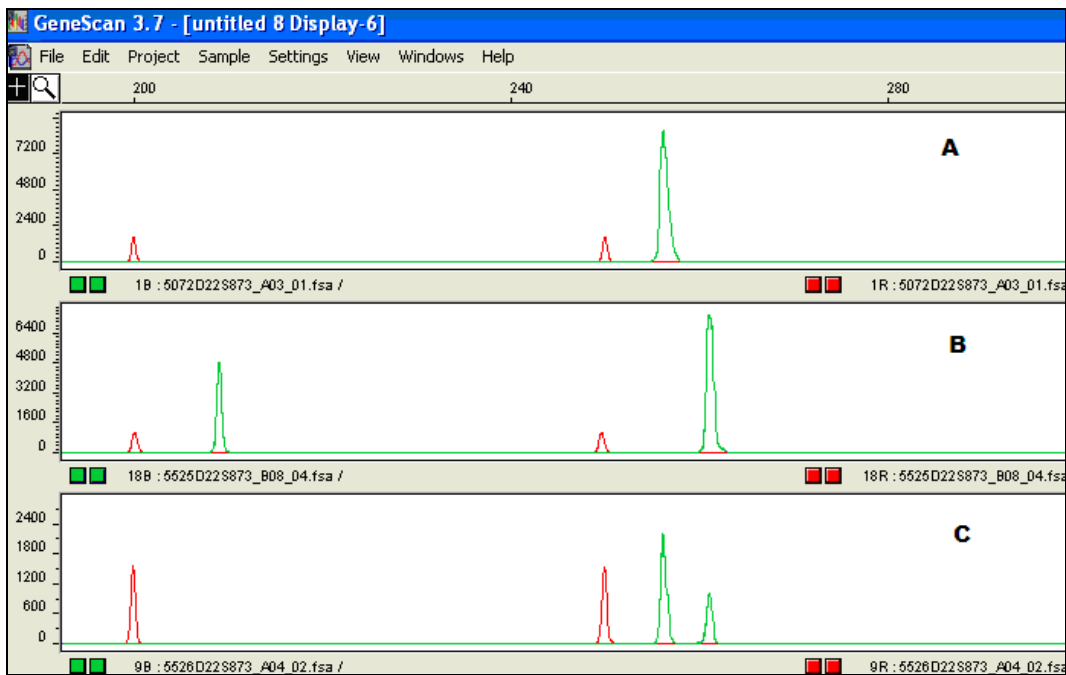


Figura 29: risultato microsatellite D22S873 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

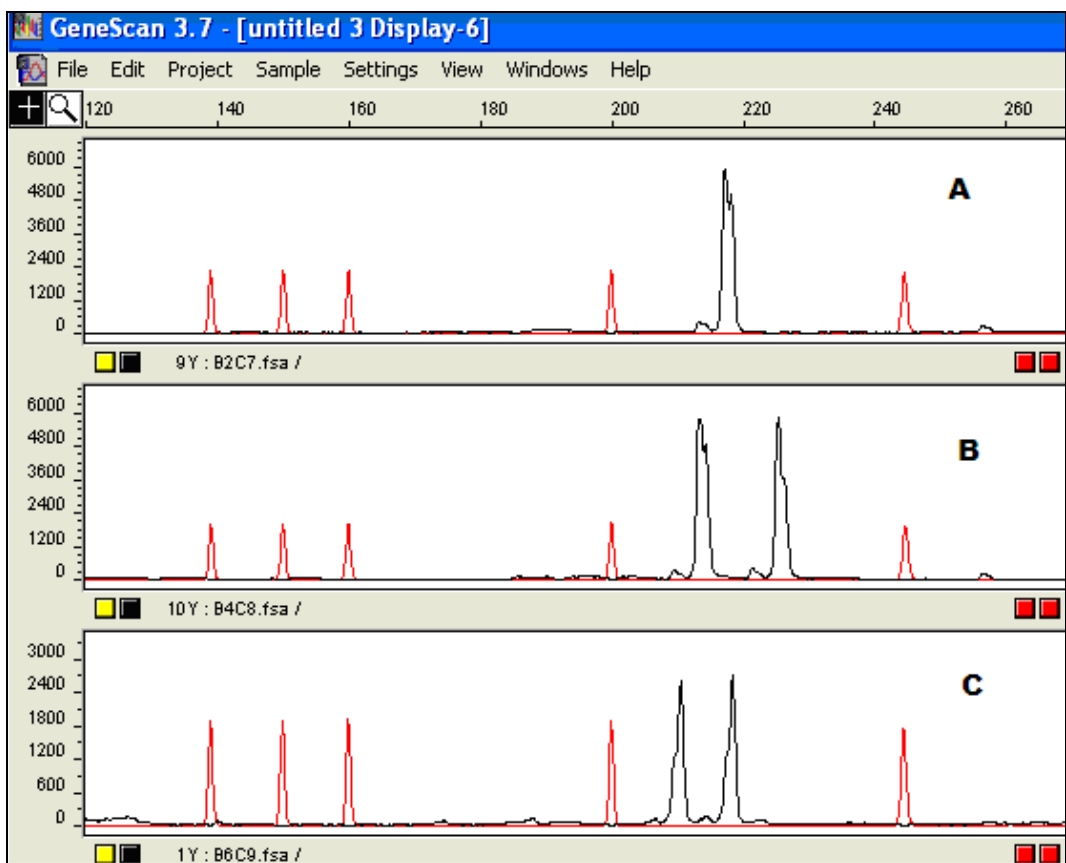


Figura 30: risultato microsatellite 22D_4_4 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

Caso # 5065

L'array-CGH ha evidenziato una duplicazione di 2.1 Mb a livello del cromosoma 2p16.1p15 [59866968 bp→61969259 bp].

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* non ha evidenziato la presenza duplicazioni segmentali che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

Per cui le sequenze di DNA che costituiscono i *breakpoints* sono state allineate mediante il *software Pipmaker* che ha evidenziato un'omologia di sequenza media pari a ~ 75%.

All'interno della regione duplicata sono stati analizzati i seguenti polimorfismi: rs11887292 C>T, rs35217978 A>G, rs7557230 A>T (figura 31).

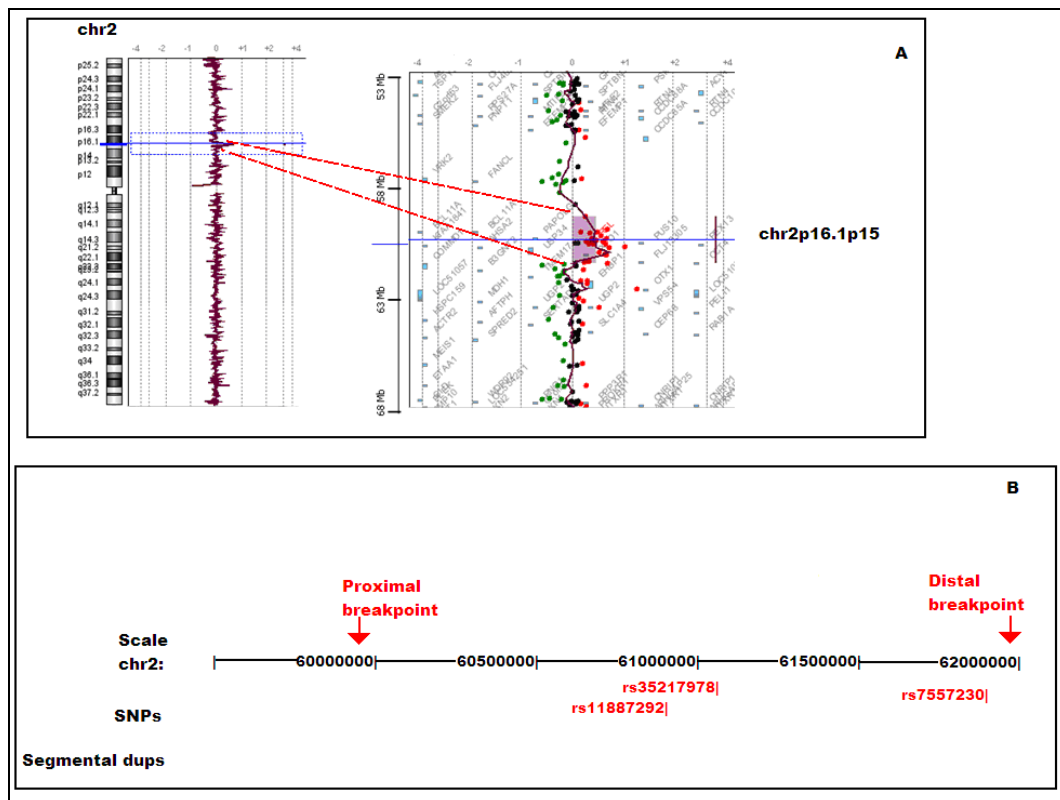


Figura 31: grafico array CGH (A); SNPs analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In tabella 27 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi RFLP.

SNPs	Probando	Padre	Madre
rs11887292 C>T	NI	NI	NI
rs35217978 A>G	NI	NI	NI
rs7557230 A>T	NI	NI	NI

Tabella 27: risultati analisi RFLP. NI = non informativo.

Nessuno dei polimorfismi analizzati è risultato informativo per cui non è stato possibile procedere con la RTq-PCR.

Caso # 4901

L'array-CGH ha evidenziato una duplicazione di 11.48 Mb a livello del cromosoma 2q24.1q24.3 [154592157 bp→166073025 bp].

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* non ha evidenziato la presenza duplicazioni segmentali che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

Per cui le sequenze di DNA che costituiscono i *breakpoints* sono state allineate mediante il *software Pipmaker* che ha evidenziato un'omologia di sequenza media pari a ~75%.

All'interno della regione duplicata sono stati analizzati i seguenti polimorfismi: rs4664207 C>T, rs716615 A>G e rs582447 G>T (figura 32).

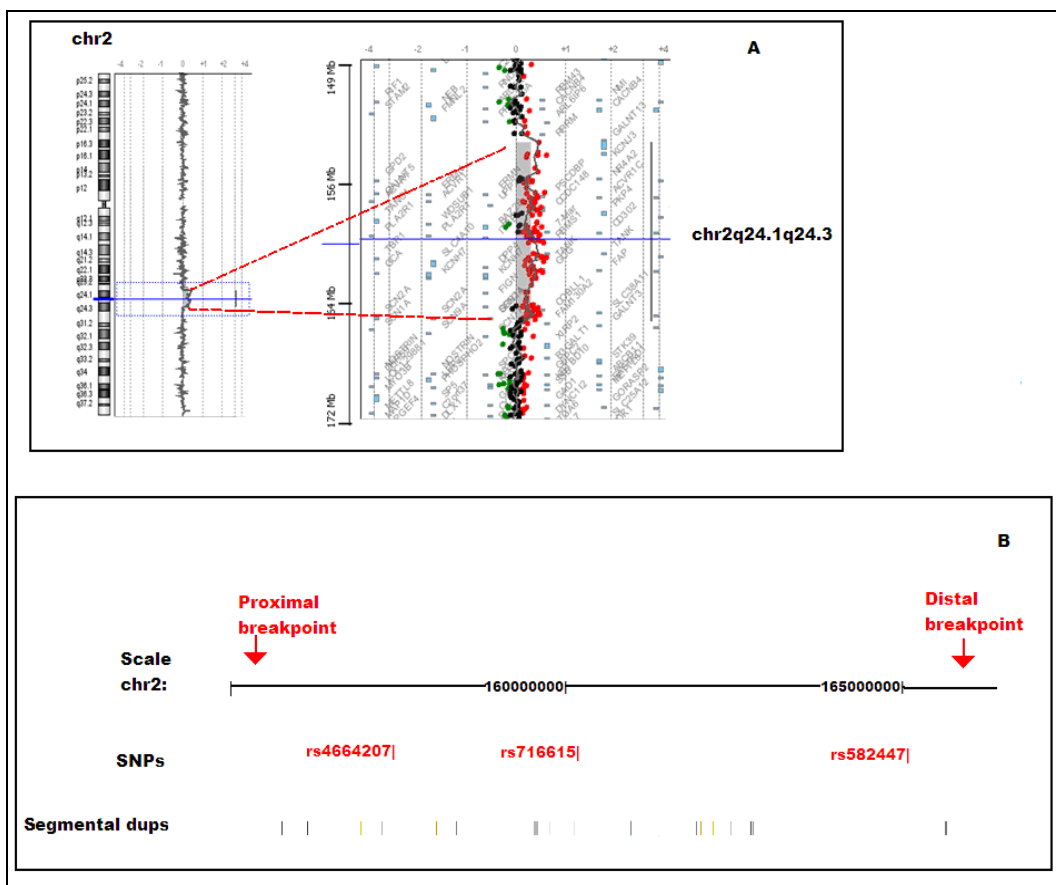


Figura 32: grafico array CGH (A); SNPs e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In figura 33 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi RFLP.

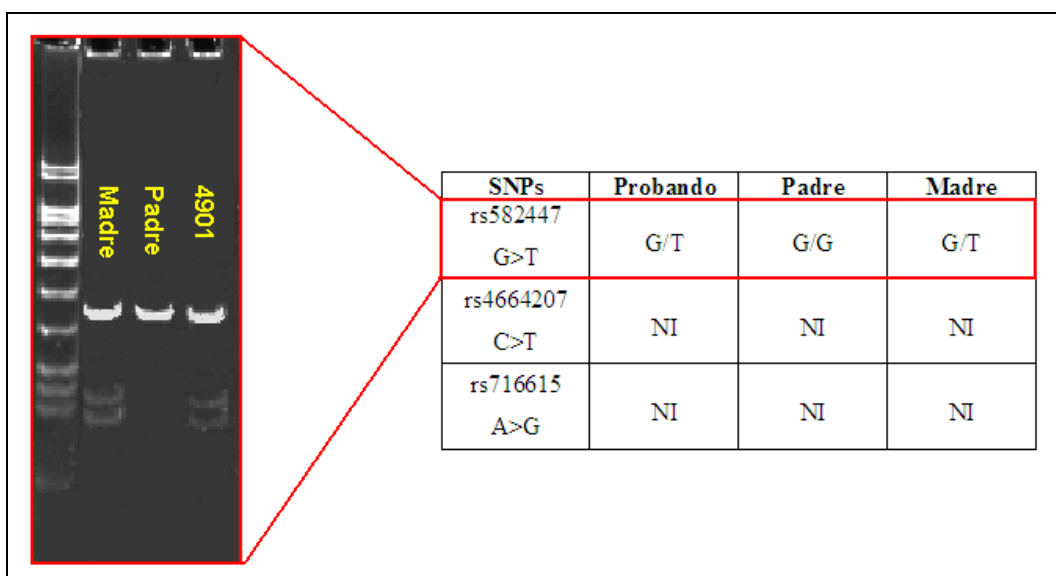


Figura 33: risultati analisi RFLP; foto gel di acrilammide per la separazione elettroforetica dei frammenti di restrizione del polimorfismo rs582447. (NI = Non Informativo).

Il polimorfismo rs582447 G>T è l'unico ad essere risultato informativo.

Per cui il prodotto della digestione è stato successivamente sottoposto a RTq-PCR (*Real time quantitative PCR*) per determinare quale dei 2 alleli sia duplicato e di conseguenza la sua origine parentale. I risultati sono riportati in tabella 28.

Campione	Rs582447 G>T			ACTB			Gene test/gene rif
	Take off	E	Comp conc	Take off	E	Comp concen	
C1 (calibratore) Omo NT	14,8	1,82	1,00E+00	12,3	1,87	1,00E+00	1,00
4901 het	15,05	1,83	8,58E-01	12,05	1,86	1,17E+00	0,73
Padre Omo NT	15,37	1,82	7,09E-01	12,76	1,87	7,50E-01	0,95
Madre het	16,23	1,83	4,21E-01	12,55	1,87	8,55E-01	0,49
C2 het	15,31	1,81	7,40E-01	11,82	1,86	1,35E+00	0,55
C3 Omo NT	14,63	1,84	1,11E+00	12,09	1,88	1,14E+00	0,97
C4 het	15,78	1,83	5,52E-01	12,2	1,89	1,07E+00	0,52

Tabella 28: risultato analisi RTq-PCR. Sono riportati per ogni campione *take off*, efficienza di amplificazione (E), *comparative concentration* (Comp. Conc.) - ottenuti per il gene test (rs582447) e per il gene di riferimento (ACTB) - e il rapporto gene test/gene di riferimento (gene test/gene rif.). (nd = non definito)

In questo caso particolare l'array-CGH mostra un log ratio = 0.3 a livello del cromosoma 2q23.3q24.3.

Nei casi di duplicazioni costituzionali il valore atteso per il rapporto (DNA test /DNA riferimento) è pari a 0.58 ($\log_2 3/2 = 0.58$).

Un valore compreso tra 0 e 0.58 è compatibile con una condizione di mosaicismo.

Nel paziente in questione il rapporto dei segnali (Cy5 paziente / Cy3 riferimento) è dato da:

[4]

$$\log_2 (\text{paziente/riferimento}) = 0.3 \rightarrow 2^{0.3} = 1.23$$

quindi

$$\text{paziente}/2 = 1.23 \rightarrow \log_2 (2.46/2) = 0.3$$

Tale dato è stato confermato con una RTq-PCR usando i *primers* successivamente impiegati per analizzare l'origine parentale (RFLP-RTqPCR).

Il risultato ottenuto è:

[5]

$$(\text{gene test} / \text{gene di riferimento}) = 1.222$$

La percentuale di cellule duplicate è stata determinata mediante la formula:

[6]

$$A+a+Xa=1.22$$

dove A è l'allele non duplicato, a è l'allele duplicato e X è la percentuale di cellule che presentano duplicazione.

In condizioni normali un eterozigote presenta 2 alleli in ugual quantità e il rapporto tra i segnali è pari a 1 (2/2); questo significa che ciascun allele contribuisce al segnale per un valore di 0.5 (cioè 1/2); in duplicazioni costitutive invece uno dei 2 alleli è presente in doppia copia e il segnale totale sarà pari a 1.5. Quindi ponendo $A = a = 0.5$ nella formula precedente si ottiene:

[7]

$$0.5+0.5+X(0.5) = 1.22 \rightarrow 1+X(0.5) = 1.22 \rightarrow X = (1.22 - 1)/0.5 \rightarrow X = 0.44$$

Pertanto, circa il 44% delle cellule presenta la duplicazione.

Un valore analogo è stato ottenuto anche con l'analisi dell'origine parentale.

Infatti il valore gene test/gene riferimento per il paziente è pari a 0.73 (tabella 37).

Questo significa che l'allele duplicato è quello non tagliato ossia quello paterno.

Come descritto nella tabella 15 se è duplicato l'allele non tagliato il rapporto atteso è pari a 1 per una duplicazione costitutiva.

Diversamente dalle analisi precedenti (RTq-PCR e *array-CGH*) nella RFLP-RTq-PCR viene preso in considerazione un solo allele (a) pertanto la formula [6] si modifica in:

[8]

$$A+a+Xa = 0.73$$

$$A=0$$

$$a=0.5,$$

quindi

[9]

$$a+Xa = 0.73$$

$$0.5+X(0.5)= 0.73 \rightarrow X = (0.73-0.5)/0.5 = 0.46$$

Ovvero circa il 46% delle cellule presenta la duplicazione.

Per avere un'ulteriore conferma è stata messa a punto una *radiolabeld PCR/RFLP*.

È stato amplificato il frammento contenente lo SNP rs582447 G>T (l'unico risultato informativo) nel paziente, nei suoi genitori e in alcuni controlli. L'amplificato ottenuto è stato marcato con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP seguendo il protocollo "*last hot cycle*" (Sacconi et al., 2008). Gli amplificati sono stati quindi digeriti, separati su gel di poliacrilamide infine visualizzati e quantificati mediante *Storm Phosphorimager* (Molecular Dynamics).

Per ogni *lane* di carico è stato calcolato il rapporto dei singoli alleli (digerito e non digerito), rispetto alla totalità del segnale emesso:

[10]

$$\% a = [a / (A+a)] \times 100$$

$$\% A = [A / (A+a)] \times 100$$

Dove **a** e **A** sono i due alleli **G** e **T** rispettivamente (rs582447 G>T).

La madre del paziente è risultata eterozigote, mostrando due valori prossimi al 50% (0,54 e 0,46, per G e T rispettivamente), il padre, invece, è omozigote G (100% del segnale a carico della banda di G). Nel paziente, infine, il valore dei segnali risulta essere ~ 0,7 per l'allele G e ~ 0,3 per l'allele T; dato che conferma sia l'origine paterna dell'allele duplicato, sia la percentuale di cellule con l'alterazione.

Riprendendo l'equazione [9]:

$$a+aX = 0,7$$

$$a=0,5$$

$$X=0,4 \rightarrow 40\%$$

Caso # 5144

L'*array-CGH* ha evidenziato una delezione di 1.33 Mb a livello del cromosoma 3q29 [197393261 bp→198723053 bp].

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* ha evidenziato la presenza di numerose duplicazioni segmentali con omologia di sequenza pari a ~ 96 % che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

All'interno della regione deleta sono stati analizzati i seguenti marcatori microsatelliti: D3S1272, D3S1311.(figura 34).



Figura 35: risultato microsatellite D3S1272 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

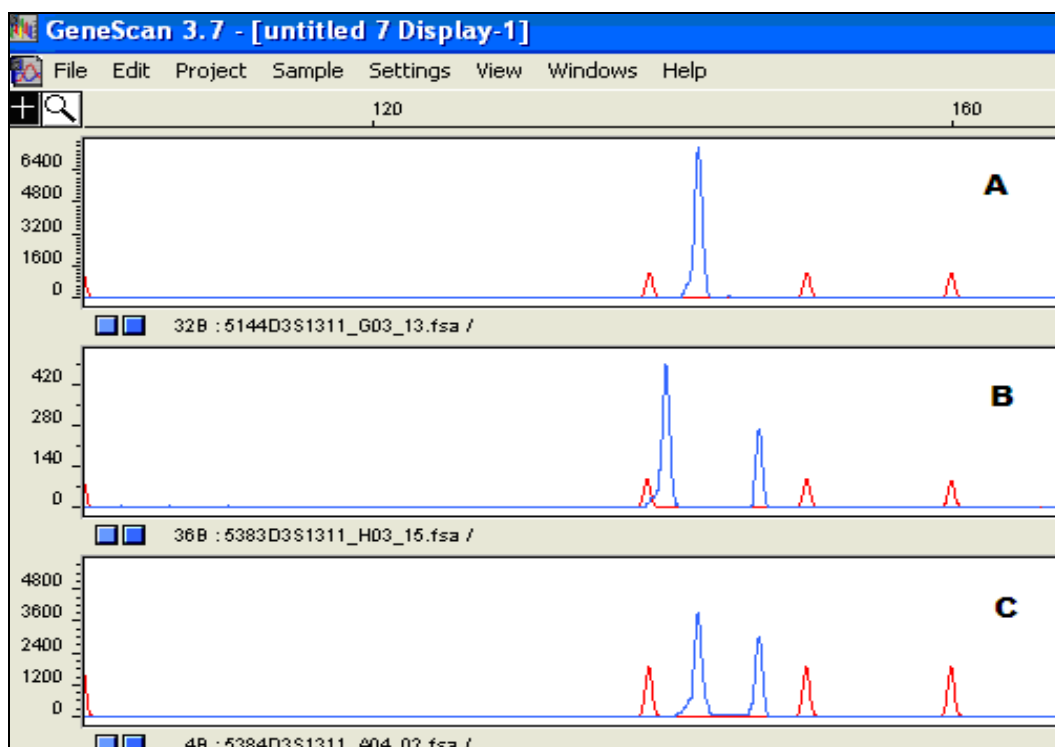


Figura 36: risultato microsatellite D3S1311 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

Caso # 5085

L'array-CGH ha evidenziato una delezione di 9.47 Mb a livello del cromosoma 4q28.3q31.22 [135844470 bp→145316133 bp].

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* non ha evidenziato la presenza duplicazioni segmentali che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

Per cui le sequenze di DNA che costituiscono i *breakpoints* sono state allineate mediante il *software Pipmaker* che ha evidenziato un'omologia di sequenza media pari a ~ 80%.

All'interno della regione deleta sono stati analizzati i seguenti marcatori microsatelliti: D4S1565, D4S1515, D4S2981.(figura 37).

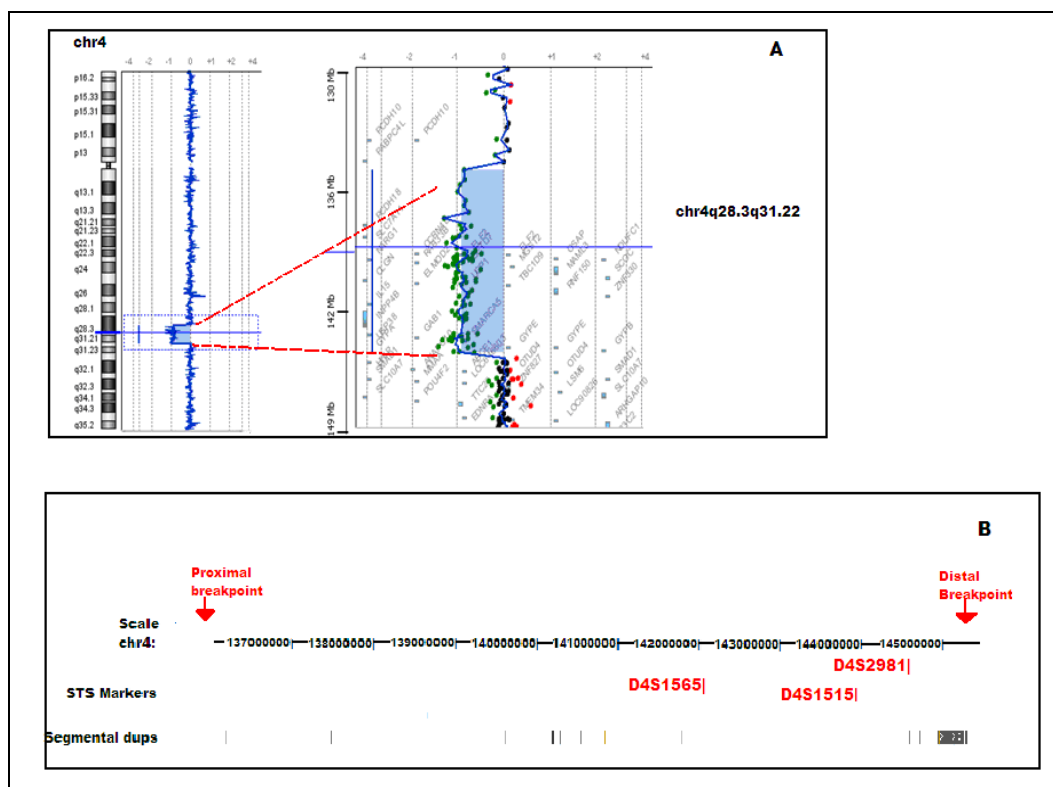


Figura 37: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In tabella 30 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di microsatelliti mentre in figura 38 e 39 sono riportati i grafici ottenuti dall'analisi con il *software Genescan* per i marcatori che sono risultati informativi.

STS	Probando	Padre	Madre	Origine
D4S2981	NI	NI	NI	paterna
D4S1515	246/-	218/226	246/246	
D4S1565	135/-	131/131	133/135	

Tabella 30: risultato analisi microsatelliti. NI = non informativo.



Figura 38: risultato microsatellite D4S1515 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

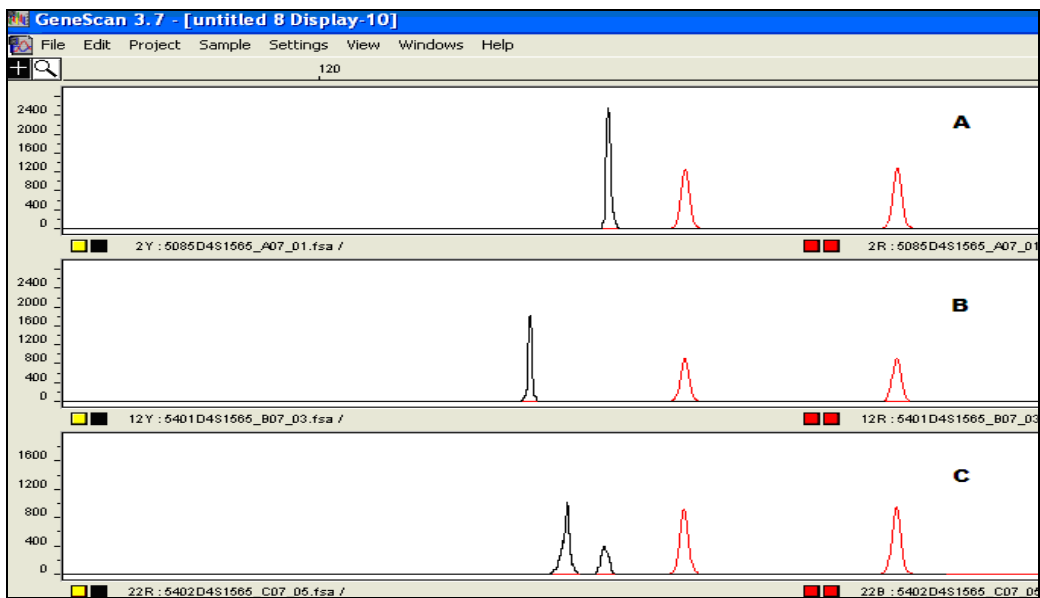


Figura 39: risultato microsatellite D4S1565 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

Caso # 4392

L'array-CGH ha evidenziato una delezione di 4.9 Mb a livello del cromosoma 8p23.1 [7290597 bp→12285523 bp].

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* ha evidenziato la presenza di numerose duplicazioni segmentali con omologia di sequenza ~ 95 % che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

All'interno della regione deleta sono stati analizzati i seguenti marcatori microsatelliti: D8S1721, D8S520, D8S550 (figura 40).

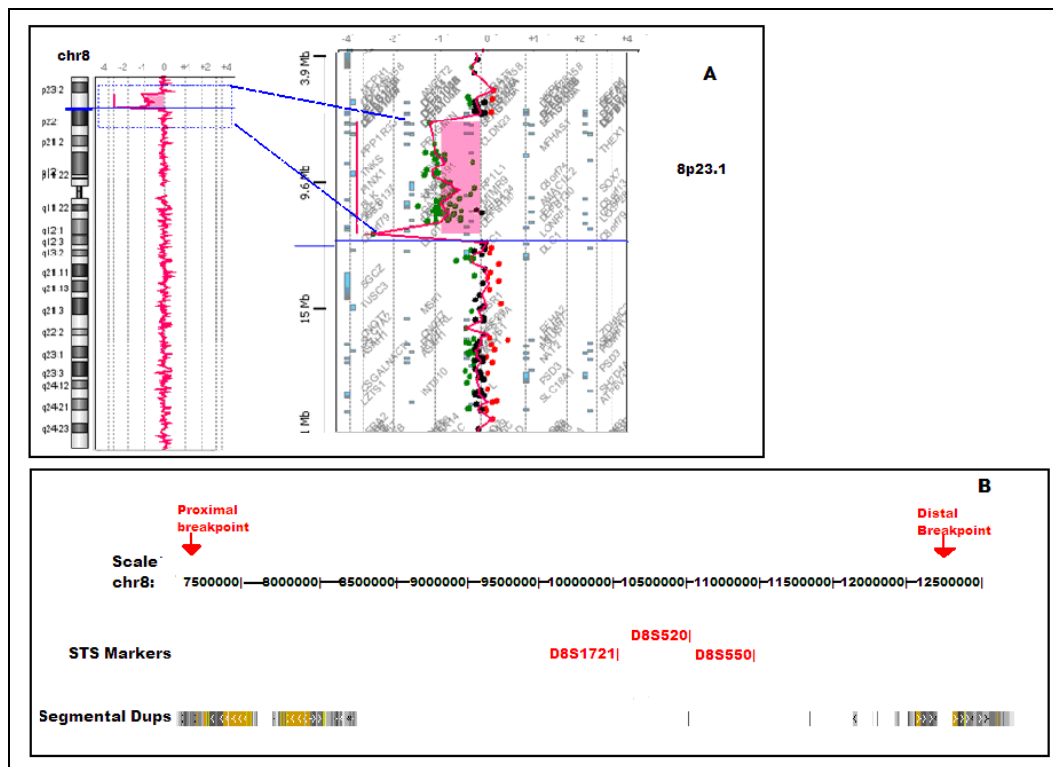


Figura 40: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In tabella 31 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di microsatelliti mentre in figura 41, 42 e 43 sono riportati i grafici ottenuti dall'analisi con il *software Genescan* per i marcatori analizzati.

STS	Probando	Padre	Madre	Origine
D8S1721	204/-	202/204	170/170	materna
D8S520	198/-	190/198	196/196	
D8S550	94/-	94/100	100/118	

Tabella 31: risultato analisi microsatelliti.

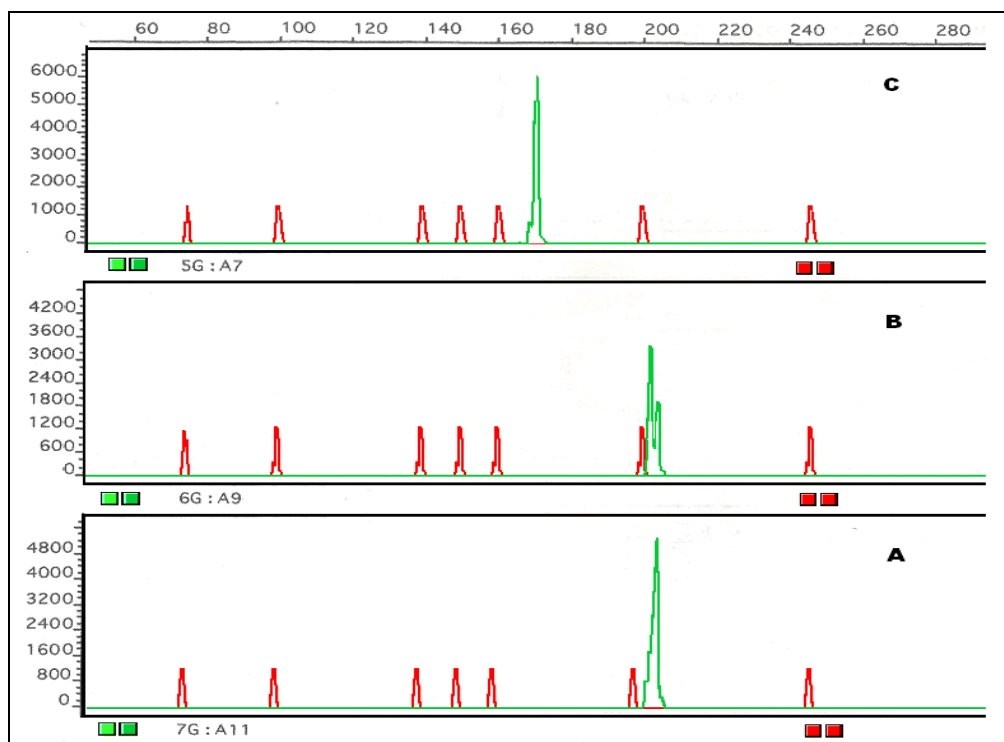


Figura 41: risultato microsatellite D8S1721 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

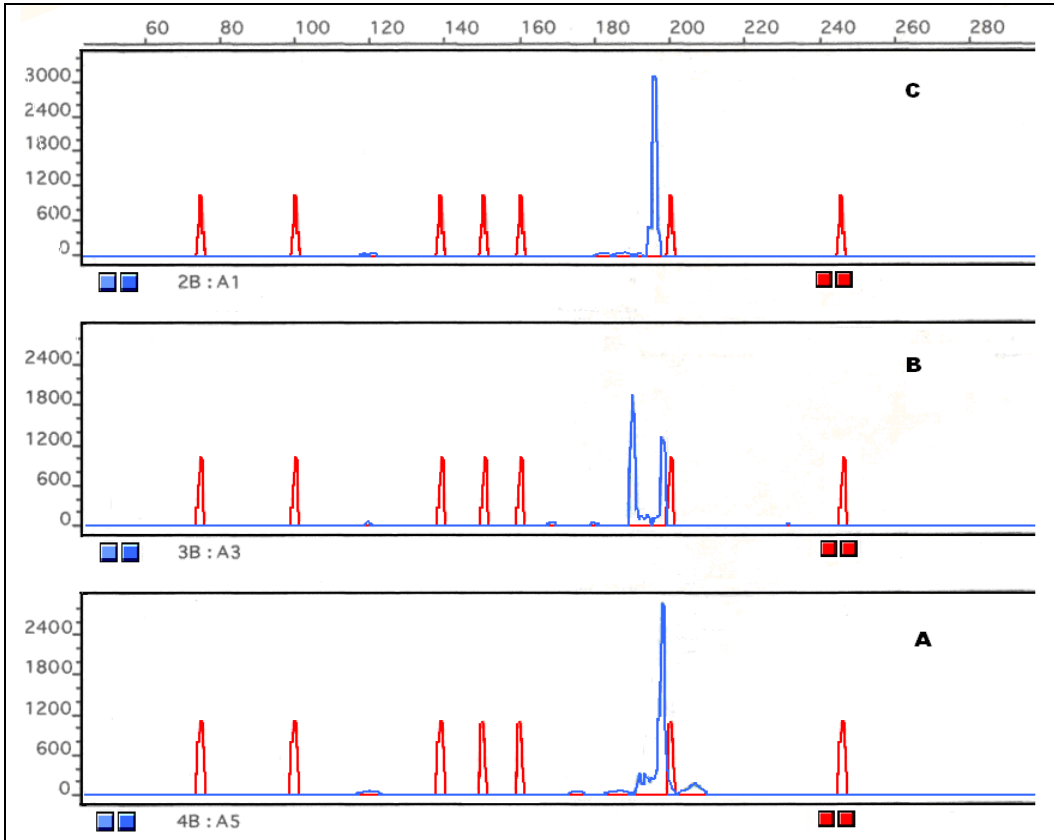


Figura 42: risultato microsatellite D8S520 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

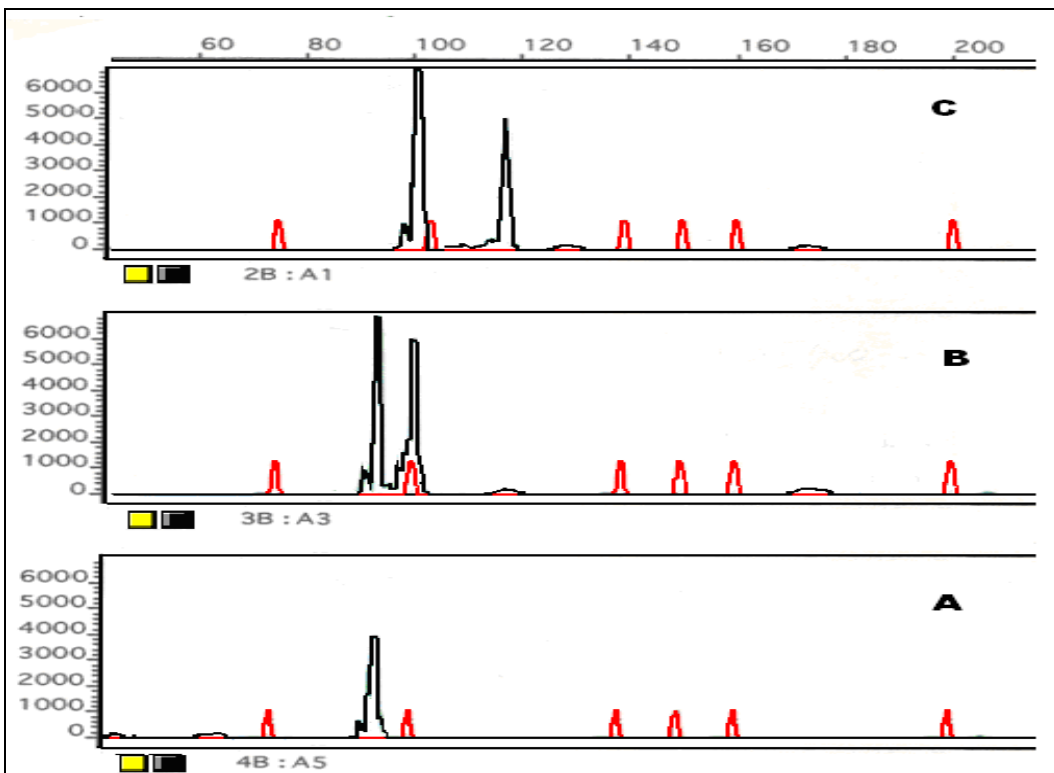


Figura 43: risultato microsatellite D8S550 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

Caso # 5099

L'array-CGH ha evidenziato una delezione di 3.54 Mb a livello del cromosoma 8p23.1 [8229404 bp→1170357 bp].

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* ha evidenziato la presenza di numerose duplicazioni segmentali con omologia di sequenza di ~ 95 % che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

All'interno della regione deleta sono stati analizzati i seguenti marcatori microsatelliti: D8S1721, D8S520, D8S550 (figura 44).

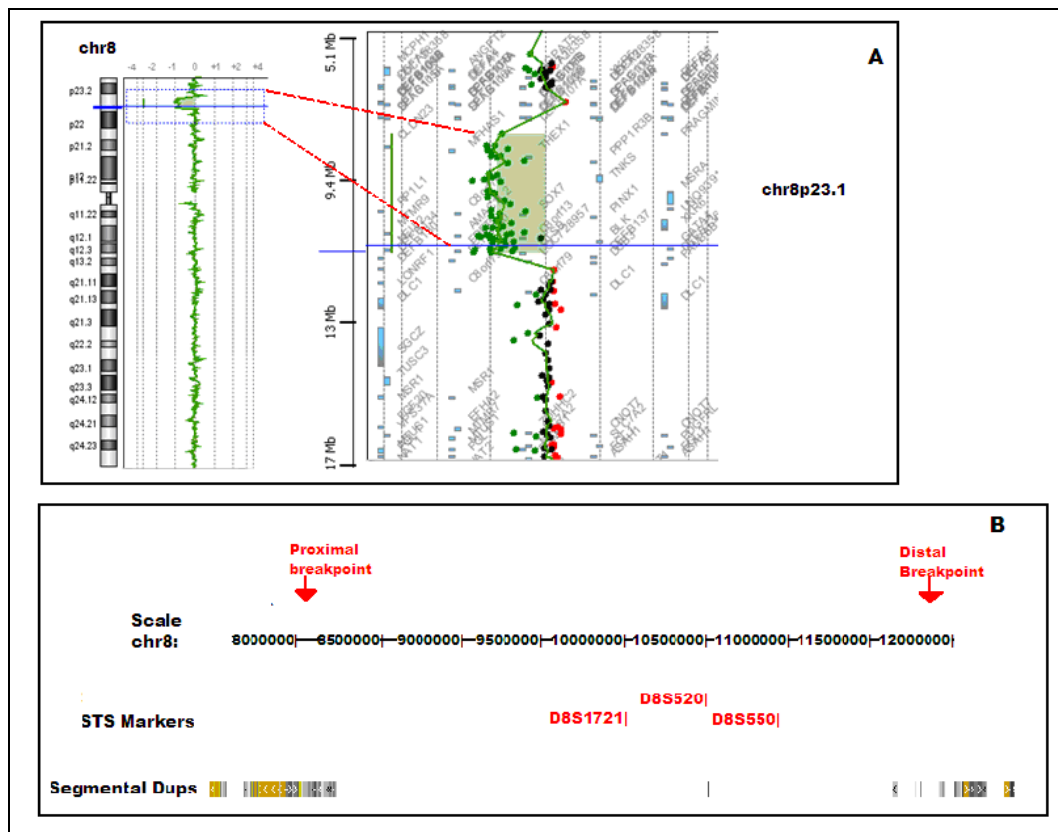


Figura 44: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In tabella 32 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di microsatelliti mentre in figura 45 e 46 sono riportati i grafici ottenuti dall'analisi con il *software Genescan* per i marcatori che sono risultati informativi.

STS	Probando	Padre	Madre	Origine
D8S1721	NI	NI	NI	materna
D8S520	180/-	180/196	196/198	
D8S550	103/-	103/103	101/115	

Tabella 32: risultato analisi microsatelliti. NI = non informativo.

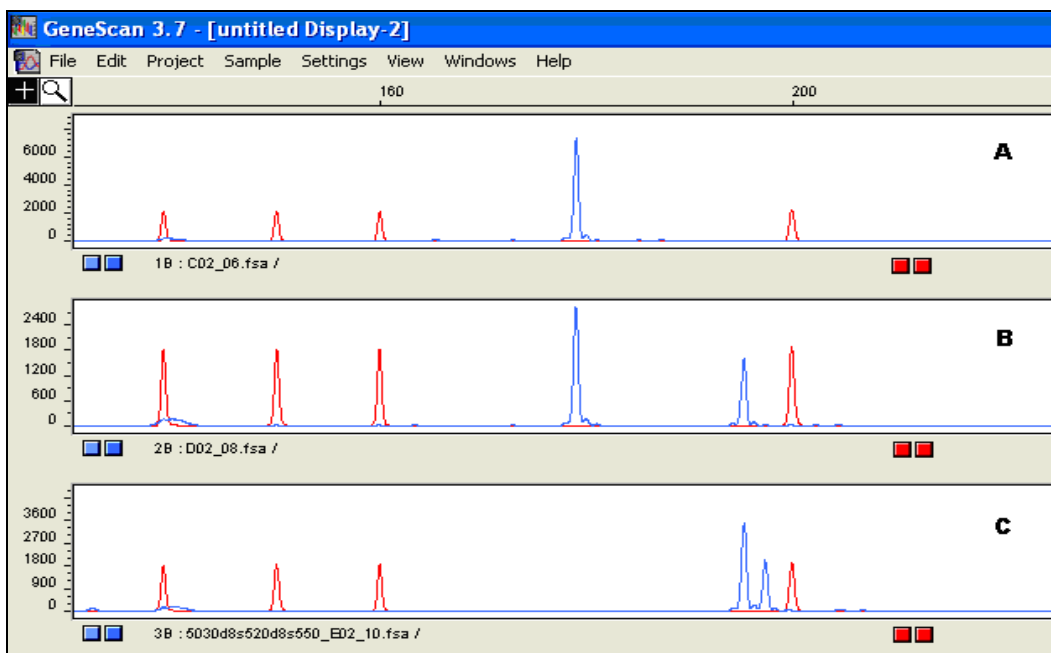


Figura 45: risultato microsatellite D8S520 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

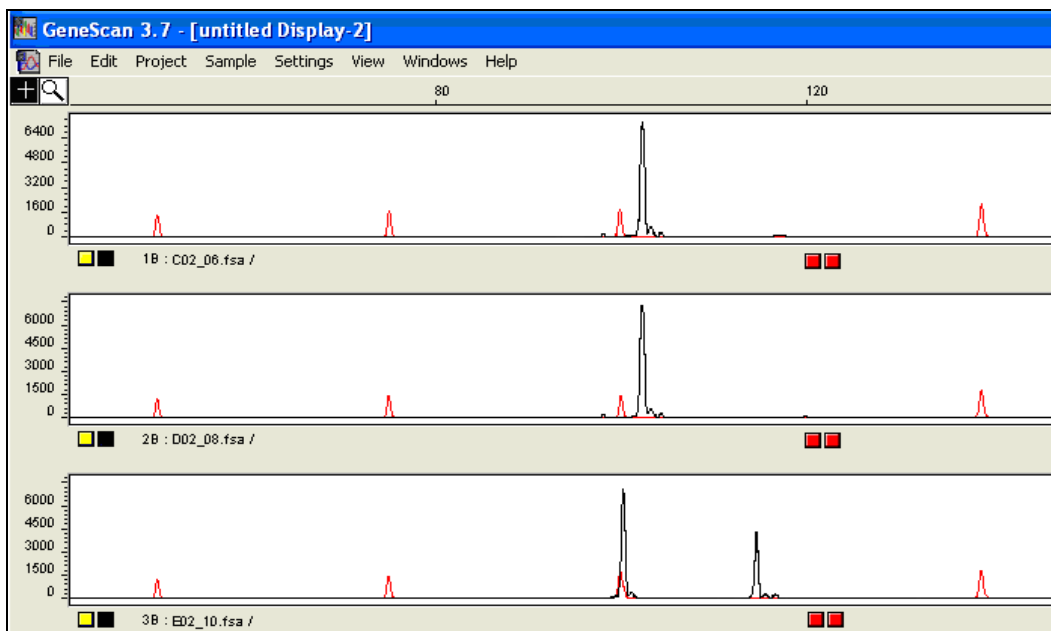


Figura 46: risultato microsatellite D8S550 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

Caso # 5136

L'*array-CGH* ha evidenziato una delezione di 4.3 Mb a livello del cromosoma 6q27 [166434362 bp→170734227 bp] e una duplicazione di 9.5 Mb sul cromosoma 8q24.23q24.3 [136728904 bp→146250824 bp].

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* non ha evidenziato la presenza duplicazioni segmentali che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

Per cui le sequenze di DNA che costituiscono i *breakpoints* sono state allineate mediante il *software Pipmaker* che ha evidenziato un'omologia di sequenza media pari a ~ 75% per entrambi i riarrangiamenti.

All'interno della regione deleta (6q27) si sono analizzati i marcatori microsatelliti D6S264, D6S297, D6S281, mentre all'interno della regione duplicata (8q24.23q24.3) sono stati analizzati i polimorfismi rs62522177 C>T, rs7841697 A>G, rs62525626 G>T (figura 47, 48).

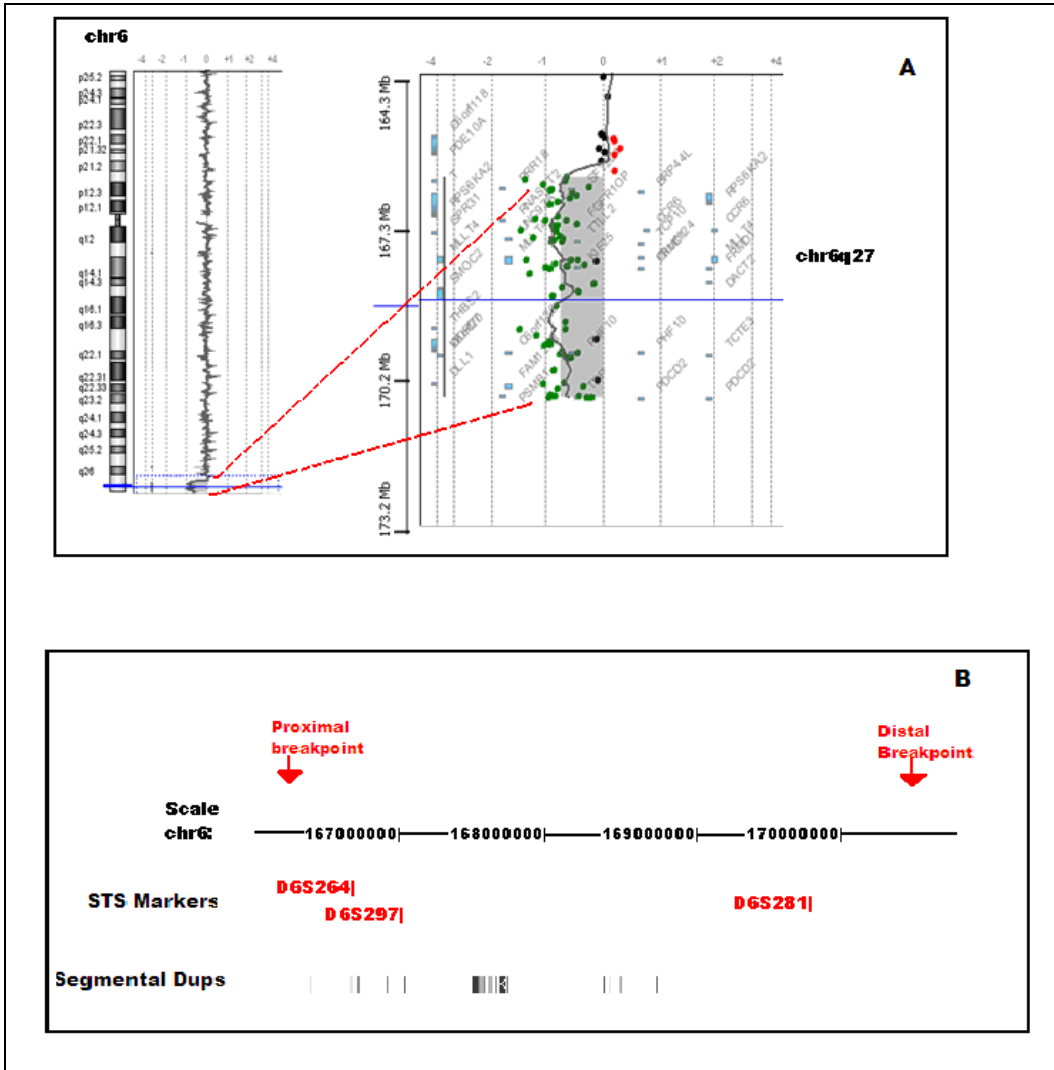


Figura 47: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

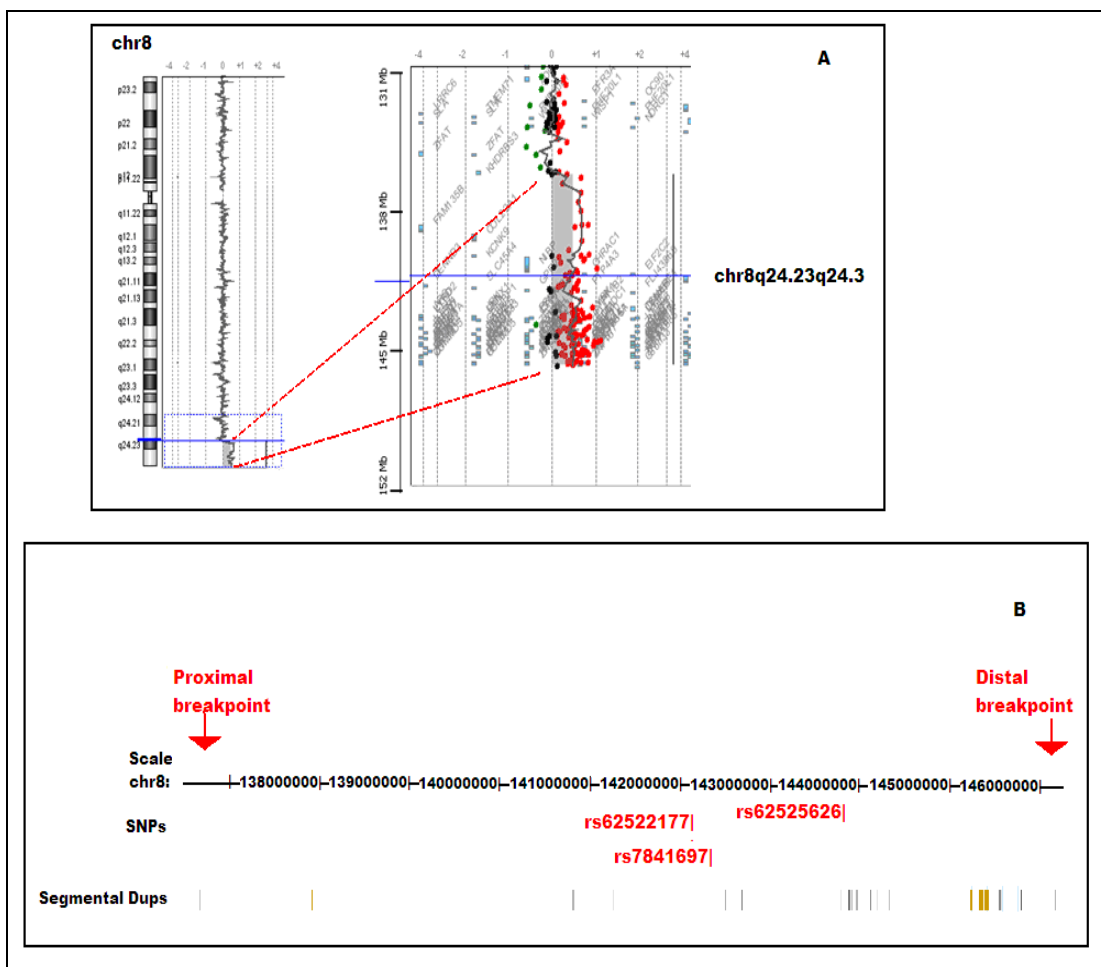


Figura 48: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In tabella 33 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di microsatelliti per determinare l'origine parentale della delezione in 6q27. In figura 49 è riportato il grafico ottenuto dall'analisi con il *software Genescan* per il marcatore che è risultato informativo.

STS	Probando	Padre	Madre	Origine
D6S264	115/-	107/107	107/115	paterna
D6S297	NI	NI	NI	
D6S281	NI	NI	NI	

Tabella 33: risultato analisi microsatelliti. NI = non informativo.

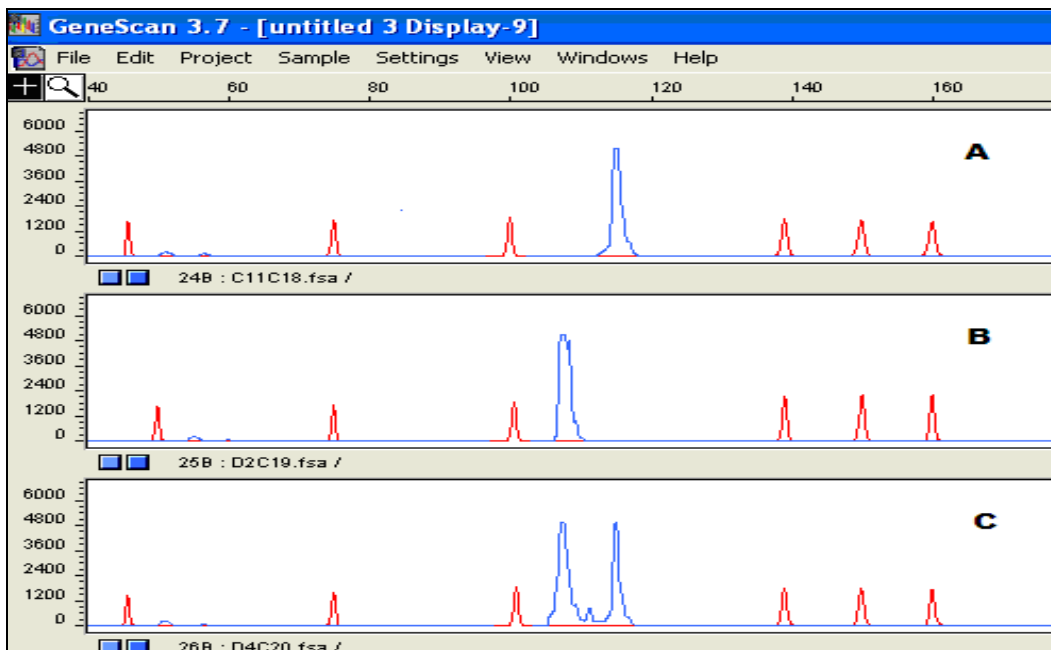


Figura 49: risultato microsatellite D6S264 nel probando (A), nel padre (B) e nella madre (C).

In figura 50 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi RFLP nella regione 8q24.23q24.3.

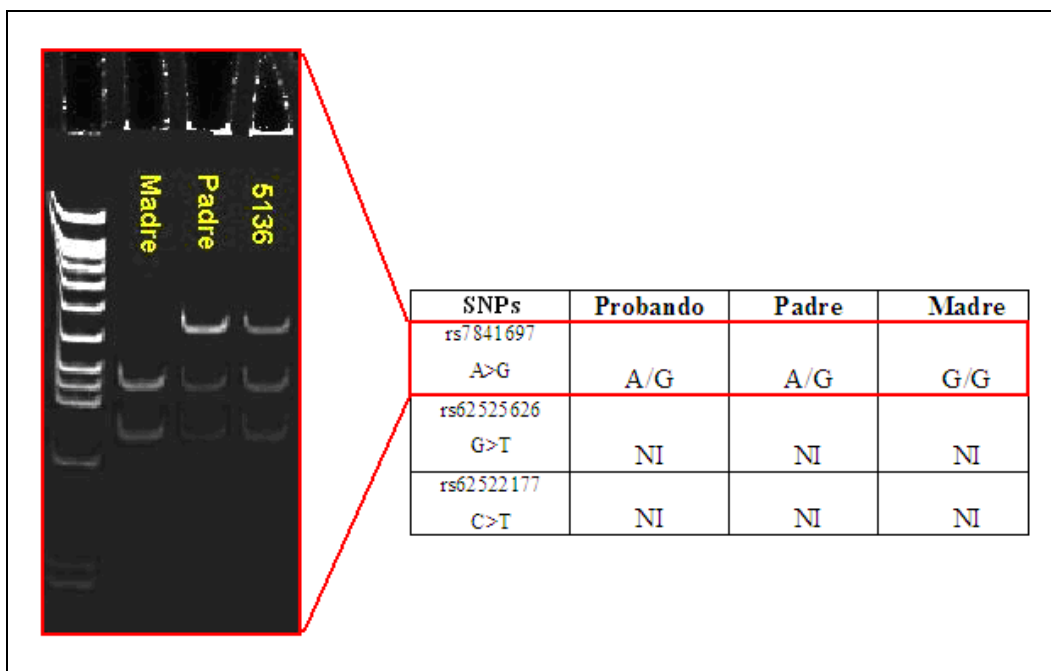


Figura 50: risultati analisi RFLP; foto gel di acrilammide per la separazione elettroforetica dei frammenti di restrizione del polimorfismo rs7841697. (NI = Non Informativo).

Il polimorfismo rs7841697 A>G è l'unico ad essere risultato informativo.

Per cui il prodotto della digestione è stato successivamente sottoposto a RTq-PCR (*Real time quantitative PCR*) per determinare quale dei 2 alleli sia duplicato e di conseguenza la sua origine parentale. I risultati sono riportati in tabella 34.

Campione	rs78411697 A>G			ACTB			Gene test/gene rif
	Take off	E	Comp. Conc.	Take off	E	Comp. Conc.	
C1 (calibratore) Omo NT	13	1,81	1,00E+00	11,1	1,83	1,00E+00	1,00
5136 het	13,65	1,79	6,85E-01	10,68	1,86	1,30E+00	0,53
Padre het	13,83	1,79	6,17E-01	10,81	1,86	1,20E+00	0,51
Madre OmoT	nd	-	-	11,1	1,83	1,00E+00	0,00
C2 het	13,84	1,78	6,17E-01	10,93	1,85	1,11E+00	0,56
C3 het	13,96	1,77	5,77E-01	11,04	1,83	1,04E+00	0,55
C4 OmoNT	12,56	1,78	1,29E+00	10,81	1,87	1,20E+00	1,08

Tabella 34: risultato analisi RTq-PCR. Sono riportati per ogni campione *take off*, efficienza di amplificazione (E), *comparative concentration* (Comp. Conc.) - ottenuti per il gene test (rs78411697) e per il gene di riferimento (ACTB) - e il rapporto gene test/gene di riferimento (gene test/gene rif.). (nd = non definito)

Il valore gene test / gene riferimento per il paziente è pari a 0.53. Questo significa che l'allele duplicato è quello tagliato ossia quello materno (tabella 15).

Caso # 5166

L'*array-CGH* ha evidenziato una duplicazione di 9.4 Mb e una delezione di 414 Kb a livello del cromosoma 16 in posizione 16q21q22.1 [56788137 bp → 66203027 bp] e 16q22.3 [69976196 bp → 70400340 bp] rispettivamente.

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* non ha evidenziato la presenza duplicazioni segmentali che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

Per cui le sequenze di DNA che costituiscono i *breakpoints* sono state allineate mediante il *software Pipmaker* che ha evidenziato un'omologia di sequenza media pari a ~ 70% per entrambi i riarrangiamenti.

All'interno della regione duplicata (16q21q22.1) sono stati analizzati i polimorfismi rs2042405 C>G, rs12446607 A>G, rs74705268 mentre all'interno della regione deleta (16q22.3) è stato analizzato il marcatore microsatellite D16S485 (figura 51, 52).

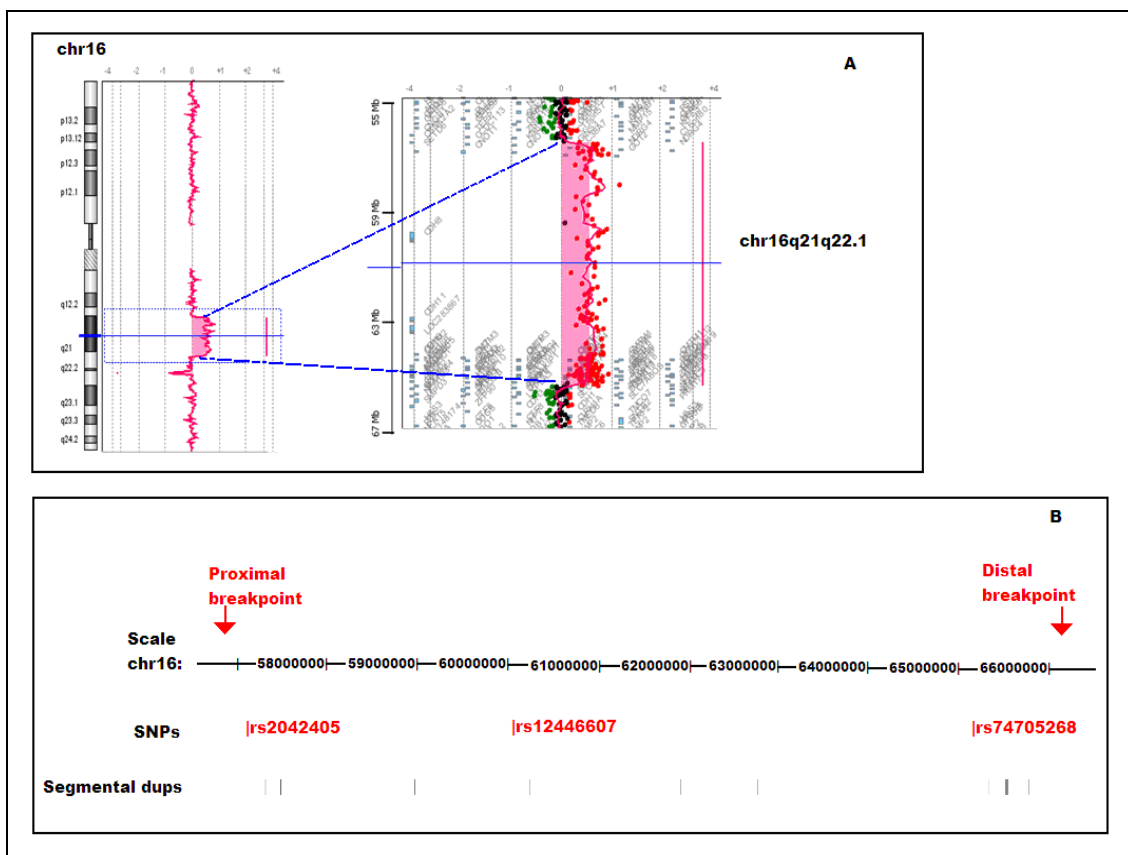


Figura 51: grafico array CGH (A); SNPs analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

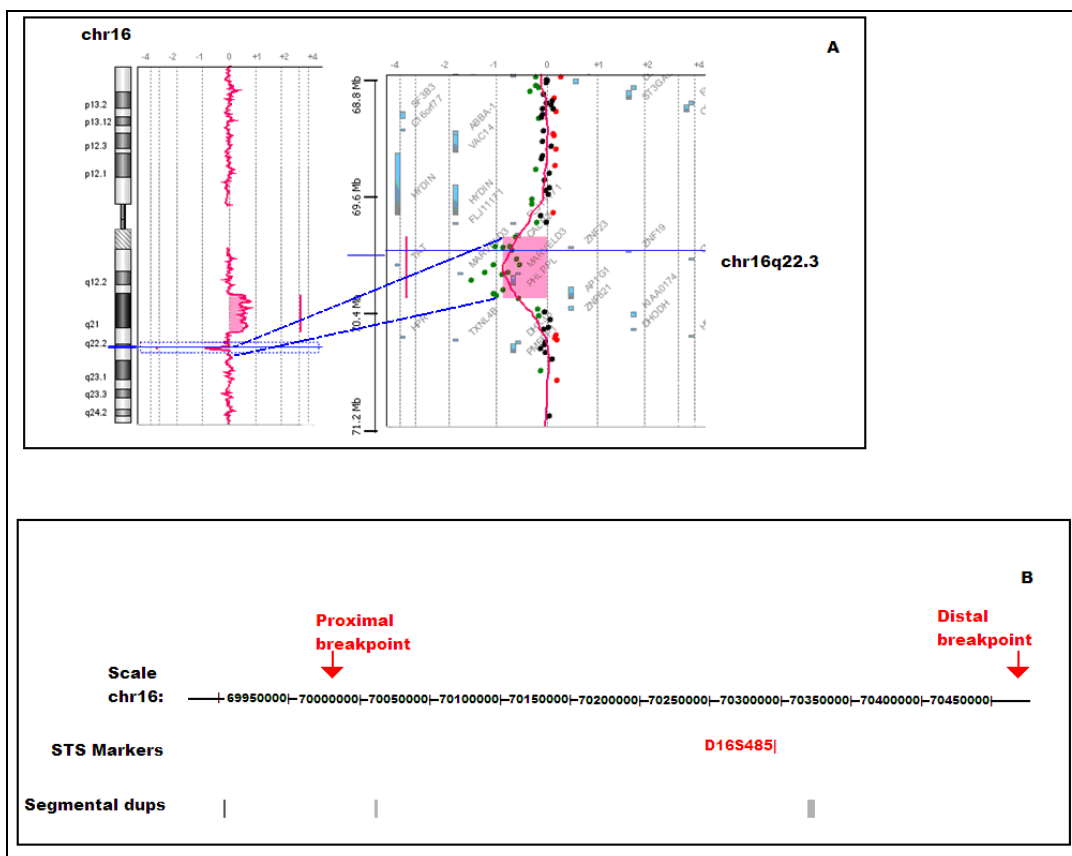


Figura 52: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In figura 53 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi RFLP nella regione 16q21q22.1.

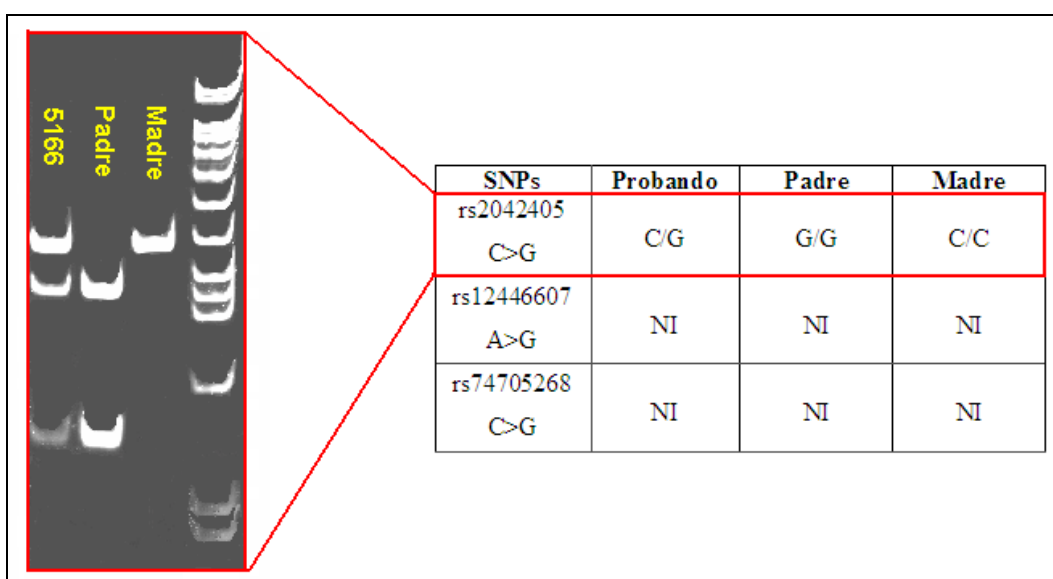


Figura 53: risultati analisi RFLP; foto gel di acrilammide per la separazione elettroforetica dei frammenti di restrizione del polimorfismo rs2042405. (NI = Non Informativo).

Il polimorfismo rs2042405 C>G è l'unico ad essere risultato informativo.

Per cui il prodotto della digestione è stato successivamente sottoposto a RTq-PCR (*Real time quantitative PCR*) per determinare quale dei 2 alleli sia duplicato e di conseguenza la sua origine parentale. I risultati sono riportati in tabella 35.

Campione	rs2042405 C>G			ACTB			Gene test/gene rif
	Take off	E	Comp. Conc.	Take off	E	Comp. Conc.	
C1 (calibratore) Omo NT	11,6	1,78	1,00E+00	11,5	1,89	1,00E+00	1,00
5166 het	12,14	1,79	7,32E-01	11,97	1,89	7,41E-01	0,99
Padre Omo T	nd	-	-	11,44	1,96	1,04E+00	0,00
Madre OmoNT	11,41	1,81	1,12E+00	11,18	1,91	1,23E+00	0,91
C2 het	13	1,8	4,40E-01	11,83	1,68	8,42E-01	0,52
C3 het	13,12	1,81	4,07E-01	12,1	1,77	7,10E-01	0,57
C4 OmoNT	12,17	1,8	7,17E-01	12,13	1,76	7,02E-01	1,02

Tabella 35: risultato analisi RTq-PCR. Sono riportati per ogni campione *take off*, efficienza di amplificazione (E), *comparative concentration* (Comp. Conc.) - ottenuti per il gene test (rs20422405) e per il gene di riferimento (ACTB) - e il rapporto gene test/gene di riferimento (gene test/gene rif.). (nd = non definito)

Il valore gene test / gene riferimento per il paziente è pari a 0,99. Questo significa che l'allele duplicato è quello non tagliato ossia quello materno (tabella 16).

In tabella 36 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di microsatellite per determinare l'origine parentale della delezione in 16q22.3.

STS	Probando	Padre	Madre	Origine
D16S485	NI	NI	NI	nd

Tabella 36: risultato analisi microsatelliti. NI = non informativo. Nd = non definita.

Caso # 5040

L'array-CGH ha evidenziato una delezione di 627,33 Kb a livello del cromosoma 17q21.31 [41073486 bp→41700815 bp].

L'analisi dei punti di rottura con *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplications Database* ha evidenziato la presenza di numerose duplicazioni segmentali con omologia di sequenza pari a ~ 98 % che potrebbero aver mediato il riarrangiamento.

All'interno della regione deleta sono stati analizzati i seguenti marcatori microsatelliti: D17S612, MAPT-17.(figura 54).

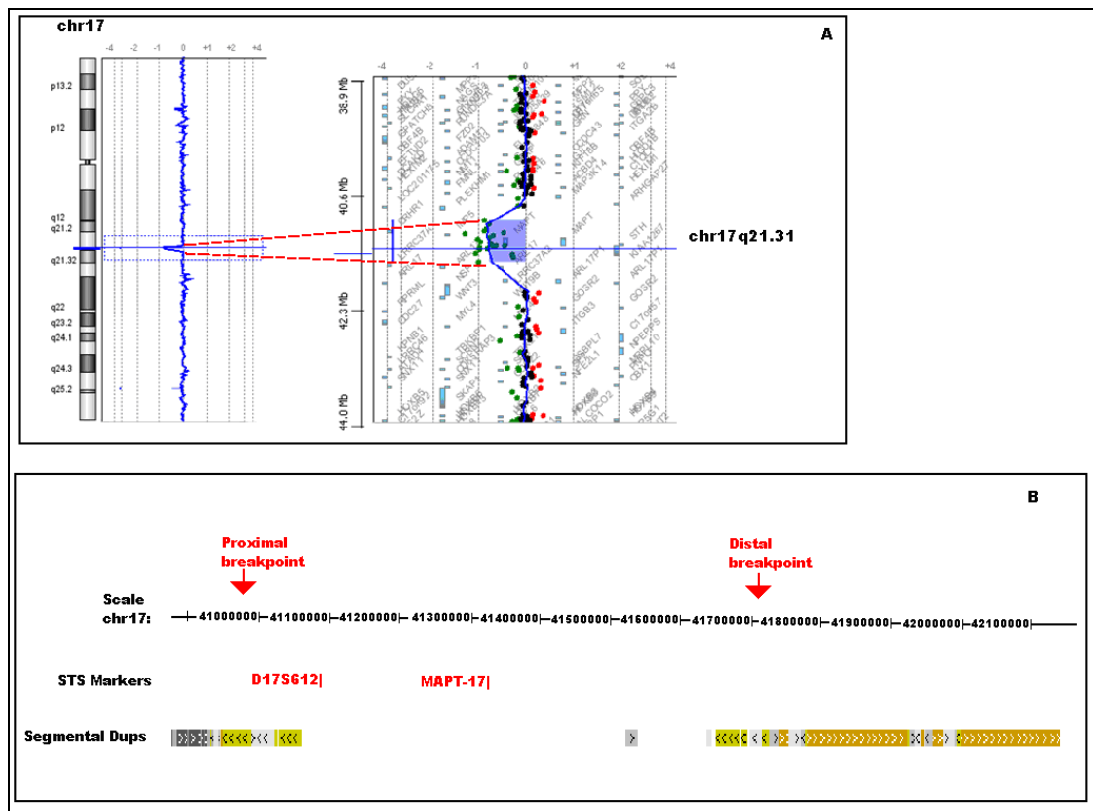


Figura 54: grafico array CGH (A); marcatori microsatelliti analizzati e duplicazioni segmentali presenti nella regione cromosomica interessata dal riarrangiamento (B).

In tabella 37 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di microsatelliti.

STS	Probando	Padre	Madre	Origine
D17S612	NI	NI	NI	nd
MAPT-17	NI	NI	NI	

Tabella 37: risultato microsatelliti. NI = non informativo. Nd = non definita.

In figura 55 e in tabella 38 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi RFLP per le duplicazioni in 17p13.1p11.2 e 6q22.2q22.31 rispettivamente.

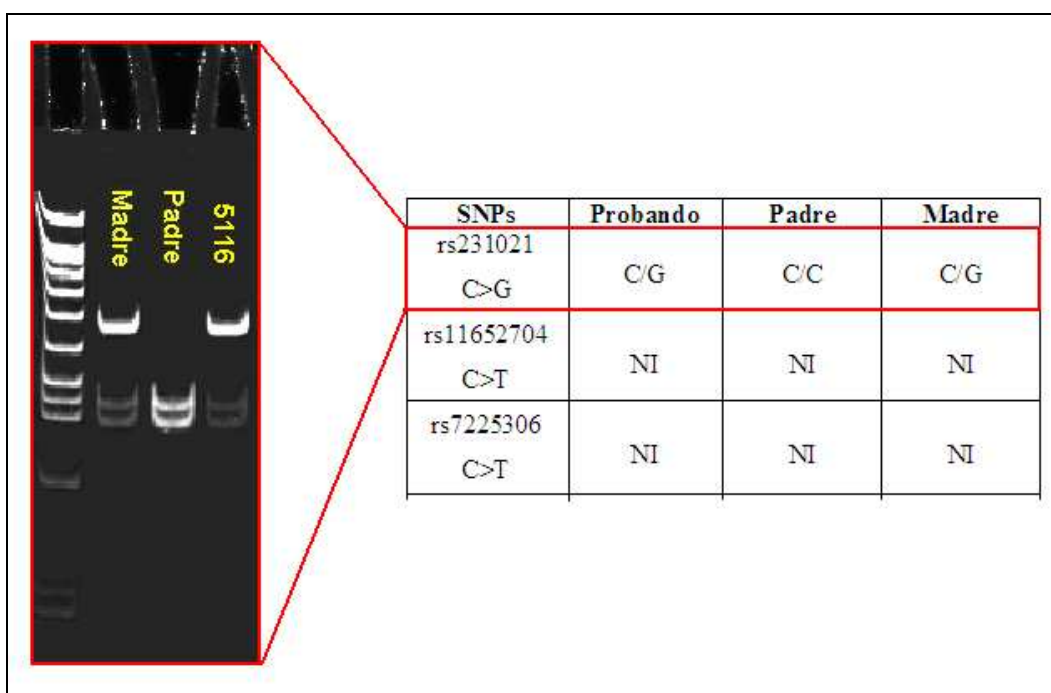


Figura 55: risultati analisi RFLP; foto gel di acrilammide per la separazione elettroforetica dei frammenti di restrizione del polimorfismo rs231021. (NI = Non Informativo).

SNPs	Probando	Padre	Madre
rs35237407 A>G	NI	NI	NI
rs35957877 A>T	NI	NI	NI
rs11153780 C>G	NI	NI	NI

Tabella 38: risultato analisi RFLP. NI = non informativo.

Il polimorfismo rs231021 C>G è l'unico ad essere risultato informativo.

Quindi il prodotto della digestione è stato successivamente sottoposto a RTq-PCR (*Real time quantitative PCR*) per determinare quale dei 2 alleli sia duplicato e di conseguenza la sua origine parentale. I risultati sono riportati in tabella 39.

Per la duplicazione in 6q22.2q22.31 non è stato possibile definire l'origine parentale in quanto nessuno degli SNPs analizzati è risultato informativo.

Campione	rs231021 C>G			ACTB			Gene test/gene rif
	Take off	E	Comp. Conc.	Take off	E	Comp. Conc.	
C1 (calibratore) Omo NT	13,9	1,75	1,00E+00	11,8	1,87	1,00E+00	1,00
5116 het	13,8	1,75	1,06E+00	11,82	1,84	9,90E-01	1,07
Padre Omo T	nd	-	-	12,34	1,85	7,19E-01	0
Madre het	14,66	1,76	6,49E-01	11,51	1,88	1,20E+00	0,54
C2 het	15,61	1,77	3,76E-01	12,3	1,86	7,34E-01	0,51
C3 Omo T	nd	-	-	12,2	1,86	7,81E-01	0
C4 Omo NT	14,2	1,76	8,44E-01	12,03	1,86	8,65E-01	0,98

Tabella 39: risultato analisi RTq-PCR. Sono riportati per ogni campione *take off*, efficienza di amplificazione (E), *comparative concentration* (Comp. Conc.) - ottenuti per il gene test (rs231021) e per il gene di riferimento (ACTB) - e il rapporto gene test/gene di riferimento (gene test/gene rif.). (nd = non definito)

Il valore gene test/ gene riferimento per il paziente è pari a 1.07. Questo significa che l'allele duplicato è quello non tagliato ossia quello materno (tabella 15).

Di seguito è riportata una tabella riassuntiva dei risultati ottenuti.

Caso #	Fenotipo	Caratterizzazione mediante a-cgh	Posizione cromosomica (bp)	Dimensioni	Origine	Omologia ai breakpoints
4973	Ritardo psicomotorio, microcefalia e dismorfismi	del (1p36.33p36.32)	1039874→2532312	1.49 Mb	pat	~ 75%
5095	Ritardo psicomotorio, epilessia, ipotonia generalizzata, ipoacusia neurosensoriale, criptorchidismo	del (1p36.33p36.31)	554268→6618291	6.1 Mb	mat	~ 75%
4461	Ritardo psicomotorio, macrocefalia, dilatazione tetraentricolare, dismorfismi	dup (9p24.2p13.1)	204367→39277118	39 Mb	mat	~ 98% LCRs
5116	Ritardo psico-motorio, ipotonia, dismorfismi	dup (6q22.2q22.31) dup (17p13.1p11.2)	117844129→119512023 7401533→18845678	1,67 Mb 11,44 Mb	mat nd	~ 80%
4509	Ritardo mentale, microcefalia, dismorfismi	del (18p11.32p11.21)	170229→13875315	13.7Mb	pat	~ 70%
4904	Ritardo mentale, lieve ginecomastia, ridotto volume testicolare	del (18q21.33q22.2)	58324742→64904670	6.57Mb	pat	~ 75%

Caso #	Fenotipo	Caratterizzazione mediante a-cgh	Posizione cromosomica (bp)	Dimensioni	Origine	Omologia ai breakpoints
5007	Microcefalia, ritardo psicomotorio, dimorfismi cranio-facciali	dup (18p11.32p11.21)	170229→14918854	14,74 Mb	mat	~ 65%
4512	Difficoltà di apprendimento, ugola bifida, lievi dismorfismi, anomalie vascolari	del (22q11.21)	17276972→19712953	2.43Mb	mat	~ 97% LCRs
4603	Dimorfismi facciali, ugola bifida, cardiopatia congenita complessa	del(22q11. 21)	17276972→19712953	2.43Mb	mat	~ 97% LCRs
5072	Difficoltà di apprendimento, deficit di attenzione ed iperattività, ugola bifida.	del(22q11. 21)	17276972→20128755	2,85 Mb	pat	~ 97% LCRs
5065	Ritardo mentale, dismorfismi	dup (2p16.1p15)	59866968→61969259	2,1 Mb	nd	~ 75%
4901	Ritardo mentale, epilessia	dup (2q24.1q24.3) in mosaico	154592157→166073025	11.48Mb	pat	~ 75%
5144	Ritardo mentale, microcefalia, dimorfismi	del (3q29)	197393261→198723053	1,33 Mb	pat	~ 96% LCRs

Caso #	Fenotipo	Caratterizzazione mediante a-cgh	Posizione cromosomica (bp)	Dimensioni	Origine	Omologia ai breakpoints
5085	Ritardo psicomotorio, dismorfismi	del (4q28.3q31.22)	135844470→145316133	9,47 Mb	pat	~ 80%
4392	Malformazione cardiaca, microcefalia.	del (8p23.1)	7290597→12285523	4.9Mb	mat	~ 95% LCRs
5099	Malformazione cardiaca microcefalia, dismorfismi facciali e ritardo dello sviluppo psicomotorio	del (8p23.1)	8229404→11770357	3,54 Mb	mat	~ 95% LCRs
5136	Ritardo mentale, ventricolomegalia cerebrale asimmetrica, fibrolipoma del filum terminale, forame ovale pervio, lassità legamentosa alle articolazioni	del (6q27)	166434362→170734227	4,3 Mb	pat	~ 75%
		dup (8q24.23q24.3)	136728904→146250824	9,5 Mb	mat	
5166	Ritardo psicomotorio, dismorfismi	dup (16q21q22.1)	56788137→66203027	9,4 Mb	mat	~ 70%
		del (16q22.3)	69976196→70400340	414,14 Kb	nd	
5040	Ritardo dello sviluppo, ipotonia, dismorfismi facciali	del (17q21.31)	41073486→41700815	627,33 Kb	nd	~ 98% LCRs

Tabella 41: per ogni caso analizzato è riportata l'alterazione rilevata mediante array-CGH, i punti di rottura, le dimensioni, l'origine parentale e la presenza di omologia di sequenza ai punti di rottura.

6. DISCUSSIONE

Lo studio delle anomalie cromosomiche strutturali si è affermato negli ultimi anni come un potente mezzo per l'identificazione delle cause molecolari alla base di disordini genomici quali ritardo mentale, autismo, epilessia, disordini psichiatrici e anomalie congenite multiple (Shaffer & Bejjani 2006).

Ciò è dimostrato dal fatto che circa il 15% dei soggetti affetti da tali patologie, preventivamente investigati tramite analisi di cariotipo, FRAXA e screening dei telomeri, risultano positivi all'analisi per microarray (Vissers, de Vries et al. 2003; Shaw-Smith, Redon et al. 2004).

Da circa 10 anni è emerso sempre più chiaramente che l'analisi citogenetica convenzionale è del tutto insufficiente a rilevare anomalie cromosomiche inferiori alle 5-10 Mb che, seppur di dimensioni submicroscopiche, possono associarsi a ritardo mentale e anomalie fenotipiche.

Questo limite è stato da qualche anno superato dall'introduzione di una tecnica di citogenetica molecolare, l'*array-CGH*, che permette un'analisi completa e precisa delle variazioni del numero di copie delle sequenze di DNA e consente di valutare contemporaneamente e con alta specificità più regioni cromosomiche in modo da poter evidenziare sbilanciamenti.

Nell'ultimo decennio con l'introduzione di *array genome wide*, è risultato evidente che i meccanismi molecolari alla base dei disordini genomici sono correlati a riarrangiamenti di particolari regioni, suscettibili più di altre ad andare incontro a ricombinazioni aberranti.

Diversi studi hanno evidenziato infatti la presenza di alcuni segmenti (sequenze SINE, LINE, LCRs) che causano un alto grado di instabilità genomica portando a riarrangiamenti cromosomici.

L'analisi dei *breakpoints* e la determinazione dell'origine parentale delle anomalie cromosomiche potrebbero aiutare a comprendere il loro meccanismo di formazione.

In questo progetto sono stati valutati, mediante *array CGH*, 66 soggetti che presentano ritardo mentale e/o dello sviluppo, autismo, anomalie congenite multiple e dimorfismi. Lo scopo è stato quello di verificare la presenza di

riarrangiamenti cromosomici criptici e caratterizzare in modo più preciso le anomalie cromosomiche identificate grazie all'esame cromosomico ad alta definizione.

E' stata quindi determinata l'origine parentale dei riarrangiamenti mediante l'utilizzo di marcatori polimorfici (STR o RFLP) per definire se esiste un diverso tasso di mutazione nei due sessi. Infine sono stati analizzati i *breakpoints* per verificare la presenza di regioni di omologia che possano aver predisposto al riarrangiamento.

I risultati ottenuti dall'analisi *array-CGH* con una risoluzione media di circa 75 kb hanno evidenziato che il 16% dei pazienti (9/56) con fenotipo patologico e cariotipo normale è portatore di una delezione/duplicazione criptica, con dimensioni comprese tra 414 Kb e 11.48 Mb.

Inoltre è stato possibile definire con più precisione anomalie individuate mediante tecniche di citogenetica tradizionale; in 2 casi su 10 sono stati identificati degli sbilanciamenti cromosomici criptici.

L'analisi bioinformatica mediante *UCSC Genome Browser* e *Human Genome Segmental Duplication Database* delle regioni in cui ricadono i punti di rottura delle aberrazioni rilevate con *array-CGH*, ha indicato la presenza in 7 alterazioni su 22 di duplicazioni segmentali (*Low Copy Repeats* –LCRs-) >1Kb, con omologia di sequenza > 95%. Da quanto riportato in letteratura, le LCRs sembrano giocare un ruolo importante nel mediare la ricombinazione omologa non allelica, in quanto l'alta omologia di sequenza fa sì che il meccanismo cellulare di controllo della ricombinazione non sia in grado di riconoscere l'appaiamento di segmenti non perfettamente identici (Gu et al. 2008).

Nei restanti casi (15) l'analisi di sequenza con il software *Pipmaker* ha individuato la presenza ai *breakpoints* di corti frammenti (5-200 nt) con un'omologia media tra il 65-80 %.

Quindi si può ipotizzare che questi riarrangiamenti siano stati causati da eventi di NHEJ o FoSTeS per i quali sono sufficienti delle regioni di micro-omologia (Gu et al. 2008).

E' chiaro quindi che l'architettura del genoma agisce come catalizzatore dell'instabilità cromosomica causando riarrangiamenti genomici

Dallo studio dell'origine parentale è emerso che 10 anomalie cromosomiche strutturali (5 delezioni e 5 duplicazioni) sono di origine materna e 8 di origine paterna (7 delezioni e 1 duplicazione).

Questo sembra contraddire gli studi fatti fino ad ora che riportano una maggiore tendenza nella gametogenesi maschile alla formazione di riarrangiamenti cromosomici; tale fenomeno è stato attribuito a un maggior numero di divisioni premeiotiche delle cellule germinali (Thomas et al. 2006).

Tuttavia per il numero di soggetti analizzati, tali risultati non sono da considerare definitivi, quindi lo studio verrà portato avanti estendendo l'analisi ad un maggior numero di individui.

Inoltre verranno fatte indagini più approfondite (sequenziamento) sui punti di rottura per capire quali sono realmente i meccanismi che hanno causato il riarrangiamento.

BIBLIOGRAFIA

- Arlt M. F., et al. (2009). "Replication stress induces genome-wide copy number changes in human cells that resemble polymorphic and pathogenic variants." Am J Hum Genet 84(3): 339-350.
- Bruce R. K. (2000) "Genetica Umana" Ed. Springer
- Bruce R. K. (2001) "Genetica umana dal problema clinico ai principi fondamentali" Ed. Springer
- Buckley P. G., et al. (2005). "Copy-number polymorphisms: mining the tip of an iceberg." Trends Genet 21(6): 315-317.
- Burwinkel B. & M. W. Kilimann (1998). "Unequal homologous recombination between LINE-1 elements as a mutational mechanism in human genetic disease." J Mol Biol 277(3): 513-517.
- Chamberlin, J. & R. E. Magenis (1980). "Parental origin of de novo chromosome rearrangements." Hum Genet 53(3): 343-347.
- Chandley, A. C. (1991). "On the parental origin of de novo mutation in man." J Med Genet 28(4): 217-223.
- Conrad D. F., et al. (2006). "A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome." Nat Genet 38(1): 75-81.
- Diaz de Stahl T., et al. (2008). "Profiling of copy number variations (CNVs) in healthy individuals from three ethnic groups using a human genome 32 K BAC-clone-based array." Hum Mutat 29(3): 398-408.
- Eichler E. E. (1998). "Masquerading repeats: paralogous pitfalls of the human genome." Genome Res 8(8): 758-762.
- Forabosco A. et al. (2009). "Incidence of non-age-dependent chromosomal abnormalities: a population-based study on 88965 amniocenteses." Eur J Hum Genet 17(7): 897-903.
- Gu W. et al. (2008). "Mechanisms for human genomic rearrangements." Pathogenetics 1(1): 4.
- Hermann M., (2002). "An explanation of the comparative quantitation technique used in the Rotor-Gene analysis software" Corbett Research.

- Hinds D. A., et al. (2006). "Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome." Nat Genet 38(1): 82-85.
- Hurst L. D. & Ellegren H. (1998). "Sex biases in the mutation rate." Trends Genet 14(11): 446-452.
- Iafrate A. J. et al. (2004). "Detection of large-scale variation in the human genome." Nat Genet 36(9): 949-951.
- Itsara A. et al. (2009). "Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease." Am J Hum Genet 84(2): 148-161.
- Knight S. J. & Regan R. (2006). "Idiopathic learning disability and genome imbalance." Cytogenet Genome Res 115(3-4): 215-224.
- Kolomietz E. M. et al. (2002). "The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors." Genes Chromosomes Cancer 35(2): 97-112.
- Laccone et al. (2004). "Large deletion of the MECP2 gene detected by gene dosage analysis in patients with Rett syndrome". Hum Mut 23(3): 234-244.
- Lapierre J. M. et al. (1998). "Comparison of comparative genomic hybridization with conventional karyotype and classical fluorescence in situ hybridization for prenatal and postnatal diagnosis of unbalanced chromosome abnormalities." Ann Genet 41(3): 133-140.
- Lee J. A. et al. (2007). "A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders." Cell 131(7): 1235-1247.
- Lee J. A. & Lupski J. R. (2006). "Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders." Neuron 52(1): 103-121.
- Lieber M. R. et al. (2003). "Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining." Nat Rev Mol Cell Biol 4(9): 712-720.
- Lupski J. R. (1998). "Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits." Trends Genet 14(10): 417-422.

- Lupski, J. R. & Stankiewicz P. (2005). "Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes." PLoS Genet 1(6): e49.
- Magenis R. E. (1988). "On the origin of chromosome anomaly." Am J Hum Genet 42(4): 529-533.
- McCarroll S. A. et al. (2006). "Common deletion polymorphisms in the human genome." Nat Genet 38(1): 86-92.
- McFadden D. E. & Friedman J. M (1997). "Chromosome abnormalities in human beings." Mutat Res 396(1-2): 129-140.
- Pinkel D. et al. (1998). "High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays." Nat Genet 20(2): 207-211.
- Reiter L. T. et al. (1998). "Human meiotic recombination products revealed by sequencing a hotspot for homologous strand exchange in multiple HNPP deletion patients." Am J Hum Genet 62(5): 1023-1033.
- Rubnitz J. & Subramani S. (1984). "The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells." Mol Cell Biol 4(11): 2253-2258.
- Sacconi S. et al (2008). "A functionally dominant mitochondrial DNA mutation". Hum Mol Genet 17: 1814-1820.
- Sebat J. B. et al. (2004). "Large-scale copy number polymorphism in the human genome." Science 305(5683): 525-528.
- Shaffer L. G. & Bejjani B. A. (2006). "Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics." Cytogenet Genome Res 115(3-4): 303-309.
- Shaffer L. G. & Lupski J. R. (2000). "Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans." Annu Rev Genet 34: 297-329.
- Sharp A. J. (2009). "Emerging themes and new challenges in defining the role of structural variation in human disease." Hum Mutat 30(2): 135-144.
- Sharp A. J. et al. (2005). "Segmental duplications and copy-number variation in the human genome." Am J Hum Genet 77(1): 78-88.

- Shaw-Smith C. et al. (2004). "Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features." J Med Genet 41(4): 241-248.
- Stankiewicz P. & Lupski J. R. (2002). "Genome architecture, rearrangements and genomic disorders." Trends Genet 18(2): 74-82.
- Stranger B. E. et al. (2007). "Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes." Science 315(5813): 848-853.
- Thomas N. S. et al. (2006). "Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man." Hum Genet 119(4): 444-450.
- Tuzun E. et al. (2005). "Fine-scale structural variation of the human genome." Nat Genet 37(7): 727-732.
- Vissers L. E. et al. (2003). "Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities." Am J Hum Genet 73(6): 1261-1270.
- Waldman A. S. & Liskay R. M. (1988). "Dependence of intrachromosomal recombination in mammalian cells on uninterrupted homology." Mol Cell Biol 8(12): 5350-5357.
- Weterings E. & van Gent D. C. (2004). "The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis." DNA Repair (Amst) 3(11): 1425-1435.