



Università degli Studi di Siena
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Scuola di Specializzazione in Genetica Medica
Indirizzo Tecnico

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLE
DELEZIONI DI 50 SOGGETTI CON SINDROME DI
PRADER-WILLI E CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO

1

Relatore
Chiar.ma Prof.ssa Alessandra Renieri

Tesi di Specializzazione
Dr. ssa Rossella Caselli

Anno accademico 2009-2010

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag. 1
1.1 La Sindrome di Prader-Willi: panoramica storica	
1.2 Caratteristiche cliniche della PWS	
1.3 Genetica della PWS	
2. MATERIALI E METODI	Pag. 10
2.1 Pazienti	
2.2 Estrazione del DNA genomico	
2.3 Determinazione della concentrazione del DNA	
2.4 MLPA	
2.5 Array-CGH	
3. RISULTATI	Pag. 20
4. DISCUSSIONE	Pag. 31
5. BIBLIOGRAFIA	Pag. 36
6. RINGRAZIAMENTI	Pag. 45

1. INTRODUZIONE

1.1 La Sindrome di Prader-Willi: panoramica storica

La Sindrome di Prader-Willi (PWS, OMIM 176270) è una patologia dello sviluppo neurologico che colpisce entrambi i sessi con un'incidenza stimata di 1/22000-1/25000 nati vivi (Whittington 2001, Smith et al., 2003, Vogels et al., 2004). Venne descritta per la prima volta nella letteratura scientifica nel 1956 da tre medici svizzeri dell'Università di Zurigo: Andrea Prader, Alexis Labhart e Heinrich Willi (Prader et al., 1956), sebbene rappresentazioni e descrizioni di individui verosimilmente affetti da PWS siano riscontrabili nell'arte e nella letteratura dei secoli precedenti. La pubblicazione rimase tuttavia ignorata per anni, fino a quando nel 1972 Hall e Smith risvegliarono l'interesse della comunità scientifica con uno studio su 32 soggetti affetti da PWS (Hall and Smith, 1972). Da allora, iniziarono ad emergere nuove conoscenze sia dal punto di vista clinico che genetico.

Con l'introduzione del cariotipo ad alta risoluzione fu possibile osservare che la maggior parte dei pazienti con PWS presentava una delezione interstiziale del cromosoma 15 a livello delle bande q11-13 (Ledbetter et al., 1981) e che insorgeva *de novo* sul cromosoma di origine paterna (Butler and Palmer, 1983). Nel 1989, lo studio di soggetti affetti da PWS non portatori di delezione, permise di identificare come causa della condizione la presenza di disomia uniparentale materna del cromosoma 15 (Nicholls et al., 1989). Quattro anni dopo venne descritta per la prima volta la presenza di una metilazione alterata della regione imprinted sul cromosoma 15 (Glenn et al., 1993, Buiting et al., 1994, Reis et al., 1994) e successivamente, nel 1995, l'identificazione delle prime microdelezioni portò a definire la struttura del centro dell'imprinting (IC) e la sua regolazione sull'intero dominio imprinted (Buiting et al., 1995).

Da un punto di vista clinico la condizione è caratterizzata nel periodo neonatale dalla presenza di ipotonia e difficoltà di suzione, nel periodo postnatale si riscontrano inoltre deficit di accrescimento, iperfagia con conseguente obesità, ipogonadismo, bassa statura, disabilità intellettiva di grado variabile da lieve a moderato e caratteristiche comportamentali tipiche. Criteri per la diagnosi clinica furono proposti per la prima volta da Holm nel 1981 e formalizzati nel 1993 in una consensus dedicata (Tab. 1) (Holm and Larnen, 1981; Holm et al., 1993). Nel 2001, in seguito ad uno studio retrospettivo che analizzava l'effettiva frequenza delle caratteristiche osservate

nei pazienti con PWS confermata geneticamente, è stata proposta una revisione dei criteri diagnostici in relazione all'età (Gunay-Aygun et al.,2001) (Tab. 2).

Restano ad oggi da delucidare alcuni dei meccanismi genetici che sottendono alla PWS: sebbene studi recenti abbiano dimostrato che la perdita dell'espressione paterna dei geni SNORD116 sia responsabile dell'insorgenza delle caratteristiche cardinali della sindrome (Sahoo et al.,2008; de Smith et al., 2009; Duker et al., 2010), non è stato ancora possibile stabilire un chiaro ruolo dei singoli geni nella determinazione del fenotipo.

Tab. 1: criteri diagnostici di Holm 1993 per la PWS.

Criteri maggiori (1 punto per ogni criterio):
- ipotonia neonatale e infantile
- problemi di nutrizione infantile o ritardo nella crescita
- eccessivo o rapido aumento di peso tra il 1° e il 6° anno di vita
- tratti del viso caratteristici
- ipogonadismo
- ritardo dello sviluppo, disabilità intellettiva o problemi di apprendimento
- iperfagia o ossessione del cibo
- anomalie a carico del cromosoma 15 (del(15), UPD, IC)
Criteri minori (0,5 punto per ogni criterio):
- movimenti fetali ridotti
- problemi comportamentali tipici
- disturbo del sonno o apnea durante il sonno
- bassa statura (in assenza di terapia con GH)
- ipopigmentazione (paragonata alla famiglia)
- Mani piccole (<25° cent.) e/o piedi piccoli (<10° cent.)
- mani strette con bordo ulnare rettilineo
- anormalità degli occhi (esotropia, miopia)
- saliva viscosa e densa
- difetti nell'articolazione della parola
- Lesioni cutanee da grattamento (skin picking)
Criteri di supporto (0 punti):
- soglia del dolore alta
- incidenza del vomito ridotta
- alterazioni della termoregolazione
- scoliosi e/o cifosi
- adrenaemia precoce
- osteoporosi
- abilità inusuale nel costruire puzzle
- reperti neuromuscolari nella norma

Tab. 2: Criteri clinici in relazione all'età, proposti a seguito della revisione della consensus del 1993, per poter identificare i pazienti da indirizzare al test genetico (Gunay-Aygun et al., 2001)

Età (anni)	Caratteristiche cliniche presenti e sufficienti per sottoporre al test genetico
Meno di 2	1. ipotonia e problemi di nutrizione
2-6	1. ipotonia e storia di problemi di nutrizione 2. ritardo di crescita
6-12	1. ipotonia e storia di problemi di nutrizione 2. ritardo di crescita 3. iperfagia legata a obesità
Oltre 13	1. problemi cognitivi; disabilità intellettiva lieve 2. iperfagia legata a obesità 3. ipogonadismo ipotalamico e/o problemi comportamentali tipici

1.2 Caratteristiche cliniche della PWS

E' ben noto che la PWS presenta due differenti stadi caratteristici (Holm et al., 1993), separati da uno stadio intermedio, proposto recentemente, e seguiti da uno stadio tipico in età più adulta (Butler et al., 2010a). Fortemente caratteristico è il primo stadio, a cui si assiste nel periodo neonatale, presente generalmente dal primo anno di vita fino ai 3 anni. Questa fase è caratterizzata da una marcata ipotonia con conseguente difficoltà di alimentazione tale da richiedere spesso un'alimentazione per gavage, ritardo dello sviluppo neuropsicomotorio, deficit di accrescimento, ipogonadismo, letargia e nessun interesse per il cibo. Alla nascita la lunghezza risulta solitamente nella norma, mentre il peso è generalmente ai centili inferiori (Dudley and Muscatelli 2007, Whittington et al., 2008); di conseguenza l'accrescimento staturponderale risulta inizialmente ridotto. Gradualmente l'ipotonia diminuisce e compare invece l'interesse per il cibo, che successivamente si trasforma in una ricerca spasmodica e in un evidente insaziabile appetito. L'iperfagia può portare a gravi conseguenze come malattie cardio-polmonari, diabete mellito di tipo 2, tromboflebiti e ad un aumento della mortalità (Schrandt-Stumpel et al., 2004; Stevenson et al., 2004; Einfeld et al., 2006; Grugni et al., 2008); è quindi fondamentale un controllo adeguato della dieta nei bambini con PWS. Altre caratteristiche, che potrebbero essere osservate nell'infanzia includono una facies tipica caratterizzata da fronte stretta con restringimento del diametro bitemporale, occhi "a mandorla", ponte nasale stretto, labbro superiore sottile con aspetto della bocca a V rovesciata, palato ogivale (Fig.1).

La cute e gli annessi sono frequentemente ipopigmentati. Le mani ed i piedi sono piccoli con dita affusolate (acromicria); i genitali esterni sono ipoplasici.

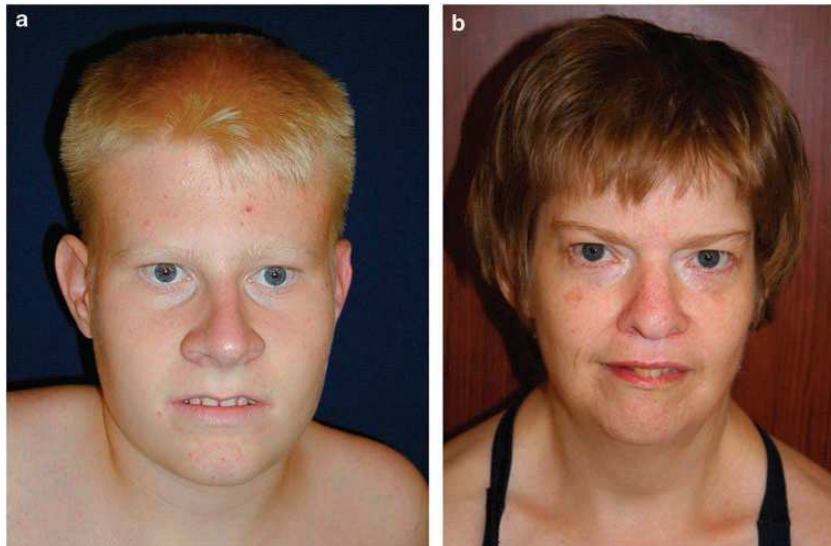


Fig.1 Fenotipo facciale caratteristico di PWS nell'adolescenza e in età adulta. (a) Paziente maschio all'età di 15 anni. (b) Paziente femmina all'età di 41. Da notare il restringimento del diametro bitemporale, occhi "a mandorla", ponte nasale stretto, labbro superiore sottile (ripresa da Cassidy and Driscoll, 2009)

Problemi agli occhi, in particolare strabismo, e scoliosi possono essere presenti fin dalla nascita o emergere successivamente, generalmente in età adolescenziale (de Lind van Wijngaarden et al.,2008, Odent et al.,2008). Possono inoltre essere osservate altre caratteristiche conseguenti ad una alterata regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisario quali l'eccessiva sonnolenza durante il giorno (Maas et al.,2010), l'instabilità della termoregolazione e l'elevata soglia del dolore (Whittington and Holland 2004).

Un caratteristico pattern comportamentale comincia a svilupparsi fin dalla prima infanzia, fino a raggiungere la massima espressione nella fase adolescenziale tardiva e nella prima età adulta; sintomi caratteristici sono ostinazione e cocciutaggine, temperamento collerico con esplosioni di rabbia incontrollata solitamente scatenati da aspettative disattese, sintomi compulsivi quali pianificazione dettagliata e ripetuta e grandi difficoltà nell'introdurre variazioni all'interno di una routine ((Dykens and Cassidy, 1995; Clarke et al.,1996; State et al., 1999; Clarke et al., 2002).

Molte delle caratteristiche comportamentali legate alla sindrome suggeriscono la possibile presenza di disordini dello spettro autistico, diagnosticati nel 25% degli individui affetti da PWS (vedi review Veltman et al., 2005). Sembra inoltre che la sintomatologia di tipo autistico sia più frequentemente presente nei soggetti in cui la

condizione è causata da disomia uniparentale materna (mUPD) (vedi review Dimitropoulos and Schulltz, 2007).

Un'altra anomalia comportamentale caratteristica è lo skin-picking, ovvero il procurarsi lesioni cutanee con le proprie mani o con l'uso di oggetti, che in alcuni casi può essere così importante da richiedere anche un ricovero ospedaliero (Holm et al., 1993, Holland et al., 2003b).

Nell'età scolastica le difficoltà cognitive diventano più evidenti. I pazienti affetti da PWS presentano disabilità intellettiva (ID) di grado variabile da lieve a moderato; nella maggior parte dei casi il QI è compreso fra 60 e 70 tuttavia, in alcuni pazienti si osserva un QI che rientra nel range di normalità (Curfs et al., 1991; Whittington et al., 2004). Sono frequenti le difficoltà di relazione con i coetanei e la preferenza a dedicarsi ad attività solitarie come i puzzles. Durante il periodo adolescenziale i soggetti con PWS presentano oltre ad obesità legata ad iperfagia, ipogonadismo con conseguente sviluppo puberale incompleto ed infertilità nella maggior parte dei casi (Crinò et al., 2003), deficit dell'ormone di crescita (GH) e bassa statura.

Nell'età adulta possono manifestarsi gravi disturbi psichiatrici e disordini affettivi come depressione e psicosi, in modo particolare nei soggetti in cui la condizione è causata da mUPD (Boer et al., 2002, Vogels et al., 2004, Soni et al., 2007).

Negli ultimi anni la terapia con GH ha migliorato sensibilmente il quadro clinico dei pazienti affetti da PWS, soprattutto se somministrata precocemente. Diversi studi hanno riportato un miglioramento della velocità di crescita, della composizione della massa corporea (con aumento della massa magra e riduzione della massa grassa), della funzione muscolare e un'azione positiva sulle alterazioni della facies (Angulo et al., 2007; Lindgren and Lindberg, 2008; Carrel et al., 2010; Colmenares et al., 2011).

1.3 Genetica della PWS

I diversi meccanismi genetici causativi della PWS determinano la mancata espressione degli alleli di origine paterna presenti all'interno della regione q11-q13 del cromosoma 15 (regione critica PWS o PWSCR, Fig.2) nella quale normalmente il contributo materno risulta essere silenziato e gli alleli di origine paterna sono i soli ad essere espressi (Nicholls, 1993). La regolazione dei geni imprinted della regione è svolta dal centro dell'imprinting (IC) localizzato all'estremità 5' del gene *SNURF-SNRPN* che contiene due distinte regioni funzionali: PWS-SRO (PWS-Shortest Region

of Deletion Overlap) e AS-SRO (AS-Shortest Region of Deletion Overlap) (Buiting et al.,1995).

PWS-SRO è localizzato a livello del promotore maggiore e dell'esone 1 del gene *SNURF-SNRPN*, mentre AS-SRO si trova in posizione centromerica rispetto a PWS-SRO, ad una distanza di 35 kb. PWS-SRO, che è non metilato ed è quindi attivo sul cromosoma paterno, agisce come promotore sull'intera unità trascrizionale di *SNRPN*, inclusi anche l'intero cluster dei geni snoRNA (small nucleolar RNA) e il trascritto antisenso di *UBE3A*, e attiva "a lunga distanza", con un meccanismo ancora sconosciuto, la trascrizione dei geni *MKRN3*, *MAGEL2* e *NDN* (vedi review Horsthemke and Wagstaff, 2008) (Fig. 3). Sul cromosoma 15 materno, dove PWS-SRO è invece metilato e inattivo, si ha il silenziamento dei geni *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN* e *SNRPN* e la trascrizione di *UBE3A* nel cervello (vedi review Horsthemke and Wagstaff, 2008) (Fig. 3).

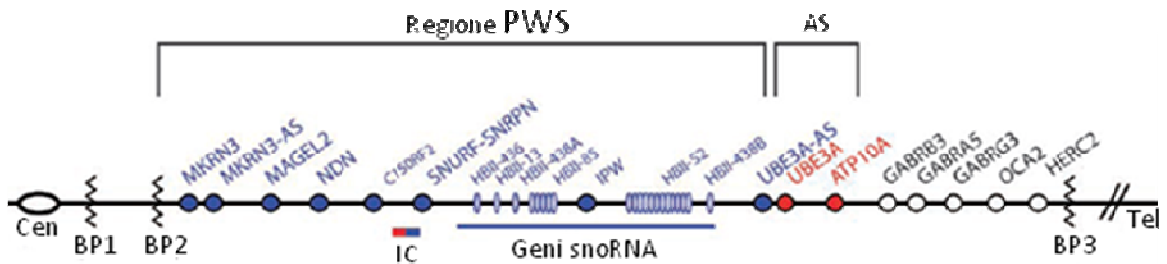


Fig. 2. Struttura della regione cromosomica 15q11-q13 (ripresa da Cassidy and Driscoll 2009). Nella regione PWS (rappresentata in blu) ci sono 6 geni (cerchi blu) e una famiglia di 5 geni snoRNA (ovali) ad espressione esclusivamente paterna. Solo *UBE3A* e *ATP10A* (cerchi rossi), associati alla Sindrome di Angelman, sono ad espressione materna tessuto-specifica. Il centro dell'imprinting ha una struttura bipartita ed è localizzato al 5' del gene *SNRPN*. Il cluster di geni *GABR*, *OCA2* e *HERC2* non sono imprinted ed hanno un'espressione biparentale (cerchi bianchi). Sono indicati i breakpoints comuni prossimali, BP1 e BP2 e quello comune distale BP3. Tra BP1 e BP2 sono presenti altri 4 geni non imprinted: *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPAI1* e *NIPAI2* (non rappresentati).

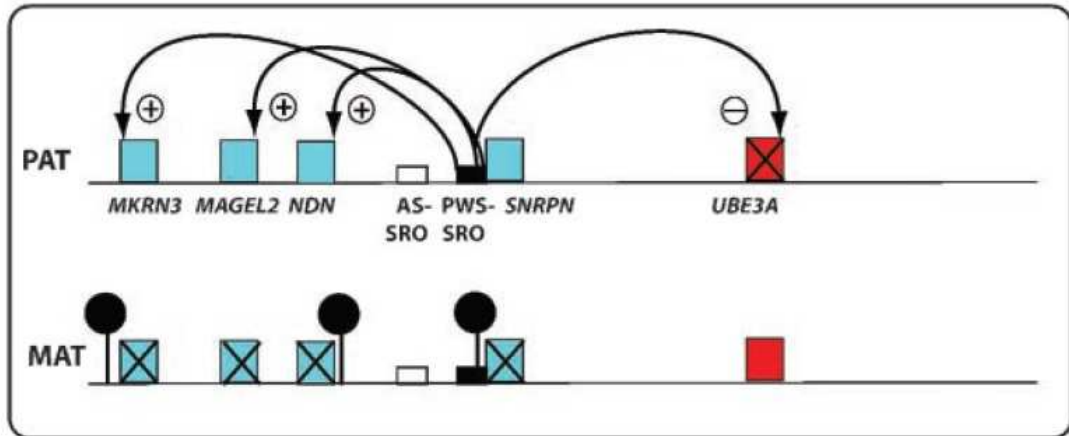


Fig.3 Regolazione dell'IC sull'espressione genica nella regione 15q11-13. Sul cromosoma paterno dove PWS-SRO è non metilato e attivo si ha la trascrizione dei geni *MKRN3*, *MAGEL2* e *NDN* e il silenziamento mediante trascritto antisenso di *UBE3A* nel cervello. Sul cromosoma materno dove PWS-SRO è metilato e inattivo si ha il silenziamento dei geni *MKRN3*, *MAGEL2* e *NDN* e la trascrizione di *UBE3A* nel cervello (ripresa da Horsthemke and Wagstaff, 2008).

La causa di gran lunga più frequente della PWS è una delezione interstiziale insorta *de novo* di 5-7 Mb nella regione 15q11.2-q13 di origine paterna (Fig.2 e 4). La delezione della medesima regione di origine materna causa, invece, la Sindrome di Angelman (AS). Meno frequente è la disomia uniparentale materna e ancora più rari sono i difetti del centro dell'imprinting (Fig 4).

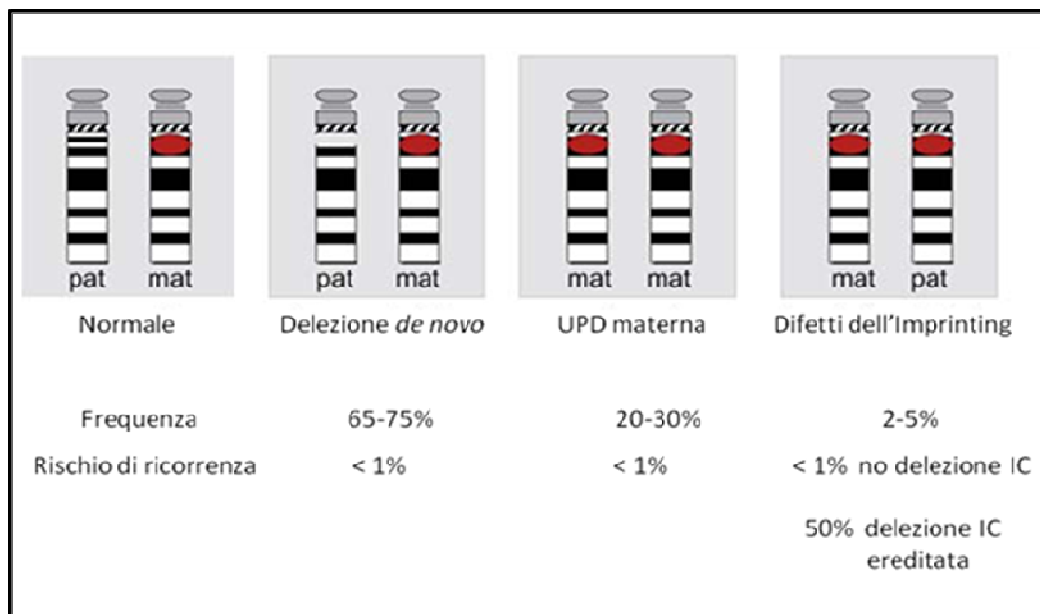


Fig.4: Meccanismi genetici responsabili della PWS (ripresa da Buiting et al.,2010). Per ognuno dei meccanismi vengono riportate le frequenze e il rischio di ricorrenza.

1.3.1 Delezioni interstiziali della regione cromosomica 15q11.2-q13

Nella maggior parte dei casi le delezioni appartengono a due classi, dette classe I (Type I, TPI) e classe II (Type II, TPII), rispettivamente definite dai punti di rottura (breakpoints, BP) ricorrenti BP1-BP3 e BP2-BP3 (Christian et al.,1995; Amos-Landgraf et al.,1999) (Fig. 2). Le delezioni si originano con il meccanismo della ricombinazione omologa non allelica (NAHR, Non Allelic Homologous Recombination) mediata dai dupliconi (o LCR, Low Copy Repeat) presenti a livello dei BP. Entrambe le delezioni includono:

- una regione ad espressione esclusivamente paterna contenente i geni *MKRN3* (OMIM 603856), *MAGEL2* (OMIM 605283), *NDN* (OMIM 602117), *C15orf2* (OMIM 610822), *SNURF-SNPRN* (OMIM 182279) ed un cluster di oltre 70 geni C/D box snoRNA (*HBII-436* o *SNORD107*, *HBII-13* o *SNORD64*, *HBII-438A* e *B* o *SNORD109A* e *B*, *HBII-85* o *SNORD116* e *HBII-52* o *SNORD115*). Gli snoRNA sono molecole coinvolte nella modificazione delle varie classi di RNA, tra cui la 2'-O-metilazione (Cavaille et al., 2000; de los Santos et al., 2000; Runte et al.,2001; Kiss, 2002).

- la “regione AS” con i geni *UBE3A* (OMIM 601623) e *ATP10A* (OMIM 605855), ad espressione materna tessuto-specifica

- una regione distale non-imprinted contenente un cluster di tre geni codificanti per il recettore GABA, *GABRB3* (OMIM 137192), *GABRA5* (OMIM 137142) e *GABRG3* (OMIM 600233), il gene *OCA2* (OMIM 611409) e il gene *HERC2* (OMIM 605837).

Le delezioni TPI differiscono dal tipo II perché coinvolgono la regione più prossimale in cui sono contenuti altri quattro geni ad espressione biparentale: *TUBGCP5* (OMIM 608147), *CYFIP1* (OMIM 606322), *NIPAI* (OMIM 608145) e *NIPAI2* (OMIM 608146). Tre di questi geni, sono implicati nello sviluppo e/o nella funzione del sistema nervoso centrale; in particolare, *NIPAI* è noto essere associato a paraplegia spastica (Rainier et al.,2003; Goytain et al.,2007), *NIPAI2* codifica per un trasportatore di magnesio altamente espresso nel sistema nervoso centrale (Goytain et al., 2008) e *CYFIP1* codifica per una proteina che interagisce con FMRP (Fragile Mental Retardation Protein) (Napoli et al., 2008).

Delezioni atipiche, con punti di rottura propri, sono piuttosto rare (Buiting et al.,1993, Caolunova et al.,2008; Kanber et al., 2009). Le microdelezioni recentemente descritte che si localizzano distalmente rispetto al gene *SNRPN* o includono gli ultimi esoni del gene e si estendono al cluster dei geni snoRNA, hanno portato a definire la

regione contenente gli *SNORD116* come critica per la sindrome (Sahoo et al., 2008, de Smith et al.,2009; Duker et al.,2010).

Delezioni che si estendono distalmente al BP3, e coinvolgenti i BP più distali BP4 , BP5 e BP6, sono solitamente associate a traslocazioni coinvolgenti altri cromosomi (vedi review, Butler e Thompson, 2000, Mignon-Ravix et al.2007) e quindi associate anche ad altre manifestazioni cliniche, come anomalie cardiache, renali e neurologiche; in alcuni casi sono state descritte delezioni interstiziali *de novo* che si estendono distalmente fino alla banda 15q14 (Galan et al., 1991, Calounova et al., 2008, Butler et al., 2010b).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Pazienti

La casistica descritta in questa tesi comprende 50 pazienti affetti da PWS portatori di delezione, con età compresa tra i 2 e 38 anni. Tutti i pazienti si sono resi disponibili nell'eseguire questo tipo di studio previa compilazione di un consenso informato. La diagnosi di PWS in tutti i pazienti è stata confermata sia clinicamente, attraverso i criteri diagnostici del consensus del 1993, sia dal punto di vista genetico con il test di metilazione, risultato positivo in tutti i casi, e con FISH con sonde commerciali che hanno evidenziato la presenza di delezione. Per ogni paziente l'analisi per la caratterizzazione delle delezioni è stata effettuata mediante MLPA su DNA genomico estratto a partire da un prelievo di sangue periferico. Quattro pazienti sono stati anche studiati mediante tecnica di array-CGH per una più precisa definizione dei *breakpoints*.

2.2 Estrazione del DNA genomico

L'estrazione di DNA genomico viene effettuata a partire da un prelievo di sangue periferico in EDTA. L'estrazione è stata eseguita utilizzando il kit "GenElute Blood Genomic DNA" (SIGMA) composto da: colonne (Miniprep binding columns), tubi di raccolta da 2 ml (Collection tubes), buffers e proteinasi K. E' possibile estrarre DNA partendo da 500 µl di sangue a cui si aggiungono 50 µl di proteinasi e 40 µl di RNasi A Solution. Le provette vengono lasciate per 2' a temperatura ambiente e successivamente, dopo aver aggiunto 550 µl di Lysis Solution C, agitate tramite vortex per 10'' e poi incubate a 55°C per 10'. Si aggiungono 550 µl di etanolo assoluto e si vortexa per 10''. Prima del loro utilizzo, è necessario preparare le colonne Miniprep binding column aggiungendo 500 µl di Column Preparation Solution, centrifugandole a 12000 x g per 1' ed eliminando l'eluato. Il contenuto delle provette, può così essere trasferito nelle Miniprep binding column. Le colonne vengono centrifugate a 6500 x g per 1' e viene eliminato l'eluato; il passaggio viene ripetuto fino ad esaurimento del campione. Le colonne vengono trasferite sopra un nuovo tubo da 2 ml e si aggiungono 500 µl di Pre-Wash Solution, segue una centrifugazione a 6500 x g per 1'. Si elimina l'eluato e si procede aggiungendo 500 µl di Wash Solution e centrifugandole 3' alla massima velocità (13000 x g). Per eliminare l'etanolo residuo si procede con una nuova centrifugazione alla massima velocità per 1', dopo avere eliminato l'eluato. Ogni

colonna viene trasferita in una nuova provetta da 2 ml alla quale vengono aggiunti 50 μ l di Elution Solution. I campioni vengono lasciati a temperatura ambiente per 5' e centrifugati per 2' a 6500 x g.

2.3 Valutazione della concentrazione e della qualità del DNA.

La quantificazione del DNA genomico estratto è stata effettuata mediante lo strumento NanoDrop ND1000 UV-Vis Spectrophotometer utilizzando 1 μ l di campione. Lo strumento sfrutta una nuova tecnologia, basata sulla tensione superficiale che piccoli volumi di liquidi esercitano quando si trovano collocati tra due superfici vicine; in tal modo una goccia di campione posizionata sull'apposita piastra di lettura crea una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche, e può essere analizzata in modo semplice e veloce. Lo strumento esegue automaticamente la lettura del campione a 260 – 280 – 230 nm di lunghezza d'onda, la concentrazione ed i relativi rapporti per determinare il grado di purezza del campione analizzato. Un rapporto tra la densità ottica a 260 nm e 280 nm maggiore o uguale a 1,8, indica che l'estrazione del DNA è stata ben eseguita poiché abbiamo un buon rapporto tra DNA estratto e proteine che lo accompagnano. Un altro indice di purezza del campione è il rapporto tra le densità ottiche 260 e 230, che dovrebbe essere compreso tra 1,8 e 2,2.

2.4 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

La metodica MLPA permette di rilevare perdite o acquisizioni nel numero di copie di sequenze del DNA in esame. Il principio su cui si basa tale tecnica è l'amplificazione simultanea di sonde ibridate su regioni target di interesse. Ciascuna sonda MLPA è costituita da un oligonucleotide sintetico e un oligonucleotide derivato da DNA fagico M13. L'oligonucleotide sintetico contiene una sequenza universale all'estremo 5' (sequenza Y) e una regione complementare alla sequenza target all'estremo 3' (Fig.5). L'altro oligonucleotide contiene una regione complementare alla sequenza target all'estremo 5', una sequenza sintetica detta *stuffer* di lunghezza variabile, per analisi contemporanea di più target, e una sequenza universale (sequenza X) all'estremo 3' (Fig.5). Gli oligonucleotidi che si ibridano alle sequenze target

vengono uniti mediante una ligasi termostabile e amplificati contemporaneamente con una sola coppia di primer grazie alla presenza al 3' e 5' di sequenze universali. Gli amplificati ottenuti che differiscono per la lunghezza della sequenza stuffer possono dunque essere separati per elettroforesi capillare (Fig.5).

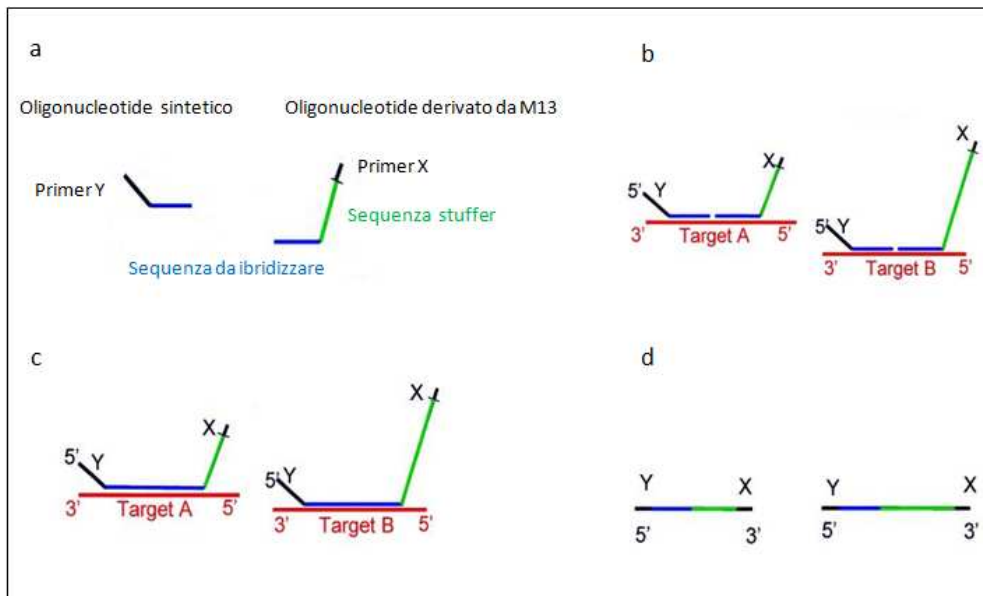


Fig. 5. Principio della tecnica MLPA. a) Rappresentazione schematica di una sonda MLPA. Gli oligonucleotidi sintetici contengono la sequenza riconosciuta dal primer universale Y (in nero), mentre il frammento derivato da M13 contiene la sequenza specifica per il primer universale X (in nero) e la sequenza stuffer (in verde). La sequenza target è indicata in blu; b) Reazione di ibridazione. Il DNA genomico è denaturato ed entrambi gli oligonucleotidi di ogni sonda MLPA si ibridano sulla sequenza target; c) Reazione di ligazione. Solo le sonde perfettamente appaiate vengono legate da una ligasi termostabile; d) Reazione di PCR. Tutte le sonde legate sono amplificate mediante PCR utilizzando un'unica coppia di primers (X e Y). Il prodotto di amplificazione di ciascuna sonda ha una lunghezza caratteristica, per cui ciascun frammento è riconoscibile in seguito a separazione mediante elettroforesi capillare.

Per la caratterizzazione delle delezioni sono stati utilizzati due diversi kit: Salsa ME028-B1 PWS-AS e Salsa P211-B2 HSP region (MRC-Holland, Amsterdam). Il primo prevede la contemporanea possibilità di valutare lo stato di metilazione e l'eventuale presenza di alterazioni nel numero di copie della regione critica responsabile di PWS/AS (Tab. 3). Il secondo, concepito per lo studio dei loci specifici associati alla paraplegia spastica ereditaria (HSP), contiene un numero di sonde aggiuntive, rispetto al kit ME028-B1, per i geni della regione 15q11, che permettono di differenziare con più precisione tra i due tipi di delezione comune TPI e TPII (Tab. 4).

Tab. 3. Sonde contenute nel kit ME028-B1 PWS-AS.

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene	Hha1 site	Distance to p-telomere	Chromosomal position	Distance to next probe
434 \wedge	06249-L05755	NIPA1			BP1-BP2 region	214.0 Kb
154 \wedge	02018-L00865	TUBGCP5			BP1-BP2 region	
<i>End of copy number variable region</i>						
172	02020-L12922	MKRN3		21.362.818		77.5 Kb
409	11155-L11839	MAGEL2		21.440.355		42.0 Kb
445	11149-L11833	NDN		21.482.381		1.0 Kb
419	04027-L13937	NDN	+	21.483.412		1136.5 Kb
287 \sim	11178-L11862	SNRPN		22.619.902	Exon u1B	6.2 Kb
238 \sim	12178-L13090	SNRPN		22.626.072	Exon u1B*	64.9 Kb
278	12179-L13383	SNRPN		22.690.980	Intron u2	12.3 Kb
270	12182-L13094	SNRPN		22.703.328	Intron u2	13.4 Kb
256 \yen	02027-L12881	SNRPN		22.716.713	Exon u5 (AS-SRO)	0.6 Kb
391 \yen	12477-L13519	SNRPN		22.717.321	Exon u5 (AS-SRO)	33.8 Kb
250	11181-L13997	SNRPN	+	22.751.105	SNRPN CpG island promotor	0.1 Kb
178 \gg	04106-L13905	SNRPN	+	22.751.213	SNRPN CpG island exon 1	0.3 Kb
190	04104-L04294	SNRPN	+	22.751.480	SNRPN CpG island intron 1	0.3 Kb
142	04103-L02951	SNRPN	+	22.751.772	SNRPN CpG island intron 1	12.5 Kb
294	01318-L13088	SNRPN		22.764.247	SNURF-SNRPN exon 3	8.3 Kb
400	11177-L11861	SNRPN		22.772.555	SNURF-SNRPN exon 7	75.7 Kb
214 \neq +	12719-L13907	SNRPN		22.848.250	SNORD116 snoRNA cluster	24.4 Kb
472 \neq +	12721-L13796	SNRPN		22.872.658	SNORD116 snoRNA cluster	16.0 Kb
328 \neq +	12723-L13798	SNRPN	+	22.888.662	SNORD116 snoRNA cluster	247.7 Kb
355	02034-L12925	UBE3A		23.136.395	exon 13	20.3 Kb
301	12082-L13474	UBE3A		23.156.677	exon 8	11.1 Kb
160	04620-L00863	UBE3A		23.167.740	exon 7	4.2 Kb
197	10880-L11550	UBE3A		23.171.919	exon 6	29.8 Kb
373	10878-L11548	UBE3A		23.201.674	exon 5	33.5 Kb
184	04641-L04293	UBE3A	+	23.235.184	exon 1	287.0 Kb
366	11162-L11846	ATP10A		23.522.207		137.7 Kb
226	11159-L11843	ATP10A		23.659.906		684.3 Kb
220	01315-L09339	GABRB3		24.344.242	exon 9	19.6 Kb
382	10874-L11544	GABRB3		24.363.881		2832.9 Kb
202 \neg	01314-L00867	APBA2		27.196.749	Outside common PWS-AS region	61864.7 Kb to BLM probe
346 #	01709-L12924	BLM	+	89.061.432	15q26	

Tab. 4. Sonde contenute nel kit P211-B2 HSP region specifiche per la regione 15q11.2

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene / exon	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
179 +	09875-L12280	WHAMML1 (WHDC1L1) exon 2	TTCAGGACACC-GAAAAGCCAACA	4.9 kb
373 +	09876-L10288	WHAMML1 (WHDC1L1) exon 5	GCGAAAGAGTTA-TGTTTAAATCAC	139.4 kb
391	07125-L05755	NIPA1 exon 4 (3)	GCCAGATTGGAA-ACTTCTGGCTT	11.7 kb
265	07124-L05206	NIPA1 exon 6 (5)	GCTGGCAGTTT-CACCGTGCCTTC	21.4 kb
214	05767-L05718	NIPA2 exon 4 (3)	TCTGAGAATAGT-GAAGCAACTCAT	13.3 kb
202	07123-L05171	NIPA2 exon 8 (6)	GTGGCCAACCTT-GCTGCGTATGCG	8.9 kb
418	05117-L04501	NIPA2 exon 10 (7)	TGAGCATTGAT-GGCCTTAGCACC	36.4 kb
382	01818-L01317	CYFIP1 exon 22 (1)	CTGTTGGAAATC-AACCGCATGACC	122.3 kb
346	01321-L12279	TUBGCP5 exon 8 (3)	CAGTGATCCATT-GTATGTTCCAGA	13.3 kb
142 *	02017-L01537	TUBGCP5 exon 1	AGCGCGGAACAT-GGCGCGGCACGG	?
124 \pm	09878-L10290	HERC2P2 exon 23	GCCCAGTTAGAT-GACTACTTCCCT	15.1 kb
428 \pm	09877-L11168	HERC2P2 exon 13	TACTGTTACAGA-TGTTACAAATA	358.1 kb
314	09874-L12277	GOLGA6L2 (FLJ36144) exon 9	AAGAGAAAGATG-AAGATCATCAAT	2.2 kb
154	09873-L10285	GOLGA6L2 (FLJ36144) exon 7	AGGAGCTGAAGA-AGAAAAATGCCG	123.6 kb
158	02019-L01538	MKRN3 exon 1 (2)	GAAGCCTCCGAG-CGCGGCCCCAT	0.5 kb
208	04901-L04285	MKRN3 exon 1 (3)	GGCTGCGCACAT-CGAGCCCCGAC	77.9 kb
409	11155-L11839	MAGEL2 exon 1	AGCAAGATGCTT-GTCTGAGGTTT	1212.3 kb
245 \yen	02026-L10004	68 nt before SNRPN exon 3 (5)	CATGTACAACCT-GCGCTTGCGCAA	

Per eseguire l'analisi di MLPA, oltre al DNA genomico da analizzare, sono necessari dei DNA di controllo (Promega). I campioni di DNA vengono diluiti ad una concentrazione di 100 ng/μl e portati al volume finale di 5 μl di TE. La metodica di MLPA si compone di tre reazioni: denaturazione-ibridazione, ligazione e PCR (Polymerase Chain Reaction), che vengono eseguite con l'utilizzo di un termociclatore e seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice (MRC Holland).

- *Denaturazione e ibridazione*

- ✓ Denaturare il DNA per 10' a 98°C e raffreddare fino a 25°C
- ✓ Aggiungere 1,5 μl di Salsa Probemix e 1,5 μl di MLPA buffer
- ✓ Denaturare a 95°C per 1' e ibridare a 60°C per 16 h (overnight).

- *Ligazione*

- ✓ Portare la temperatura a 54°C
- ✓ Aggiungere 32 μl della mix di ligazione (3 μl di Ligasi-65 buffer A, 3 μl di Ligasi-65 buffer B, 25 μl di acqua distillata e 1 μl di Ligasi-65)
- ✓ Incubare 15' a 54°C
- ✓ Incubare 5' a 98°C per inattivare la ligasi

- *PCR*

- ✓ Dispensare 10 μl del prodotto di ligazione in nove provette in cui sono stati aggiunti 4 μl di Salsa PCR Buffer 10X e 26 μl di acqua distillata
- ✓ Caricare nel termociclatore e portare a 60°C
- ✓ Aggiungere a ciascun campione 10 μl di mix di PCR (2 μl di Salsa PCR primer, 2 μl Salsa Enzyme dilution buffer, 5,5 μl di acqua distillata e 0,5 μl di Salsa Polymerase)

- ✓ Avviare il seguente programma di PCR: 30'' a 95°C, 30'' a 60°C, 60'' a 72°C per 35 cicli.

Al termine della reazione di PCR, ad 1 µl del prodotto di amplificazione si aggiungono 0,5 µl di ROX e 15,5 µl di formammide deionizzata. I campioni vengono poi incubati a 94°C per 2', raffreddati in ghiaccio ed infine caricati nel sequenziatore ABI Prism 310 (Applied Biosystems) per la separazione dei frammenti e l'analisi tramite software GeneMapper. I dati relativi alle corse elettroforetiche vengono importati ed elaborati nel software di analisi dedicato "Coffalyser" (MRC Holland). Le alterazioni vengono considerate significative se i valori presentano una deviazione maggiore del 30% rispetto al controllo.

2.5 Array-based Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH)

Questa tecnologia permette di identificare la presenza di microdelezioni e microduplicazioni di un campione di DNA (DNA test) rispetto ad un DNA di riferimento (DNA reference). Il principio della tecnica si basa su una ibridazione comparativa dei due genomi differentemente marcati con fluorocromi rossi (Cy5) e verdi (Cy3) che vengono coprecipitati in presenza di Cot-1 DNA per bloccare le sequenze ripetute e coibridati su un array su cui sono immobilizzate sequenze omologhe di DNA (sonde) (Fig.6). Le sonde possono essere cloni BAC (cromosomi artificiali batterici), cloni PAC (cromosomi artificiali di fago P1) o sequenze di oligonucleotidi. La fluorescenza è rilevata mediante uno scanner a laser, grazie al quale si acquisisce un'immagine per entrambi i fluorocromi. In seguito, le immagini sono quantificate con metodo digitale mediante software specifici dedicati, che quantificano l'intensità di fluorescenza emessa per ogni sonda, calcolando quanto il rapporto tra i segnali emessi dal campione e dal DNA di riferimento devia dai valori attesi. Dato che le misurazioni possono essere riferite direttamente alle posizioni sul genoma, è possibile definire, con precisione, i punti di rottura (breakpoints) dei riarrangiamenti eventualmente presenti.

La sovrapposizione dei due segnali corrispondenti ai due fluorocromi, nel caso di un soggetto normale produce un valore di intensità di fluorescenza uguale a 1, poiché il

rapporto tra i 2 fluorocromi $2/2$ è pari a 1. La rappresentazione grafica fornita dal software trasforma questo valore in logaritmo in base 2. Quindi i cloni in cui è avvenuta una normale ibridazione tra DNA di controllo e DNA test si trovano lungo la linea grafica dello 0. L'elaborazione finale del programma produce uno schema in cui è possibile vedere la distribuzione dei segnali di fluorescenza dei cloni nell'intorno del valore "zero" ad indicare un uguale dosaggio della regione del DNA test e del DNA di controllo. Cloni che si discostano da questa linea di "zero" verso $+0.58$, dove il rapporto tra i 2 fluorocromi è di $3/2$, sono indicativi di una regione duplicata e cloni che si discostano verso -1 , dove il rapporto tra i 2 fluorocromi è $1/2$, sono indicativi di una delezione (Fig. 6).

L'analisi di array-CGH è stata condotta con oligo-array 244K (Human Genome CGH Microarray 244K, Agilent) contenenti circa 236.381 sonde ad una distanza spaziale media di 8.9 Kb con una risoluzione media di circa 50 Kb. Sono stati utilizzati per l'analisi $2\mu\text{g}$ di DNA test e reference (Promega).

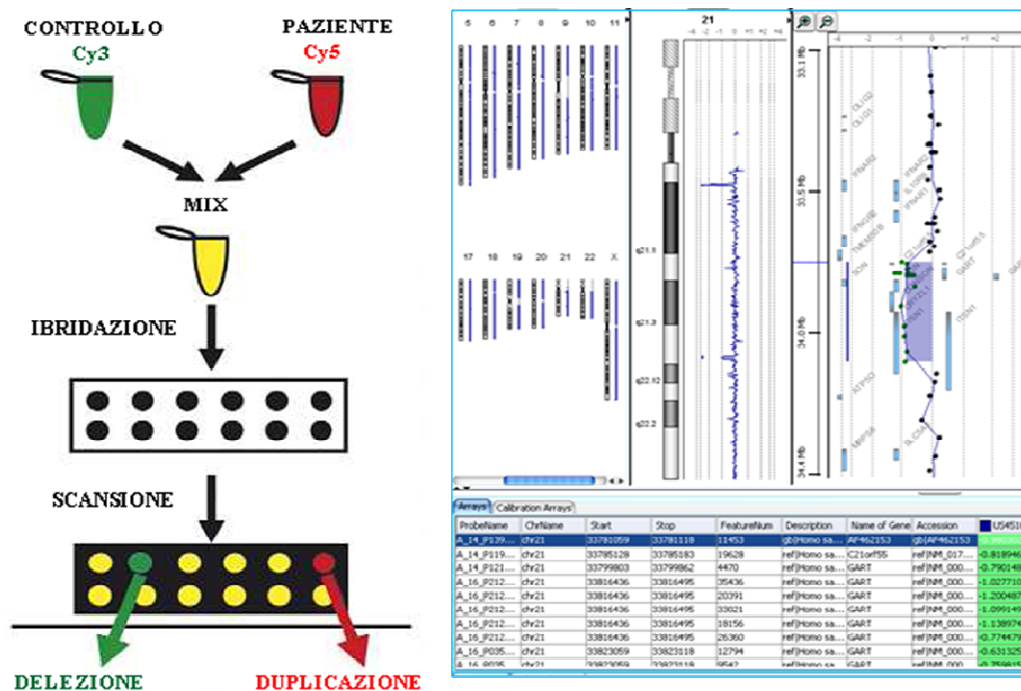


Fig.6. Rappresentazione schematica di un esperimento array-CGH. (a) I DNA test e di controllo sono differentemente marcati, coprecipitati e ibridati su un array. Dopo le procedure di lavaggio, l'immagine dei vetrini è acquisita attraverso uno scanner che determina l'intensità di fluorescenza di ogni sonda. Dopo l'elaborazione e la normalizzazione dei dati, i rapporti in \log_2 delle sonde sono tracciati come funzione della posizione cromosomica. (b) Profilo dell'array visualizzato dal software. Ogni punto rappresenta una singola sonda presente individuata sull'array; le sonde con valore uguale a zero rappresentano un uguale rapporto dell'intensità di fluorescenza tra il test e il controllo. Le sonde con un valore uguale a -1 indicano la presenza di una delezione.

Digestione del DNA

- ✓ Aggiungere al DNA acqua Nuclease-free fino ad un volume di 20.2 μ l
- ✓ Aggiungere ad ogni campione 5.8 μ l della Mix di digestione (2 μ l di acqua Nuclease-free, 2,6 μ l di Buffer C, 0,2 μ l di BSA (10 μ g/ μ l), 0,5 μ l di Alu I (10 U/ μ l), 0,5 μ l di Rsa I (10 U/ μ l))
- ✓ Incubare i campioni per 2 ore a 37°C
- ✓ Bloccare la reazione incubando a 65°C per 20 minuti
- ✓ Verificare la digestione del DNA mediante gel elettroforesi caricandone 2 μ l (Agarosio 0,8% in TAE; Etidio Bromuro 0,01 mg/ml).

Marcatura del DNA mediante Agilent Genomic DNA Labelling Kit PLUS (Agilent)

- ✓ Incubare a 95-100°C per 5 minuti e successivamente 5 minuti in ghiaccio;
- ✓ Aggiungere ad ogni campione 21 μ l della mix di marcatura (2 μ l di acqua Nuclease-free, 10 μ l di 5X Buffer, 5 μ l di 10X dNTP, 3 μ l di CY3-dUTP (1 mM) oppure CY5-dUTP, 1 μ l di Exo-Klenov fragment)
- ✓ Incubare per 2 ore a 37°C;
- ✓ Bloccare la reazione incubando a 65°C per 10 minuti;

Purificazione del prodotto di marcatura (Clean-up)

- ✓ Aggiungere alla miscela di reazione 430 μ l di Buffer TE (Promega) e trasferire l'intero volume in una colonnina Amicon YM30 (Millipore) adagiata nell'apposita provetta
- ✓ Centrifugare a 14000 rpm per 10'
- ✓ Eliminare l'eluato e lavare il contenuto della colonnina con altri 430 μ l di Buffer TE
- ✓ Centrifugare nuovamente a 14000 rpm per 10'
- ✓ Trasferire la provetta capovolta in una nuova provetta e centrifugare a 14000 rpm per 1'
- ✓ Misurare il volume di DNA marcato eluito e ripetere gli ultimi passaggi fino a che questo sia inferiore a 80.5 μ l; raggiungere il volume desiderato aggiungendo ai campioni Buffer TE

- ✓ Valutare concentrazione e attività della marcatura mediante NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer.

Ibridazione mediante Agilent Oligo aCGH Hybridization Kit (Agilent).

- ✓ Unire i campioni di DNA test e DNA di riferimento marcati
- ✓ Aggiungere 520 µl della mix di ibridazione (50 µl di Human Cot-1 DNA (1 mg/ml, 52 µl di 10X Blocking Agent, 260 µl di 2X Hybridization buffer
- ✓ Incubare a 95/100 °C per 5 minuti e successivamente a 37°C per 30'
- ✓ Depositare l'intero volume sul coprioggetto (slide gasket) precedentemente adagiati sulla parte inferiore della Agilent Microarray Hybridization Chamber
- ✓ Posizionare quindi il vetrino con il barcode "Agilent" rivolto verso i campioni e chiudere la Agilent Hybridization Chamber
- ✓ Posizionare così il vetrino nell'apposito forno preriscaldato a 65°C e lasciare per 48 ore.

20

Lavaggi post-ibridazione mediante Oligo aCGH Wash Buffer 1 e 2 (Agilent)

- ✓ Dissamblare la Agilent Hybridization Chamber
- ✓ Separare il vetrino dal coprioggetto immergendoli in una vaschetta contenente il Wash Buffer 1
- ✓ Lavare il vetrino immergendolo nel Wash Buffer 1 in agitazione su piastra magnetica per 5'
- ✓ Spostare velocemente il vetrino nel Wash Buffer 2 preriscaldato a 37°C e tenerlo in agitazione su piastra magnetica per 1'
- ✓ Estrarre il vetrino molto lentamente dalla soluzione e caricarlo nell'apposita navicella per la lettura con scanner a laser (Agilent).

Dopo la scansione del vetrino, si procede con l'estrazione dei dati mediante software Feature Extraction (v 10.7.1.1) ed analisi con il software dedicato DNA Analytics (v 4.0, Agilent).

Lo studio delle regioni sbilanciate evidenziate all'analisi viene effettuato mediante l'impiego di browser e database dedicati (UCSC, <http://genome.ucsc.edu/>; Database of Genomic Variants, <http://projects.tcag.ca/variation/>).

3. RISULTATI

L'analisi con tecnica MLPA dei 50 soggetti (25 femmine e 25 maschi), di età compresa tra i 2 e 38 anni, affetti da PWS e portatori di delezione, ha evidenziato nel 92% (46/50) dei casi una delezione comune: il 40% (20/50) è portatore di TPI e il 52% (26/50) di TPII.

Nell'8% dei casi (4/50) sono state definite delezioni atipiche, che sono state ulteriormente caratterizzate mediante array-CGH per una più precisa definizione dei breakpoints.

I risultati e i dati relativi ai singoli pazienti sono riportati nelle tabelle 5 e 6.

pt	sesso	età	Criteri Diagnostici																								score	Tipo di delezione			
			maggiore								minore								supporto												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			25	26	27
1	F	2	si	si	no	si	no	si	no	si	no	no	no	si	si	no	si	si	no	no	no	no	si	no	no	no	si	7	TPI		
2	F	2	si	si	no	si	no	si	no	si	si	no	si	si	no	no	no	no	no	no	si	si	si	no	no	no	no	si	6.5	TPI	
3	F	7	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	si	si	si	si	no	si	no	no	si	no	si	si	12.5	TPI	
4	M	10	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	no	si	no	no	no	no	si	si	no	no	si	si	no	no	si	si	10.5	TPI	
5	M	10	si	si	no	si	si	si	no	si	si	si	no	no	si	no	no	si	si	si	si	si	no	no	si	no	si	si	9.5	TPI	
6	F	10	si	si	no	si	no	si	no	si	si	no	no	si	si	no	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	si	si	9	TPI	
7	M	11	si	si	no	si	si	si	no	si	no	no	no	si	no	si	si	no	no	si	si	si	no	si	si	no	no	si	9	TPI	
8	F	13	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	no	si	ND	13	TPI	
9	F	14	si	si	si	si	no	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	no	si	si	no	si	si	si	si	11.5	TPI	
10	M	16	si	si	no	si	si	si	no	si	si	no	si	si	no	no	si	si	no	si	no	si	no	si	no	no	si	si	9.5	TPI	
11	M	19	si	si	no	si	si	si	no	si	si	si	no	no	si	no	si	si	si	si	si	no	no	si	si	si	no	si	9.5	TPI	
12	M	20	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	no	si	no	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	si	no	no	si	11.5	TPI
13	M	20	si	si	no	si	si	si	no	si	si	si	si	no	si	no	si	si	si	si	si	no	si	no	si	no	no	si	si	10.5	TPI
14	M	23	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	no	no	no	no	si	no	si	no	si	no	si	no	no	si	si	10.5	TPI	
15	F	26	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	si	no	si	si	si	no	no	si	si	si	si	no	no	si	si	11.5	TPI
16	F	27	si	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	si	si	no	no	si	no	si	si	si	no	si	no	?	si	si	11.5	TPI	
17	F	28	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	no	no	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	si	11	TPI	
18	M	30	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	no	no	no	no	si	si	si	si	si	si	no	si	no	si	si	si	11	TPI	
19	M	34	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	no	si	si	no	si	no	no	no	no	no	no	ND	12	TPI		
20	F	38	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	13.5	TPI	

CRITERI MAGGIORI	1	2	3	4	5	6	7	8
1	ipotonia neonatale e infantile							
2	problemi di nutrizione infantile o ritardo nella crescita							
3	eccessivo o rapido aumento di peso tra il 1° e il 6° anno di vita							
4	tratti del viso caratteristici							
5	ipogonadismo							
6	ritardo dello sviluppo, disabilità intellettiva o prob. di apprendimento							
7	iperfagia o ossessione per il cibo							
8	anomalie a carico del cromosoma 15 (del(15), UPD, IC)							
CRITERI MINORI	9	10	11	12	13	14	15	16
9	movimenti fetali ridotti							
10	problemi comportamentali tipici							
11	disturbo del sonno o apnea durante il sonno							
12	bassa statura (in assenza di terapia con GH)							
13	ipopigmentazione (paragonata alla famiglia)							
14	mani piccole (<25° cent.) e/o piedi piccoli (<10°cent.)							
15	mani strette con bordo ulnare rettilineo							
16	anormalità degli occhi (esotropia, miopia)							
17	saliva viscosa e densa							
18	difetti nell'articolazione della parola							
19	skin picking							
CRITERI DI SUPPORTO	20	21	22	23	24	25	26	27
20	soglia del dolore alta							
21	incidenza del vomito ridotta							
22	alterazioni della termoregolazione							
23	scoliosi e/o cifosi							
24	adrenarca precoce							
25	osteoporosi							
26	abilità inusuale nel costruire puzzle							
27	reperiti neuromuscolari nella norma							

Tab.5 Criteri diagnostici nei pazienti TPI. Per ogni paziente viene indicata la presenza (si) o assenza (no) dei criteri maggiori, minori e di supporto. L'età riportata si riferisce all'età al momento della valutazione. ND: dati non disponibili. A destra la legenda relativa ai criteri diagnostici.

pt	sesso	età	Criteri Diagnostici																								score	Tipo di delezione			
			maggiore								minore								supporto												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			25	26	27
21	M	7	si	si	no	no	si	si	no	si	si	no	no	no	si	si	no	no	si	si	no	no	no	si	si	no	no	no	no	7.5	TPII
22	F	7	si	si	no	si	no	si	no	si	si	no	no	no	si	si	si	si	si	si	no	no	si	si	si	no	no	no	si	8.5	TPII
23	F	7	si	si	no	no	si	si	no	si	si	no	no	no	si	si	si	si	no	no	no	no	si	no	si	no	no	si	si	7.5	TPII
24	F	7	si	si	no	si	no	si	si	si	no	no	si	no	si	no	no	no	si	si	si	si	si	no	si	no	no	si	si	8.5	TPII
25	M	9	si	si	no	no	si	si	no	si	si	no	no	no	si	si	no	si	si	si	si	si	no	no	si	no	si	si	8.5	TPII	
26	M	9	si	si	no	si	si	si	no	si	si	no	si	no	si	no	si	no	si	si	si	no	no	no	si	si	no	si	no	8.5	TPII
27	F	13	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	si	no	si	si	si	si	si	si	no	si	no	no	si	si	11.5	TPII	
28	F	13	si	si	no	si	si	si	no	si	si	no	no	no	si	no	si	si	si	si	si	no	no	si	no	si	si	si	9	TPII	
29	M	14	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	si	no	si	si	si	no	si	si	no	no	si	no	no	no	ND	11.5	TPII
30	M	15	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	no	no	si	si	12	TPII
31	M	15	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	no	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	no	si	si	12	TPII
32	F	15	si	si	si	no	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	si	si	si	no	si	si	si	no	si	no	no	no	ND	11	TPII
33	M	17	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	si	no	no	no	no	si	no	no	si	si	si	no	no	ND	si	10.5	TPII
34	M	19	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	no	si	si	si	si	si	si	no	si	no	no	no	ND	12.5	TPII
35	M	20	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	no	si	si	si	10	TPII
36	F	21	si	no	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	12.5	TPII
37	M	25	si	si	si	no	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	no	no	no	no	no	ND	10.5	TPII
38	M	26	si	si	si	no	si	si	si	si	si	si	no	si	no	si	si	si	si	si	no	si	si	no	si	no	no	no	si	10.5	TPII
39	F	28	si	no	no	si	si	si	no	si	si	no	no	si	si	si	si	no	si	si	no	no	no	no	si	no	si	no	si	8.5	TPII
40	F	30	no	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	si	si	si	si	si	si	si	11.5	TPII
41	F	31	si	si	no	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	si	no	no	no	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10.5	TPII
42	F	32	si	si	no	no	si	si	si	si	no	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	no	si	si	si	11	TPII
43	F	33	si	si	si	si	si	si	no	si	no	no	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	si	no	si	si	si	si	si	11	TPII
44	F	35	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	no	si	si	si	si	si	si	no	si	si	no	si	no	si	si	si	12	TPII
45	M	35	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	no	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	12.5	TPII
46	M	36	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	no	no	no	si	si	si	si	si	no	no	si	si	no	si	si	si	si	9.5	TPII
47	F	2	si	si	no	no	no	si	no	si	no	no	no	si	si	no	no	si	no	no	no	si	si	si	si	no	no	no	si	5.5	atipica
48	M	19	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	13	atipica
49	M	33	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si	si	si	si	si	si	si	no	si	no	no	no	no	ND	12	atipica	
50	F	37	si	si	si	no	si	si	si	si	si	no	si	si	no	no	no	no	no	no	no	no	no	si	no	no	ND	ND	9	atipica	

CRITERI MAGGIORI	1	2	3	4	5	6	7	8			
1 ipotonia neonatale e infantile											
2 problemi di nutrizione infantile o ritardo nella crescita											
3 eccessivo o rapido aumento di peso tra il 1° e il 6° anno di vita											
4 tratti del viso caratteristici											
5 ipogonadismo											
6 ritardo dello sviluppo, disabilità intellettiva o prob. di apprendimento											
7 iperfagia o ossessione per il cibo											
8 anomalie a carico del cromosoma 15 (del(15), UPD, IC)											
CRITERI MINORI	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
9 movimenti fetali ridotti											
10 problemi comportamentali tipici											
11 disturbo del sonno o apnea durante il sonno											
12 bassa statura (in assenza di terapia con GH)											
13 ipopigmentazione (paragonata alla famiglia)											
14 mani piccole (<25° cent.) e/o piedi piccoli (<10°cent.)											
15 mani strette con bordo ulnare rettilineo											
16 anomalità degli occhi (esotropia, miopia)											
17 saliva viscosa e densa											
18 difetti nell'articolazione della parola											
19 skin picking											
CRITERI DI SUPPORTO	20	21	22	23	24	25	26	27			
20 soglia del dolore alta											
21 incidenza del vomito ridotta											
22 alterazioni della termoregolazione											
23 scoliosi e/o cifosi											
24 adrenarca precoce											
25 osteoporosi											
26 abilità inusuale nel costruire puzzle											
27 reperti neuromuscolari nella norma											

Tab.6 Criteri diagnostici nei pazienti TPII e con delezione atipica. Per ogni paziente viene indicata la presenza (si) o assenza (no) dei criteri maggiori, minori e di supporto. L'età riportata si riferisce all'età al momento della valutazione. ND: dati non disponibili. A destra la legenda relativa ai criteri diagnostici.

Pazienti con delezione atipica

Paziente 47 (# OG): 3 anni al momento dell'ultima valutazione

Unicogenita, nata alla 38° settimana di gestazione da taglio cesareo per riscontro ecografico a partire dalla 30° settimana di ritardo di crescita intrauterino (IUGR). Vengono riportati movimenti attivi fetali validi. Alla nascita il peso era 2525 g (3° centile), venivano inoltre riscontrati ipotonia, iporeattività e pianto flebile. La deambulazione autonoma è stata acquisita all'età di 14 mesi. La polisonnografia non ha evidenziato alterazioni di significato patologico. L'ecocardiogramma ha rilevato pervietà del forame ovale. All'esame obiettivo effettuato all'età di 3 anni e 3 mesi si rilevavano: altezza 101.5 cm (95° centile), peso 16.900 kg (90° centile), BMI (Body Mass Index) 15.8, circonferenza cranica 49.5 cm (50° centile), lieve scoliosi, piede piatto di I grado, fototipo chiaro, non caratteristiche facciali peculiari, lieve strabismo in occhio sinistro, area ipercromica caffè-latte alla gamba sinistra, non acromicria, non skin-picking. Si evidenziava lieve ritardo cognitivo con prevalente compromissione del linguaggio.

Risultato Array-CGH: l'analisi ha evidenziato una delezione interstiziale di circa 4,22 Mb con breakpoint prossimale localizzato in 15q11.2 e distale in 15q13.1 (ultimo oligomero presente in posizione 21610007 bp, primo oligomero deleto in posizione 21636667 bp, ultimo oligomero deleto in posizione 25853589 bp, primo oligomero presente in posizione 25860035 bp) (Fig.7).

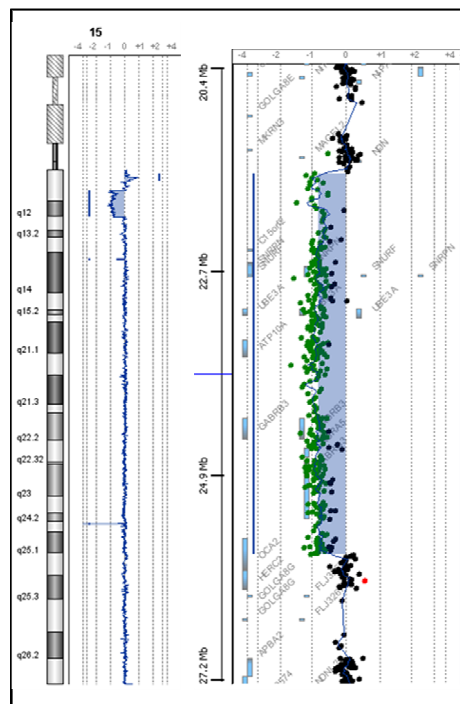


Fig.7. Profilo di array-CGH del cromosoma 15 nella paziente 47. Sulla sinistra è rappresentato l'ideogramma del cromosoma 15 con la visualizzazione del log₂ dei rapporti delle 2 "probes" per ciascun oligonucleotide; sulla destra l'ingrandimento della delezione con i geni contenuti.

Paziente 48 (#PD): 19 anni al momento dell'ultima valutazione

Nato da taglio cesareo alla 42° settimana di gestazione. La madre riporta scarsi movimenti fetali rispetto alla precedente gravidanza. Alla nascita il peso era 3170 g (10-25° centile), l'indice di Apgar 6 al 1 minuto e 7 al 5; venivano rilevati ipotono, pianto flebile e letargia. Nel primo anno di vita veniva evidenziato incremento ponderale e iperfagia; veniva inoltre riscontrato ritardo dello sviluppo neuromotorio.

All'età di 2 anni veniva sottoposto ad intervento di orchidopessi bilaterale.

Dall'età di 8 anni e 6 mesi per i 2 anni successivi è stata effettuata terapia con GH, successivamente sospesa per ridotta tolleranza al glucosio. All'età di 14 anni e 9 mesi è stato diagnosticato diabete mellito di tipo II trattato con insulina.

Per la presenza di obesità grave è stato trattato prima con inserimento di palloncino intragastrico (BIB) (x 4 volte) ed all'età di 17 anni è stato sottoposto ad intervento di diversione-bilio-pancreatica.

Le indagini strumentali e di laboratorio effettuate hanno evidenziato ipertrigliceridemia, ipertensione arteriosa, anemia ferrocarenziale, osteoporosi.

All'ultimo esame obiettivo effettuato all'età di 19 anni e 10 mesi si evidenziavano peso 103.600 Kg (>>97° centile), altezza 168.3 cm (3° centile), BMI 36.6, cifoscoliosi, ginecomastia bilaterale, importante elefantiasi degli arti inferiori, sviluppo puberale equivalente al III stadio secondo Tanner, in particolare venivano segnalati: scroto ipoplasico bilateralmente, gonadi piccole di volume di 7 ml in sede.

Il deficit intellettivo risulta di grado lieve-moderato; sono presenti gravi disturbi comportamentali insorti già in età infantile caratterizzati da aggressività, scatti d'ira e nervosismo ed atteggiamenti autolesionistici.

Risultato Array-CGH: l'analisi ha evidenziato una delezione interstiziale di circa 2,19 Mb con breakpoints localizzati in 15q11.2 (ultimo oligomero presente in posizione 20079935 bp, primo oligomero deleto in posizione 20220416 bp, ultimo oligomero deleto in posizione 20454985 bp, primo oligomero presente in posizione 20462294 bp). E' presente, inoltre, sempre nella regione 15q11.2, una delezione di circa 235 Kb (ultimo oligomero presente in posizione 20851679 bp, primo oligomero deleto in posizione 21195208 bp, ultimo oligomero deleto in posizione 23389200 bp, primo oligomero presente 23440964 bp). (Fig.8)

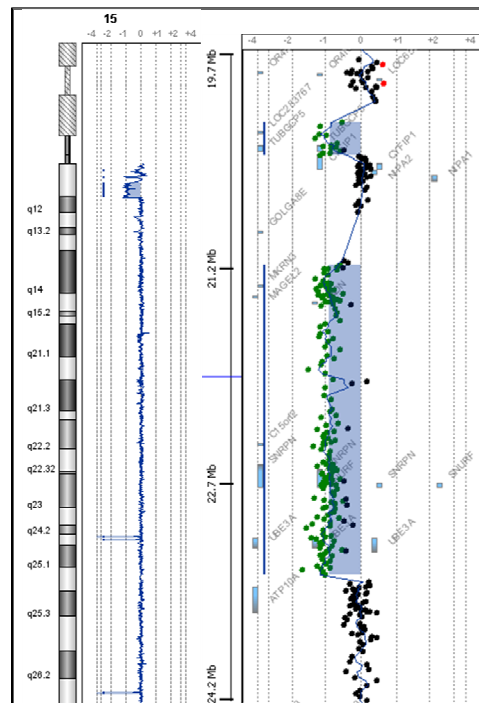


Fig.8. Profilo di array-CGH del cromosoma 15 nel paziente 48. Sulla sinistra, l'ideogramma del cromosoma 15 con la visualizzazione del log₂ dei rapporti delle 2 "probes" per ciascun oligonucleotide; sulla destra l'ingrandimento della delezione con i geni contenuti.

Paziente 49 (#SV): 33 anni al momento dell'ultima valutazione

Nato alla 40° settimana di gestazione. La madre riferisce movimenti fetali scarsi rispetto alla gravidanza precedente della sorella sana. Alla nascita viene segnalata la presenza di ipogonadismo (criptorchidismo e scroto ipoplastico). La storia post-natale è segnata da ipotonìa marcata, difficoltà di alimentazione e ritardo dello sviluppo. All'età di due anni compare un insaziabile appetito con rapido aumento di peso. Nell'infanzia oltre ad un ritardo globale dello sviluppo neuromotorio si apprezzano anomalie comportamentali tipiche della PWS. All'età di 11 anni viene sottoposto ad intervento di orchidopessi del testicolo sinistro. A causa della bassa statura viene intrapresa terapia con GH dagli 11 ai 13 anni. A 19 anni, data la grave obesità, viene effettuato intervento di diversione biliopancreatica. All'esame obiettivo effettuato a 33 anni di età si evidenziano: peso 108.9 kg (>97° centile), altezza 161 cm (<3° centile), BMI 42, fronte stretta, occhi a mandorla, labbro superiore sottile, mani e piedi piccoli e mani strette con bordo ulnare rettilineo (Fig.9). Lo sviluppo sessuale risulta incompleto con testicoli di volume di 5 ml. Non si apprezzano lesioni cutanee né ipopigmentazione. Vengono inoltre rilevati: miopia, grave scoliosi, saliva viscosa, ridotta sensibilità al vomito ed al dolore. La polisonnografia ha rilevato irregolarità del ritmo respiratorio con episodi di apnee notturne. La valutazione neuropsicologica mediante WAIS-R (Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised) ha evidenziato un quoziente intellettivo (QI) globale di 57, verbale 58 e di performance 66.



Fig. 9. Foto del paziente all'età di 33 anni

Risultato Array-CGH: l'analisi ha evidenziato una delezione interstiziale di circa 6,27 Mb con breakpoint prossimale e distale localizzati, rispettivamente, in 15q11.2 e 15q13.2 (ultimo oligomero presente in posizione 21795947 bp, primo oligomero deleto in posizione 21813423 bp, ultimo oligomero deleto in posizione 28087557 bp, primo oligomero presente in posizione 28109371 bp) (Fig.10)

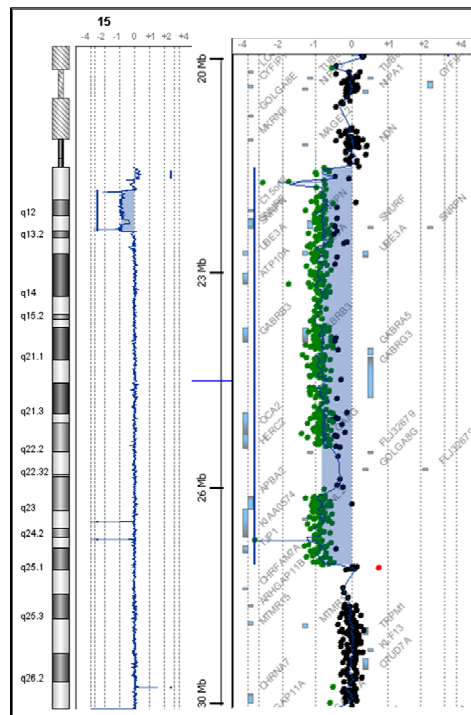


Fig.10. Profilo di array-CGH del cromosoma 15 nel paziente 49. Sulla sinistra, l'ideogramma del cromosoma 15 con la visualizzazione del log₂ dei rapporti delle 2 "probes" per ciascun oligonucleotide; sulla destra l'ingrandimento della delezione con i geni contenuti.

Paziente 50 (#BA): 37 anni al momento dell'ultima valutazione

Nata alla 42° settimana di gestazione da gravidanza normodecorsa. Alla nascita a causa di importante ipotonia muscolare con conseguente difficoltà di suzione è stata alimentata con un sondino nasogastrico per 8 giorni. Viene riportato un pianto molto flebile. La bambina ha acquisito con ritardo le principali tappe dello sviluppo motorio, iniziando a camminare a 19 mesi. Il linguaggio è stato acquisito in epoca e con modalità fisiologica. L'accrescimento ponderale è rimasto deficitario per tutto il primo anno di vita. I genitori riportano che l'obesità è comparsa intorno ai 6-7 anni a seguito dell' sviluppo di iperfagia. All'esame obiettivo effettuato all'età di 37 anni si evidenziano: peso 81.9 Kg (>97° centile), altezza 141.3 cm (<<3° centile), BMI 41, fronte stretta, occhi a mandorla, mani e piedi piccoli, scoliosi, skin-picking, saliva viscosa (Fig.11). Ha presentato amenorrea primaria per la quale è stata somministrata terapia ormonale sostitutiva. La valutazione neuropsicologica mediante WAIS-R ha evidenziato un quoziente intellettivo (QI) globale di 71, verbale di 76 e di performance di 72. La valutazione polisonografica ha rilevato la presenza di ipoventilazione e apnee notturne.



Fig. 11. Foto della paziente all'età di 37 anni

Risultato Array-CGH: l'analisi ha evidenziato una delezione interstiziale di circa 372 Kb con breakpoints localizzati in 15q11.2 (ultimo oligomero presente in posizione 22643367 bp, primo oligomero deleto in posizione 22648348 bp, ultimo oligomero deleto in posizione 23020695 bp, primo oligomero presente in posizione 23034364 bp) (Fig.12).

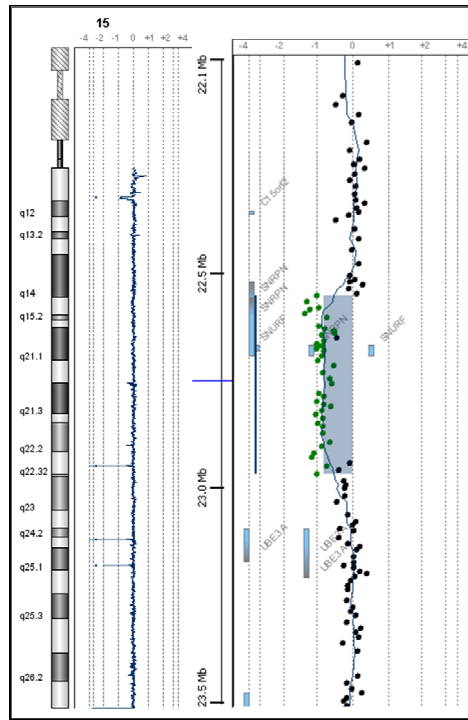


Fig.12. Profilo di array-CGH del cromosoma 15 nella paziente 50. Sulla sinistra, l'ideogramma del cromosoma 15 con la visualizzazione del \log_2 dei rapporti delle 2 "probes" per ciascun oligonucleotide; sulla destra l'ingrandimento della delezione con i geni contenuti.

4. DISCUSSIONE

La classe TPII rappresenta la delezione più frequente nei soggetti PWS con una percentuale del 60-70% dei casi con delezione (Christian et al.,1995; Butler et al., 2004). In accordo con quanto riportato, nella nostra casistica la maggior parte dei casi (52%) è portatore di una delezione di classe II e il 40% di una di classe I, mentre inaspettatamente una percentuale non indifferente, l'8%, presenta una delezione con breakpoints propri. Tale risultato potrebbe essere dovuto alla tecnica con la quale viene effettuata l'analisi molecolare, che ancora oggi è prevalentemente eseguita con FISH (Fluorescent in situ hybridization) rispetto alla MLPA di più recente introduzione che consente una migliore definizione dei breakpoints.

Dal confronto tra le caratteristiche fenotipiche dei portatori delle due classi di delezione comuni, alcuni autori hanno concluso che i portatori di delezione TPI presentano un quadro clinico più grave, soprattutto a livello neurocomportamentale (Butler et al.,2004, Hartley et al.,2005). Sebbene questi dati siano supportati dalla recente probabile associazione di microdelezioni tra BP1-BP2 con disfunzioni neurologiche e ritardo dello sviluppo e del linguaggio (Doornbos et al., 2009, Burnside et al., 2011), nella nostra casistica non sono state evidenziate differenze significative a livello comportamentale tra i pazienti con TPI e TPII, in accordo con quanto riportato da altri autori (Milner et al.,2005, Varela et al.,2005). Le anomalie comportamentali che si riscontrano nei pazienti descritti in questo studio (eccetto il paziente 48) non sono gravi, sono per lo più legate all'ossessione per il cibo e includono testardaggine, ripetitività, oppositività e scatti d'ira. Anche per quanto riguarda i dati relativi ai criteri diagnostici, non sono state evidenziate differenze: i criteri maggiori, minori e di supporto sono omogeneamente rappresentati nelle due classi di delezione (Tab 7).

Differente è invece, il fenotipo neurocomportamentale del caso 48 che presenta gravi disturbi comportamentali insorti già in età infantile caratterizzati, oltre che da scatti d'ira e nervosismo, da aggressività ed atteggiamenti autolesionistici. Una delezione molto simile, con breakpoint prossimale a livello di BP2 e distale nel gene *UBE3A* è stata descritta da Calounova (Calounova et al.,2008, paziente 1). Come nel nostro caso, la delezione non include i geni *APT10A*, i geni *GABR* e *OCA2* e il paziente presenta tutte le caratteristiche tipiche di PWS (Fig.13). Il nostro caso presenta un'ulteriore delezione in posizione prossimale rispetto a BP2 che si estende per circa 235 Kb a partire da BP1,

includendo il gene *TUBGP5* e interrompendo il gene *CYFIP1*. Tuttavia, sulla base dei riscontri evidenziati nella nostra casistica, l'aggravamento del quadro comportamentale non sembra essere causato dalla perdita di questa regione, che potrebbe, invece, rappresentare una CNV (Copy Number Variation) benigna; inoltre, variazioni nel numero di copie di questa regione sono riportate anche nel database delle varianti genomiche (Database of Genomic Variant, <http://projects.tcag.ca/variation/>). Non è tuttavia escludibile che la microdelezione di *TUBGCP5* e *CYFIP1*, possa avere un ruolo come fattore modificatore del fenotipo, come già riportato per altre sindromi da microdelezioni/duplicazioni come la 16p11.2, 16p12.1, 22q11.2 nella quale è stato recentemente introdotto il modello "two hit" (Girirajan et al.,2010). A tal proposito la conservazione dei *NIPAI* e *NIPA2* potrebbe esacerbare le manifestazioni della malattia.

La delezione caratterizzata nella paziente 47 è un po' più piccola di una comune TPII in quanto non sono inclusi i geni *MKRN3*, *MAGEL2* e *NDN* ed è interessante notare che lo score clinico raggiunto, pari a 5.5, è appena sufficiente per la diagnosi clinica di PWS (Fig.13). La paziente in particolare non presenta obesità, non è tuttavia da escludere che vista l'età infantile della bambina, tale condizione possa comparire in seguito.

Gli stessi geni, *MKRN3*, *MAGEL2* e *NDN*, non sono compresi nella delezione del caso 49 e dei pazienti 2 e 3 riportati da Kanber (Kanber et al.,2009) (Fig.13). Tuttavia da un punto di vista clinico le caratteristiche riportate sono perfettamente sovrapponibili a quelle delle delezioni comuni; sembra pertanto plausibile che questi geni non siano determinanti per il fenotipo. Bisogna però tener presente che sebbene si tratti di delezioni atipiche tutte includono l'IC e quindi verosimilmente potrebbero comunque avere effetto sulla metilazione anche dei geni ad espressione paterna che non risultano deleti; per chiarire meglio il contributo dei singoli geni sarà necessario studiarne lo stato di metilazione e il livello di espressione.

La delezione del caso 49 si estende distalmente fino al BP4, includendo altri geni non imprinted che nelle delezioni comuni sono normalmente presenti: *APBA2* (OMIM 602712), *FAM189A1*, *NDNL2* (OMIM 608243) e *TJPI* (OMIM 601009) (Fig.13). Delezioni tra BP3 e BP4 sono piuttosto rare; un lavoro recente suggerisce una possibile associazione tra delezioni di questa regione, precedentemente considerata una CNV, e un quadro sindromico caratterizzato da bassa statura o ritardo dell'accrescimento, microcefalia, ipotonia e precoce sviluppo della ghiandola mammaria (Rosenfeld et al.,2011). Il paziente 49 presenta un QI di 56 ai limiti inferiori rispetto al range solitamente descritto nei pazienti con PWS, 60-70 (Whittington et al., 2004); tale dato

potrebbe essere influenzato dalla delezione di *APBA2* e *TJPI1* che svolgono un ruolo nello sviluppo e nella funzione del sistema nervoso (Okamoto et al.,1997, Zhang et al.,2009, Ebnet 2008, Kiener et al.,2007).

La delezione più piccola tra quelle da noi caratterizzate (paziente 50) ha un'estensione di 382 Kb ed include tutto il gene *SNRPN* e i cluster dei geni snoRNA (Fig.13). Ad oggi sono stati descritti tre pazienti con delezioni dei soli geni snoRNA, senza interessamento dell'IC (Sahoo et al., 2008, de Smith et al.,2009, Duker et al.,2010). Il fenotipo emergente non sembra discordante da quello delle delezioni tipiche, se non per l'assenza di alcune delle caratteristiche facciali. Analogamente dal confronto tra il paziente 50 sia con i tre casi di delezione atipica che con le delezioni comuni non si riscontrano differenze significative nel quadro clinico. Tali dati supportano le evidenze che la sola delezione degli snoRNA sia sufficiente a determinare il fenotipo PWS.

Solo due delle quattro delezioni atipiche (pazienti 47 e 49) includono il cluster dei tre geni codificanti per le subunità del recettore GABA_A, *GABRB3*, *GABRA5* e *GABRG3*. Un coinvolgimento di questi geni è stato descritto in numerose condizioni neuropsichiatriche, incluso l'autismo (Hogart et al., 2007). I dati relativi alla nostra casistica non evidenziano tuttavia differenze tra i due gruppi di pazienti nell'incidenza di disturbi dello spettro autistico, che risultano ugualmente rappresentati in entrambi.

Tab.7 Confronto dei criteri diagnostici tra i portatori di delezione TPI, TPII e atipiche.

Criteri di Holm	TPI (20 pazienti)	TPII (26 pazienti)	Atipiche (4 pazienti)
ipotonia neonatale e infantile	20/20	25/26	4/4
problemi di nutrizione infantile o ritardo nella crescita	20/20	24/26	4/4
eccessivo o rapido aumento di peso tra il 1° e il 6° anno di vita	11/20	16/26	3/4
tratti del viso caratteristici	20/20	19/26	2/4
ipogonadismo	16/20	24/26	3/4
ritardo dello sviluppo, disabilità intellettiva o problemi di apprendimento	20/20	26/26	4/4
iperfagia o ossessione per il cibo	12/20	17/26	3/4
movimenti fetali ridotti	15/20	20/26	3/4
problemi comportamentali tipici	15/20	15/26	2/4
disturbo del sonno o apnea durante il sonno	10/20	11/26	3/4
bassa statura (in assenza di terapia con GH)	11/20	13/26	4/4
ipopigmentazione (paragonata alla famiglia)	15/20	20/26	2/4
mani piccole (<25° cent.) e/o piedi piccoli (<10°cent.)	9/20	18/26	3/4
mani strette con bordo ulnare rettilineo	9/20	15/26	1/4
anormalità degli occhi (esotropia, miopia)	14/20	20/26	3/4
saliva viscosa e densa	18/20	23/26	2/4
difetti nell' articolazione della parola	13/20	17/26	1/4
skin picking	13/20	13/26	1/4
soglia del dolore alta	10/20	14/25	2/4
incidenza del vomito ridotta	17/20	20/25	2/4
alterazioni della termoregolazione	8/20	7/25	2/4
scoliosi e/o cifosi	17/20	20/25	4/4
adrenarca precoce	6/20	6/25	0/4
osteoporosi	5/20	7/25	1/4
abilità inusuale nel costruire puzzle	14/20	16/25	1/3

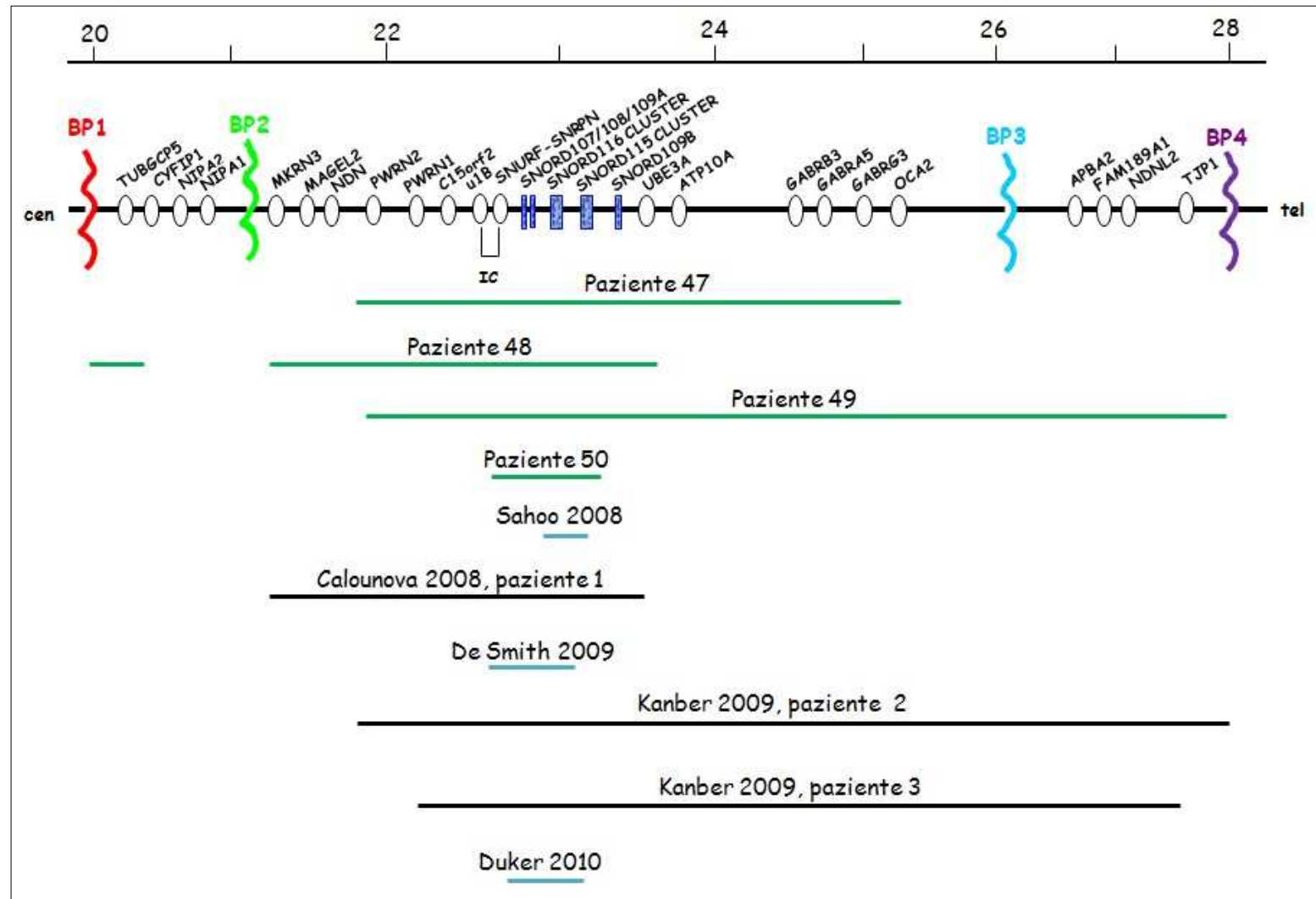


Fig.13. Localizzazione genomica della regione compresa tra BP1 e BP4. In alto sono riportate le nostre 4 delezioni atipiche (pazienti 47, 48, 49 e 50), in basso sono visualizzate le delezioni atipiche descritte in letteratura.

5. BIBLIOGRAFIA

Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD. Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet.* 1999 Aug;65(2):370-86.

Angulo MA, Castro-Magana M, Lamerson M, Arguello R, Accacha S, Khan A. Final adult height in children with Prader-Willi syndrome with and without human growth hormone treatment. *Am J Med Genet A.* 2007 Jul 1;143A(13):1456-61

Boer H, Holland A, Whittington J, Butler J, Webb T, Clarke D. Psychotic illness in people with Prader Willi syndrome due to chromosome 15 maternal uniparental disomy. *Lancet.* 2002 Jan 12;359(9301):135-6.

Buiting K, Dittrich B, Robinson WP, Guitart M, Abeliovich D, Lerer I, Horsthemke B. Detection of aberrant DNA methylation in unique Prader-Willi syndrome patients and its diagnostic implications. *Hum Mol Genet.* 1994 Jun;3(6):893-5

Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet.* 1995 Apr;9(4):395-400.

Burnside RD, Pasion R, Mikhail FM, Carroll AJ, Robin NH, Youngs EL, Gadi IK, Keitges E, Jaswaney VL, Papenhausen PR, Potluri VR, Risheg H, Rush B, Smith JL, Schwartz S, Tepperberg JH, Butler MG. Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Hum Genet.* 2011 Feb 27.

Butler MG, Palmer CG. Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader-Willi syndrome. *Lancet.* 1983 Jun 4;1(8336):1285-6.

Butler MG, Thompson T. Prader-Willi Syndrome: clinical and genetic findings. *Endocrinology* 2000 10:35-65.

Butler MG, Bittel DC, Kibiryeveva N, Talebizadeh Z, Thompson T. Behavioral differences among subjects with Prader-Willi syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy. *Pediatrics*. 2004 Mar;113(3 Pt 1):565-73.

Butler JV, Whittington JE, Holland AJ, McAllister CJ, Goldstone AP. The transition between the phenotypes of Prader-Willi syndrome during infancy and early childhood. *Dev Med Child Neurol*. 2010a Jun;52(6):e88-93.

Butler MG, Bittel DC, Kibiryeveva N, Cooley LD, Yu S. An interstitial 15q11-q14 deletion: expanded Prader-Willi syndrome phenotype. *Am J Med Genet A*. 2010b Feb;152A(2):404-8.

Calounova G, Hedvicakova P, Silhanova E, Kreckova G, Sedlacek Z. Molecular and clinical characterization of two patients with Prader-Willi syndrome and atypical deletions of proximal chromosome 15q. *Am J Med Genet A*. 2008 Aug 1;146A(15):1955-62.

Carrel AL, Myers SE, Whitman BY, Eickhoff J, Allen DB. Long-term growth hormone therapy changes the natural history of body composition and motor function in children with prader-willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Mar;95(3):1131-6.

Cassidy SB, Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2009 Jan;17(1):3-13.

Cavaillé J, Buiting K, Kiefmann M, Lalande M, Brannan CI, Horsthemke B, Bachellerie JP, Brosius J, Hüttenhofer A. Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14311-6

Christian SL, Robinson WP, Huang B, Mutirangura A, Line MR, Nakao M, Surti U, Chakravarti A, Ledbetter DH. Molecular characterization of two proximal deletion breakpoint regions in both Prader-Willi and Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet*. 1995 Jul;57(1):40-8.

Clarke DJ, Boer H, Chung MC, Sturmey P, Webb T. Maladaptive behaviour in Prader-Willi syndrome in adult life. *J Intellect Disabil Res*. 1996 Apr;40 (Pt 2):159-65.

Clarke DJ, Boer H, Whittington J, Holland A, Butler J, Webb T. Prader-Willi syndrome, compulsive and ritualistic behaviours: the first population-based survey. *Br J Psychiatry*. 2002 Apr;180:358-62

Colmenares A, Pinto G, Taupin P, Giuseppe A, Odent T, Trivin C, Laborde K, Souberbielle JC, Polak M. Effects on growth and metabolism of growth hormone treatment for 3 years in 36 children with Prader-Willi syndrome. *Horm Res Paediatr*. 2011 Feb;75(2):123-30.

Crinò A, Schiaffini R, Ciampalini P, Spera S, Beccaria L, Benzi F, Bosio L, Corrias A, Gargantini L, Salvatoni A, Tonini G, Trifirò G, Livieri C; Genetic Obesity Study Group of Italian Society of Pediatric endocrinology and diabetology (SIEDP). Hypogonadism and pubertal development in Prader-Willi syndrome. *Eur J Pediatr*. 2003 May;162(5):327-33

Curfs LM, Wiegers AM, Sommers JR, Borghgraef M, Fryns JP. Strengths and weaknesses in the cognitive profile of youngsters with Prader-Willi syndrome. *Clin Genet*. 1991 Dec;40(6):430-4.

de Lind van Wijngaarden RF, de Klerk LW, Festen DA, Hokken-Koelega AC. Scoliosis in Prader-Willi syndrome: prevalence, effects of age, gender, body mass index, lean body mass and genotype. *Arch Dis Child*. 2008 Dec;93(12):1012-6.

de los Santos T, Schweizer J, Rees CA, Francke U. Small evolutionarily conserved RNA, resembling C/D box small nucleolar RNA, is transcribed from PWCR1, a novel imprinted gene in the Prader-Willi deletion region, which is highly expressed in brain. *Am J Hum Genet*. 2000 Nov;67(5):1067-82

de Smith AJ, Purmann C, Walters RG, Ellis RJ, Holder SE, Van Haelst MM, Brady AF, Fairbrother UL, Dattani M, Keogh JM, Henning E, Yeo GS, O'Rahilly S, Froguel P, Farooqi IS, Blakemore AI A deletion of the HBII-85 class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is associated with hyperphagia, obesity and hypogonadism. *Hum Mol Genet*. 2009 Sep 1;18(17):3257-65.

Dimitropoulos A, Schultz RT. Autistic-like symptomatology in Prader-Willi syndrome: a review of recent findings. *Curr Psychiatry Rep*. 2007 Apr;9(2):159-64. Review.

Doornbos M, Sikkema-Raddatz B, Ruijvenkamp CA, Dijkhuizen T, Bijlsma EK, Gijsbers AC, Hilhorst-Hofstee Y, Hordijk R, Verbruggen KT, Kerstjens-Frederikse WS, van Essen T, Kok K, van Silfhout AT, Breuning M, van Ravenswaaij-Arts CM. Nine patients with a microdeletion 15q11.2 between breakpoints 1 and 2 of the Prader-Willi critical region, possibly associated with behavioural disturbances. *Eur J Med Genet*. 2009 Mar-Jun;52(2-3):108-15

Dudley O, Muscatelli F. Clinical evidence of intrauterine disturbance in Prader-Willi syndrome, a genetically imprinted neurodevelopmental disorder. *Early Hum Dev.* 2007 Jul;83(7):471-8.

Duker AL, Ballif BC, Bawle EV, Person RE, Mahadevan S, Alliman S, Thompson R, Traylor R, Bejjani BA, Shaffer LG, Rosenfeld JA, Lamb AN, Sahoo T. Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2010 Nov;18(11):1196-201. Epub 2010 Jun 30.

Ebnet K. Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochem Cell Biol.* 2008 Jul;130(1):1-20.

Einfeld SL, Kavanagh SJ, Smith A, Evans EJ, Tonge BJ, Taffe J. Mortality in Prader-Willi syndrome. *Am J Ment Retard.* 2006 May;111(3):193-8.

Galán F, Aguilar MS, González J, Clemente F, Sánchez R, Tapia M, Moya M. Interstitial 15q deletion without a classic Prader-Willi phenotype. *Am J Med Genet.* 1991 Mar 15;38(4):532-4.

Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C, Mefford HC, Kidd JM, Browning SR, Browning BL, Dickel DE, Levy DL, Ballif BC, Platky K, Farber DM, Gowans GC, Wetherbee JJ, Asamoah A, Weaver DD, Mark PR, Dickerson J, Garg BP, Ellingwood SA, Smith R, Banks VC, Smith W, McDonald MT, Hoo JJ, French BN, Hudson C, Johnson JP, Ozmore JR, Moeschler JB, Surti U, Escobar LF, El-Khechen D, Gorski JL, Kussmann J, Salbert B, Lacassie Y, Biser A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Deardorff MA, Shaikh TH, Haan E, Friend KL, Fichera M, Romano C, Gécz J, DeLisi LE, Sebat J, King MC, Shaffer LG, Eichler EE. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet.* 2010 Mar;42(3):203-9.

Glenn CC, Nicholls RD, Robinson WP, Saitoh S, Niikawa N, Schinzel A, Horsthemke B, Driscoll DJ. Modification of 15q11-q13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients. *Hum Mol Genet.* 1993 Sep;2(9):1377-82.

Goytain A, Hines RM, El-Husseini A, Quamme GA. NIPA1 (SPG6), the basis for autosomal dominant form of hereditary spastic paraplegia, encodes a functional Mg²⁺ transporter. *J Biol Chem.* 2007 Mar 16;282(11):8060-8.

Goytain A, Hines RM, Quamme GA. Functional characterization of NIPA2, a selective Mg²⁺ transporter. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Oct;295(4):C944-53.

Grugni G, Crinò A, Bosio L, Corrias A, Cuttini M, De Toni T, Di Battista E, Franzese A, Gargantini L, Greggio N, Iughetti L, Livieri C, Naselli A, Pagano C, Pozzan G, Ragusa L, Salvatoni A, Trifirò G, Beccaria L, Bellizzi M, Bellone J, Brunani A, Cappa M, Caselli G, Cerioni V, Delvecchio M, Giardino D, Iannì F, Memo L, Pilotta A, Pomara C, Radetti G, Sacco M, Sanzari A, Sartorio A, Tonini G, Vettor R, Zaglia F, Chiumello G; Genetic Obesity Study Group of Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology (ISPED). The Italian National Survey for Prader-Willi syndrome: an epidemiologic study. *Am J Med Genet A*. 2008 Apr 1;146(7):861-72.

Grugni G, Crinò A, Bosio L, Corrias A, Cuttini M, De Toni T, Di Battista E, Franzese A, Gargantini L, Greggio N, Iughetti L, Livieri C, Naselli A, Pagano C, Pozzan G, Ragusa L, Salvatoni A, Trifirò G, Beccaria L, Bellizzi M, Bellone J, Brunani A, Cappa M, Caselli G, Cerioni V, Delvecchio M, Giardino D, Iannì F, Memo L, Pilotta A, Pomara C, Radetti G, Sacco M, Sanzari A, Sartorio A, Tonini G, Vettor R, Zaglia F, Chiumello G; Genetic Obesity Study Group of Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology (ISPED). The Italian National Survey for Prader-Willi syndrome: an epidemiologic study. *Am J Med Genet A*. 2008 Apr 1;146(7):861-72.

Gunay-Aygun M, Schwartz S, Heeger S, O'Riordan MA, Cassidy SB. The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria. *Pediatrics*. 2001 Nov;108(5):E92.

Hall BD, Smith DW. Prader-Willi syndrome. A resumé of 32 cases including an instance of affected first cousins, one of whom is of normal stature and intelligence. *J Pediatr*. 1972 Aug;81(2):286-93.

Hartley SL, Maclean WE Jr, Butler MG, Zarcone J, Thompson T. Maladaptive behaviors and risk factors among the genetic subtypes of Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A*. 2005 Jul 15;136(2):140-5.

Hogart A, Nagarajan RP, Patzel KA, Yasui DH, Lasalle JM. 15q11-13 GABAA receptor genes are normally biallelically expressed in brain yet are subject to epigenetic dysregulation in autism-spectrum disorders. *Hum Mol Genet*. 2007 Mar 15;16(6):691-703

Holland AJ, Whittington JE, Butler J, Webb T, Boer H, Clarke D. Behavioural phenotypes associated with specific genetic disorders: evidence from a population-based study of people with Prader-Willi syndrome. *Psychol Med.* 2003 Jan;33(1):141-53.

Holm VA, Cassidy SB, Butler MG et al: Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 1993; 91: 398–402.

Holm VA, Laurnen EL. Prader-Willi syndrome and scoliosis. *Dev Med Child Neurol.* 1981 Apr;23(2):192-201.

Horsthemke B, Wagstaff J. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am J Med Genet A.* 2008 Aug 15;146A(16):2041-52.

Kanber D, Giltay J, Wiczorek D, Zogel C, Hochstenbach R, Caliebe A, Kuechler A, Horsthemke B, Buiting K. A paternal deletion of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2009 May;17(5):582-90.

Kiss T. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell.* 2002 Apr 19;109(2):145-8.

Kiener TK, Sleptsova-Friedrich I, Hunziker W. Identification, tissue distribution and developmental expression of tjp1/zo-1, tjp2/zo-2 and tjp3/zo-3 in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene Expr Patterns.* 2007 Aug;7(7):767-76

Ledbetter DH, Riccardi VM, Airhart SD, Strobel RJ, Keenan BS, Crawford JD Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med.* 1981 Feb 5;304(6):325-9.

Lindgren AC, Lindberg A. Growth hormone treatment completely normalizes adult height and improves body composition in Prader-Willi syndrome: experience from KIGS (Pfizer International Growth Database). *Horm Res.* 2008;70(3):182-7.

Maas AP, Sinnema M, Didden R, Maaskant MA, Smits MG, Schrandt-Stumpel CT, Curfs LM. Sleep disturbances and behavioural problems in adults with Prader-Willi syndrome. *J Intellect Disabil Res.* 2010 Oct;54(10):906-17.

Mignon-Ravix C, Depetris D, Luciani JJ, Cuoco C, Krajewska-Walasek M, Missirian C, Collignon P, Delobel B, Croquette MF, Moncla A, Kroisel PM, Mattei MG. Recurrent

rearrangements in the proximal 15q11-q14 region: a new breakpoint cluster specific to unbalanced translocations. *Eur J Hum Genet.* 2007 Apr;15(4):432-40.

Milner KM, Craig EE, Thompson RJ, Veltman MW, Thomas NS, Roberts S, Bellamy M, Curran SR, Sporikou CM, Bolton PF. Prader-Willi syndrome: intellectual abilities and behavioural features by genetic subtype. *J Child Psychol Psychiatry.* 2005 Oct;46(10):1089-96.

Napoli I, Mercaldo V, Boyl PP, Eleuteri B, Zalfa F, De Rubeis S, Di Marino D, Mohr E, Massimi M, Falconi M, Witke W, Costa-Mattioli M, Sonenberg N, Achsel T, Bagni C. The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell.* 2008 Sep 19;134(6):1042-54.

Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalonde M. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 1989 Nov 16;342(6247):281-5.

Nicholls RD. Genomic imprinting and candidate genes in the Prader-Willi and Angelman syndromes. *Curr Opin Genet Dev.* 1993 Jun;3(3):445-56.

Odent T, Accadbled F, Koureas G, Cournot M, Moine A, Diene G, Molinas C, Pinto G, Tauber M, Gomes B, de Gauzy JS, Glorion C. Scoliosis in patients with Prader-Willi Syndrome. *Pediatrics.* 2008 Aug;122(2):e499-503.

Prader A, Labhart A, Willi H Ein Syndrome von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myatonieartigem Zustand in Neugebo renenalter. *Schweiz Med Wochenschr.* 1956: 1260-1261

Okamoto M, Südhof TC Mints, Munc18-interacting proteins in synaptic vesicle exocytosis. *J Biol Chem.* 1997 Dec 12;272(50):31459-64.

Rainier S, Chai JH, Tokarz D, Nicholls RD, Fink JK. NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6). *Am J Hum Genet.* 2003 Oct;73(4):967-71.

Reis A, Dittrich B, Greger V, Buiting K, Lalonde M, Gillessen-Kaesbach G, Anvret M, Horsthemke B. Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi syndromes. *Am J Hum Genet.* 1994 May;54(5):741-7.

Rosenfeld JA, Stephens LE, Coppinger J, Ballif BC, Hoo JJ, French BN, Banks VC, Smith WE, Manchester D, Tsai AC, Merrion K, Mendoza-Londono R, Dupuis L, Schultz R, Torchia B, Sahoo T, Bejjani B, Weaver DD, Shaffer LG. Deletions flanked by breakpoints 3 and 4 on 15q13 may contribute to abnormal phenotypes. *Eur J Hum Genet.* 2011 May;19(5):547-54.

Runte M, Hüttenhofer A, Gross S, Kiefmann M, Horsthemke B, Buiting K. The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet.* 2001 Nov 1;10(23):2687-700.

Sahoo T, del Gaudio D, German JR, Shinawi M, Peters SU, Person RE, Garnica A, Cheung SW, Beaudet AL. Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet.* 2008 Jun;40(6):719-21.

Schrander-Stumpel CT, Curfs LM, Sastrowijoto P, Cassidy SB, Schrander JJ, Fryns JP. Prader-Willi syndrome: causes of death in an international series of 27 cases. *Am J Med Genet A.* 2004 Feb 1;124A(4):333-8.

Smith A, Egan J, Ridley G, Haan E, Montgomery P, Williams K, Elliott E. Birth prevalence of Prader-Willi syndrome in Australia. *Arch Dis Child.* 2003 Mar;88(3):263-4.

Soni S, Whittington J, Holland AJ, Webb T, Maina E, Boer H, Clarke D. The course and outcome of psychiatric illness in people with Prader-Willi syndrome: implications for management and treatment. *J Intellect Disabil Res.* 2007 Jan;51(Pt 1):32-42.

State MW, Dykens EM, Rosner B, Martin A, King BH. Obsessive-compulsive symptoms in Prader-Willi and "Prader-Willi-Like" patients. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1999 Mar;38(3):329-34.

Varela MC, Kok F, Setian N, Kim CA, Koiffmann CP. Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on Prader-Willi syndrome phenotype: study of 75 patients. *Clin Genet.* 2005 Jan;67(1):47-52.

Vogels A, De Hert M, Descheemaeker MJ, Govers V, Devriendt K, Legius E, Prinzie P, Fryns JP. Psychotic disorders in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A.* 2004 Jun 15;127A(3):238-43.

Whittington JE, Holland AJ, Webb T, Butler J, Clarke D, Boer H. Population prevalence and estimated birth incidence and mortality rate for people with Prader-Willi syndrome in one UK Health Region. *J Med Genet.* 2001 Nov;38(11):792-8.

Whittington JE, Holland AJ. Prader-Willi syndrome: Development and manifestation. Cambridge: Cambridge University Press, 2004

Whittington J, Holland A, Webb T, Butler J, Clarke D, Boer H. Cognitive abilities and genotype in a population-based sample of people with Prader-Willi syndrome. *J Intellect Disabil Res.* 2004 Feb;48(Pt 2):172-87.

Whittington JE, Butler JV, Holland AJ. Pre-, peri- and postnatal complications in Prader-Willi syndrome in a UK sample. *Early Hum Dev.* 2008 May;84(5):331-6.

Veltman MW, Craig EE, Bolton PF. Autism spectrum disorders in Prader-Willi and Angelman syndromes: a systematic review. *Psychiatr Genet.* 2005 Dec;15(4):243-54. Review.

Vogels A, Van Den Ende J, Keymolen K, Mortier G, Devriendt K, Legius E, et al. Minimum prevalence, birth incidence and cause of death for Prader-Willi syndrome in Flanders. *Eur J Hum Genet* 2004;12:238-40.

Zhang Y, Wang YG, Zhang Q, Liu XJ, Liu X, Jiao L, Zhu W, Zhang ZH, Zhao XL, He C. Interaction of Mint2 with TrkA is involved in regulation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 2009 May 1;284(18):12469-79.

6. RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare la Prof.ssa Alessandra Renieri per aver contribuito in maniera decisiva alla mia crescita professionale.

Un ringraziamento speciale va alla dott.ssa Maria Antonietta Mencarelli per il suo supporto durante la stesura della tesi.

Un grazie sincero a tutto il gruppo con cui ho condiviso questo percorso per la disponibilità e la collaborazione.