

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA**

**SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN GENETICA  
APPLICATA**

**DIRETTORE PROF.SSA GUGLIELMINA NADIA RANZANI**

**DISOMIA UNIPARENTALE NELL'AMBITO DELLA  
DIAGNOSI CROMOSOMICA PRENATALE**

**SPECIALIZZANDA: DR.SSA LUCIA VISENTIN**

**MATRICOLA: 289497/10**

**ANNO ACCADEMICO 2003-2004**

**LAVORO SVOLTO IN LABORATORIO DI CITOGENETICA**  
**RESPONSABILE SEZIONE DI CITOGENETICA:**  
**DOTT. LAMBERTO CAMURRI**

**STRUTTURA DI APPARTENENZA: ARCELLA ANALISI**  
**MEDICHE (PD)**  
**RESPONSABILE : DOTT. GIANLUIGI GASPARONI**

# INDICE

## **CAPITOLO 1: INTRODUZIONE**

1.1 IMPRINTING	pag. 1
1.2 DISOMIA UNIPARENTALE (UPD)	pag. 3
1.3 PRINCIPALI SINDROMI LEGATE A UPD	pag. 7
1.4 patUPD(15) E SINDROME DI ANGELMAN (AS); matUPD(15) E SINDROME DI PRADER-WILLI (PWS)	pag. 8
1.5 matUPD(14) E patUPD(14)	pag. 10
1.6 patUPD(11) E SINDROME DI BECKWITH-WIEDEMANN (BWS)	pag. 11
1.7 patUPD(6) E DIABETE MELLITO TRANSIENTE NEONATALE (TND)	pag. 12
1.8 matUPD(7) E SINDROME DI SILVER-RUSSELL (SRS)	pag. 13
1.9 matUPD(2)	pag. 14
1.10 matUPD(16) E UPD(20)	pag. 14

## **SCOPO DEL LAVORO**

pag. 15

## **CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI**

2.1 ANALISI CROMOSOMICA. CAMPIONI DI SANGUE PERIFERICO (SP)	pag. 16
2.1.2 TERRENI DI COLTURA E SOLUZIONI UTILIZZATE PER CAMPIONI DI SP	pag. 16
2.2 ANALISI CROMOSOMICA. CAMPIONI DI LIQUIDO AMNIOTICO (LA)	pag. 17
2.2.1 METODO IN SITU	pag. 17
2.2.2 METODO IN FIASCA	pag. 18
2.2.3 TERRENI DI COLTURA E SOLUZIONI UTILIZZATE PER CAMPIONI DI LA	pag. 19
2.3 ANALISI CROMOSOMICA. CAMPIONI DI VILLI CORIALI (CV)	pag. 19
2.3.1 METODO SEMIDIRETTO	pag. 19

2.3.2 METODO COLTURALE	pag. 20
2.3.3 TERRENI DI COLTURA E SOLUZIONI UTILIZZATE PER CAMPIONI DI CV	pag. 21
2.4 ANALISI CROMOSOMICA. OSSERVAZIONE DEI PREPARATI	pag. 21
2.5 UPD: METODO DI ANALISI TRAMITE STR (SHORT TANDEM REPEAT)	pag. 22
2.6 IBRIDAZIONE IN SITU	pag. 23
2.6.1 REAGENTI E PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI	pag. 25

### **CAPITOLO 3: RISULTATI**

3.1 CASO 1: P-V	pag. 26
3.2 CASO 2: F-P	pag. 30
3.3 CASO 3: S-V	pag. 33

### **CAPITOLO 4: DISCUSSIONE**

4.1 CASO 2: F-P	pag. 37
4.2 CASO 3: S-V	pag. 39
4.3 CASO 1: P-V	pag. 42

### **BIBLIOGRAFIA**

pag. 45

### **RINGRAZIAMENTI**

pag. 56

# CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

## 1.1 IMPRINTING

L'imprinting genomico si evidenzia quando l'espressione di un gene o di una regione cromosomica risulta differente in relazione al genitore dal quale è stato ereditato. Nelle cellule somatiche dell'individuo, sono presenti entrambi gli alleli materno e paterno ma uno solo dei due è funzionalmente attivo e l'altro è silenziato (Hitchins et al., 2002).

L'imprinting genomico è stato ritrovato solo nei mammiferi ed è considerato un meccanismo di controllo della crescita della placenta e dello sviluppo dell'embrione (Kotzot, 1999).

L'imprinting genomico è reversibile da una generazione all'altra, ossia la differenziazione tra cromosoma di origine materna o paterna viene cancellata durante la gametogenesi nell'individuo e viene stabilito un nuovo "imprint" a seconda del sesso dell'individuo stesso.

L'imprinting genomico è un fenomeno epigenetico: l'allele viene segnato a seconda del genitore di provenienza con una marcatura la cui natura non è nota ma potrebbe consistere in un pattern di metilazione, una configurazione cromatinica o un addotto proteico. Nelle cellule della linea germinale la marcatura stabilita è trasmessa ad ogni divisione cellulare. Nelle cellule somatiche questa marcatura a livello genico comporta tre caratteristiche principali: espressione monoallelica, raggruppamento in domini soggetti a imprinting evolutivamente conservati e un'associazione con metilazione genitore-allele-specifica (Wevrick et al., 2001; Hitchins et al., 2002).

L'espressione monoallelica consegue alla trascrizione di un gene da un singolo allele di un solo genitore ed è la caratteristica principale dei geni soggetti a imprinting. Esempio classico è il gene *SNRPN* (small nuclear ribonucleoprotein-associated polypeptide N), implicato nella sindrome di Prader-Willi (PWS). Tale gene è espresso solamente a partire dall'allele paterno negli embrioni pre-impianto e continua a essere espresso in questa maniera per tutta la gestazione e in tutti i tessuti principali fino all'età adulta.

Il pattern di espressione dei geni soggetti a imprinting può essere complesso:

- Alcuni geni soggetti a imprinting sono espressi monoallelicamente solamente in un particolare organo o tessuto, mentre possono essere espressi da entrambi gli alleli parentali in altre parti del corpo. Studi condotti su topo evidenziano che *UBE3A* (ubiquitin protein ligase E3A) ha un'espressione materna in specifiche regioni del cervello e biallelica in altre regioni del cervello.

- I geni soggetti a imprinting possono anche essere espressi monoallelicamente durante uno specifico stadio dello sviluppo. Ad esempio, il gene *IGF2* (insulin-like growth factor 2) ha espressione paterna nella maggior parte dei tessuti fetali, ma biallelica durante l'infanzia e nel fegato adulto.
- Esistono anche geni soggetti a imprinting in modo opposto in tessuti diversi, come il gene *GRB10* (human growth factor receptor-bound 10) che mostra espressione paterna nel cervello fetale, ma di cui è stata ritrovata un'isoforma ad espressione materna nel muscolo scheletrico ed ha espressione biallelica in altri tessuti.

Il raggruppamento in domini dei geni soggetti a imprinting nel genoma, si è probabilmente evolutivamente selezionato perché l'espressione o il silenziamento dei geni soggetti a imprinting entro un cluster è regolato in modo coordinato da uno o più elementi che agiscono in cis detti 'centro di imprinting' (IC) o 'imprinting control element' (Hitchins et al., 2002). Il 'centro di imprinting' è attivo nella linea germinale nello stabilire la marcatura del genitore d'origine e durante lo sviluppo postzigotico dove è necessario per il mantenimento della marcatura (Mann et al., 2000; Bittel et al., 2003). Geni e regioni soggette a imprinting sono spesso altamente conservate tra topi e uomini.

La metilazione delle isole CpG al 5' dei geni è caratteristica delle regioni non espresse del DNA. La metilazione di un singolo allele parentale è evidenza di geni soggetti a imprinting, e tale metilazione correla con la sua inattivazione trascrizionale. Ci sono tuttavia delle eccezioni: *IGF2* per esempio è metilato nella copia paterna attiva.

L'imprinting è regolato dall'interazione di diverse componenti epigenetiche, inclusa la struttura della cromatina, il tempo di replicazione, e il grado di acetilazione degli istoni e di metilazione del DNA, tra i due alleli parentali. L'IC regola l'instaurarsi delle differenze allele-specifiche nella metilazione del DNA, nella struttura della cromatina, e nell'espressione (Bittel et al., 2003). Gli alleli attivi presentano una struttura cromatica simile all'eucromatina, più accessibile agli enzimi modificatori del DNA, iperacetilazione degli istoni H3 e H4 e mancanza di metilazione delle isole CpG. Le caratteristiche opposte si riscontrano sull'allele silenziato.

Non tutti i cromosomi sono soggetti a imprinting. Geni soggetti a imprinting svolgono un ruolo importante nella regolazione della crescita fetale e nello sviluppo dei mammiferi. L'importanza dell'imprinting risulta evidente dall'osservazione di alcune principali sindromi che hanno alla base l'alterazione di questo processo (Hitchins et al., 2002).

## **1.2 DISOMIA UNIPARENTALE (UPD)**

Si indica con Disomia Uniparentale o UPD la situazione in cui entrambi i membri di una coppia di cromosomi o i segmenti di una coppia di cromosomi sono ereditati solamente da un genitore (Robinson et al., 1993)

I meccanismi di formazione dell'UPD sono principalmente (tabella 1):

- a) complementazione gametica: fertilizzazione attraverso l'unione di gameti aneuploidi che si complementano: un gamete disomico si unisce a un gamete nullisomico. Si accompagna quindi a eterodisomia se l'errore avviene durante la I divisione meiotica o a isodisomia se l'errore avviene durante la II divisione meiotica (Engel, 1993).
- b) trisomy rescue: la perdita di un cromosoma in uno zigote trisomico formatosi per fusione di un gamete disomico con uno normale monosomico. Questo è forse il meccanismo più frequente di formazione di UPD. In 2/3 dei casi, la perdita casuale di uno dei tre cromosomi omologhi, determina una coppia biparentale normale, ma in 1/3 dei casi si ha disomia uniparentale. Può determinare non solo eterodisomia ma anche isodisomia in relazione al tipo di errore meiotico che ha generato il gamete disomico e può essere accompagnato da osservazione di trisomia a mosaico nella placenta (Berend et al., 1999; Engel, 1993; Hitchins et al., 2001).
- c) duplicazione mitotica (o monosomy duplication): fertilizzazione di un gamete monosomico da parte di un gamete nullisomico, seguita nelle prime divisioni mitotiche da duplicazione del cromosoma monosomico. E' sempre caratterizzata da isodisomia (Engel, 1993).
- d) sostituzione eterocromosomica (sostituzione di marker): rappresenta un tentativo mitotico di oltrepassare una situazione di aneuploidia, più precisamente una pseudodiploidia. Un marker strutturalmente anormale sparisce dalla cellula sostituito da una seconda copia del suo partner normale attraverso duplicazione. Si ritrova quindi sempre isodisomia (Engel, 1993).
- e) scambio eterocromatidico: un crossing over somatico determina lo scambio alla mitosi tra due eterocromatidi di una coppia di cromosomi replicati. L'UPD riguarda in questo caso un segmento del cromosoma, ma si può accompagnare oltre che a scambio allelico, anche a delezioni o duplicazioni nei punti di rottura (Engel, 1993).

Cause	Erroneous pair		
	At fertilization	And/or after fertilization	End result: UPD
a. Gamete complementation [Wang et al., 1991]	2 + 0		= 2 (ubiquitous)
b. Trisomy rescue [Cassidy et al., 1992; Purvis-Smith et al., 1992]	2 + 1	- 1	= 2 (mosaic?)
c. Monosomy duplication [Spence et al., 1988]	1 + 0	× 2	= 2 (mosaic?)
d. Heterochromosomal substitution [Petersen et al., 1992].d'	mar + 1 1 + 1	-mar + 2(1) -1 + 2(1)	= 2 (mosaic?) = 2 (mosaic?)
e. Heterochromatid exchange [Henry et al., 1991; Cavenee et al., 1983]	$1_1 + 1_2$ $1_1 + 1_2$	$1_2 + (1_1 - n_1 + n_2)$ $1_1 + (1_2 - n_2 + n_1)$	= 2 (mosaic) = 2 (mosaic)

Tab.1 Meccanismi di formazione di UPD (Engel, 1993).

Si definisce UPD segmentale l'UPD di una parte di un cromosoma (interstiziale o telomerica) in presenza di eredità biparentale del resto della coppia di cromosomi e in presenza di un cariotipo normale. (Fig.1A,1B) Si indica come UPD complessa l'UPD di una parte o di un intero cromosoma direttamente implicato o associato con un cariotipo con alterazione strutturale (traslocazione semplice Fig.1C, traslocazione Robertsoniana di due cromosomi acrocentrici non omologhi Fig.1D, isocromosomi di braccio corto e braccio lungo di un cromosoma non acrocentrico Fig.1E,1F, traslocazione Robertsoniana tra cromosomi acrocentrici omologhi Fig.1G) o numerica (presenza di marker sovranumerario Fig.1H) (Kotzot, 2001).

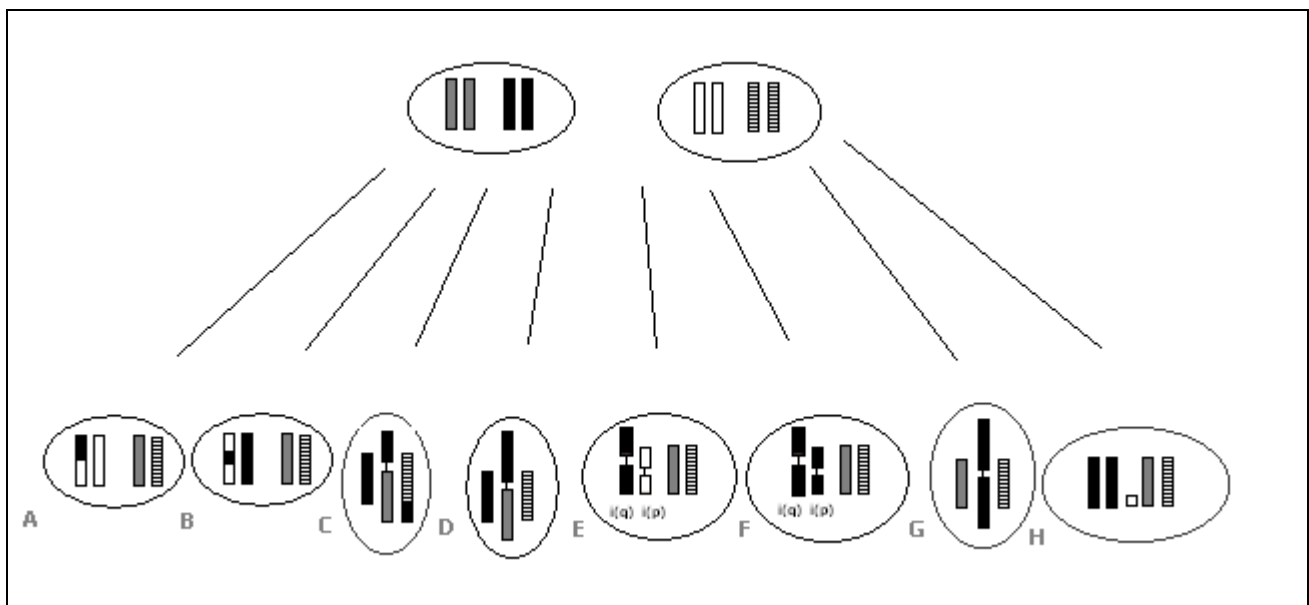


Fig.1 Diagrammi di UPD segmentale e complessa (Kotzot, 2001).

Lo studio della UPD può essere rilevante nel corso di analisi del cariotipo costituzionale, in special modo in epoca prenatale.

Indicazione allo studio di UPD, a livello di diagnosi prenatale, è rappresentata da:



- presenza di trisomia a mosaico. In alcune casi, nell'analisi citogenetica del campione di villi coriali si evidenzia la presenza di trisomia a mosaico; di seguito l'analisi citogenetica su liquido amniotico o sangue fetale identifica solamente un corredo cromosomico normale. Si ritiene che la trisomia sia confinata alla placenta e precocemente corretta durante le prime divisioni (trisomy rescue). E' stata osservata un'associazione tra UPD, età materna avanzata e trisomy rescue, in particolar modo per la trisomia 15, che si spiega con l'aumento del rischio di trisomie all'aumentare dell'età materna. Infatti la trisomia a mosaico si osserva in circa l'1% dei campioni di villi coriali prelevati per età materna avanzata, ma la frequenza di mosaicismo vero nelle colture di liquido amniotico è significativamente più bassa (circa 0.1-0.3%) (Ledbetter et al., 1995; Fritz et al., 2001).
- presenza di traslocazioni Robertsoniane o reciproche. L'UPD si può verificare per i cromosomi acrocentrici implicati in traslocazioni robertsoniane che coinvolgono cromosomi omologhi o non omologhi, sia che la traslocazione risulti de novo, sia che risulti ereditata. I portatori di traslocazione Robertsoniana sono considerati ad aumentato rischio di non-disgiunzione e perciò va valutata un'eventuale trisomia o, in presenza di cariotipo normale, un'eventuale presenza di UPD per i cromosomi 14 o 15 a seguito di trisomy rescue o monosomy duplication. Le traslocazioni reciproche si accompagnano a un rischio minore di non-disgiunzione, ma sono stati riportati in letteratura casi di traslocazioni bilanciate non robertsoniane presentanti UPD, soprattutto in presenza del coinvolgimento del cromosoma 15 (Ledbetter et al., 1995; Kotzot, 2002).
- presenza di markers cromosomici sovrannumerari. Distinguiamo in questo gruppo di casi un sottogruppo con presenza di marker costituito da inv dup(15) e un sottogruppo caratterizzato da marker addizionale di altra origine cromosomica. Nel primo caso il rischio di UPD è rilevante e stimato attorno al 3%. Per il secondo sottogruppo, sono riportati in letteratura solo due casi di UPD associata a marker di altra natura rispetto alla inv dup(15) (Kotzot, 2002).

L'indicazione allo studio di UPD, a livello di diagnosi postnatale può essere rappresentata da alcune caratteristiche cliniche come ritardo di crescita nel bambino, bambini con malformazioni multiple, presenza di sindromi ben definite riferibili a UPD (come Sdr. di Silver-Russell, Brachmann-De Lange, Wiedemann-Beckwith, etc.).

Il fenotipo di individui con UPD varia notevolmente a seconda :

- della presenza nel cromosoma in questione di geni soggetti a imprinting. A seconda del cromosoma coinvolto il fenotipo varia da individui normali ( es. UPD(13), UPD(21),

UPD(22) ) a individui con vere e proprie sindromi (es. matUPD(15) con sdr. di Prader-Willi, patUPD(15) con sdr. di Angelman) (Engel, 1993; Ledbetter et al., 1995)

- della presenza di mosaicismo. Il mosaicismo consiste nella presenza di due o più differenti linee cellulari in un organismo. Diverse sono le modalità di formazione del mosaicismo. La presenza di una linea trisomica può conseguire sia alla formazione di uno zigote trisomico formatosi a partire da gameti aneuploidi che recupera poi in parte la trisomia nelle prime divisioni cellulari, sia a non-disgiunzione mitotica nelle divisioni cellulari successive alla formazione di uno zigote diploide. Sospetto e indicazione della presenza di UPD è dato dalla presenza di una linea addizionale trisomica o monosomica che viene talvolta rilevata nell'analisi del campione di villi coriali ma non viene ritrovata nell'analisi del liquido amniotico: si parla in questo caso di CMP (confined placental mosaicism). L'estensione della linea a mosaico o il tipo di tessuti coinvolti può determinare un diverso effetto fenotipico legato a UPD (Kotzot, 1999).
- della presenza di un allele recessivo patologico nell'aplotipo ereditato. In caso di isodisomia tale allele risulta presente in omozigosi e porta al manifestarsi della malattia (ereditarietà non mendeliana di disordini monogenetici) (Engel, 1993; Kotzot, 1999).

La dimostrazione di UPD è possibile praticamente solo con metodi molecolari, in quanto il verificarsi di UPD solo in casi estremamente rari è accertabile mediante indagini citogenetiche, ed anche in questi casi la sicurezza non è assoluta. Lo studio dell'UPD viene fatto analizzando l'origine parentale del cromosoma in questione tramite l'osservazione dell'aplotipo di un certo numero di markers polimorfici di quel cromosoma. Per lo più si utilizzano markers microsatellitari (come gli STRs 'short tandem repeats') in cui le varianti alleliche presentano un diverso numero di unità ripetute. Dato che ogni genitore per quel dato paio di cromosomi ha due aplotipi, uno per cromosoma, l'analisi degli stessi markers polimorfici nella prole permette di verificare la presenza di UPD e di capire se si tratta di eterodisomia paterna o materna (quando compaiono gli stessi due aplotipi di un unico genitore) o di isodisomia paterna o materna (quando compare uno solo dei due aplotipi di un genitore e si osserva una "riduzione dell'eterozigosità del genitore ad omozigosità" nel probando). E' considerata sufficiente l'analisi di pochi loci (3-6) con 2 o più markers informativi per documentare la presenza di UPD (Horsthemke et al., 2003; Ledbetter et al., 1995). Inoltre se si ottiene un dato di omozigosità dei marcatori in prossimità del centromero associata ad eterozigosità dei segmenti periferici, ciò indica un errore nella seconda divisione meiotica; se si osserva invece eterodisomia dei marker vicino al centromero ciò è indicativo per un errore nella prima divisione meiotica. Si parla poi di errore somatico se tutti i marcatori lungo il cromosoma mostrano riduzione all'omozigosità (Robinson et al., 2000).

### **1.3 PRINCIPALI SINDROMI LEGATE A UPD**

In letteratura sono riportati casi di UPD per molti cromosomi. Se per la maggior parte di questi non c'è apparente effetto fenotipico, per pochi invece il fatto di essere presenti in UPD ha conseguenze cliniche riconoscibili. In tabella 2 sono schematicamente evidenziati i cinque cromosomi per i quali è stato dimostrato un definito effetto fenotipico e i cromosomi per i quali non è ancora chiaro se esistano effetti legati a fenomeni di imprinting (Ledbetter Engel, 1995; Engel, 1998; Shaffer et al., 2001).

	Tipo di UPD	Sindrome
sicure	6 paterno	Diabete neonatale (transiente)
	7 materno	Silver-Russell
	11 paterno	Wiedemann-Beckwith
	14 materno	Mancanza di crescita, pubertà precoce
	14 paterno	Nanismo, ipoplasia della gabbia toracica
	15 materno	Prader-Willi
	15 paterno	Angelman
probabili	2 materno	Ritardo di crescita, displasia broncopolmonare
	16 materno	Febbre Familiare Mediterranea
	20 materno/ paterno	Mancanza di crescita, iperattività

Tab.2 UPD e sindromi cromosomiche.

I disordini genetici come conseguenza di UPD possono avvenire attraverso due meccanismi distinti:

- a) omozigosi di mutazioni recessive, presenti per effetto di isodisomia del locus se il genitore che trasmette è un portatore eterozigote,
- b) alterazione dell'espressione di geni soggetti a imprinting (Hitchins et al., 2001).

#### **1.4 patUPD(15) E SINDROME DI ANGELMAN (AS); matUPD(15) DI PRADER-WILLI (PWS)**

Le sindromi di Angelman e Prader-Willi sono due disordini neurocomportamentali clinicamente distinti, caratterizzati da una frequenza alla nascita di 1/10000-20000 nati. Esiste una relazione nella loro origine genetica: entrambe le sindromi sono caratterizzate da alterazioni in una regione di 4 Mb localizzata in 15q11-q13 (Landgraf et al., 1999).

La sindrome di Prader-Willi è caratterizzata da ipotonia neonatale, ipogonadismo, iperfagia che porta ad obesità, bassa statura, mani e piedi piccoli, problemi comportamentali e ritardo mentale (Horsthemke, 2003). Nei pazienti con PWS si è ritrovato:

- delezione paterna 15q11-q13 nel 70% dei casi
- UPD materna del cromosoma 15 nel 25% dei casi
- una mutazione nell'imprinting nel 2-3% dei casi (Bittel et al., 2003).

La sindrome di Angelman è un disordine multisistemico le cui caratteristiche cliniche includono: severo ritardo dello sviluppo, profonda compromissione del linguaggio, disordini di movimento ed equilibrio, caratteristico profilo comportamentale che include riso frequente e inappropriato, e una personalità facilmente eccitabile. In comune ad alcuni casi ma non a tutti sono anche: microcefalia, disturbi del sonno, ipopigmentazione e strabismo (Lossie et al., 2001).

Nei pazienti con AS si è ritrovato:

- delezione materna 15q11-q13 nel 70% dei casi
- UPD paterna del cromosoma 15 in circa 3-5% dei casi
- difetti nel processo di imprinting in circa 8% dei casi
- nessun difetto genetico in 10-15% dei casi (Baumer et al., 1999)
- mutazione intragenica nel gene (*UBE3A*) della ligasi proteina-ubiquitina E6AP-E3 nel resto dei casi (Trent et al., 1997; Lossie et al., 2001).

La regione cromosomica 15q11-q13 è una regione soggetta a imprinting ed è meioticamente instabile. E' coinvolta in una varietà inusuale di riarrangiamenti citogenetici, tra cui le delezioni riscontrate in AS e PWS, frequenti duplicazioni-inversioni (inv dup15), rare duplicazioni e triplicazioni, inversioni, traslocazioni bilanciate o sbilanciate (Landgraf et al., 1999).

Recenti evidenze supportano l'ipotesi della presenza di almeno 30 geni in questa regione. Alcuni di questi geni sono espressi a partire dal solo allele paterno; la mancanza di espressione di questi geni causa PWS. In particolare *SNRPN* (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N) sembra essere un primo gene candidato. Il locus *SNRPN* è tuttavia molto complesso composto di un certo numero di trascritti precursori molto lunghi con più funzioni tra cui *MAGEL2* (MAGE-like 2) (espresso nel cervello) e il gene *needin* associato al controllo dell'appetito (Bittel et al., 2003; Gallagher et al.,

2002). Esistono inoltre almeno due geni in questa regione che sono ad espressione materna in alcuni tessuti (*UBE3A*, *ATP10C*) (Bittel et al., 2003). *UBE3A*, noto anche come gene *E6-AP* codifica una ubiquitina ligasi e ha espressione biallelica nella maggior parte dei tessuti ma è espresso solamente a partire dall'allele materno nel cervello. Mutazioni strutturali di questo gene sono state trovate in alcuni pazienti AS, indicando che *UBE3A* è il gene più importante nella AS (Burger et al., 2002). *UBE3A* è implicata nella proteolisi proteica ubiquitina dipendente e gioca un ruolo critico durante lo sviluppo del cervello, attraverso la regolazione di alcuni processi quali il turnover proteico, la fosforilazione e l'endocitosi (Trent et al., 1997).

La regolazione dei geni nella regione 15q11-q13 è governata da un elemento bipartito 'cis-acting', il centro dell'imprinting, che controlla i diversi aspetti dell'imprinting collocabile a livello del promotore del gene *SNRPN* (Mann et al, 2000).

La delezione è la causa più frequente di queste due sindromi: circa il 70% degli individui con PWS e AS presentano delezione 15q11-q13 di origine paterna e materna rispettivamente (Gimelli et al., 2003). Queste delezioni rimuovono i geni strutturali di PWS e AS e le loro sequenze regolatorie compreso il centro dell'imprinting (IC) e hanno alla base fenomeni di ricombinazioni 'inappropriate' tra sequenze duplicate END (derivanti da duplicazioni del gene *HERC2*: hect domain and RLD 2), la cui presenza è stata evidenziata nei 3 siti di 'breakpoint' comuni alla maggior parte di queste delezioni (Gimelli et al., 2003; Golden et al., 1999; Tekin et al., 2000). In una piccola percentuale di casi la mancanza della regione PWS/AS è legata a presenza e trasmissione di traslocazioni sbilanciate o legata a segregazione in presenza di traslocazioni bilanciate, o a inversioni del cromosoma 15 (Horsthemke, 1996).

La disomia uniparentale spiega circa il 25% dei casi di PWS e il 3-5% dei casi di AS. Per quanto riguarda questi casi di PWS per l'80% è stato osservato un legame con l'età materna avanzata e non infrequentemente con trisomie o trisomie a mosaico nell'analisi dei villi coriali, cosa che evidenzia la formazione di uno zigote trisomico iniziale come conseguenza di una non disgiunzione alla I divisione meiotica materna (Ginsburg et al., 2000). Il fenotipo di PWS per effetto di UPD è molto simile a quello degli individui con delezione, con facies meno tipica e qualche manifestazione minore meno ricorrente. Esso è imputabile forse alla presenza di uno o più geni non soggetti a imprinting nella regione deleta che contribuirebbero al tipico fenotipo facciale (Cassidy et al., 1997).

L'origine più comune per l'UPD del cromosoma 15 paterno, alla base della AS, è la fertilizzazione di un oocita nullisomico per il cromosoma 15 seguita da duplicazione postzigotica del cromosoma 15 paterno. E' constatato un legame con l'età materna avanzata essendo la mancanza di un cromosoma nell'oocita imputabile a non disgiunzione alla I divisione meiotica (Horsthemke et al.,

2003). In pochi casi invece l'UPD deriva da un errore nella seconda divisione meiotica paterna (Robinson et al., 2000). Anche nel caso di AS per effetto di UPD il fenotipo clinico è relativamente meno severo rispetto a quello di pazienti con delezione essendo caratterizzato da miglior crescita fisica, minor grado di atassia, maggiori capacità cognitive e, in qualche paziente, una limitata capacità di dire qualche parola (Fridman et al., 2000). Anche altri riarrangiamenti coinvolgenti il cromosoma 15 possono determinare UPD e conseguentemente PWS o AS. Si tratta di casi in cui si ritrova una maggiore probabilità di non disgiunzione: come in presenza di riarrangiamenti strutturali, come le traslocazioni Robertsoniane, o in presenza di riarrangiamenti pericentromerici o in presenza di regioni instabili del genoma (Toth-Fejel et al., 1996).

Una piccola percentuale di casi di PWS e AS viene poi spiegata da delezione, microdelezione o malfunzionamento del centro dell'imprinting. Questi pazienti mostrano eredità biparentale normale, nessuna delezione classica ma un pattern uniparentale di metilazione ed espressione genica (Buiting et al., 2003). Piccole delezioni che rimuovono il promotore di *SNRPN* hanno identificato la presenza di un segmento che funziona come IC nel cromosoma paterno che acquisisce un epigenotipo materno, suggerendo l'esistenza di un cambio di marcatura mediato dall'IC e bloccato in presenza di delezioni o microdelezioni durante la maturazione dei gameti (Mann et al., 2000).

### **1.5 matUPD(14) E patUPD(14)**

L'UPD del cromosoma 14 comporta un fenotipo anormale. Se sono presenti due cromosomi di origine materna (matUPD(14)) si osservano un insieme variabile di malformazioni e/o problemi clinici: in alcuni casi c'è un ritardo di crescita intrauterina e si manifesta solamente una pubertà precoce legata all'accelerazione della maturazione scheletrica, ma nella maggior parte dei casi sono presenti caratteristiche dismorfiche, malformazioni, moderato ritardo dello sviluppo e problemi neurologici (Kotzot, 2001). La presenza invece di due cromosomi di origine paterna (patUPD(14)) si accompagna a polioidramnios, torace piccolo con deformità delle costole associato a difficoltà respiratorie, membra piccole, anomalie facciali e ritardo mentale da moderato a severo (Karen et al., 2002; Eggermann et al., 2001).

Sembra siano presenti su questo cromosoma più regioni soggette a imprinting. In particolare due geni soggetti a imprinting Meg3/GTL2 (Maternal expressed 3 or gene trap locus 2) e DLK1 (delta-like 1 *Drosophila* homolog) sono stati mappati in 14q32. Meg3/GTL2 è espresso solamente dal cromosoma materno e codifica alcuni trascritti non tradotti, soggetti a splicing alternativo e contenenti diverse ORF (open reading frame), mentre DLK1 è espresso dall'allele paterno e

codifica una proteina transmembrana contenente 6 motivi dell'EGF (Kotzot, 2001; Karen et al., 2002). Nell'uomo DLK1 è altamente espresso in una varietà di tipi cellulari fetali, e la proteina è attiva nella differenziazione degli adipociti, delle cellule neuroendocrine, del muscolo e di alcuni tipi cellulari ematopoietici. La trascrizione del gene Meg3/GTL2 avviene a livello dei tessuti fetali del cuore, rene, fegato e polmoni, mentre nell'adulto è confinata al cervello (Karen et al., 2002). Questi geni sono entrambi candidati per i fenotipi della UPD(14), anche se non se ne conosce la funzione esatta né la rilevanza fenotipica, né si esclude la presenza di altri geni presenti in 14q32 o in altre zone del cromosoma 14 che potrebbero essere importanti nel determinare il fenotipo. Non si sa se, alla base del fenotipo matUPD(14), possa essere la sovraespressione del gene materno o la mancanza del prodotto paterno, o la combinazione dei due.

Da un'analisi comparativa del fenotipo clinico di casi con matUPD(14) e casi con delezioni del cromosoma 14 paterno, si è rilevato che la mancanza di espressione di uno o più geni si associa a alterazioni fenotipiche caratteristiche della matUPD(14). Dall'analisi dell'estensione delle regioni delete ne deriva l'assunzione che probabilmente è interessata da imprinting genomico la zona 14q23→14q32 (Kotzot, 2001). Sono inoltre riportati in letteratura anche due casi di matUPD(14) interstiziale eterodisomica, riguardanti le regioni 14q23-24.2 e 14q22.2→14q31.3, associati a pazienti con caratteristiche del fenotipo atteso da matUPD(14) (Eggermann et al., 2001; Kotzot, 2001).

### **1.6 patUPD(11) E SINDROME DI BECKWITH-WIEDEMANN (BWS)**

La Sindrome di Wiedemann-Beckwith (WBS) è un disordine multigenico con disregolazione dell'espressione dei geni soggetti a imprinting presenti nella regione 11p15.5. E' caratterizzata da iperplasia di tessuti e organi, gigantismo, difetti della parete addominale anteriore, macroglossia, dismorfismi facciali, anomalie renali, emiipertrofia e un aumentato rischio di tumori embrionali (Reish et al., 2002; Hitchins et al., 2002). La genetica di questa sindrome è particolarmente complessa, ma difetti di imprinting sono implicati in ogni meccanismo causativo. Fino a un 15% dei casi è di tipo familiare. Si presenta nella maggior parte dei casi in modo sporadico e con cariotipo apparentemente normale. Nel 20% dei casi sporadici è stata confermata la presenza di disomia uniparentale paterna e in un altro 1-2% si ritrovano anomalie citogenetiche legate sia a duplicazioni paterne, sia a traslocazioni o inversioni materne con punto di rottura in 11p15 (Hitchins et al., 2002; Reish et al., 2002; Diaz-Meyer et al., 2003). Tra i geni presenti nella regione di 1000 kb del dominio soggetto a imprinting 11p15.5, ce ne sono 5 che sono espressi esclusivamente o preferenzialmente

dal cromosoma materno che codificano sopressori della crescita (*TSSC3*: tumor-suppressing subchromosomal transferable fragment candidate gene 3, *SLC22A1L*: solute carrier family 22 member 1-like , *CDKN1C*: cyclin-dependent kinase inhibitor 1C , *KCNQ1*: potassium channel, voltage-gated, kqt-like subfamily, member 1 , *H19*), mentre il gene *IGF2* (insulin-like growth factor 2) e il gene dell'insulina sono prevalentemente espressi dal cromosoma paterno e sono implicati nel promuovere la crescita (Hitchins et al., 2002; Diaz-Meyer et al.,2003).

La maggior parte dei casi sporadici di BWS (20-50%) presenta 'loss of imprinting' (LOI) che si manifesta nell'espressione biallelica di *IGF2* ed è talvolta associata a ipermetilazione e silenziamento del gene *H19*. In circa il 40% dei casi familiari e nel 5% dei casi sporadici di BWS si ritrova la mutazione di *CDKN1C*, gene che codifica un inibitore della Kinasi ciclina-dipendente..

Circa la metà dei casi sporadici di BWS è poi spiegata da assenza o perdita di metilazione dell'allele materno *KvDMR1* (differentially methylated region 1), un isola CpG intronica entro il gene *KCNQ1*. Questa regione sembra funzionare come una regione di controllo dell'imprinting (ICR) e, nella sua forma demetilata, silenzia i geni sul cromosoma paterno permettendo così l'espressione a imprinting specifico materno (Diaz-Meyer et al.,2003).

### **1.7 patUPD(6) E DIABETE MELLITO TRANSIENTE NEONATALE (TND)**

Riconducibile a UPD del cromosoma 6 è una forma rara e transiente di diabete neonatale (TND), caratterizzato da un andamento a tre fasi: comparsa di diabete in fase neonatale, apparente remissione entro i 18 mesi, ricaduta in circa il 50/60% dei casi con sviluppo di diabete di tipo 2. TND ha una base genetica nell'80% dei casi. Sono stati descritti tre meccanismi genetici correlati a TND che hanno alla base la presenza di geni soggetti a imprinting al locus 6q24: UPD paterna del cromosoma 6, duplicazione paterna della banda 6q24 e un difetto di metilazione in una particolare isola CpG, a metilazione opposta negli individui normali. Nei pazienti con TND derivante da meccanismi genetici diversi non sono state riscontrate differenze fenotipiche. In 6q24 sono stati identificati due geni soggetti a imprinting: *ZAC* (una proteina 'zinc finger' associata con apoptosi e arresto del ciclo cellulare) e *H19* (soggetta a imprinting nella mole idatiforme) e 8 isole CpG, di cui una nei soggetti normali metilata nel cromosoma di origine materna e non metilata in quello di origine paterna.

*ZAC* è un gene soggetto a imprinting nel tessuto fetale che sovraespresso, attraverso l'alterazione della sua funzione di regolatore di apoptosi e ciclo cellulare, potrebbe alterare il numero e l'efficienza delle cellule delle isole  $\beta$  durante un momento critico dello sviluppo pancreatico in



utero. Il numero ridotto di queste isole potrebbe essere sufficiente a mantenere una normoglicemia durante la fase di remissione della malattia ma si determinerebbe diabete in corrispondenza di periodi di stress metabolici come malattie o durante l'adolescenza. Un'altra ipotesi è che la sua capacità di regolare il recettore 1 di PACAP (il polipeptide attivante la adenilato ciclastasi pituitaria) potente secretogeno di insulina nel pancreas, potrebbe essere alterata dalla sua sovraespressione. Anche la sequenza *HYMAI* (hydatidiform mole associated and imprinted) si sovrappone a *ZAC* ed è soggetta a imprinting ma non ha ORF e la sua funzione non è chiara (Temple et al, 2002).

### **1.8 matUPD(7) E SINDROME DI SILVER-RUSSELL (SRS)**

La sindrome di Silver-Russell (SRS) è un disordine caratterizzato da ritardo di crescita sia prenatale che postnatale, da faccia piccola triangolare e da una varietà di altre note dismorfiche. Questo disordine è clinicamente eterogeneo, ma è più frequentemente associato a clinodattilia del quinto dito, brachidattilia, macrocefalia relativa unita a scarsa crescita del cranio, asimmetria scheletrica, ipotrofia muscolare o ipotonia, angoli della bocca rivolti verso il basso, aree di pigmentazione della pelle (spot caffè-latte). La maggior parte dei casi di SRS avviene sporadicamente ma dall'analisi degli alberi genealogici di singoli individui sono stati suggeriti diversi modi di ereditarietà: autosomica recessiva, autosomica dominante e legata all'X. L'eterogenicità clinica è probabilmente legata all'eterogenicità genetica che la caratterizza. Anomalie strutturali di diversi cromosomi sono riportate in individui SRS (cromosomi 7, 8, 15, 17, 18). Ma nel 7/10% dei casi si riscontra UPD materna del cromosoma 7. SRS potrebbe essere causata dall'assenza di un gene funzionale che promuove la crescita attivo sull'allele paterno, o dalla sovraespressione di un inibitore della crescita attivo sul cromosoma 7 materno. L'identificazione di pazienti SRS con anomalie in 7p11.2-p13 e 7q31-qter hanno suggerito l'esistenza di due regioni soggette a imprinting separate sul cromosoma 7 che danno origine alla SRS (Riegel et al., 2003). In due casi riportati in letteratura si è riscontrata una duplicazione materna della regione 7p11.2-p13. L'unico gene soggetto a imprinting identificato in questa regione è *GRB10* (growth factor receptor bound protein 10) e codifica per un potente inibitore della crescita. Questo lo rende un ottimo candidato per la SRS ma un'analisi dei pazienti portanti mutazioni non ha evidenziato un ruolo di *GRB10* nella SRS. È stato finora identificato un solo paziente con UPD materna segmentale 7q31-qter che comprende la regione soggetta a imprinting 7q32 in cui si trovano i geni soggetti a imprinting *MEST* (mesoderm specific transcript homolog (mouse)) e *gamma-2 COP* (coat protein gamma-2). *MEST* è espresso a partire dall'allele

paterno e quindi una mancanza del trascritto potrebbe contribuire alla SRS. Non c'è tuttavia evidenza in tal senso in pazienti senza UPD materna del cromosoma 7 (Hitchins et al, 2002).

### **1.9 matUPD(2)**

L'UPD di origine materna del cromosoma 2 è stata riportata in 6 casi ed interessa sempre l'intero cromosoma. Di questi pazienti, 2 risultano clinicamente normali, mentre gli altri presentano aspetti clinici significativi come IUGR (ritardo di crescita intrauterina), oligoidramnios e ipoplasia polmonare e genitale (Stratakis et al., 2001). E' stato di recente notato il legame tra UPD del cromosoma 2 e individui malati che presentano deficienza di TFP ('mitochondrial trifunctional protein deficiency') un disordine genetico raro del ciclo di  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi. La proteina TFP è un complesso multienzimatico composto di una subunità  $\alpha$  e di una subunità  $\beta$  e mutazioni in una delle due subunità possono portare a insufficienza del multienzima. A livello fenotipico si riscontrano tre forme legate a questa alterazione: una forma severa, neonatale, caratterizzata da cardiomiopatia, sintomi tipo-Reye e morte precoce, una forma epatica con ricorrenti episodi di ipoglicemia ipochetotica, e una forma più leggera a esordio fenotipico più tardivo e con neuromiopia e raddomiolisi episodica. Le due subunità sono codificate da geni nucleari distinti, localizzati nella stessa regione del cromosoma 2 (2p23). Per il 16,7% dei pazienti con mancanza di TFP la causa genetica è stata ritrovata nella presenza per isodisomia del cromosoma 2 di due copie mutate della subunità  $\alpha$  (Spiekerkoetter et al., 2002).

### **1.10 matUPD(16) E UPD(20)**

matUPD(16) è stata riportata in un ragazzo con varie caratteristiche dismorfiche, ritardo dello sviluppo e parziale trisomia a mosaico 16p, ma non si sa quanto queste caratteristiche possano essere in realtà correlate con UPD (Kotzot, 2001). Le osservazioni circa la presenza di ritardo di crescita in gravidanze con evidenza di trisomia a mosaico e possibile UPD evidenziano che IUGR correla con il livello di trisomia presente nella placenta più che con presenza o assenza di matUPD(16), indicando che il ritardo di crescita non è legato ad un effetto da imprinting. Legata ad matUPD(16) è invece la manifestazione di una malattia ad eredità autosomica recessiva, la febbre familiare mediterranea (FMF) (Ledbetter et al.,1995).

Sono riportati in letteratura tre casi di pazienti con UPD(20), due casi con UPD materna e uno paterna che mostrano rispettivamente ritardo di crescita nei casi materni e note dismorfiche e iperattività in quello paterno (Eggermann et al., 2001). E' stato identificato inoltre un gene soggetto a imprinting *GNAS1* (guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha stimulating activity polypeptide 1), localizzato in 20q, responsabile per una forma di pseudoipoparatiroidismo in presenza di patUPD(20) e di alterazioni del funzionamento dell'ormone paratiroideo in due pazienti con delezioni 20q sia paterna che materna (Aldred et al., 2002).

## SCOPO DEL LAVORO

Scopo di questo lavoro è stato verificare l'iter, la rilevanza e i limiti dell'indagine di disomia uniparentale (UPD) nell'ambito della diagnosi cromosomica prenatale.

Attraverso l'analisi di loci microsatelliti di 3 casi sospetti sono stati mappati sui cromosomi interessati loci presentanti disomia uniparentale, poi utilizzati per arrivare ad una mappatura clinica dei cromosomi coinvolti. Vengono qui evidenziate tramite confronto con dati di letteratura le principali tematiche legate alla diagnosi di UPD e alla sua diagnosi in ambito prenatale.

# CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI

## **2.1 ANALISI CROMOSOMICA. CAMPIONI DI SANGUE PERIFERICO (SP)**

Entro 24h dal prelievo di sangue periferico in eparina del paziente, vengono allestite le colture del campione. Per ogni campione vengono predisposte due colture (denominate  $\alpha$  e  $\beta$ ): in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> vengono aggiunti 9 ml di terreno di coltura RPMI 1640, 0,2 ml di PHA, 1 ml di campione di sangue periferico. Le fiasche vengono riposte in incubatore per 72h, al termine delle quali vengono aggiunte alla fiasca  $\alpha$  2-3 gocce di Colchicina. La coltura prosegue l'incubazione per 1h. Il contenuto della fiasca viene quindi riportato in una provetta, poi centrifugata per 10' a 2000 rpm. Aspirato il surnatante e risospeso il fondello al vortex, si aggiungono 10 ml di soluzione ipotonica, si agita ripetutamente per inversione e si attende 15'.

Dopo nuova centrifugazione per 10' a 2000 rpm, si aspira il sovrnatante e si aggiunge rapidamente agitando al vortex il fissativo. Si porta a un volume finale di 10 ml, si agita per inversione e si attende 15'.

Centrifugando per 10' a 2000 rpm, aspirando il sovrnatante e risospeso il fondello al vortex, si prepara il pellet per un lavaggio con fissativo, che viene aggiunto fino a 10ml e lasciato per 10'. I lavaggi in fissativo si ripetono fino ad ottenere un fondello trasparente, che viene poi risospeso in circa 2 ml di fissativo residuo. A questo punto si allestiscono i vetrini. Su ogni vetrino si indicano i dati del paziente e la coltura da cui proviene il materiale ( $\alpha$  o  $\beta$ ).

Per ogni coltura vengono allestiti circa 3 vetrini. In caso di necessità (es. insufficiente crescita o poche mitosi nella coltura  $\alpha$ ) la coltura  $\beta$  può essere portata fino ad un massimo di 96h e processata quindi come la  $\alpha$ .

### **2.1.2 TERRENI DI COLTURA E SOLUZIONI UTILIZZATE PER CAMPIONI DI SP**

TERRENO DI COLTURA RPMI 1640 (100 ml di RPMI 1640 (EUROCLONE-CELBIO) + 25 ml di FBS + 0.2 ml di penicillina G sodica + 0.2 ml di streptomina solfato + 1 ml di L-

glutamina)

SOLUZIONE IPOTONICA (KCl 0.075M)

FISSATIVO (3 Etanolo assoluto:1 Acido acetico glaciale)

PHA M (phytohemagglutinin M)(INVITROGEN) (40µg/ml)

COLCHICINA (SIGMA) (10µg/ml)

EPARINA VISTER (PFIZER) (5000 U.I./ml)

FBS (fetal bovine serum)(HYCLONE-CELBIO)

PENICILLINA G SODICA (PHARMACIA)(50000 U.I./ml)

STREPTOMICINA SOLFATO (BRISTOL-MYERS SQUIBB) (50000 U.I./ml.)

L-GLUTAMINA (EUROCLONE-CELBIO) (200mM)

## **2.2 ANALISI CROMOSOMICA. CAMPIONI DI LIQUIDO AMNIOTICO**

Il campione (2 provette da 10 ml) viene messo in coltura entro 24h dal prelievo. Le provette vengono centrifugate per 10' a 2000 rpm. Si preleva il sovrantante (che può essere utilizzato per il dosaggio dell' $\alpha$ -fetoproteina) in modo da lasciare circa 2 ml di liquido nella provetta sopra il pellet di cellule. Si risospende quindi al vortex e si procede con la coltura secondo uno dei due metodi sotto riportati.

### **2.2.1 METODO IN SITU**

Per ogni campione si allestiscono le colture in 3 capsulini (amniodish) e 1 fiasca da 25 cm<sup>2</sup>. Si prepara ogni capsulino con 2 ml di terreno Chang e la fiasca con 4 ml di terreno RPMI.

Viene quindi diviso equamente il contenuto della prima provetta tra il 1° e 2° capsulino; il contenuto della seconda provetta tra il 3° capsulino e la fiasca. Le colture allestite si lasciano in incubatore per almeno 4 gg per consentire l'impianto delle cellule.

In 4<sup>a</sup> giornata viene cambiato il terreno dei 3 capsulini. In 5<sup>a</sup>/6<sup>a</sup> giornata vengono osservati i capsulini all'invertoscopio per valutare il numero e la grandezza dei cloni presenti. Si ritengono utili ai fini dell'esame citogenetico cloni che occupano più o meno il campo ottico, e che manifestano una buona attività proliferativa (osservabile al microscopio per la presenza di cellule birifrangenti); dai 3 capsulini si dovranno ottenere almeno 10 cloni osservabili. Ai capsulini che non sono pronti in 7<sup>a</sup> giornata viene cambiato il terreno per stimolare la crescita cellulare.

Al termine della coltura il trattamento per l'ottenimento delle metafasi inizia con l'aggiunta di 2-3 gocce di colchicina per ogni capsulino. Le colture vengono quindi lasciate in incubatore per 2h (max. 4h). Quindi, sotto cappa chimica, il vetrino contenuto nel capsulino viene posto in una Petri di vetro contenente 5 ml di soluzione ipotonica per 10'. Si procede poi al prefissaggio aggiungendo 0.5-1.5 ml di fissativo e attendendo 10'. Seguono poi la fissazione e due lavaggi dei campioni condotti aspirando la soluzione e aggiungendo 7 ml di fissativo per 10'. Si procede infine all'asciugatura dei vetrini utilizzando una pompa a vuoto. L'osservazione all'invertoscopio dei vetrini permette di valutare la qualità delle mitosi ottenute e poter variare se necessario le condizioni ambientali di asciugatura (T° e umidità).

In caso di scarsa crescita o scarsa resa di cloni con metafasi utilizzabili nei capsulini si deve ricorrere alla coltura in fiasca, nella quale viene sostituito il terreno RPMI con terreno Chang e attesi 2-3 gg per consentire una buona crescita. Dopo osservazione all'invertoscopio, se la crescita è sufficiente si procede alla tripsinizzazione come descritto nel metodo in fiasca.

In alcuni casi (ad esempio campioni molto ematici) per l'allestimento della coltura si utilizza unicamente il metodo in fiasca.

### **2.2.2 METODO IN FIASCA**

Da ogni provetta di campione si allestiscono 3 colture in fiasca, una con RPMI e 2 con Chang. Senza mai cambiare il terreno (a meno che non sia ematico), si osservano le fiasche con Chang in 10ª giornata. Se il numero di cloni risulta superiore a 6-7 si procede al trattamento della coltura.

Il trattamento della coltura avviene attraverso tripsinizzazione.

Aspirato il terreno, si aggiungono 4 ml di tripsina EDTA 1X a temperatura ambiente e si pone la fiasca in incubatore per 3'-4'. Si osserva all'invertoscopio fino al momento del distacco delle cellule e si aggiunge quindi 1 ml di FCS per bloccare l'azione della tripsina. Il campione viene poi trasferito in una provetta sterile preparata con 4 ml di RPMI.

Dopo centrifugazione per 10' a 2000 rpm, si aspira il sovrantante e si aggiungono 4 ml di RPMI, risospendendo infine al vortex. Si centrifuga nuovamente per 10' a 2000 rpm e si procede nuovamente con il lavaggio con RPMI e la risospensione del pellet di cellule al vortex. La semina avviene quindi in 2 o 3 capsulini preparati con 2 ml di Chang.

Dopo 1-2 gg si procede all'osservazione e al trattamento come per il metodo in situ.

## **2.2.3 TERRENI DI COLTURA E SOLUZIONI UTILIZZATE PER CAMPIONI DI LA**

CHANG B (IRVINE SCIENTIFIC) (Reidratare in 10 ml di acqua per soluzioni iniettabili il Chang A ed aggiungerlo al Chang B. Aggiungere 0.2 ml di penicillina G sodica, 0.2 ml di streptomicina solfato e 1 ml di L-glutamina)

TERRENO DI COLTURA RPMI 1640 (100 ml di RPMI 1640 (EUROCLONE-CELBIO) + 25 ml di FBS + 0.2 ml di penicillina G sodica + 0.2 ml di streptomicina solfato + 1 ml di L-glutamina)

SOLUZIONE IPOTONICA (Na citrato 1%)

FISSATIVO (3 Etanolo assoluto:1 Acido acetico glaciale)

COLCHICINA (SIGMA) (10 $\mu$ g/ml)

FBS (fetal bovine serum)(HYCLONE-CELBIO)

PENICILLINA G SODICA (PHARMACIA) (50000 U.I./ml)

STREPTOMICINA SOLFATO (BRISTOL-MYERS SQUIBB) (50000 U.I./ml.)

L-GLUTAMINA (EUROCLONE-CELBIO) (200mM)

TRIPSINA EDTA 1X (EUROCLONE-CELBIO) Trypsin 0.05% EDTA 0.02%

## **2.3 ANALISI CROMOSOMICA. CAMPIONI DI VILLI CORIALI (CV)**

Entro 24h dal prelievo il campione deve essere posto in coltura. I villi, dopo essere stati lavati con terreno di coltura per villi, vengono suddivisi in due capsulini (identificati con  $\alpha$  e  $\beta$ ) e riposti in incubatore.

Il giorno seguente, i capsulini  $\alpha$  vengono trattati direttamente con il metodo semidiretto. L'analisi dei villi coriali è completa solo se vengono osservate sia metafasi provenienti da materiale trattato con il metodo semidiretto sia metafasi provenienti da materiale trattato con il metodo colturale.

### **2.3.1 METODO SEMIDIRETTO**

Aggiunte 4 gocce di colchicina ai capsulini  $\alpha$ , vengono lasciati nuovamente in termostato per 2h. Allo scadere, tolto il terreno di coltura, viene eseguito un lavaggio con soluzione ipotonica. Poi la soluzione viene aspirata, se ne aggiunge di nuova e la si lascia per 7'. Dopo aver rimosso

l'ipotonica, si bagnano i villi con alcune gocce di fissativo, che vengono riaspirate immediatamente, per poi risospenderli in abbondante fissativo (2-3 ml circa) dove li si lascia per 10'.

Si procede quindi all'idratazione. Rimosso il fissativo, e raggruppati nel capsulino i villi, vengono aggiunte e subito tolte le seguenti soluzioni: etanolo 90%, etanolo 70% e etanolo 50%. Tolta l'ultima soluzione di etanolo, viene aggiunta acqua distillata. Riaspirata l'acqua e raggruppati i villi in una zona del capsulino, si asciugano quindi delicatamente i villi con della carta bibula. Si aggiungono poche gocce di dissociante (in rapporto alla quantità di materiale) e si lascia agire 10'.

Risospesi i villi si passa quindi alla fase di 'strisciatura' del campione sui vetrini, ponendo una goccia del sovrantante su un vetrino rettangolare appoggiato su una piastra termostatica a 36°C e spostando lentamente avanti e indietro il materiale con una pasteur di vetro ripiegata ad ansa.

Il primo vetrino viene quindi osservato all'invertoscopio per valutare la quantità e la qualità delle mitosi. Nel caso in cui il materiale non sia sufficiente si ripete la procedura utilizzando i villi del capsulino  $\beta$ .

### **2.3.2 METODO COLTURALE**

Si utilizza il capsulino  $\beta$ . Aspirato il terreno, viene fatto un lavaggio ai villi aggiungendo e riaspirando successivamente circa 2 ml di terreno Hank's preriscaldato a 37°C. Si aggiunge quindi pronase (a 37°C) in quantità sufficiente a coprire il materiale. Passati circa 4' si blocca l'azione della pronase con l'aggiunta di 2-3 ml di terreno Hank's freddo. Dopo aver aspirato la soluzione, si esegue un lavaggio dei villi con nuova aggiunta di Hank's freddo che viene quindi riaspirato. Una fiasca viene preparata bagnandone la superficie interna con 1 ml di terreno di coltura Chang. Tale terreno viene poi riaspirato e usato per pipettare i villi trattati, trasferirli e distribuirli sulla fiasca stessa. Il terreno di coltura viene quindi tolto dalla fiasca in modo da non smuovere i villi adesi alla superficie e la fiasca viene riposta in incubatore. A parte il tempo necessario per l'aggiunta il giorno dopo di 5 ml di Chang, la fiasca viene lasciata in incubatore per 6 giorni senza essere spostata. Al 10°g. viene osservata per verificarne la crescita e, in presenza di un numero di cloni sufficiente, viene tripsinizzata come le fiasche di liquido amniotico. La preparazione dei capsulini viene fatta aggiungendo a 3 capsulini quantità crescenti di tripsinizzato, per ottenere densità diverse di crescita. Dopo 1 o 2 gg. la crescita nei capsulini permette solitamente di procedere al trattamento degli stessi per ottenere i preparati per la lettura



al microscopio. Si aggiunge qualche goccia di colchicina a ciascun capsulino scelto e si lasciano in incubatore per 2h, al termine delle quali si processano i vetrini nello stesso modo di quelli ottenuti da liquido amniotico.

### **2.3.3 TERRENI DI COLTURA E SOLUZIONI UTILIZZATE PER CAMPIONI DI CV**

TERRENO DI COLTURA PER VILLI (100 ml di terreno RPMI 1640 con 25mM HEPES (EUROCLONE-CELBIO) + 10 ml FBS + 0.2 ml penicillina G sodica + 0.2 ml streptomicina solfato + 1 ml L-glutamina)

HBSS (HANK'S BALANCED SALT SOLUTION) (EUROCLONE-CELBIO)

CHANG B (Reidratare in 10 ml di acqua per soluzioni iniettabili il Chang A ed aggiungerlo al Chang B. Aggiungere 0.2 ml di penicillina G sodica, 0.2 ml di streptomicina solfato e 1 ml di L-glutamina)

SOLUZIONE IPOTONICA (0.8% Na citrato, 0.2 % KCl)

FISSATIVO (3 Etanolo assoluto:1 Acido Acetico Glaciale)

DISSOCIANTE (70% Acido Acetico Glaciale)

PRONASE (ROCHE) (7U/ml)

FBS (fetal bovine serum)(HYCLONE-CELBIO)

PENICILLINA SODICA (PHARMACIA) (50000 U.I./ml)

STREPTOMICINA SOLFATO (BRISTOL-MYERS SQUIBB) (50000 U.I./ml.)

L-GLUTAMINA (EUROCLONE-CELBIO) (200mM)

COLCHICINA (SIGMA) (10µg/ml)

### **2.4 ANALISI CROMOSOMICA. OSSERVAZIONE DEI PREPARATI**

L'osservazione dei preparati è stata condotta, previa colorazione dei vetrini con bandeggio QFQ, con microscopio ottico a fluorescenza.

Il bandeggio QFQ si ottiene utilizzando una soluzione preparata sciogliendo 100mg di quinacrina mustard in 200 ml di H<sub>2</sub>O, lasciando in agitazione per 2h e conservandola poi a -4°C in un contenitore ricoperto di stagnola. Per il lavaggio dei vetrini nel bandeggio QFQ e come soluzione di inclusione per il bandeggio QFQ si usa la soluzione tampone McIlvaine pH 7, preparata a partire da due soluzioni: la soluzione A (Acido Citrico 0.1M ) e la soluzione B

( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  71.628g/l preparata lasciando in agitazione tutta la notte). Per ottenere la soluzione tampone vengono uniti 175 ml di soluzione A a 825 ml di soluzione B.

Il vetrino viene immerso nella soluzione di bandeggio e, dopo alcuni secondi, viene risciacquato con soluzione tampone McIlvaine pH 7 e coperto con un coprioggetto.

## **2.5 UPD: METODO DI ANALISI TRAMITE STR (SHORT TANDEM REPEAT)**

La dimostrazione di UPD è possibile praticamente solo con metodi molecolari. Per l'estrazione del DNA da cellule di LA, CV e SP è stato usato il FlexiGene DNA kit (Quiagen).

Sono stati poi selezionati 6-9 marcatori genetici STR (short tandem repeat), mappati sul braccio lungo del cromosoma, che presentano elevati valori di eterozigotità (>70%). Per amplificare tali regioni microsatellite, vengono disegnate specifiche coppie di primers da marcare con molecole fluorescenti. In particolare, un singolo oligonucleotide di ciascuna specifica coppia, viene marcato con una delle seguenti molecole: TET (5'-Tetrachloro-Fluorescein-Phosphoramidite), FAM (5'- Phosphoramidite), HEX (5'-Hexachloro-Fluorescein-Phosphoramidite).

Le condizioni di amplificazione sono costanti:

30'' a 94 °C

30'' a temperatura di annealing (marcatore-specifica)

30'' a 72 °C.

Ogni reazione di amplificazione contiene circa 60 ng di DNA genomico diluiti in 15  $\mu\text{l}$  di soluzione di reazione contenente:

- 1.5  $\mu\text{l}$  di Buffer (tampone 100mM Tris HCL, pH 8.3, 500mM KCl)
- 1.2  $\mu\text{l}$  di  $\text{MgCl}_2$  (25mM)
- 3.5  $\mu\text{l}$  di dNTPs mix (2.5mM)
- 7 pmol di primer Forward marcato con molecola fluorescente.
- 7 pmol di primer Reverse
- 0.5 U/ $\mu\text{l}$  di Ampli Taq Gold Applied Biosistem (250 units, 5 U/ $\mu\text{l}$ )

Gli amplificati ottenuti vengono genotipizzati mediante corsa in sequenziatore automatico ad elettroforesi capillare (ABI 310, Applied Biosystems, CA, USA).

I campioni da genotipizzare sono preparati combinando circa 1 $\mu\text{l}$  del prodotto di PCR con 18-19  $\mu\text{l}$  di formamide (agente denaturante) e 1  $\mu\text{l}$  di un marcatore di riferimento contenente frammenti di dimensioni note marcati con un fluorocromo con emissione nel rosso (Rox).

L'elettroforesi di ciascun campione avviene in condizioni denaturanti (60°C) e ha una durata di 24 minuti.

La dimostrazione della mancata trasmissione di marcatori molecolari del cromosoma da parte di uno dei genitori è indicativa di presenza di Disomia Uniparentale. In particolare, la discriminazione tra etero- ed isodisomia per un determinato segmento cromosomico si effettua mediante la dimostrazione di “riduzione dell'eterozigotità dei genitori ad omozigotità” nel probando.

L'assenza di Disomia Uniparentale viene determinata mediante l'osservazione della corretta trasmissione al probando di almeno 2 marcatori completamente informativi (4 alleli diversi nei due genitori).

## **2.6 IBRIDAZIONE IN SITU**

I vetrini da utilizzare vanno innanzitutto pretrattati. Vengono prima immersi per 30' a 37° C in SSC 2X, poi per 5' ciascuno nella scala ascendente degli alcoli (70%, 90%, 100%) e si lasciano quindi asciugare all'aria per 10'.

Si procede alla preparazione delle sonde e all'ibridazione seguendo protocolli differenziati in base al tipo di sonda commerciale utilizzata (Vysis, Oncor).

Quando i vetrini sono pronti nel caso delle sonde Oncor a sequenza unica si procede a ibridazione. La sonda viene portata a temperatura ambiente e se necessario si centrifuga 2/3''. Se ne prelevano 10 µL da utilizzare per un vetrino 25x25 mm o 20 µL per un vetrino 22x50 mm; si stende la sonda sul vetrino, si copre con il coprioggetto. Il vetrino viene trasferito sulla piastra Hybrite dove si procede a denaturazione a 75°C per 5 minuti, il vetrino viene quindi sigillato lasciato a ibridare a 37°C per tutta la notte.

Nel caso delle sonde Vysis a sequenza unica, invece, quando i vetrini sono pronti si procede in modo diverso. Si miscelano 7 µL di LS1 hybridization buffer (fornito con la sonda) con 1 µL di sonda e 2 µL di acqua distillata (per ogni area di ibridazione 25x25), si centrifuga il tutto, se necessario, per 2/3'' e si stendono i 10 µL della miscela su un'area di 25x25 mm del vetrino da ibridare. Si copre con il coprioggetto e si trasferisce il vetrino sulla piastra Hybrite dove si procede a denaturazione a 75°C per 5 minuti. Si sigilla il vetrino e si pone a ibridare a 37°C per tutta la notte. Si procede quindi ai lavaggi post-ibridazione.

Nel caso delle sonde Oncor, la soluzione SSC (SSC 2X per sonde a sequenza unica; SSC 1X per sonde painting e per sonde per i centromeri di tutti i cromosomi; SSC 0.25X per sonde alfoidi e

telomeriche) viene portata alla temperatura di 72°C. Dopo aver rimosso il sigillante dal vetrino con la pinzetta, si immergono i vetrini in una soluzione 2XSSC a temperatura ambiente per agevolare il distacco del vetrino coprioggetto; quindi per 5' li si lascia nella soluzione SSC a 72°C (fino a 15 min per i vetrini ibridati con sonde painting). I vetrini vengono quindi trasferiti in 40 ml circa di SSC4X, 0.1% Tween 20 a temperatura ambiente per almeno 10'; possono rimanere in questa soluzione anche per alcuna ore e a temperatura ambiente e fino a 15 giorni a 4°C.

Nel caso delle sonde Vysis viene preparata una prima soluzione 0,4X SSC/0,3% NP-40 che viene scaldata in bagnetto termostato a 72°C e una seconda soluzione 2X SSC/0,1% NP-40 che viene tenuta a temperatura ambiente. I vetrini vengono immersi nella prima soluzione per 2 minuti, e quindi nella seconda soluzione per 1 minuto. Si prosegue quindi con le controcolorazioni.

Nel caso di sonde della Ditta Oncor, sonde marcate con metodo indiretto, si devono invece effettuare ulteriori passaggi per permetterne il rilevamento. Dopo aver preparato la camera umida ricoprendo il fondo di una scatola porta vetrini con carta bibula imbevuta di acqua distillata, si procede diversamente a seconda che si tratti con sonde marcate con biotina o con sonde marcate con digossigenina. Nel caso di sonde marcate con biotina, si procede nel seguente modo. Si prepara la soluzione di rilevazione diluendo l'Avidina-Cy3 1mg/ml e la soluzione di detection in rapporto 1:100. Tolti i vetrini dalla soluzione SSC 4X, 0.1% Tween 20 e lasciato scolare l'eccesso di liquido, si stendono 200 µL di soluzione di rilevazione per ogni area di ibridazione 25x25 mm. Si ricopre quindi il vetrino con un coprioggetto di plastica e si lascia ad incubare per 30' a 37°C nella camera umida. Quindi, rimosso il coprioggetto e lasciato scolare l'eccesso di liquido, si eseguono tre lavaggi del vetrino in SSC 4X, 0.1% Tween 20 per 2' a temperatura ambiente. Si può a questo punto proseguire con le controcolorazioni. Nel caso invece di sonde marcate con digossigenina, si procede nel seguente modo. Si prepara la soluzione di rilevazione diluendo l'anti-digossigenina fluoresceinata 200µg/ml e la soluzione di detection in rapporto 10:100. Tolti i vetrini dalla soluzione SSC 4X, 0.1% Tween 20 e lasciato scolare l'eccesso di liquido, si stendono 200 µL di soluzione di rilevazione per ogni area di ibridazione 25x25 mm. Si ricopre quindi il vetrino con un coprioggetto di plastica e si lascia ad incubare per 30' a 37°C nella camera umida. Quindi, rimosso il coprioggetto e lasciato scolare l'eccesso di liquido, si eseguono tre lavaggi del vetrino in SSC 4X, 0.1% Tween 20 per 2' a temperatura ambiente. Si può a questo punto proseguire con le controcolorazioni.

La controcolorazione viene effettuata con DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole), stendendo 200 µL di DAPI 0.2 µg/mL sul vetrino, coprendolo con un coprioggetto di plastica e lasciandolo per 15' a temperatura ambiente dentro la camera umida. Al microscopio viene utilizzato il filtro per DAPI

per la ricerca delle metafasi e il filtro per FITC o Cy3, a seconda del fluorocromo utilizzato, per la visione del segnale di ibridazione.

### **2.6.1 REAGENTI E PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI**

SSC (Saline-sodium citrate buffer) 20X pH 7:

(sciogliere 175.3 gr di NaCl + 88.2 gr di Na Citrato in 800 mL di acqua distillata, portare a 1 litro, autoclavare per 20 min a 120°C)

SSC 2X (4 mL di SSC 20X + 36 mL acqua sterile)

SSC 1X (2 mL di SSC 20X + 38 mL acqua sterile)

SSC 0.25X (0.5 mL SSC 20X + 39.5 mL acqua sterile)

NP-40 (nonidet P40) (IGEPAL CA-630-SIGMA)

0,4X SSC/0,3% NP-40 (0,8 ml di SSC 20X+0,1 ml NP-40+39,1 ml di acqua sterile)

2X SSC/0,1% NP-40 (4ml di SSC 20X+40 µl NP40+36 ml di acqua sterile)

Hybrisol VI

Detergente per lavaggi (SSC 4X + 0.1% Tween 20); per 40 mL: 8 mL SSC 4X + 32 mL acqua sterile + 40 µL Tween 20

scala degli alcoli 70%, 90%, 100% etanolo anidro in acqua distillata

rubber cement o sigillante similare (acquistato in ferramenta)

DAPI (soluzione madre: 5 mg di DAPI in 25 mL di acqua distillata pari ad una concentrazione di 0.2 µg/mL; soluzione d'uso: 1 µL di soluzione di madre in 999 µL di SSC 2X pari ad una concentrazione di 0.2 µL/mL. Conservare le aliquote al buio a -20°C)

Soluzione Antifade (0,233 gr DABCO+100µl Tris-HCl 2M+ 9ml Glicerolo+ 900µl acqua distillata)

Soluzione di detection (1% BSA, SSC4X, 0,1% Tween 20)

anti-digossigenina fluoresceinata Fab Fragments (Roche), 200µg/ml.

Avidina Cy3 (Fluorolink-Cy3- Amersham Pharmacia), 1mg/ml

## CAPITOLO 3: RISULTATI

Analisi di 3 casi giunti alla nostra osservazione:

### 3.1 Caso 1: P-V

L'analisi cromosomica è eseguita su un campione di Liquido Amniotico (LA) prelevato a una donna di 28 anni a 16,2 settimane gestazionali. L'analisi viene eseguita su indicazione di ansia materna, viene condotta osservando 2 colture in situ, 10 colonie e 52 metafasi e riscontra in un cariotipo maschile una traslocazione reciproca tra un cromosoma 9 e un cromosoma 15: 46,XY,t(9;15)(q21-22.1;q13-15). I limiti della tecnica lasciano spazio a diverse interpretazioni dei punti esatti di traslocazione. In Fig. 3.1.1 è riportata una metafase rappresentante il risultato dell'analisi di LA e in Fig. 3.1.2 i derivativi e gli ideogrammi dei derivativi conseguenti alle diverse combinazioni dei punti di rottura della traslocazione.

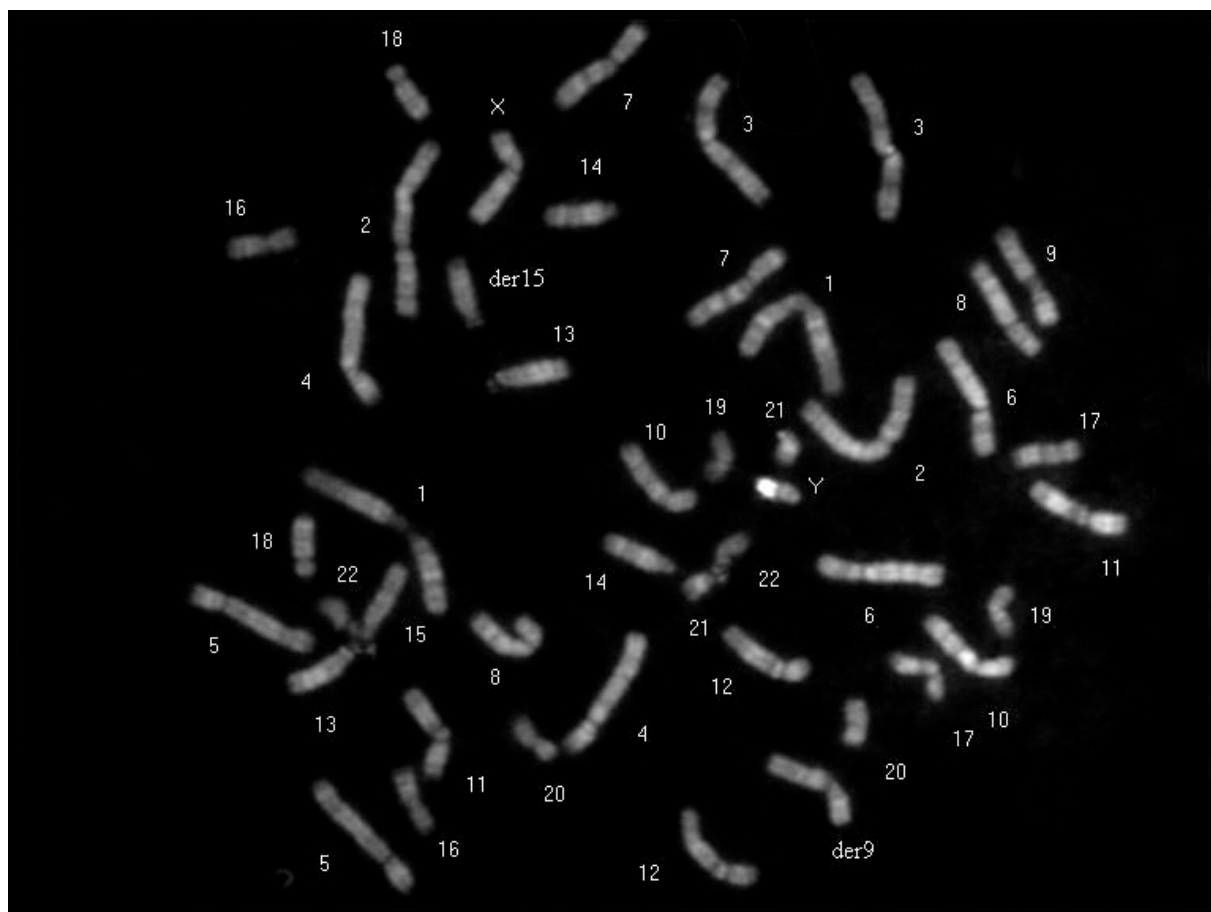


Fig. 3.1.1 Immagine da analisi del campione di LA. Cariotipo: 46,XY,t(9;15)(q21-22.1;q13-15).

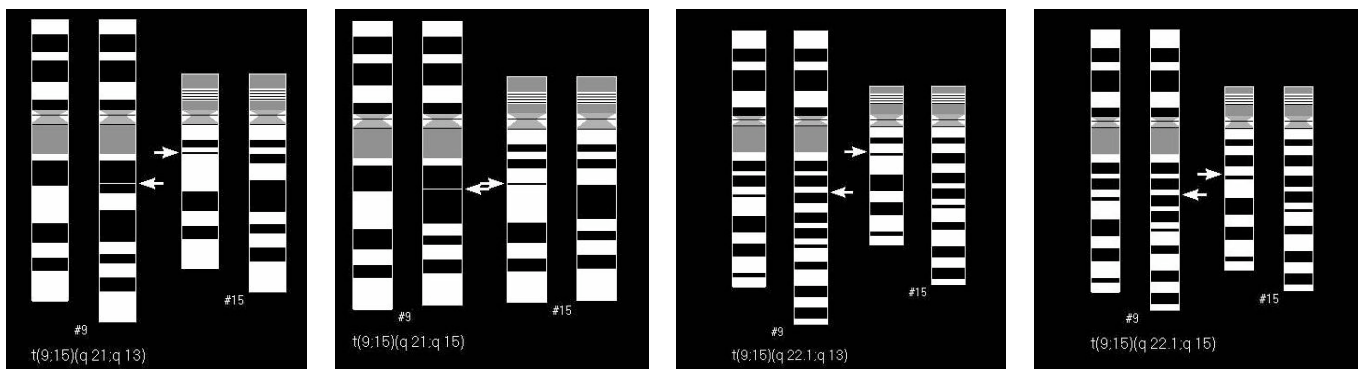
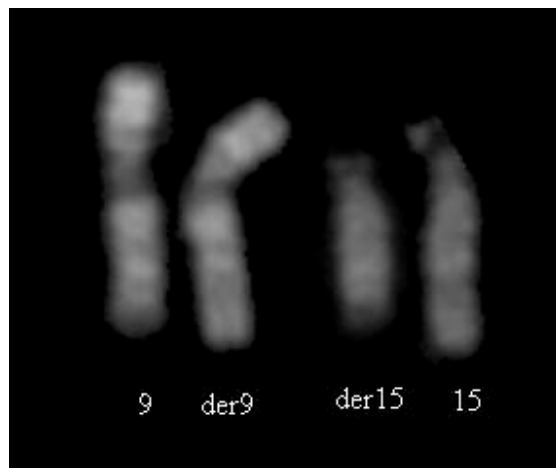


Fig. 3.1.2 Ideogrammi rappresentanti nell'ordine i cromosomi 9, der9, der15, 15. I derivativi sono ottenuti ipotizzando i diversi punti di rottura compatibili con l'osservazione citogenetica.

L'analisi del cariotipo parentale risulta normale: è possibile concludere che si tratta di una traslocazione de novo.

Si procede quindi con l'analisi FISH per valutare eventuali delezioni, utilizzando:

- la sonda SNRPN, che mappa nella regione critica PWS/AS (segnale rosso), insieme a una sonda terminale del 15q (segnale verde); il dato che si ottiene indica la presenza della regione 15q11.2. La sonda terminale del 15q, oltre a fungere come controllo interno, identifica la parte terminale del cromosoma 15 nel derivativo (Fig. 3.1.3, Fig. 3.1.4)
- la sonda D15S10, che identifica la regione comprendente *UBE3A* e *D15S10* (regione critica PWS/AS), insieme alla sonda D15Z1, che identifica la regione  $\alpha$ -satellite centromerica (segnale verde), e alla sonda PML, che funge da controllo del braccio 15q ibridizzando nella regione 15q22 e dà indicazioni per la definizione della traslocazione (segnale arancio) (Fig. 3.1.5, Fig. 3.1.6)
- la sonda GABRB3, che identifica il locus GABRB3 localizzato nella regione critica PWS/AS (segnale rosso), insieme alla sonda D15Z1 che identifica la regione  $\alpha$ -satellite centromerica (segnale verde) (Fig. 3.1.7, Fig. 3.1.8)

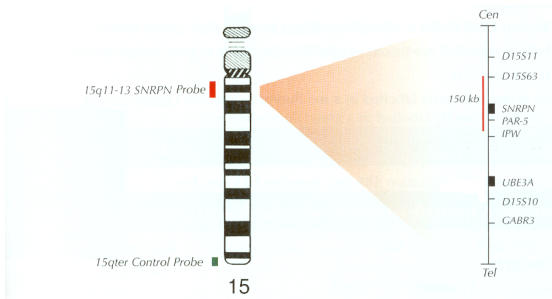


Fig. 3.1.3 Regioni di legame delle sonde *SNRPN*/15qter (Vysis)

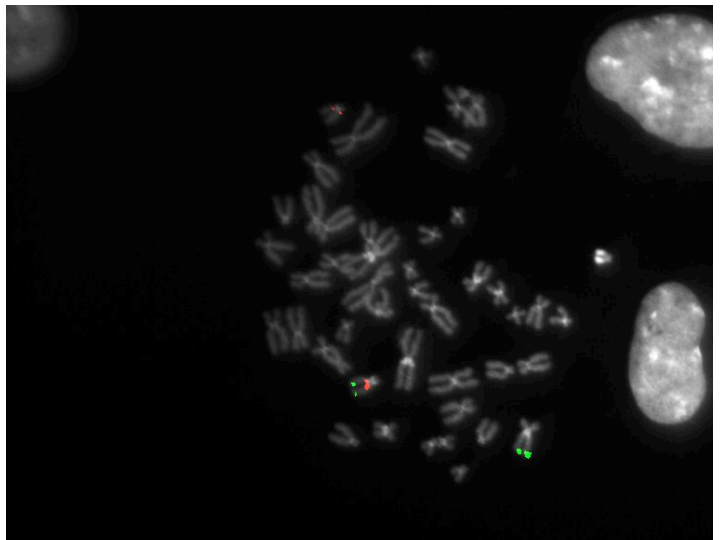


Fig. 3.1.4 Risultato di FISH ottenuto con le sonde *SNRPN*/15qter



Fig. 3.1.5 Regioni di legame delle sonde *D15Z1*/*D15S10*/*PML* (Oncor)

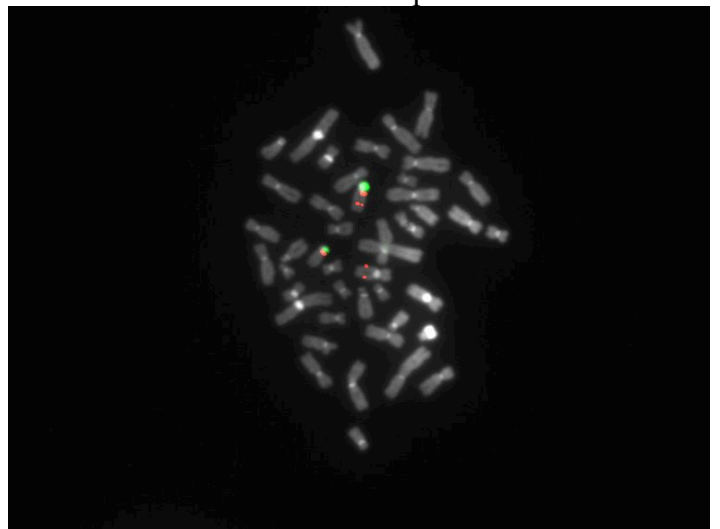


Fig. 3.1.6 Risultato di FISH ottenuto con le sonde *D15Z1*/*D15S10*/*PML*

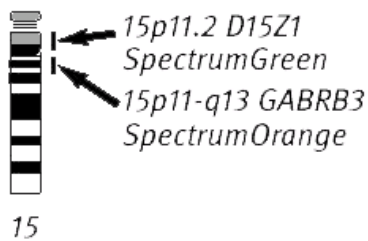


Fig. 3.1.7 Regioni di legame delle sonde *D15Z1*/*GABRB3*(Oncor)

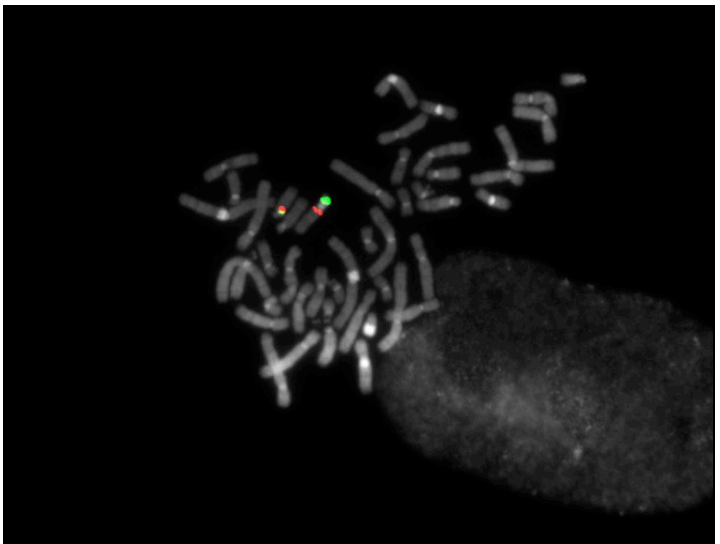


Fig. 3.1.8 Risultato di FISH ottenuto con le sonde *D15Z1*/*GABRB3*



Il punto di rottura sul cromosoma 15 risulta essere prossimale alla banda q22. Si procede quindi tramite PCR ed elettroforesi capillare all'analisi di alcuni marcatori microsatelliti del cromosoma 15. Le regioni in cui mappano i markers prescelti sono riportate in Fig. 3.1.9, e i risultati in Tab. 3.1.1.

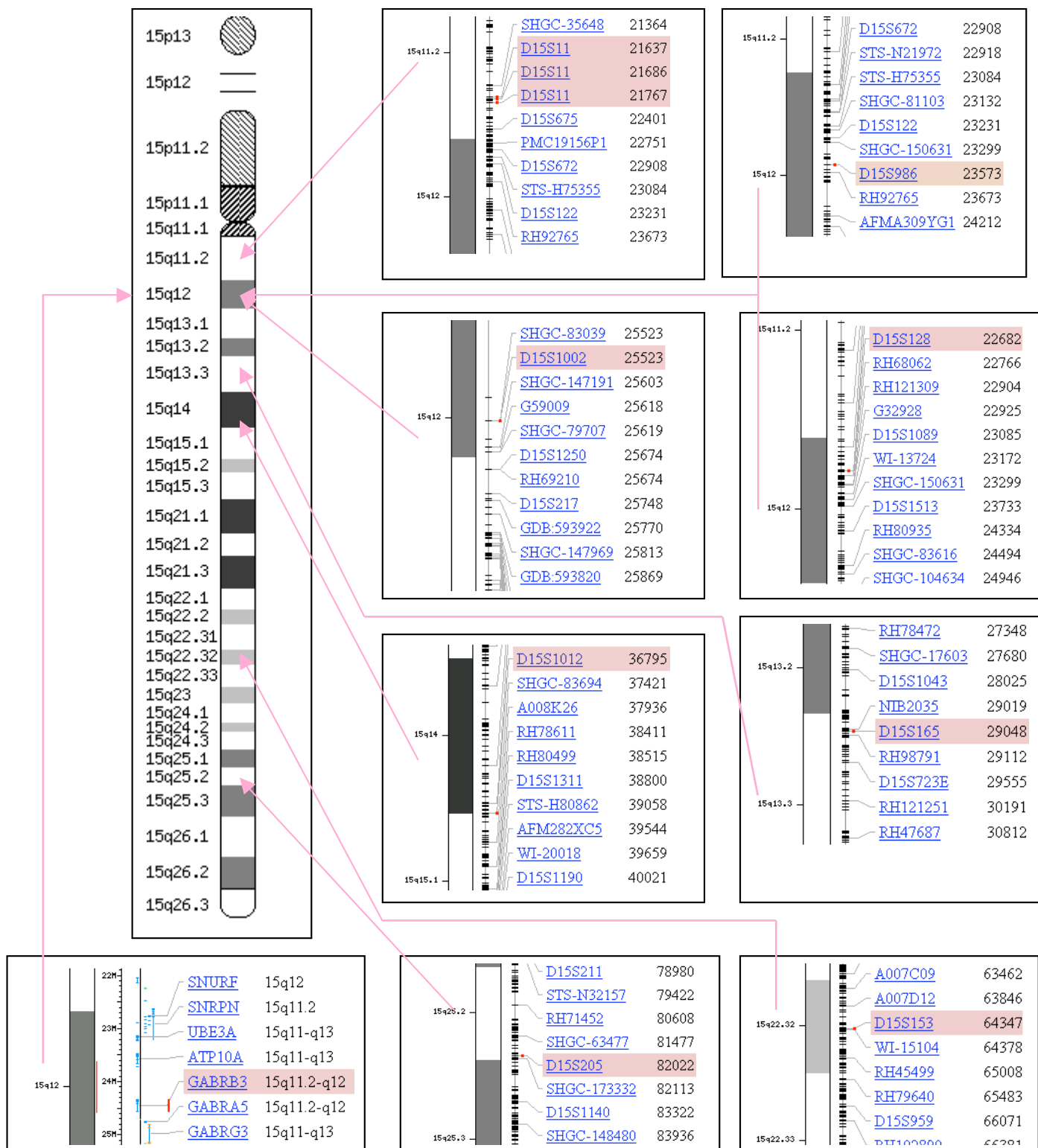


Fig. 3.1.9 Mappa dei loci STS indagati lungo il cromosoma 15

LOCALIZZAZIONE	LOCUS STR	M	F	P	RISULTATO
15q11.2-q12	D15S11	A1- A2	A2- A1	A2- A2	n.i.(non disomia paterna)
15q11.2-q12	D15S128	A2- A1	A3-A2	A2- A3	n.i.(non disomia materna)
15q11.2-q12	D15S986	A3- A3	A2- A2	A1- A2	<b>isoUPDpat</b>
15q11.2-q12	D15S1002	A1- A2	A1- A1	A1- A2	n.i.
15q11.2-q12	GABRB3	A1- A2	A1- A2	A1- A2	n.i.
15q13.3	D15S165	A2- A2	A1- A2	A2-A1	n.i.(non disomia materna)
15q14	D15S1012	A2-A1	A1-A2	A3-A1	n.i.(non disomia paterna)
15q22	D15S153	A3-A4	A1-A3	A2-A1	biparentale
15q25.2	D15S205	A3-A2	A2-A3	A1-A2	n.i.(non disomia paterna)

Tab. 3.1.1 Risultato dell'analisi di segregazione allelica degli STR del cromosoma 15.

I marcatori analizzati sono informativi in 2 casi. Un solo marcatore della regione 15q11.2-q12 (D15986) risulta informativo per la presenza di omozigosi paterna; nella stessa regione un altro marcatore è indicativo per la presenza di un contributo materno (D15S11) e un diverso marcatore è indicativo per la presenza di un contributo paterno (D15S128). Altri 2 marcatori di quella regione risultano non informativi. Nella regione 15q22 si evidenzia invece un contributo biparentale. Dopo consulenza genetica la coppia ha deciso di interrompere la gravidanza.

### **3.2 Caso 2: F-P**

L'analisi cromosomica è eseguita su un campione di Villi Coriali (CV) prelevato a una donna di 39 anni a 11,6 settimane gestazionali. L'analisi viene eseguita su indicazione di età materna, viene condotta osservando 30 metafasi, in parte con il metodo semidiretto, in parte con quello culturale e riscontra in un cariotipo femminile una traslocazione robertsoniana tra due cromosomi 15: 45,XX,t(15;15)(q10;q10). In Fig. 3.2.1 sono riportate la foto e l'ideogramma del cromosoma derivante da questa traslocazione e in Fig. 3.2.2 una metafase rappresentante il dato dell'analisi di coltura CV.

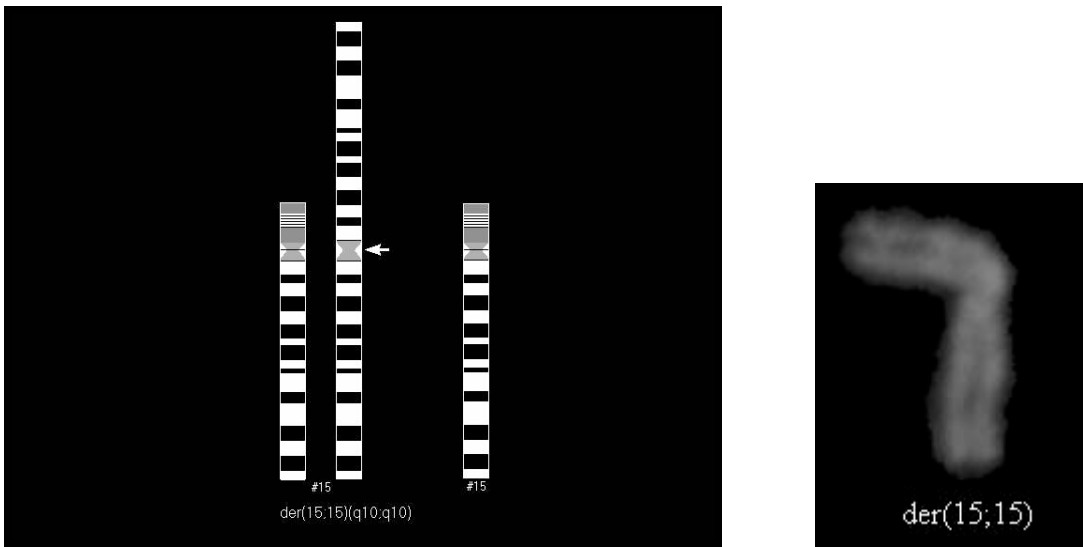


Fig. 3.2.1 Ideogramma rappresentante i cromosomi 15, il der15;15 conseguente alla traslocazione, l'altro cromosoma 15, e immagine del derivativo tratta da una metafase dell'analisi di LA.

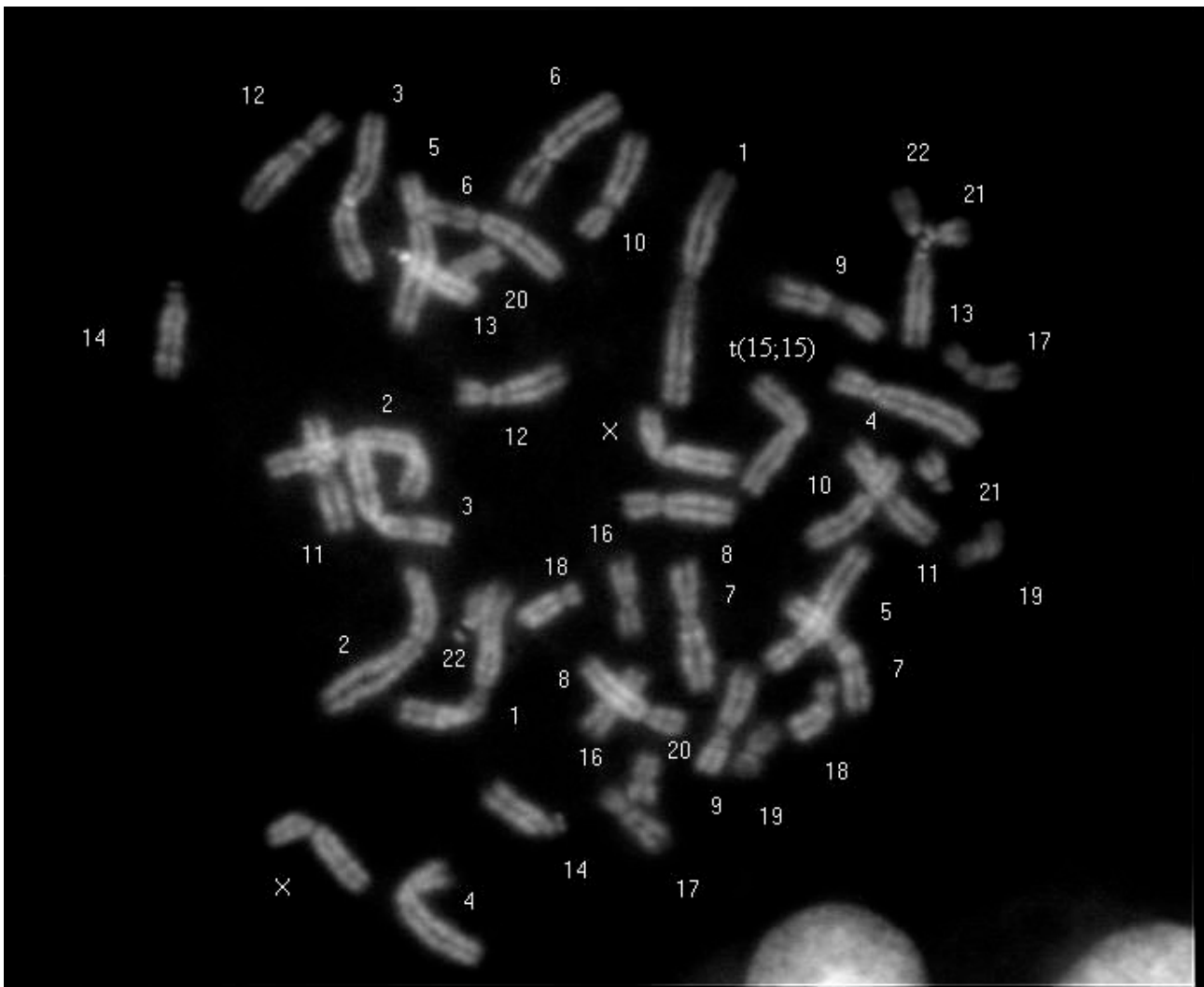


Fig. 3.2.2 Immagine da analisi del campione di LA. Cariotipo: 45,XX,t(15;15)(q10;q10).

Le analisi dei cariotipi parentali risultano normali : è possibile concludere che si tratta di una traslocazione de novo. Si procede quindi tramite PCR ed elettroforesi capillare all'analisi di alcuni marcatori microsatelliti del cromosoma 15. Le regioni in cui mappano i markers prescelti sono riportate in Fig. 3.2.3, e i risultati in Tab. 3.2.1.

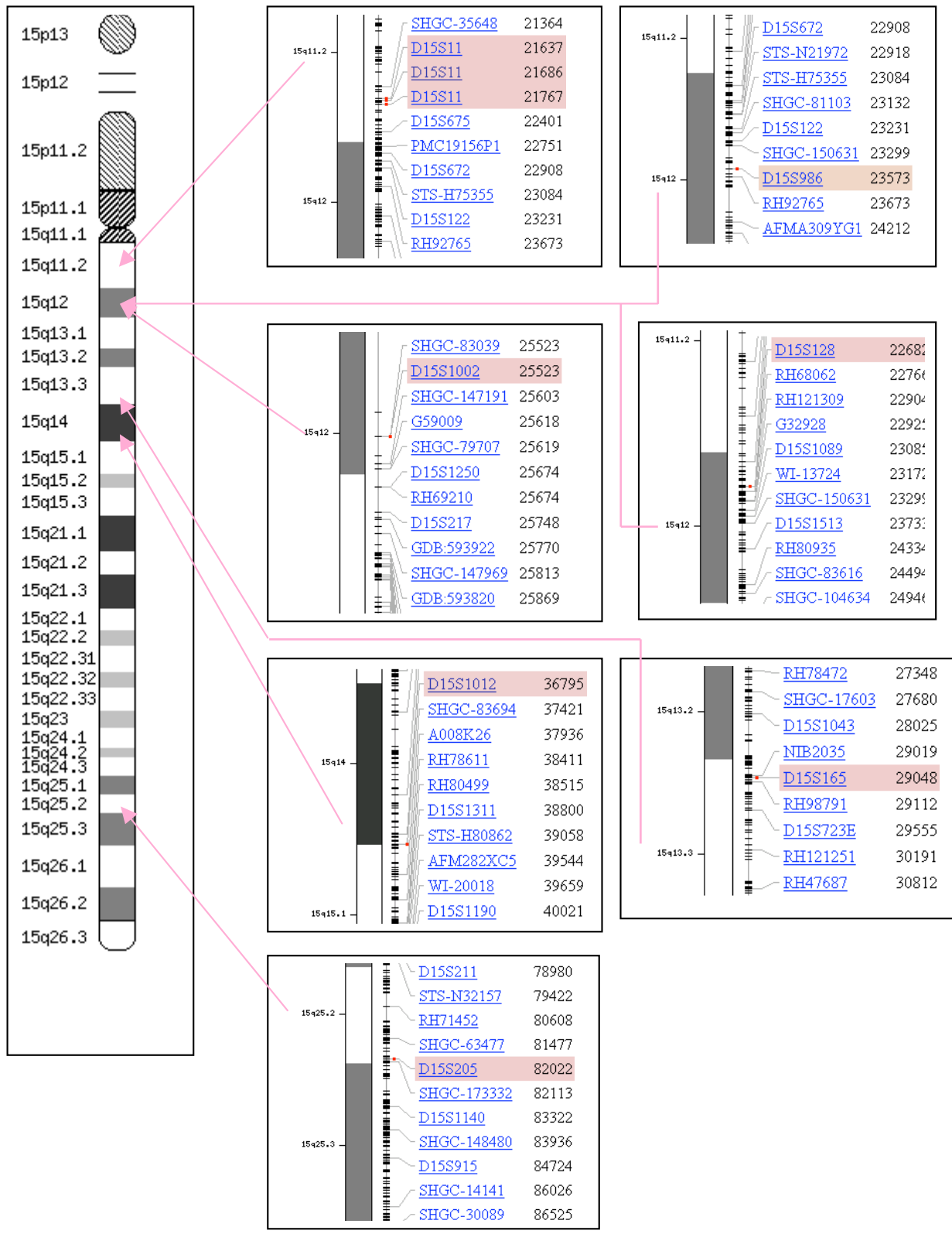


Fig. 3.2.3 Mappa dei loci STS indagati lungo il cromosoma 15.

LOCALIZZAZIONE	LOCUS STR	M	F	P	RISULTATO
15q11.2-q12	D15S11	A2-A3	A1-A1	A4-A1	<b>isoUPD paterna</b>
15q11.2-q12	D15S128	A2-A3	A1-A1	A2-A1	<b>isoUPD paterna</b>
15q11.2-q12	D15S986	A1-A1	A2-A2	A2-A2	<b>UPD paterna</b>
15q11.2-q12	D15S1002	A3-A4	A2-A2	A1-A2	<b>isoUPD paterna</b>
15q13.3	D15S165	A1-A2	A1-A1	A3-A1	n.i.
15q14	D15S1012	A3-A3	A1-A1	A2-A1	<b>isoUPD paterna</b>
15q25.2	D15S205	A1-A3	A2-A2	A1-A2	<b>isoUPD paterna</b>

Tab. 3.2.1 Risultato dell'analisi di segregazione allelica degli STR del cromosoma 15.

L'omozigosi osservata per tutti i marcatori informativi considerati, sia nella regione 15q11.2-q12, sia al di fuori di tale regione, depone per la presenza di isodisomia uniparentale paterna del cromosoma 15. Dopo consulenza genetica la coppia ha deciso di interrompere la gravidanza.

### 3.3 Caso 3: S-V

L'analisi cromosomica è eseguita su un campione di Liquido Amniotico prelevato a una donna di 38 anni a 16,2 settimane gestazionali. L'analisi viene eseguita su indicazione di età materna, viene condotta osservando 3 colture in situ, 18 colonie e 173 metafasi e riscontra in un cariotipo maschile la presenza di una traslocazione robertsoniana tra un cromosoma 13 e un cromosoma 14: 45,XY,t(13;14)(q10;q10). Le Fig. 3.3.1 e 3.3.2 sono relative all'analisi di LA e riportano i due cromosomi coinvolti in questa traslocazione e il derivativo formatosi.

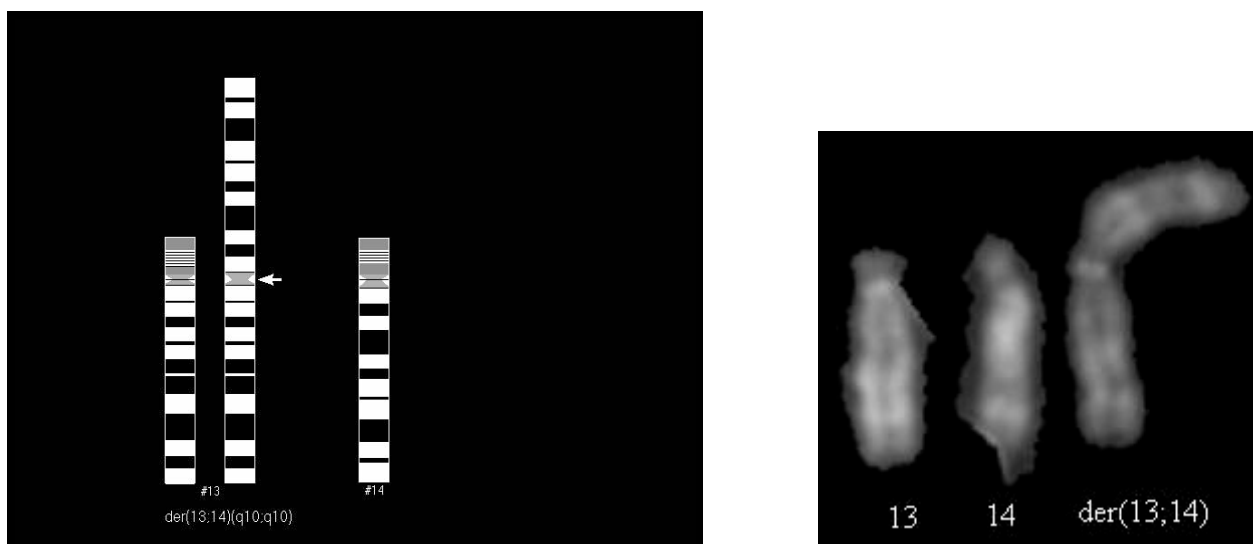


Fig. 3.3.1 Ideogramma e immagine rappresentanti i cromosomi 13, il der13;14 conseguente alla

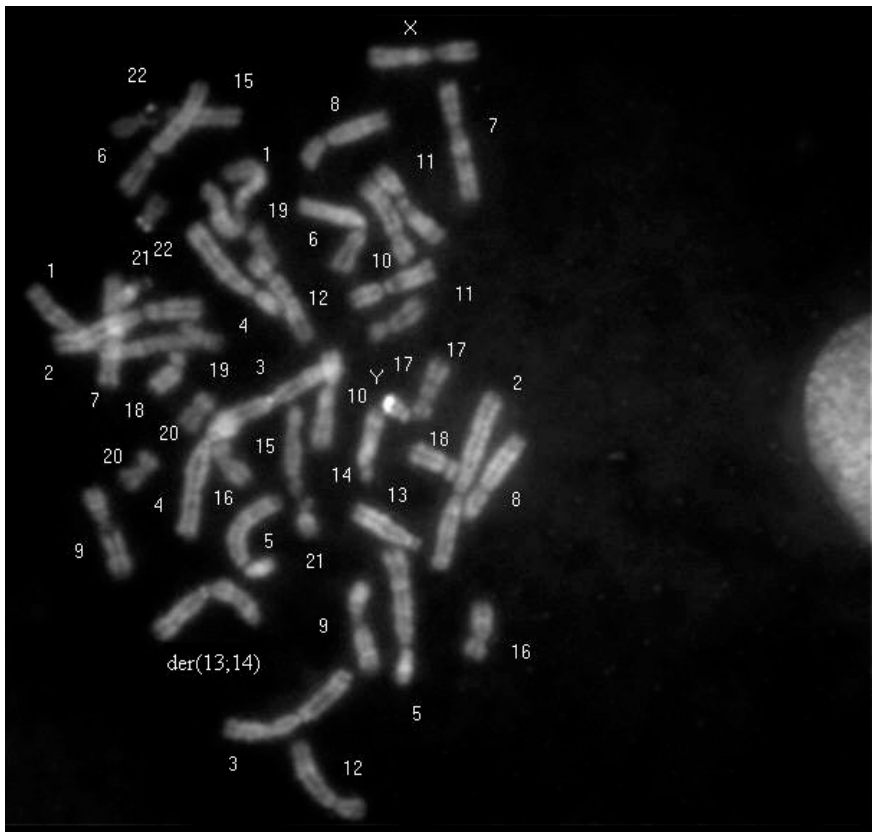


Fig. 3.3.2 Immagine da analisi del campione di CV. Cariotipo: 45,XY,t(13;14)(q10;q10).

Dalle analisi dei cariotipi parentali risulta che la traslocazione è di eredità materna (Fig. 3.3.3).

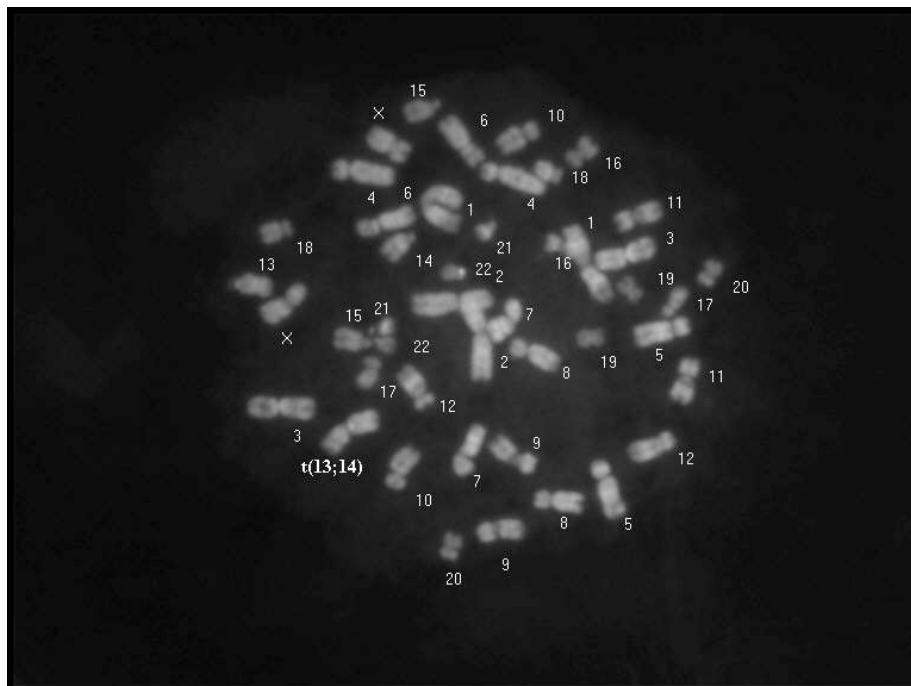


Fig. 3.3.3 Immagine da analisi del campione di SP materno. Cariotipo: 45,XX,t(13;14)(q10;q10).

Si procede quindi tramite PCR ed elettroforesi capillare all'analisi di alcuni marcatori microsatelliti del cromosoma 14. Le regioni in cui mappano i markers prescelti sono riportate in Fig. 3.3.4 e i risultati in Tab. 3.3.1.

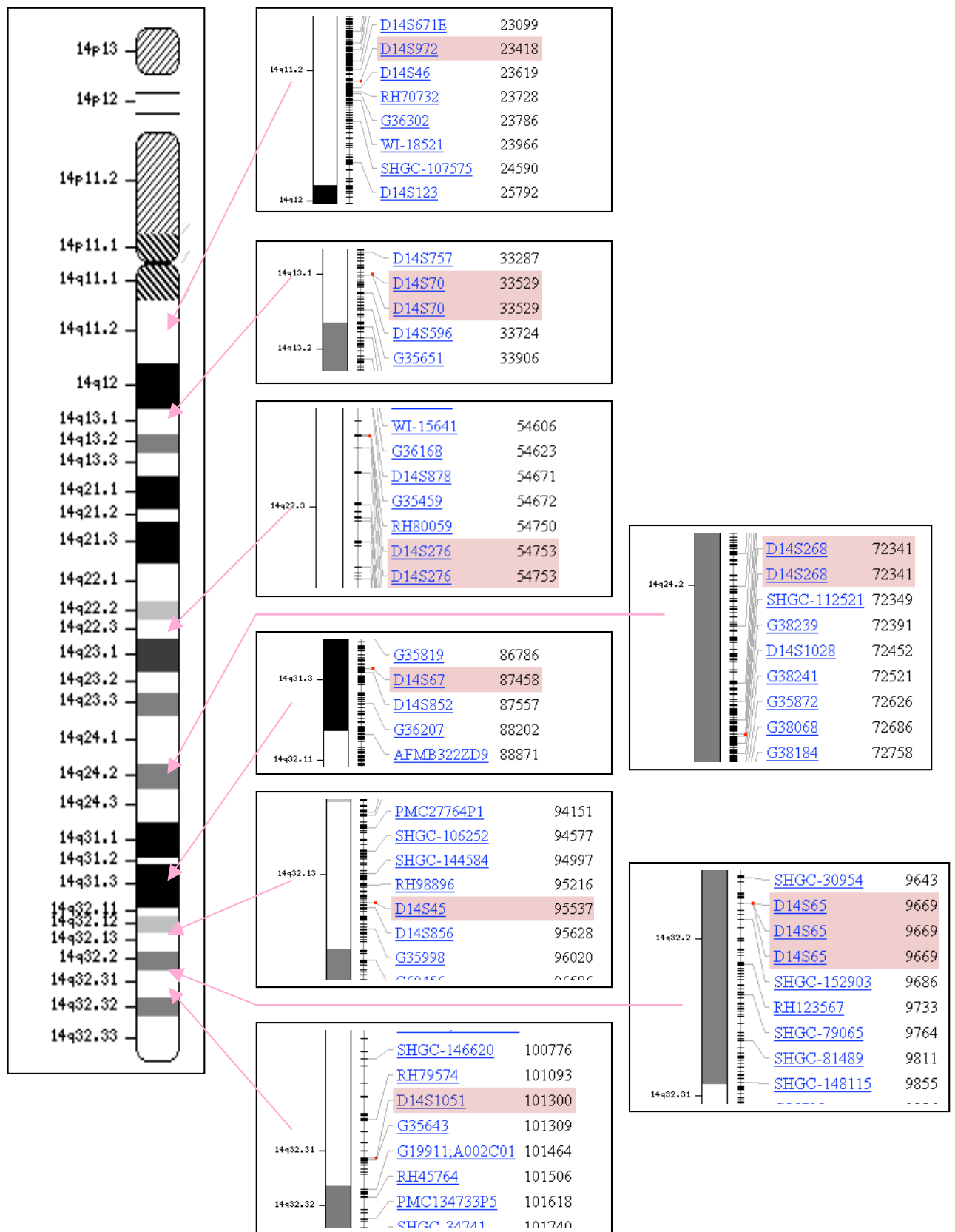


Fig. 3.3.4 Mappa dei loci STS indagati lungo il cromosoma 14.

LOCALIZZAZIONE	LOCUS STR	M	F	P	RISULTATO
14q11.2	D14S972	A2-A3	A4-A2	A1-A4	biparentale
14q13.1	D14S70	A1-A2	A2-A1	A3-A2	n.i.(non disomia paterna)
14q22.3	D14S276	A3-A1	A1-A3	A2-A1	n.i.(non disomia paterna)
14q24.2	D14S268	A3-A2	A2-A3	A1-A2	n.i.(non disomia paterna)
14q31.3	D14S67	A1A1	A1A1	A2-A1	n.i.
14q32.1	D14S45	A1-A2	A3-A1	A4-A3	biparentale
14q32.2	D14S65	A1-A2	A3-A1	A2-A3	biparentale
<b>14q32.31</b>	<b>D14S1051</b>	<b>A2-A2</b>	<b>A2-A2</b>	<b>A1-A1</b>	<b>UPD materna</b>

Tab. 3.3.1 Risultato dell'analisi di segregazione allelica degli STR del cromosoma 14.

I marcatori analizzati sono informativi in 4 casi. In tre loci è evidente il contributo biparentale; un solo marcatore, nella regione 14q32.31, risulta informativo per la presenza di disomia uniparentale materna. Dopo consulenza genetica la coppia ha deciso di interrompere la gravidanza.



# CAPITOLO 4: DISCUSSIONE

## 4.1 Caso 2: F-P

Tre risultati fenotipici sono possibili per un individuo con traslocazione Robertsoniana omologa bilanciata del cromosoma 15:

1. un individuo fenotipicamente normale con aborti spontanei ripetuti
2. un individuo con PWS se la traslocazione è di derivazione materna
3. un individuo con AS se la traslocazione è di derivazione paterna (Cheung et al. 1997).

Nel nostro caso, constatata citogeneticamente la presenza della traslocazione ed essendo da dati di letteratura il rischio di UPD teorico per traslocazioni Robertsoniane omologhe 15;15 indicato da Robinson *et al.* approssimativamente nel 14% (Kotzot, 2001), abbiamo analizzato i cromosomi da un punto di vista molecolare.

L'analisi dei loci STS ha accertato l'esistenza di disomia uniparentale paterna legata alla presenza di isocromosoma del cromosoma 15.

L'UPD associata alla presenza di un isocromosoma (intendendone la definizione citogenetica) può teoricamente essere il risultato di diversi meccanismi che possono avvenire a livello meiotico o mitotico:

1. Una incorretta divisione meiotica dei centromeri determina la formazione di un gamete con isocromosoma che si unisce a un gamete normale. Lo zigote successivamente, a livello mitotico, perde il cromosoma omologo (Fig. 4.1A)
2. Una incorretta divisione meiotica dei centromeri determina la formazione di un gamete con isocromosoma che si unisce a un gamete nullisomico (Fig. 4.1B)
3. In uno zigote trisomico, una incorretta divisione mitotica dei centromeri tra cromatidi fratelli o non fratelli determina la formazione di un isocromosoma, seguita da perdita dell'altro omologo (Fig. 4.1C)
4. In uno zigote monosomico una incorretta divisione mitotica dei centromeri determina la formazione di un isocromosoma (Fig. 4.1D) (Kotzot, 2001).

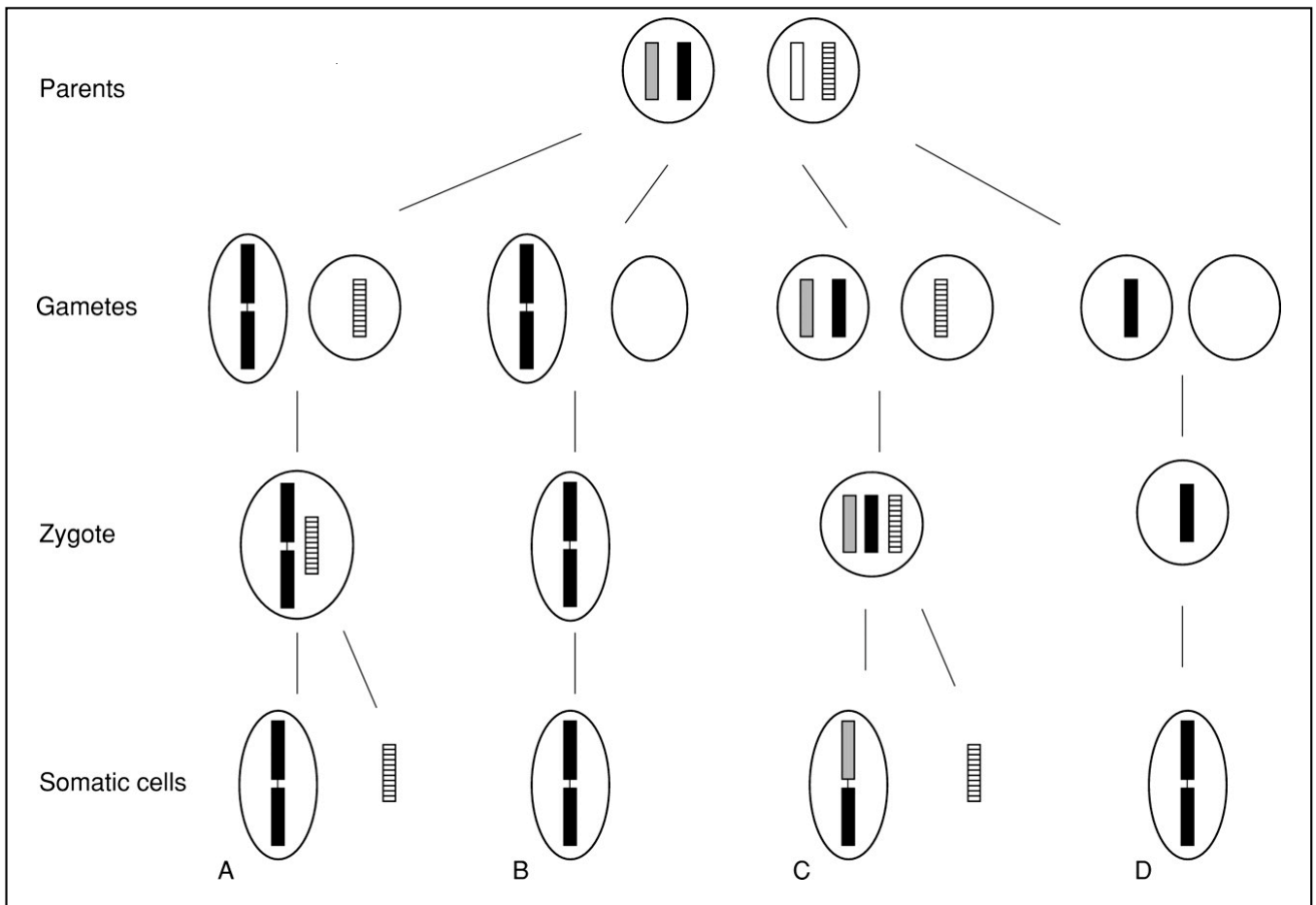


Fig. 4.1 Formazione di UPD associata a isocromosoma (Kotzot, 2001)

Possiamo ipotizzare quale di questi meccanismi abbia dato luogo nel nostro caso all'isocromosoma basandoci su dati di letteratura. Uno studio di Kotzot del 2001 riporta i dati di un'analisi di casi caratterizzati da isocromosomi. Per gli isocromosomi formatisi 'de novo' l'analisi con marcatori molecolari evidenzia nella maggioranza di questi casi la presenza di isodisomia (30/34 casi nei dati di Kotzot). In uno studio su isocromosomi di cromosomi acrocentrici Berend et al. suggeriscono che, nei casi di UPD paterna, l'origine paterna dell'UPD e la completa isodisomia lungo tutti questi isocromosomi depongono a favore dell'ipotesi più probabile di formazione dell'isocromosoma per mancata divisione al centromero durante le prime mitosi di uno zigote monosomico (Fig. 4.1D). Infatti dal momento che la non disgiunzione avviene più frequentemente durante la I meiosi materna e che al 50% essa produce un gamete nullisomico, la successiva fecondazione da parte di un gamete maschile produce uno zigote monosomico. La monosomia di un autosoma è probabilmente letale nelle prime fasi di embriogenesi e può essere salvata da duplicazione del cromosoma paterno che determina però così la formazione di un isocromosoma e di UPD paterna (Berend et al., 2000; Kotzot, 2001).

E' possibile in questo caso fare una chiara previsione del fenotipo atteso: sindrome di Angelman, nella forma legata a UPD, caratterizzata quindi, rispetto alle forme che hanno una delezione all'origine, da migliore crescita fisica, minor numero di attacchi, minor grado di atassia, e migliori capacità cognitive (Fridman et al., 2000).

#### **4.2 Caso 3: S-V**

In questo caso l'analisi citogenetica ha rilevato la presenza di una traslocazione tra un cromosoma 13 e un cromosoma 14 di origine materna. Siamo passati a una valutazione molecolare dei markers microsatelliti del cromosoma 14 dal momento che, da dati di letteratura:

- la maggior parte delle UPD(14)mat riportate riguardano portatori di traslocazioni Robertsoniane bilanciate (13q;14q), (14q;14q), (14q;21q) con fenotipo anormale (Sanlaville et al., 2000).
- i portatori di traslocazioni Robertsoniane sono stati identificati come un gruppo a rischio per UPD dal momento che si riscontra una non-disgiunzione aumentata per quei cromosomi implicati nella traslocazione, legata all'incapacità degli omologhi di appaiarsi correttamente (trisomy rescue) (Eggermann et al., 1999).

L'analisi dei loci STS ha accertato rilevato la presenza di disomia uniparentale materna in un singolo locus: siamo in presenza di disomia uniparentale segmentale o meglio, dal momento che è verificata per un solo marker, dell'impossibilità di escluderla.

In letteratura sono riportati per il cromosoma 14: un caso di isodisomia segmentale paterna 14q12-qter (Coveler et al., 2002) e almeno 1 caso di disomia materna segmentale interstiziale del segmento 14q23-q24 (Eggermann et al., 2001).

Per l'isodisomia uniparentale segmentale il meccanismo ipotizzato da Coveler è di un evento embriologico molto precoce di ricombinazione mitotica occorso tra un cromatidio paterno e uno materno, seguito (se la disomia segmentale non è a mosaico) da perdita della linea cellulare disomica per il contributo dell'altro genitore : quest'ultimo fatto potrebbe per esempio essere dovuto all'alterazione di fattori collegati con la sopravvivenza della cellula, o con la presenza di alleli letali in omozigosi o ancora a susseguente suddivisione in tessuti embrionali e extraembrionali (Coveler et al., 2002; Hannula et al., 2001; Kotzot, 2001). Nel nostro caso, l'unica analisi è stata compiuta su LA, quindi l'ipotesi della presenza di un solo tipo di disomia segmentale deve tener conto dei limiti legati al campione analizzato. Per la disomia uniparentale segmentale terminale

(Eggermann et al., 2001) è stato supposto anche un altro meccanismo di formazione che ipotizza inizialmente alla meiosi un evento di ricombinazione e un errore di segregazione e successivamente passa attraverso la formazione di uno zigote trisomico (che nel nostro caso ha una certa probabilità essendoci una traslocazione robertsoniana che favorisce la non-disgiunzione). Segue un eventuale evento di C.O tra cromatidi non uniparentali e la perdita del cromatidio implicato nello scambio e originantisi dal gamete disomico (fig. 4.2.1, 4.2.2) (Kotzot, 2001).

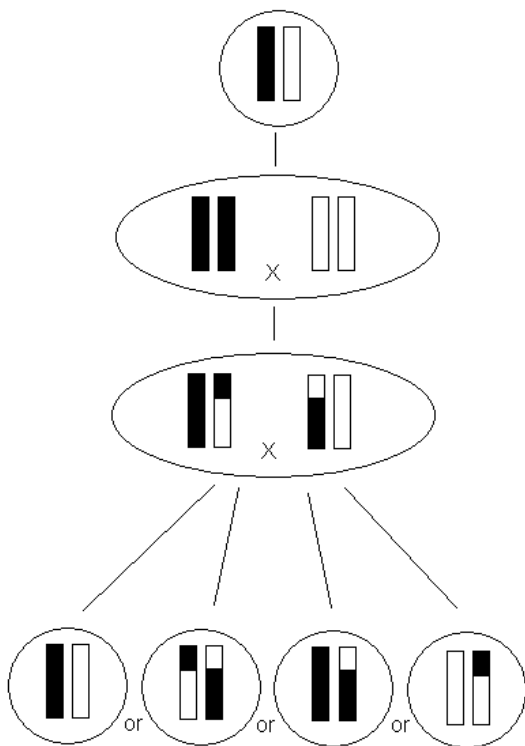


Fig. 4.2.1 Meccanismo di formazione mitotica di UPD segmentale associata a cariotipo normale (Kotzot, 2001).

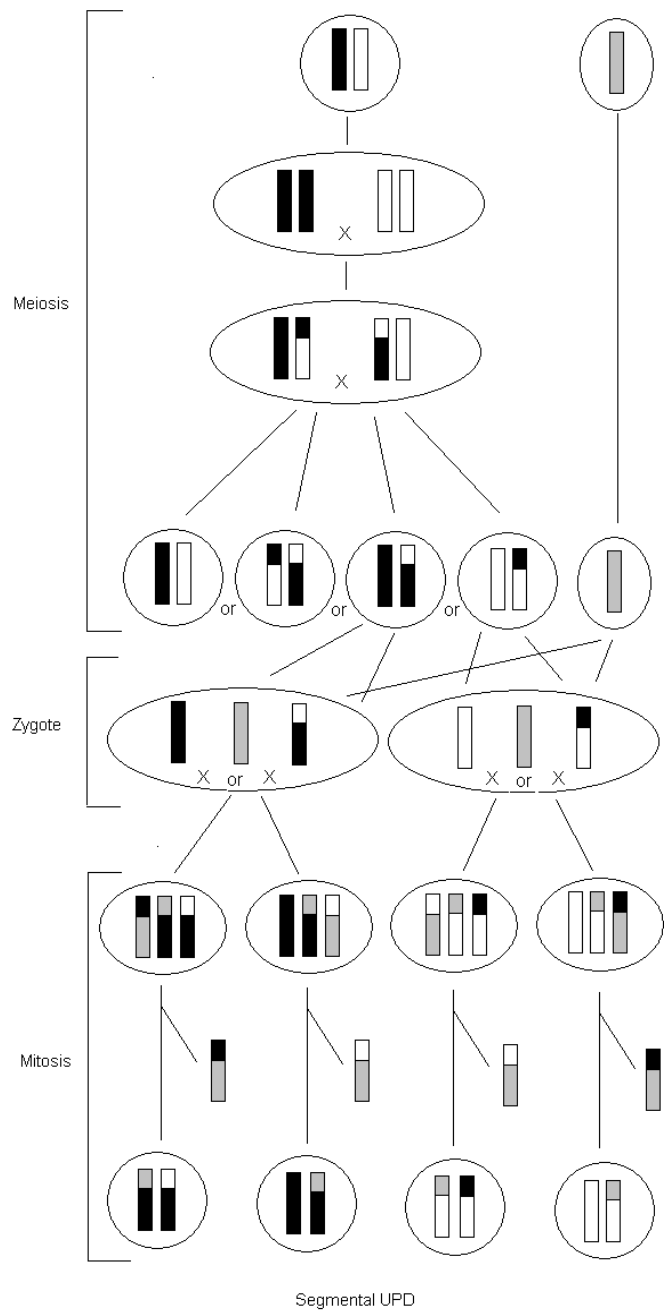


Fig. 4.2.2 Meccanismo di formazione meiotica di UPD segmentale associata a cariotipo normale formatosi per trisomy rescue (Kotzot, 2001).

La nostra analisi ha rilevato un solo sito con UPD.

Il tipo e la quantità di materiale analizzato a nostra disposizione, i tempi necessari per una risposta da sottoporre a un consulente genetico e la successiva scelta di interruzione di gravidanza non hanno permesso di procedere all'estensione dell'analisi dei markers polimorfici nell'intorno del sito presente in disomia. Tanto meno abbiamo potuto avere un riscontro fenotipico.

Considerato che una recente stima di mutazioni microsatellitari dell'intero genoma dà un tasso di mutazione per microsatellite del  $1.94 \times 10^{-4}$  per meiosi (Coveler et al., 2003), non possiamo escludere che il dato da noi rilevato possa essere riferibile a una mutazione.

Nell'ipotesi della UPD, bisogna tener presente che nei casi di UPD segmentale ci si può aspettare una certa variabilità nel fenotipo, in relazione all'estensione del segmento in UPD.

Dei due casi riportati in letteratura uno (matUPD14q23-q24) riguarda un bambino morto all'età di 6 mesi con caratteristiche cliniche di macrocefalia relativa, clinodattilia, ipotonia muscolare, leggero ritardo di crescita, ernia inguinale e di cui non si sono potuti rilevare altri sintomi vista la giovane età (Eggermann et al., 2001).

L'altro caso riportato in letteratura (isodisomia segmentale paterna 14q12-qter) riguarda un bambino nato prematuro (29 settimane) e morto per sopraggiunte complicazioni, che presentava caratteristiche facciali dismorfiche minori, onfalocele, criptorchidismo bilaterale, ernia inguinale bilaterale, clinodattilia del terzo dito, piccola gabbia toracica e conseguente ipoplasia dei polmoni, stenosi polmonare, difetto del setto muscolare ventricolare, emorragia interventricolare di grado 3 (Coveler et al., 2002).

Nel nostro caso non è facile fare alcuna previsione fenotipica dal momento che non si conosce l'esatta estensione del segmento in disomia uniparentale. Tuttavia bisogna sicuramente considerare che nell'uomo nella vicina regione 14q32, dove si è ritrovata disomia uniparentale materna nel nostro caso, è localizzato un gruppo di geni imprintati contenenti *DLKI* (ad espressione paterna), *MEG3/GTL2* (ad espressione materna) (Coveler et al., 2002). Inoltre nella vicina 14q31, sono stati individuati due loci di suscettibilità per il diabete mellito di tipo 2 e due casi di letteratura riportano anche il diabete tra le caratteristiche cliniche di pazienti con matUPD14 inducendo la supposizione che in omozigosi un gene raro, mutato, recessivo possa produrre questa caratteristica clinica (Katahira et al., 2002; Kayashima et al., 2002).

In figura 4.2.3 è riportata la regione cromosomica interessata in questo caso da UPD con evidenziati i loci malattia esistenti nell'intorno.

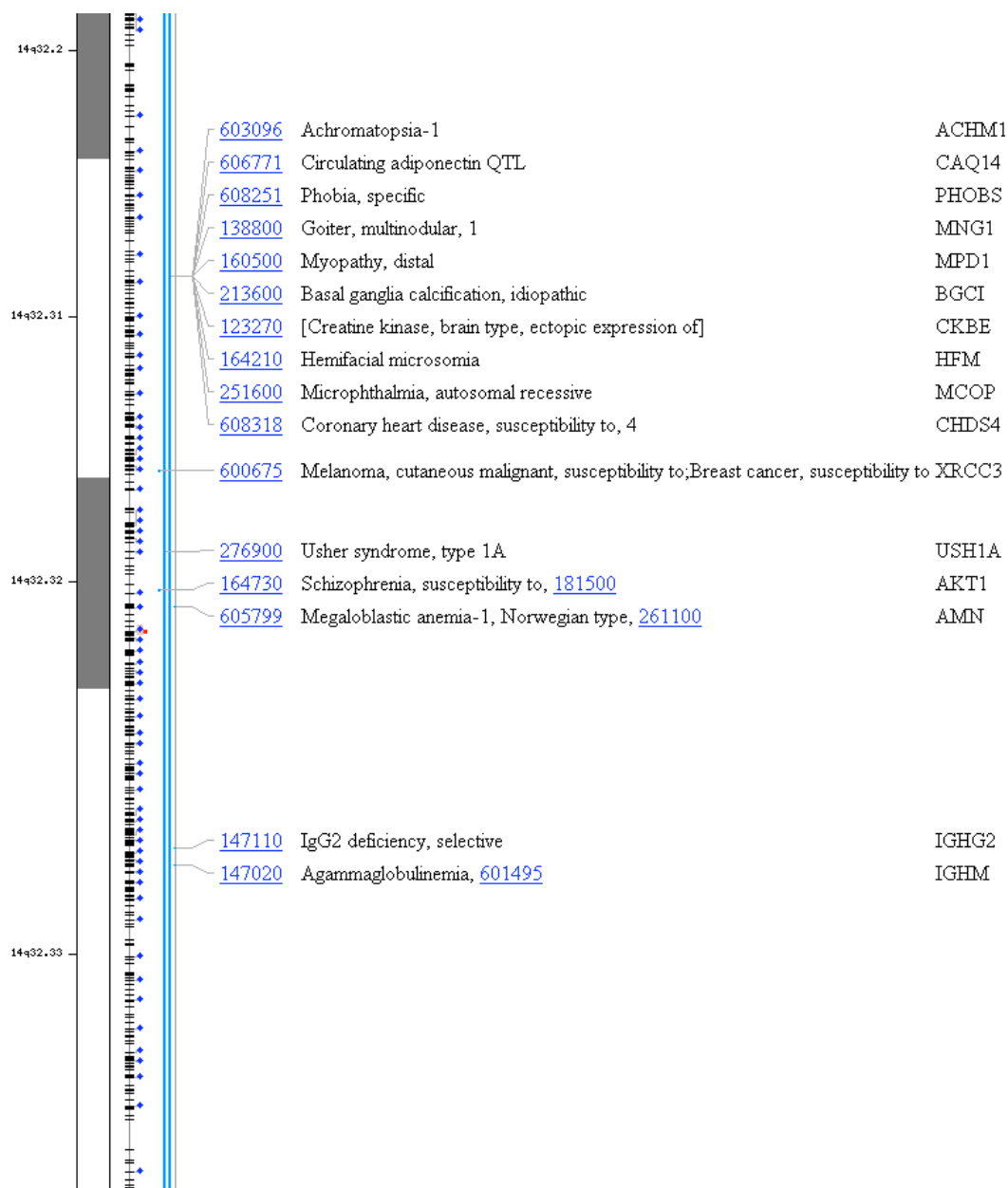


Fig. 4.2.3 Intorno della regione cromosomica 14q32.31 interessata da UPD nel caso S-V.

### **4.3 Caso 1: P-V**

Sono riportati in letteratura alcuni casi di traslocazione apparentemente bilanciata tra un cromosoma 9 e un cromosoma 15. In nessun caso i punti di rottura coincidono con quelli da noi osservati.

In uno di questi casi la traslocazione, che ha punti di rottura definiti con indagine FISH: t(9;15)(q21;q12-13), risulta de novo e, benchè si accompagni a eredità biparentale dei 12 loci STS testati, determina il fenotipo PWS (Schulze et al., 1996). Gli autori che verificano l'assenza di

delezioni nella regione PWS/AS e la presenza di un normale pattern di metilazione in *SNRPN* e *PAR5*, presenti sul der(15), ma un'inattivazione trascrizionale dei geni a valle (*IPW*, *PAR-1*) traslocati sul der(9) della regione, evidenziano un fenomeno dovuto o a un effetto posizionale determinato da giustapposizione delle sequenze del cromosoma 9 o alla distruzione delle normali relazioni di regolazione in cis tra il centro dell'imprinting IC e i geni imprintati di questa regione. Per i rapporti genotipo / fenotipo bisogna considerare quindi anche un effetto da sindrome da geni contigui.

Altri casi di traslocazioni reciproche apparentemente bilanciate coinvolgenti un autosoma e il cromosoma 15, sono stati studiati perchè presenti in individui con fenotipo PWS o AS. Essi si accompagnano a delezioni di due o più loci della regione q11-q13. Sono riportati casi di traslocazioni familiari e in almeno due di questi ( t(8;15), t(6;15) ) il derivativo del cromosoma 15 va incontro a doppio crossing over (D.C.O.) meiotico ineguale che provoca una delezione interstiziale de novo di una piccola regione e la comparsa in un figlio di fenotipo patologico da UPD (Smeets et al., 1992; Smith et al., 1994).

Ne consegue che la concomitanza di traslocazione e UPD segmentale è un caso raro poiché il riarrangiamento più frequente in seguito a traslocazione è la delezione o, se la traslocazione è gametica, l' errore meiotico porta eventualmente ad UPD dell'intera parte traslocata (cariotipo sbilanciato) o dell'intero cromosoma (cariotipo bilanciato).

I nostri dati non mostrano se la traslocazione iniziale è zigotica o gametica. La formazione di una traslocazione gametica predispone a non disgiunzione con conseguenti trisomie e monosomie che si accompagnano a meccanismi di formazione di UPD.

Non ci sono però evidenze in letteratura che inducano a pensare che una traslocazione favorisca un evento di ricombinazione che porta a isoUPD segmentale, per cui si può forse ipotizzare per l'isodisomia paterna interstiziale un origine indipendente dalla traslocazione tramite un evento di D.C.O. secondo uno dei due meccanismi precedentemente descritti.

Va sottolineato invece come la regione interessata da questi eventi di traslocazione e UPD del cromosoma 15 sia una regione instabile ad alto grado di ricombinazione.

La regione interessata da UPD segmentale nel nostro caso è una regione estremamente importante per la determinazione di un fenotipo patologico.

La collocazione del marker D15S986, presente in disomia è infatti, come evidenziato dalla freccia in figura 4.3, nella zona che, in disomia uniparentale per il contributo paterno, comporta AS.

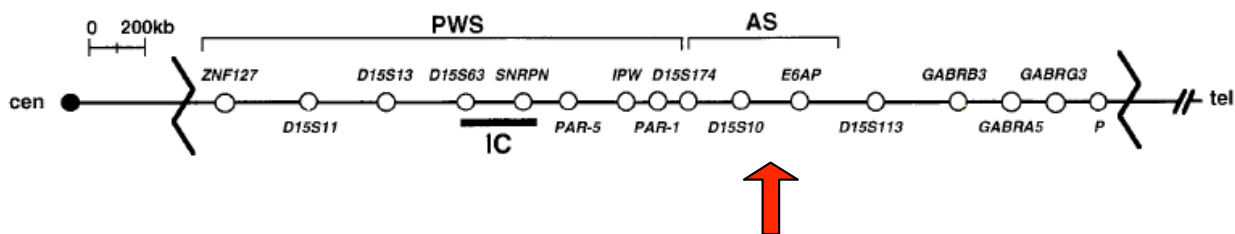


Fig. 4.3 Rappresentazione schematica della regione PWS/AS con indicazione della posizione del locus D15S986

Valgono tuttavia anche per questo caso i limiti delle osservazioni relative al ritrovamento di un solo locus in omozigosi fatte per il caso precedente.

Si può quindi delineare, nel caso di presenza di UPD segmentale, sospetto di Sdr di Angelman (il dato più importante ai fini di diagnosi prenatale), più eventuali effetti da alterazione di trascrizione per giustapposizione delle sequenze del cromosoma 9 sui geni a valle del punto di rottura del braccio lungo del cr.15 (come nel caso riportato) e delle sequenze del cromosoma 15 sui geni a valle del punto di rottura del braccio lungo del cr.9.

In conclusione:

l'importanza di studi di UPD segmentale può essere riassunta nei seguenti punti:

- il ritrovamento in futuro di fenotipo normale in persone con UPD segmentale permetterà di escludere in quelle regioni cromosomiche la presenza di geni imprintati,
- permetterà di evidenziare e confermare hotspots per ricombinazioni meiotiche e mitotiche,
- permetterà di spiegare un certo numero di casi atipici di disordini monogenetici non-Mendeliani (Kotzot, 2001).

In generale va anche considerato che la presenza di UPD segmentale potrebbe essere attualmente sottostimata essendo la sua constatazione legata alla casualità dei marker prescelti (Eggerman et al., 2001). D'altra parte il ritrovamento di un solo sito con UPD, in assenza di un fenotipo caratteristico, potrebbe anche non riflettere una reale UPD segmentale, ed essere legato invece a mutazione del microsatellite utilizzato.

Quando possibile, risulta quindi opportuno aumentare la densità dei loci testati nell'intorno del sito con UPD per delimitare al meglio l'estensione della regione interessata da disomia uniparentale, e valutare più correttamente i loci malattia e il corrispondente fenotipo interessato (Coveler et al., 2003).



# BIBLIOGRAFIA

Aldred M. A., Aftimos S., Hall C., Waters K. S., Thakker R. V., Trembath R. C. and Brueton L. (2002) Constitutional Deletion of Chromosome 20q in two patients affected with Albright Hereditary Osteodystrophy. *Am. J. Med. Genet.* 113, 167-172.

Baumer A., Balmer D. and Schinzel A. (1999) Screening for *UBE3A* gene mutations in a group of Angelman Syndrome patients selected according to non-stringent clinical criteria. *Hum. Genet.* 105, 598-602.

Berend. S.A., Feldman G.L., McCaskill C., Czarnecki P., Van Dyke D.L. and Shaffer L.G. (1999) Investigation of two cases of paternal disomy 13 suggests timing of isochromosome formation and mechanisms leading to uniparental disomy. *Am. J. Med. Genet.* 82, 275-281.

Bittel D.C., Kibiryeveva N., Talebizadeh Z. and Butler M.G. (2003) Microarray analysis of gene/transcript expression in Prader-Willi syndrome: deletion versus UPD. *J. Med. Genet.* 40(8), 568-574.

Browne C.E., Dennis N.R., Maher E., Long F.L., Nicholson J.C., Sillibourne J. and J.C.K. Barber (1997) Inherited interstitial duplications of proximal 15q: genotype-phenotype correlations. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 1342-1352.

Bruyère H., Wilson R.D. and Langlois S. (2003) Risk of mosaicism and uniparental disomy associated with the prenatal diagnosis of a non-homologous Robertsonian translocation carrier. *Fetal Diagn. Ther.* 19, 399-403.

Buiting K., Groß S., Lich C., Gillessen-Kaesbach G., El-Maarri O. and Horsthemke B. (2003) Epimutations in Prader-Willi and Angelman Syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 571-577.

Bürger J., Horn D., Tönnies H., Neitzel H. and Reis A. (2002) Familial interstitial 570 kbp deletion of the *UBE3A* gene region causing Angelman Syndrome but not Prader-Willi Syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 111, 223-237.

Cassidy S.B., Forsythe M., Heeger S., Nicholls R.D., Schork N., Benn P. and Schwartz S. (1997) Comparison of phenotype between patients with Prader-Willi syndrome due to deletion 15q and uniparental disomy 15. *Am. J. Med. Genet.* 68, 433-440.

Chan C-T. J., Clayton-Smith J., Cheng X-J., Buxton J., Webb T., Pembrey M.E. and Malcolm S. (1993) Molecular mechanism in Angelman syndrome: a survey of 93 patients. *Med. Genet.* 30, 895-902.

Cheung S.W., Shaffer L.G., Richards S., Page S.L. and Riconda D.L. (1997) Prenatal diagnosis of a fetus with a homologous Robertsonian translocation of chromosomes 15. *Am. J. Med. Genet.* 72, 47-50.

Chu C., Shwartz S. and McPherson E. (2004) Paternal uniparental isodisomy for chromosome 14 in a patient with normal 46,XX karyotype. *Am. J. Med. Genet.* 127A, 167-171.

Cotter P.D., Ledesma C.T., Dietz L.G., Pusso S., Wohlferd M.M. and Goldberg J.D. (1999) Prenatal diagnosis of supernumerary marker 15 chromosomes and exclusion of uniparental disomy for chromosome 15. *Prenat. Diagn.* 19(8), 721-726.

Coveler K.J., Sutton V.R., Knox-DuBois C. and Shaffer L.G. (2003) Comprehensive microsatellite marker analysis contradicts previous report of segmental maternal heterodisomy of chromosome 14. *J. Med. Genet.* 40, e26

Coveler K.J., Yang S.P., Sutton V.R., Milstein J.M., Wu Y.Q., Knox-Du Bois C., Beischel L.S., Johnson J.P. and Shaffer L.G. (2002) A case of segmental paternal isodisomy of chromosome 14. *Hum. Genet.* 110(3), 251-6.

Diaz-Meyer N., Day C.D., Khatod K., Maher E.R., Cooper W., Reik W., Junien C., Graham G., Algar E., Der Kaloustian V.M. and Higgins M.J. (2003) Silencing of *CDKN1* (*p57<sup>KIP2</sup>*) is associated with hypometilation at kvDMR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J. Med. Genet.* 40, 797-801.

Dupont J.M., Cuisset L., Cartigny M., Le Tessier D., Vasseur C., Rabineau D. and Jeanpierre M. (2002) Familial reciprocal translocation (7;16) associated with maternal uniparental disomy 7 in a Silver-Russell patient. *Am. J. Med. Genet.* 111, 405-408

Eggermann T., Mergentheler S., Eggermann K., Albers A., Linnemann K., Fusch C., Ranke M.B. and Wollmann H.A. (2001) Identification of interstitial maternal uniparental disomy (UPD) (14) and complete maternal UPD (20) in a cohort of growth retarded patients. *J. Med. Genet.* 38, 86-89.

Eggermann T., Mergentheler S., Eggermann K., Ranke M.B. and Wollmann H.A. (2001) Segmental uniparental disomy of 7q31-qter is rare in Silver-Russell syndrome. *Clin. Genet.* 60, 395-396.

Eggermann T., Wolf M., Spaich C., Uyanik G., Wolff G., Eggermann K., Mau U.A. and Kaiser P. (1999) Search for uniparental disomy 14 in balanced Robertsonian translocation carriers. *Clin. Genet.* 56, 464-466.

Engel E. (1993) Uniparental disomy revisited: the first twelve years. *Am. J. Med. Genet.* 46, 670-674.

Estivill X., Cheung J., Pujana M.A., Nakabayashi K., Scherer S. W. and Tsui L.C. (2002) Chromosomal regions containing high-density and ambiguously mapped putative single nucleotide polymorphism (SNPs) correlate with segmental duplications in the human genome. *Hum. Mol. Genet.* 11(17), 1987-1995.

Fridman C. and Koiffmann C.P. (2000) Origin of uniparental disomy 15 in Patients with Prader-Willi or Angelman syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 94, 249-253.

Fridman C., Varela M. C., Kok F., Diament A. and Koiffmann C. P. (2000) Parental UPD15: further genetic and clinical studies in four Angelman syndrome patients. *Am. J. Med. Genet.* 92, 322-327.

Fridman C., Varela M.C., Nicholls R.D. and Koiffmann C.P. (1998) Unusual clinical features in an Angelman syndrome patient with uniparental disomy due to translocation 15q15q. *Clin. Genet.* 54, 303-308.

Fritz B., Aslan M., Kalscheuer V., Ramsing M., Saar K., Fuchs B. and Rehder H. (2001) Low incidence of UPD in spontaneous abortions beyond the 5th gestational week. *Eur. J. Hum. Genet.* 9(12), 910-6.

Gallagher R.C., Pils B., Albawi M. and Francke U. (2002) Evidence for the role of *PWCR1/HBII-85C/D* box small nucleolar RNAs in Prader-Willi syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 669-678.

Gimelli G., Pujana M.A., Patricelli M.G., Russo S., Giardino D., Larizza L., Cheung J., Armengol L., Schinzel A., Estivill X. and Zuffardi O. (2003) Genomic inversions of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions. *Hum. Mol. Genet.* 12(8), 849-858.

Ginsburg C., Fokstuen S. and Schinzel A. (2000) The contribution of uniparental disomy to congenital development defects in children born to mothers at advanced childbearing age. *Am. J. Med. Genet.* 95, 454-460.

Gole L., Crolla J.A., Thomas S.N., Jacobs P.A. and Dennis N.R. (2004) Characterization of breakpoints in the *GABRG3* and *TSPY* genes in family with a t(Y,15)(p11.2;q12). *Am. J. Med. Genet.* 125A, 177-180.

Hanel M.L. and Wevrick R. (2001) The role of genomic imprinting in human developmental disorders: lessons from Prader-Willi Syndrome. *Clin. Genet.* 59, 156-164.

Hannula K., Lipsanen-Nyman M., Kontiokari T. and Kere J. (2001) A narrow segment of maternal uniparental disomy of chromosome 7q31-qter in Silver-Russell syndrome delimits a candidate gene region. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 247-253.

Hitchins M.P. and Moore G. (2002) Genomic imprinting in fetal growth and development. *Exp. Rev. Mol. Med.* 2002, 1-19.

Hitchins M.P., Stainer P., Preece M.A., Moore G.E. (2001) Silver-Russell syndrome: a dissection of the genetic aetiology and candidate chromosomal regions. *J. Med. Genet.* 38, 810-819.

Horsthemke B., Nazlican H., Husing J., Klein-Hitpass L., Claussen U., Michel S., Lich C., Gillessen-Kaesbach G. and Buiting K. (2003) Somatic mosaicism for maternal uniparental disomy 15 in a girl with Prader-Willi syndrome: confirmation by cell cloning and identification of candidate downstream genes. *Hum. Mol. Genet.* 12(20), 2723-2732.

Horsthemke B., Maat-Kievit A., Slegers E., Van den Ouweland A., Buiting K., Lich C., Mollevanger P., Beverstock G., Gillessen-Kaesbach G. and Schwanitz G. (1996) Familial translocation involving 15q11-q13 can give rise to interstitial deletions causing Prader-Willi or Angelman syndrome. *J. Med. Genet.* 33, 848-851.

Jiang Y., Lev-Leham E., Bressler J., Tsai T.F. and Baudet A.L.(1999) Genetics of Angelman Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 1-6.

Kamnasaran D. and Cox D.W. (2002) Current status of human chromosome 14. *J. Med. Genet.* 39, 81-90.

Katahira M., Kayashima T., Kishino T. and Niikawa N. (2002) Maternal uniparental disomy for chromosome 14 with Diabetes Mellitus. *Intern. Med.* 41, 717-721.

Kayashima T., Katahira M., Harada N., Miwa N., Ohta T., Yoshiura K., Matsumoto N., Nakane Y., Nakamura Y., Kajii T., Niikawa N. and Kishino T. (2002) Maternal isodisomy for 14q21-q24 in a man with Diabetes Mellitus. *Am. J. Med. Genet.* 111, 38-42.

Klein O.D., Cotter P.D., Albertson D.G., Pinkel D., Tidyman W.E., Moore M.W. and Rauen K.A.(2004) Prader-Willi syndrome resulting from an unbalanced translocation: characterization by array comparative genomic hybridization. *Clin. Genet.* 65, 477-482.

Kosaki K., Kosaki R., Robinson W.P., Craigen W.J., Shaffer L.G., Sato S. and Matsuo N. (2000) Diagnosis of maternal uniparental disomy of chromosome 7 with a methylation specific PCR assay. *J. Med. Genet.* 37(9), E19.

Kotzot D. (1999) Abnormal phenotypes in uniparental disomy (UPD): fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15. *Am. J. Med. Genet.* 82, 265-274.

Kotzot D. (2002) Review and meta-analysis of systematic searches for uniparental disomy (UPD) other than UPD 15. *Am. J. Med. Genet.* 111, 366-375.

Kotzot D. (2001) Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. *J. Med. Genet.* 38,497-507.

Kotzot D. (2001) Comparative analysis of isodisomic and heterodisomic segments in cases with maternal uniparental disomy 14 suggests more than one imprinted region. *Clin. Genet.* 60, 226-231.

Kotzot D., Lurie I.W., Mehes K., Werder E. and Schinzel A. (2000) No evidence of uniparental disomy 2, 6, 14, 16, 20 and 22 as a major cause of intrauterine growth retardation. *Clin. Genet.* 58, 177-180.

Landgraf J.M.A., Ji Y., Gottlieb W., Depinet T., Wandstrat A.E., Cassidy S.B., Driscoll D.J., Rogan P.K., Schwartz S. and Nicholls R.D. (1999) Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 370-386.

Ledbetter D.H. and Engel E. (1995) Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1757-1764.

Levy B., Dunn T.M., Hirschhorn K. and Nardon N. (2000) Jumping translocations in spontaneous abortions. *Cytogenet. Cell Genet.* 88, 25-29.

Lossie A.C., Whitney M.M., Amidon D., Dong H.J., Chen P., Theriaque D., Hutson A., Nicholls R.D., Zori R.T., Williams C.A. and Driscoll D.J. (2001) Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *J. Med. Genet.* 38(12), 834-845.

Mann M.R.W. and Bartolomei M.S. (2000) Maintaining imprinting. *Nature Genet.* 25, 4-5.

Martin R.A., Sabol D.W. and Rogan P.K. (1999) Maternal uniparental disomy of chromosome 14 confined to an interstitial segment. *J. Med. Genet.* 36, 633-636

Price S.M., Stanhope R., Garrett C., Preece M.A. and Trembath R.C. (1999) The spectrum of Silver-Russell syndrome: a clinical and molecular genetic study and new diagnostic criteria. *J. Med. Genet.* 36, 837-842.

Reish O., Lerer I., Amiel A., Heyman E., Herman A., Dolfin T. and Abeliovich D. (2002) Wiedemann-Beckwith syndrome: further prenatal characterization of the condition. *Am. J. Med. Genet.* 107(3), 209-13.

Ritchie R.J., Mattei M.G. and M. Lalande (1998) A large polymorphic repeat in the pericentromeric region of human chromosome 15q contains three partial gene duplications. *Hum. Mol. Genet.* 7(8), 1253-1260.

Robinson W.P., Bernasconi F., Mutirangura A., Ledbetter D.H., Langlois S., Malcom S., Morris M.A. and Schinzel A.A. (1993) Nondisjunction of chromosome 15: origin and recombination. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 740-751.



Robinson W.P., Christian S.L., Kuchinka B.D., Peñaherrera M.S., Das S., Schuffenhauer S., Malcom S., Schinzel A.A., Hassold T.J. and Ledbetter D.H. (2000) Somatic segregation errors predominantly contribute to the gain or loss of a paternal chromosome leading to uniparental disomy for chromosome 15. *Clin. Genet.* 57, 349-358.

Saitoh S., Wada T., Kuno T., Kim K.C., Ohashi H., Hashimoto K. and Niikawa N. (1999) Clinical characteristics of Angelman syndrome patients with a non-IC-deleted imprinting mutation. *Clin. Genet.* 55, 277-278.

Sanlaville D., Aubry M.C., Dumez Y., Nolen M.C., Amiel J., Pinson M.P., Lyonnet S., Munnich A., Vekemans M. and Morichon-Delvallez N. (2000) Maternal uniparental heterodisomy of chromosome 14: chromosomal mechanism and clinical follow up. *J. Med. Genet.* 37, 525-528.

Schulze A., Hansen C., Skakkebaek, Brøndum-Nielsen K., Ledbetter D. and Tommerup N. (1996) Exclusion of *SNRPN* as a major determinant of Prader-Willi syndrome by a translocation breakpoint. *Nature Genet.* 12, 452-454.

Shaffer L.G., Agan N., Goldberg J.D., Ledbetter D.H., Longshore J.W. and Cassidy S. (2001) American college of medical genetics statement on diagnostic testing for uniparental disomy. *Genet. Med.* 3, 206-211.

Smith A., Deng Z.-M., Beran R., Woodage T. and Trent R. J. (1994) Familial unbalanced translocation t(8;15)(p23.3;q11) with uniparental disomy in Angelman syndrome *Hum. Genet.* 93, 471-473.

Smeets D. F. C. M., Hamel B. C. J., Nelen M.R., Smeets H. J. M., Bollen J. H. M., Smits A.P.T., Ropers H-H. and Van Oost B. A. (1992) Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome in cousins from a family with a translocation between chromosomes 6 and 15. *N. Engl. J. Med.* 326, 807-811.

Spiekerkoetter U., Eeds A., Yue Z., Haines J., Strauss A.W. and Summar M. (2002) Uniparental disomy of chromosome 2 resulting in lethal trifunctional protein deficiency due to homozygous alpha-subunit mutations. *Hum. Mutat.* 20(6), 447-51.

Stratakis C., Taymans S.E., Schteingart D. and Haddad B.R. (2001) Segmental uniparental isodisomy (UPD) for 2p16 without clinical symptoms: implications for UPD and other genetic studies of chromosome 2. *J. Med. Genet.* 38, 106-109.

Tekin M., Jackson-Cook C., Buller A., Ferreira-Gonzalez A., Pandya A., Garrett C.T. and Bodurtha J. (2000) Fluorescence in situ hybridization detectable mosaicism for Angelman syndrome with biparental methylation. *Am. J. Med. Genet.* 95, 145-149.

Temple I.K. and Shield J.P.H. (2002) Transient neonatal diabetes, a disorder of imprinting. *J. Med. Genet.* 39, 872-875.

Toth-Fejel S., Olson S., Gunter K., Quan F., Wolford J., Popovich B. W. and Magenis R. E. (1996) The impact of imprinting: Prader-Willi syndrome resulting from chromosome translocation, recombination, and nondisjunction. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 1008-1016.

Trent R.J., Sheffield L.J., Deng Z.-M., Kim W.S., Nassif N.T., Ryce C., Woods C.G., Michaelis R.C., Tarleton J. and Smith A. (1997) The elusive Angelman Syndrome critical region. *J. Med. Genet.* 34, 714-718.

Walczak C., Enders H., Grissinger K. and Dufke A. (2000) Retrospective diagnosis of trisomy 15 in formalin-fixed, paraffin-embedded placental tissue in a newborn girl with Prader-Willi syndrome. *Prenat. Diagn.* 20(11), 914-916.