



**UNIVERSITÀ
DI PAVIA**

**Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”
Corso di Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata
Scienze Biomediche Molecolari**

**Valutazione del danno al DNA nella sindrome di Cornelia de Lange mediante Comet
Assay: studio longitudinale e confronto con la sindrome di Kleefstra.**

Relatore:

Prof.ssa TRICARICO ROSSELLA

Correlatori:

Prof.ssa MASSA VALENTINA

Dott.ssa PARODI CHIARA

**Tesi sperimentale
di WASEF SARA
Matr. n. 537521**

INDICE

1. RIASSUNTO	4
2. INTRODUZIONE	6
2.1 CROMATINOPATIE	6
2.2 SINDROME DI KLEEFSTRA (KS): GENETICA, MANIFESTAZIONI CLINICHE E DIAGNOSI	8
2.3 SINDROME DI CORNELIA DE LANGE (CdLS): ORIGINI E MANIFESTAZIONI CLINICHE	12
2.4 DIAGNOSI DI CdLS	14
2.5 GENETICA DI CdLS: LA PIÙ COMUNE COESINOPATIA	17
2.6 GENI CAUSATIVI DI CdLS	21
2.6.1 NIPBL	21
2.6.2 SMC1A e SMC3	22
2.6.3 RAD21	23
2.6.4 HDAC8	23
2.6.5 BRD4	23
2.6.6 ANKRD11	23
2.7 RELAZIONE TRA IL COMPLESSO DELLE COESINE E IL PATHWAY CANONICO DI WNT	24
2.8 LITIO COME POSSIBILE STRATEGIA TERAPEUTICA IN CdLS	30
2.9 STRESS OSSIDATIVO COME FATTORE PREDISPONENTE AL DANNO AL DNA IN CdLS	33
3. SCOPO DELLO STUDIO	37
4. MATERIALI E METODI	39
4.1 PROGETTO CLoSER: ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI	39

4.2	COMET ASSAY: PRINCIPIO DELLA TECNICA E PREPARAZIONE DEI REGENTI.....	41
4.3	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E DEI VETRINI.....	42
4.4	FORMAZIONE DELLE COMETE AL MICROSCOPIO A FLUORESCENZA	44
4.5	ANALISI STATISTICA	45
5.	RISULTATI.....	46
5.1	LA PERCENTUALE DI DNA BREAKS INDICA UN DANNO AL DNA Più ELEVATO NEI PAZIENTI KS E UNA LIMITATA VARIAZIONE NEI PAZIENTI CDLS.....	46
5.2	L'ANALISI DELLA TAIL LENGHT CONFERMA UN'ELEVATA ETEROGENEITÀ DEL DANNO AL DNA.....	49
5.3	L'ANDAMENTO DEL TAIL MOMENT RISULTA ETEROGENEO NEI PAZIENTI CDLS	52
5.4	LA PERCENTUALE DI DNA NELLA CODA RIMANE GENERALMENTE ELEVATA E STABILE NEI PAZIENTI CDLS	55
6.	DISCUSSIONE	59
7.	CONCLUSIONI	64
8.	RINGRAZIAMENTI	67
9.	BIBLIOGRAFIA	69

1. RIASSUNTO

La sindrome di Cornelia de Lange (CdLS) è una rara sindrome genetica multisistemica causata principalmente da varianti patogenetiche nei geni del complesso delle coesine e dei suoi regolatori. Oltre alle caratteristiche dismorfiche e al ritardo dello sviluppo neurocognitivo, numerose evidenze indicano che nei pazienti CdLS sia presente una marcata instabilità genomica associata ad alterazioni della risposta al danno del DNA e a un aumento dello stress ossidativo

La sindrome di Kleeftstra (KS), anch'essa appartenente ai disturbi mendeliani del macchinario epigenetico, condivide diversi aspetti clinici con la CdLS, rendendo particolarmente interessante il confronto tra le due condizioni.

L'obiettivo del presente studio è valutare il danno al DNA in soggetti affetti da CdLS mediante Comet Assay, analizzarne l'andamento longitudinale nel tempo e confrontare i risultati ottenuti con quelli osservati in pazienti con KS e in controlli sani.

Lo studio è stato condotto su cellule di sangue periferico, sottoposte a Comet Assay in condizioni standardizzate, una tecnica di laboratorio nota anche come Single-cell Gel Electrophoresis (SCGE), altamente sensibile, semplice, rapida e versatile, motivo per cui è ampiamente utilizzata per la rilevazione del danno al DNA a livello della singola cellula.

I parametri di danno sono stati quantificati attraverso l'analisi della coda cometaria e confrontati tra i diversi gruppi sperimentali.

Nei pazienti CdLS è stata inoltre effettuata una valutazione longitudinale per verificare eventuali variazioni del danno genomico nel corso del follow-up.

I risultati evidenziano un aumento significativo del danno al DNA nei soggetti CdLS rispetto ai controlli sani, confermando la presenza di una condizione di instabilità genomica associata alla sindrome.

Il confronto con i pazienti KS mostra un profilo di danno differente, suggerendo che, pur appartenendo entrambe al gruppo delle cromatinopatie, le due patologie possano coinvolgere meccanismi distinti di mantenimento dell'integrità genomica.

L'analisi longitudinale indica che il livello di danno nei pazienti CdLS tende a mantenersi elevato nel tempo, supportando l'ipotesi di una persistente alterazione dei processi di risposta al danno del DNA.

Nel complesso, questo studio conferma l'utilità del Comet Assay come strumento sensibile per la valutazione dell'instabilità genomica nelle cromatinopatie e contribuisce a chiarire le differenze biologiche tra CdLS e KS. I dati ottenuti rafforzano il ruolo dello stress ossidativo e dei difetti di riparazione del DNA nella patogenesi della CdLS.

2. INTRODUZIONE

2.1 CROMATINOPATIE

Le cromatinopatie (CP) o disturbi mendeliani del macchinario epigenetico (MDEM) sono malattie genetiche rare causate da uno squilibrio nello stato della cromatina e della regolazione trascrizionale (Bjornsson HT., 2015).

Il termine “cromatinopatie” si riferisce a ogni disturbo dello sviluppo umano derivante da mutazioni germinali nei cosiddetti “epigeni” (Nava AA. e Arboleda VA., 2024), come la sindrome di Cornelia de Lange, la sindrome di Rubinstein-Taybi, associata ad alterazioni nei processi di acetilazione degli istoni, e la sindrome di Kleefstra, caratterizzata da difetti nella metilazione degli istoni. A queste si aggiunge il disturbo dello sviluppo intellettivo sindromico legato al cromosoma X correlato a *KDM5C*, in cui risultano compromessi i meccanismi di demetilazione degli istoni. Infine, la sindrome di Rett, la sindrome di Angelman e la sindrome di Prader-Willi condividono anomalie nei processi di metilazione del DNA (Avagliano L. et al., 2020).

Per quanto riguarda gli epigeni, essi codificano per le tre componenti enzimatiche del macchinario epigenomico (“*writer*”, “*eraser*” e “*remodeler*”) e per un gruppo non enzimatico (“*reader*”) (Fahrner J. e Bjornsson HT., 2019; Figura 1). Tuttavia, una classificazione più ampia ha incluso in questo macchinario anche chaperoni degli istoni, proteine scaffold, modificatori del DNA e dell’RNA, proteine del gruppo Polycomb e fattori di trascrizione. A queste si aggiungono numerose proteine cofattore specifiche per ciascuna delle categorie principali, coinvolte nel supporto funzionale delle componenti principali (Bukowska-Olech E. et al., 2024).

I recenti progressi nel sequenziamento di nuova generazione hanno permesso di associare 154 epigeni alle CP (Bukowska-Olech E. et al., 2024). In genere, questi geni responsabili dei meccanismi patogenetici delle CP non risultano mutati simultaneamente; tuttavia, ciascun gene, quando alterato, determina specifiche caratteristiche patologiche in relazione alla propria funzione e alle interazioni con altre vie biologiche. Inoltre, mutazioni in geni diversi, o varianti differenti all’interno dello stesso gene, possono dar luogo a quadri clinici con gradi di gravità variabili.

Un esempio di gene mutato è *AFF4* che codifica per una proteina scaffold che contribuisce all'organizzazione della cromatina ed è un componente chiave del complesso di super-allungamento (SEC), essenziale per la regolazione dell'espressione genica durante l'embriogenesi, per l'allungamento trascrizionale e l'attività della RNA polimerasi II (RNAP2) (Izumi K. et al., 2015).

Anche il fattore di trascrizione p300, codificato da *EP300*, interagisce con *RNAP2* ed è coinvolto nel rimodellamento della cromatina grazie alla sua attività di istone acetiltransferasi (Woods et al., 2014). Le mutazioni di *EP300* sono tipicamente associate alla sindrome di Rubinstein-Taybi, ma sono state ipotizzate correlazioni anche con i geni responsabili della sindrome di Cornelia de Lange (CdLS) (Van Gils J. et al., 2021; Scolnick et al., 1997; Wang et al., 2016).

Varianti patogeniche nel gene *ANKRD11* sono state inizialmente descritte nella sindrome di *KBG* (corrispondenti alle iniziali dei cognomi delle prime tre famiglie in cui questa condizione è stata descritta), ma mutazioni eterozigoti con perdita di funzione sono state riscontrate anche in condizioni con fenotipo simile alla CdLS.

Un'altra proteina coinvolta nella regolazione della cromatina è SETD5, le cui mutazioni sono associate a disabilità intellettiva, bassa statura, microcefalia, ipotonia e difetti cardiaci (Kuechler et al., 2015).

La regolazione epigenetica dipende inoltre dalle proteine della famiglia BET, ed in particolare da BRD4, una proteina che si lega a regioni super-enhancer, regolando il destino cellulare, motivo per cui essa risulta alterata in alcune CP.

Relativamente all'aspetto clinico, tali disturbi condividono la presenza di tipici dismorfismi facciali, un alterato sviluppo del SNC con conseguente deficit di apprendimento e memoria, anomalie cardiache, disabilità intellettiva, immunodeficienza, problemi gastrointestinali, uditivi e visivi, ed infine, in alcuni casi, anche predisposizione al cancro (Russell e Tan, 2024).

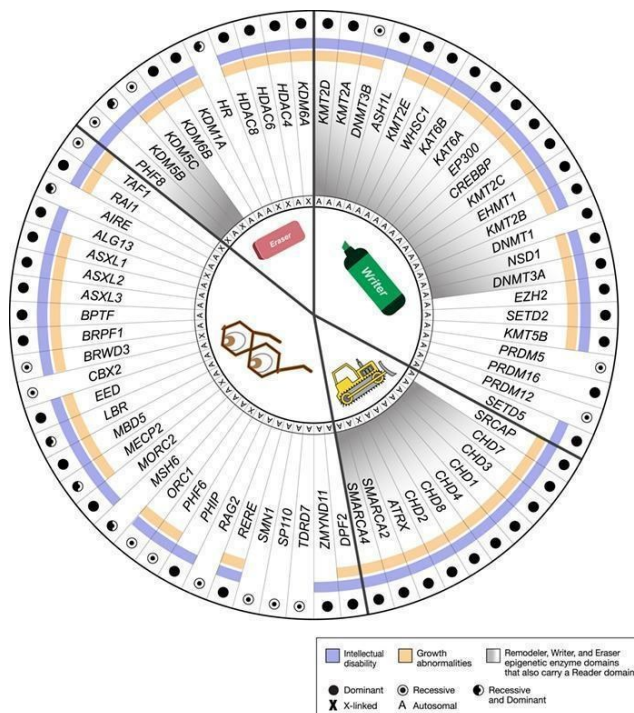


Figura 1. Epigeni. Settanta geni con domini epigenetici definiti, la maggior parte dei quali causa malattie allo stato eterozigote (cerchio pieno). I domini enzimatici “writer”, “eraser” e “remodeler” — risultano mutuamente esclusivi all’interno di uno stesso fattore, ma spesso coesistono con un dominio “reader”(ombreggiatura grigia). La disabilità intellettiva è osservata nella stragrande maggioranza (blu), così come le anomalie di crescita (arancione). “A” indica i geni sugli autosomi; “X” indica i geni sul cromosoma X (Fahrner J. e Bjornsson HT., 2019).

2.2 SINDROME DI KLEEFSTRA (KS): GENETICA, MANIFESTAZIONI CLINICHE E DIAGNOSI

Questo elaborato di tesi sarà incentrato sullo studio e sul confronto di due sindromi, la Sindrome di Kleefstra (KS) e la Sindrome di Cornelia de Lange (CdLS). La sindrome di Kleefstra è una rara malattia (a prevalenza incerta, sono stati identificati diverse centinaia di pazienti in tutto il mondo, ma è probabile che il numero reale sia maggiore grazie al crescente utilizzo del sequenziamento genetico) a trasmissione autosomica dominante causata nella maggior parte dei casi dalla perdita della funzione dell’enzima istone lisina

metiltransferasi 1 (*EHMT1*), in seguito a mutazioni puntiformi o microdelezioni nella regione subtelomerica del braccio lungo del cromosoma 9 (9q34.3).

Quasi tutti i casi di sindrome di Kleefstra descritti in letteratura sono dovuti a mutazioni *de novo*, cioè ad insorgenza spontanea durante la gametogenesi; solo raramente sono stati documentati casi di ricorrenza familiare, attribuibili alla presenza, in uno dei genitori, di una traslocazione cromosomica bilanciata che coinvolge la regione 9q34.3 oppure di un mosaicismo somatico associato a una delezione interstiziale della stessa regione. Inoltre, ad eccezione dei soggetti con mosaicismo somatico per la delezione di 9q34.3, non sono stati finora riportati individui affetti da sindrome di Kleefstra che abbiano raggiunto l'età riproduttiva (Kleefstra, T. et al., 1993).

Sebbene non sia nota alcuna correlazione genotipo-fenotipo, in generale i soggetti con una mutazione patogenetica intragenica di *EHMT1*, come una variante missenso, frameshift o nonsenso o con una piccola (< 1Mb) delezione di 9q34.3 presentano segni clinici simili, mentre il fenotipo dei pazienti con una delezione di 9q34.3 relativamente più ampia ($\geq$ 1Mb) sembra essere più grave, con una disabilità intellettiva più marcata e un maggior numero di comorbidità, proprio in relazione all'estensione della delezione o al coinvolgimento di altri geni dosaggio-dipendenti.

Più nello specifico, i sintomi clinici tipici sono una facies caratteristica che comprende brachi/microcefalia, ipoplasia medio-facciale, anomalie della forma delle sopracciglia, sinofria, labbro superiore con arco di cupido, e quello inferiore anteverso, lingua protrudente, dentizione primaria, naso corto con narici anteverse e prognatismo (Figura 2; Kleefstra T. et al., 2009). Con l'età, tutti questi tratti del viso diventano più grossolani.

Il peso alla nascita è normale, ma la metà dei bambini sviluppa obesità con la crescita. L'ipotonia infantile causa un ritardo motorio, ma la maggior parte dei bambini cammina in maniera indipendente all'età di 2 o 3 anni. Inoltre, in una percentuale considerevole di individui si osserva una compromissione anche della vista e dell'udito, come l'ipermetropia in giovane età.

Altri segni clinici includono tratti autistici, disabilità intellettiva moderata-grave e marcato ritardo del linguaggio espressivo con scarso sviluppo verbale, motivo per cui il linguaggio dei segni o l'uso di pittogrammi sono utili per molti individui affetti.

I pazienti possono presentare anche cardiopatie congenite, che rappresentano la principale causa di morte precoce nell'infanzia o nell'adolescenza, come comunicazione

interatriale, difetti del setto interventricolare, valvola aortica bicuspidale, stenosi della valvola polmonare), difetti dei genitali nei maschi (ipospadia, criptorchidismo, micropene), difetti renali (idronefrosi, insufficienza renale cronica, cisti renali, reflusso vescico-ureterale), epilessia, infezioni ricorrenti e costipazione grave (Ren R. et al., 2024).

Infine, nell'adolescenza/età adulta si può verificare una regressione funzionale che comporta l'insorgenza di problemi comportamentali, come scatti d'ira/emotivi, deficit di attenzione, automutilazione e gravi disturbi del sonno caratterizzati da frequenti risvegli notturni e mattutini, nonché un'eccessiva veglia diurna.

Questi disturbi del sonno negli adolescenti e nei giovani adulti affetti possono contribuire allo sviluppo di psicosi, per le quali è raccomandato un continuo monitoraggio. (Kleefstra T. et al., 1993; Aydin H. et al., 2022; Yoshida K. et al., 2023).



Figura 2. Tipici dismorfismi facciali nei pazienti affetti da KS (Kleefstra T. et al., 2009).

Per quanto riguarda la diagnosi della sindrome di Kleefstra, essa si basa sull'integrazione dei dati clinici e della conferma genetico-molecolare, necessaria per via dell'eterogeneità fenotipica di tale patologia.

Il sospetto diagnostico nasce generalmente dalla presenza del quadro clinico caratteristico già descritto, quindi comprendente ritardo globale dello sviluppo, disabilità intellettiva di grado variabile, marcata compromissione del linguaggio, ipotonia neonatale o infantile e peculiari caratteristiche dismorfiche del volto. A queste manifestazioni possono associarsi anomalie comportamentali, epilessia, cardiopatie

congenite, malformazioni renali e urogenitali, oltre a problematiche endocrine e metaboliche.

La conferma diagnostica si ottiene mediante l'identificazione di una variante patogena eterozigote del gene *EHMT1* oppure di una delezione della regione cromosomica 9q34.3 che coinvolga il gene stesso.

La scelta della metodica diagnostica dipende dal quadro clinico e dal sospetto iniziale. Nei pazienti con fenotipo compatibile è possibile ricorrere al sequenziamento del gene *EHMT1*, oggi frequentemente eseguito mediante pannelli multigenici dedicati ai disturbi del neurosviluppo oppure tramite sequenziamento dell'esoma (Whole Exome Sequencing, WES) o del genoma (Whole Genome Sequencing, WGS) (ACMG, Genetics in Medicine, 2021). L'introduzione delle tecniche di sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing, NGS) ha notevolmente migliorato la capacità diagnostica, permettendo di identificare la sindrome anche nei pazienti con presentazioni cliniche atipiche o incomplete.

Una diagnosi precoce rappresenta un elemento fondamentale non solo per impostare un adeguato percorso assistenziale multidisciplinare, ma anche per fornire un corretto counselling genetico alla famiglia, definire il rischio di ricorrenza, pianificare un follow-up clinico mirato nel corso della vita per l'attivazione tempestiva di interventi terapeutici e riabilitativi mirati, con l'obiettivo di migliorare la prognosi funzionale e la qualità di vita del paziente. (Aydin H. et al., 2022).

Qualora tali analisi non evidenzino varianti patogene è indicata la ricerca di alterazioni del numero di copie (copy number variants, CNV) mediante chromosomal microarray analysis (CMA), metodica di prima scelta per l'identificazione di microdelezioni e microduplicazioni genomiche. In casi selezionati possono essere impiegate anche tecniche come la Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) o l'ibridazione in situ fluorescente (FISH), utili per confermare specifiche delezioni o per lo studio dei familiari.

Dopo la conferma molecolare della diagnosi è essenziale effettuare una valutazione clinica completa, finalizzata a definire l'estensione del coinvolgimento multisistemico. Le raccomandazioni comprendono una visita neurologica con valutazione dello sviluppo neuropsicomotorio ed eventuale elettroencefalogramma nei pazienti con sospetta epilessia, una valutazione cardiologica con elettrocardiogramma ed ecocardiogramma,

un'ecografia renale per l'identificazione di anomalie dell'apparato urinario, una valutazione audiologica e oftalmologica, oltre al monitoraggio della crescita staturo-ponderale, dello stato nutrizionale e della funzionalità endocrina. È inoltre indicata una valutazione neuropsichiatrica infantile per individuare precocemente disturbi dello spettro autistico, deficit dell'attenzione, disturbi del sonno e alterazioni comportamentali, consentendo l'avvio tempestivo di programmi riabilitativi personalizzati (Haseley A., 2021).

Come per la sindrome di Cornelia de Lange, anche in questo caso è importante fare diagnosi differenziale con numerose sindromi genetiche associate a disabilità intellettiva, ritardo dello sviluppo e ipotonia, tra cui la sindrome di Pitt-Hopkins, la sindrome di Smith-Magenis, la sindrome di Koolen-de Vries, la sindrome di Mowat-Wilson e altre condizioni riconducibili ai cosiddetti "disordini epigenetici", caratterizzati da alterazioni di geni coinvolti nella regolazione della cromatina e dell'espressione genica. Per questo motivo, l'impiego di pannelli NGS dedicati ai disturbi del neurosviluppo rappresenta oggi un approccio diagnostico particolarmente efficace.

Infine, come già accennato, solo nei rari casi familiari correlati a traslocazioni cromosomiche bilanciate o a mosaicismo germinale o somatico in uno dei genitori, è raccomandato lo studio genetico dei genitori per stabilirne l'origine e definire il rischio di ricorrenza: nella maggior parte delle famiglie tale rischio risulta inferiore all'1%, ma può aumentare in presenza di mosaicismo germinale o di riarrangiamenti cromosomici parentali.

Inoltre, qualora la variante patogena familiare sia nota, è possibile offrire la diagnosi prenatale mediante villocentesi o amniocentesi, oppure ricorrere alla diagnosi genetica preimpianto (PGT-M) nell'ambito della procreazione medicalmente assistita. Sebbene tali situazioni siano poco frequenti, rappresentano un'importante opportunità di counselling riproduttivo per le famiglie interessate (Kleefstra T. et al., 1993).

2.3 SINDROME DI CORNELIA DE LANGE (CdLS): ORIGINI E MANIFESTAZIONI CLINICHE

La Sindrome di Cornelia de Lange è una rara patologia genetica multisistemica, la cui incidenza varia approssimativamente tra 1 caso ogni 10.000 e 30.000 nati vivi, anche se la reale prevalenza potrebbe essere sottostimata a causa della grande variabilità

fenotipica con cui la patologia si manifesta, ma anche per la rarità dei casi familiari e per la presenza di alterazioni cromosomiche anche in individui sani (Beratis NG. et al., 1971). Questa condizione è causata principalmente da mutazioni *de novo* autosomiche dominanti o legate al cromosoma X nei geni che codificano per i componenti del complesso delle coesine (Kline AD. et al., 2018).

Più precisamente, sono state descritte anche varianti patogenetiche in geni non appartenenti al complesso delle coesine con funzioni sovrapposte, associate alla CdLS (Parenti I., 2021). La CdLS deve il suo nome alla pediatra olandese Cornelia Catharina de Lange, che la descrisse per la prima volta nel 1933 quando studiò il caso clinico di due bambine originarie di Amsterdam e che erano accomunate da ritardo della crescita con microcefalia proporzionale, difficoltà di alimentazione e caratteristiche facciali peculiari, definite nel complesso come "Typus Degenerativus Amstelodamensis" (De Lange C., 1933).

Le principali manifestazioni cliniche degli individui affetti da questa patologia, con una gravità che va da relativamente lieve a grave, sono la presenza simultanea di dismorfismi facciali distintivi, quali sopracciglia arcuate con sinofridia, ciglia folte e lunghe, orecchie basse, mento poco sviluppato, labbro superiore sottile, palatoschisi, denti piccoli e distanziati e un naso piccolo, rivolto verso l'alto e con una punta leggermente triangolare (Deardorff MA. et al., 1993, 2007; Avagliano L. et al., 2017; Figura 3).

Un altro segno clinico comune è l'irsutismo, localizzato soprattutto a livello della fronte e della regione lombosacrale della schiena; mani e/o piedi piccoli, frequenti fratture ossee, ritardo della crescita pre e post-natale con conseguente basso peso corporeo. In particolare, quest'ultimo aspetto è spesso associato alla presenza di reflusso gastroesofageo presente nel 70-90% dei pazienti (Kline AD. et al., 2007; Macchini F. et al., 2010) e difficoltà di suzione/deglutizione che, in alcuni casi, possono rendere necessaria la nutrizione enterale tramite sondino nasogastrico o gastrostomo. La condizione di reflusso risulta inoltre associata a un aumento del rischio di infezioni polmonari gravi, che rappresentano una delle principali cause di mortalità nei soggetti affetti da CdLS (Schrier SA. et al., 2011). In aggiunta, è stato osservato che nella giovane età adulta il reflusso ha favorito l'insorgenza precoce di metaplasia della mucosa esofagea (esofago di Barrett), riscontrata in circa il 10% dei casi (Luzzani et al., 2003; Kline AD. et al., 2007; Macchini F. et al., 2018), che può ulteriormente evolvere verso

una trasformazione neoplastica, con sviluppo di adenocarcinoma esofageo (DuVall GA. e Walden DT., 1996).

Ciò nonostante, queste difficoltà sono solitamente transitorie poiché in età adulta la maggior parte dei pazienti acquisisce progressivamente la capacità di alimentarsi per via orale. Al contrario, il sovrappeso o l'obesità sono piuttosto comuni nei giovani adulti, spesso a causa di una dieta ipercalorica e di una scarsa attività fisica (Mariani M. et al., 2016).

Altri disturbi comunemente riscontrati nei pazienti con CdLS includono vari gradi di disabilità intellettiva, conseguenti ad un marcato ritardo nello sviluppo psicomotorio e cognitivo. Oltre agli aspetti strettamente genetici e clinici, la sindrome comporta anche importanti implicazioni sul piano neuropsicologico, educativo e sociale: infatti, gli individui affetti possono presentare diversi livelli di difficoltà comunicative, spesso associate a disturbi comportamentali come ansia, agitazione, iperattività, aggressività verso gli altri, autolesionismo o tratti dello spettro autistico. Di conseguenza, tale complessità clinica rende necessaria la gestione della patologia tramite un approccio multidisciplinare che coinvolga pediatri, genetisti, neurologi, psicologi, logopedisti ed educatori, con l'obiettivo di migliorare la qualità della vita dei pazienti e di supportare le famiglie nel percorso assistenziale.

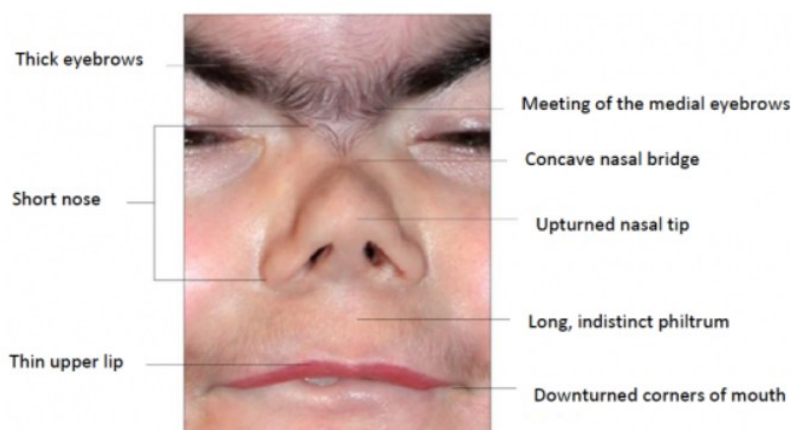


Figura 3. Tipici dismorfismi facciali nei pazienti affetti da CdLS (Kline AD. et al., 2018).

2.4 DIAGNOSI DI CdLS

Oltre alla grande variabilità fenotipica con cui la Sindrome di Cornelia de Lange si manifesta, la rarità dei casi familiari e la presenza di alterazioni cromosomiche anche in individui sani (Beratis NG. et al., 1971), un altro fattore che complica ulteriormente la diagnosi di CdLS è la sua sovrapposizione clinica con altre patologie caratterizzate anch'esse da disregolazione della cromatina, come la sindrome di Wiedemann-Steiner, la sindrome di Rubinstein-Taybi e la sindrome di Coffin-Siris (Avagliano L. et al., 2020). Nel 2018 un gruppo internazionale ha pubblicato una dichiarazione di consenso (Kline AD. et al., 2018), proponendo un algoritmo diagnostico (Tabella 1; Selicorni A. et al., 2021) basato sulla distinzione tra segni “cardinali” e “suggestivi”. A ciascuna caratteristica clinica viene assegnato un punteggio, e la somma totale consente di collocare il paziente all'interno dello spettro della sindrome, distinguendo tra forme classiche con o senza identificazione di una variante patogena in geni legati alla funzione delle coesine, e forme non classiche rappresentate invece da individui portatori di una variante patogena in geni associati alle coesine (Figura 4. Kline AD. et al., 2018).

In caso di assenza di conferma molecolare tramite test eseguiti su linfociti di sangue periferico, la diagnosi può essere clinica e spesso si tratta di un quadro di mosaicismo per CdLS. Per dimostrare questa situazione clinica, è indispensabile estendere l'analisi molecolare ad altri tessuti, come fibroblasti, cellule della mucosa buccale o cellule epiteliali della vescica.

Cardinal Features	Score
Synophrys (HP:0000664) and/or thick eyebrows (HP:0000574)	2
Short nose (HP:0003196), concave nasal ridge (HP:0011120) and/or upturned nasal tip (HP:0000463)	2
Long (HP:0000343) and/or smooth philtrum (HP:0000319)	2
Thin upper lip vermilion (HP:0000219) and/or downturned corners of mouth (HP:0002714)	2
Hand oligodactyly (HP:0001180) and/or adactyly (HP:0009776)	2
Congenital diaphragmatic hernia (HP:0000776)	2
Suggestive Features	
Global developmental delay (HP:0001263) and/or intellectual disability (HP:0001249)	1
Prenatal growth retardation (<2 SD) (HP:0001511)	1
Postnatal growth retardation (<2 SD) (HP:0008897)	1
Microcephaly (prenatally and/or postnatally) (HP:0000252)	1
Small hands (HP:0200055) and/or feet (HP:0001773)	1
Short fifth finger (HP:0009237)	1
Hirsutism (HP:0001007)	1
Interpretation of the Score	
Score ≥11 points, of which at least 3 are cardinal features	classic CdLS
Score between 9 or 10 points, of which at least 2 are cardinal features	non-classic CdLS
Score between 4–8 points, of which at least 1 is cardinal feature	molecular testing for CdLS indicated
Score <4 points	insufficient to indicate molecular testing for CdLS

TABELLA 1. Algoritmo diagnostico proposto dalla Dichiarazione di Consenso (Selicorni A. et al., 2021).

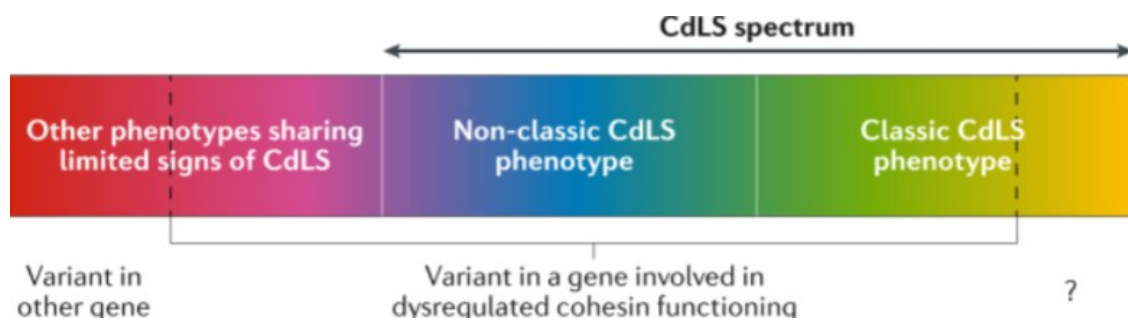


Figura 4. Lo spettro della sindrome di Cornelia de Lange comprende individui con fenotipo classico e/o non classico, mentre si osserva come gli individui che presentano una presunta variante patogenetica in un gene rilevante per la funzione delle coesine, ma poca o nessuna somiglianza col fenotipo classico, non rientrano nello spettro di CdLS. Infine, il punto interrogativo nell'immagine indica geni attualmente sconosciuti, la cui esistenza non può essere esclusa (Kline AD. et al., 2018).

Indipendentemente dal fenotipo, è bene specificare che nella maggior parte dei casi la diagnosi di CdLS viene posta alla nascita perché solo nel 30% dei casi si è potuto formulare un sospetto diagnostico di CdLS già durante il periodo prenatale (Pajkrt E. et al., 2010) in madri la cui età non rappresentava un fattore di rischio per l'insorgenza della sindrome (Opitz JM., 1985), fatta eccezione per le forme associate al cromosoma X. Le principali anomalie che si possono osservare ecograficamente sono un aumento della translucenza nucale in circa il 51% dei casi (Sekimoto H. et al., 2000; Figura 5), ritardo di crescita intrauterino, malformazioni degli arti superiori osservabili in circa il 66% dei feti, ernia diaframmatica, cardiopatie congenite e il tipico profilo facciale (Marino B. et al., 2002; Pajkrt E. et al., 2010).



Figura 5. Neonato affetto da CdLS con malformazioni degli arti superiori, rilevabili già ecograficamente a 35 settimane di gestazione come presenza di omero corto e totale assenza dell'avambraccio (Sekimoto H. et al., 2000).

Oltre all'esame ecografico, alcuni studi hanno evidenziato livelli ridotti di PAPP-A nel sangue di alcune madri con feti affetti da CdLS (Westergaard et al., 1983; Aitken et al., 1999; Arbuzova S. et al., 2003; Chong K. et al., 2009; Avagliano L. et al., 2017). Al contrario, i test di screening non invasivi basati sul DNA fetale libero circolante, pur includendo geni associati alla sindrome, non trovano attualmente applicazioni nella pratica clinica a causa della complessità interpretativa dei risultati molecolari (Avagliano et al., 2017). Infine, ulteriori osservazioni hanno evidenziato l'assenza di fattori predisponenti evidenti, quali età della madre, consanguineità parentale o una maggiore incidenza in specifiche popolazioni/etnie. A tal proposito, si può affermare che la significativa variabilità fenotipica osservata tra i pazienti rifletta anche un'elevata

eterogeneità genetica, inquadrando la sindrome come un vero e proprio spettro, poiché può essere causata da mutazioni diverse, localizzate sia nello stesso gene sia in geni distinti (Allanson JE. et al., 1997; Russell KL. et al., 2001).

2.5 GENETICA DI CdLS: LA PIÙ COMUNE COESINOPATIA

Sebbene ad oggi molti dei pazienti affetti da CdLS non abbia ancora una diagnosi a causa dell'ampia variabilità genetica, i progressi della genetica molecolare hanno permesso di chiarire i meccanismi patogenetici della sindrome, classificandola come la più comune coesinopatia" (sottofamiglia delle cromatinopatie) in quanto i sette geni causativi finora identificati codificano tutti per componenti strutturali o proteine regolatrici del complesso delle coesine.

Tale complesso è un sistema proteico multimerico appartenente alla famiglia delle proteine responsabili del mantenimento strutturale dei cromosomi (SMC) che forma sul DNA un anello costituito da quattro subunità *core*: SMC1A, SMC3, RAD21 (nota anche come SCC1), STAG (STAG1 e STAG2) e altre proteine, quali NIPBL, PDS5, WAPL, HDAC8 ed ESCO, che ne regolano finemente l'attività (Figura 6, Kline AD. et al., 2018). Più nello specifico, le proteine SMC1 e SMC3 formano un eterodimero caratterizzato da lunghi domini a coiled-coil uniti da una regione centrale detta "cerniera" (hinge). Le estremità ATPasiche delle due proteine sono collegate dalla subunità RAD21, mentre STAG stabilizza l'intero complesso e ne modula le interazioni con numerosi fattori regolatori. Questa organizzazione genera una struttura ad anello capace di intrappolare topologicamente il DNA (Nasmyth K. e Haering CH., 2009).

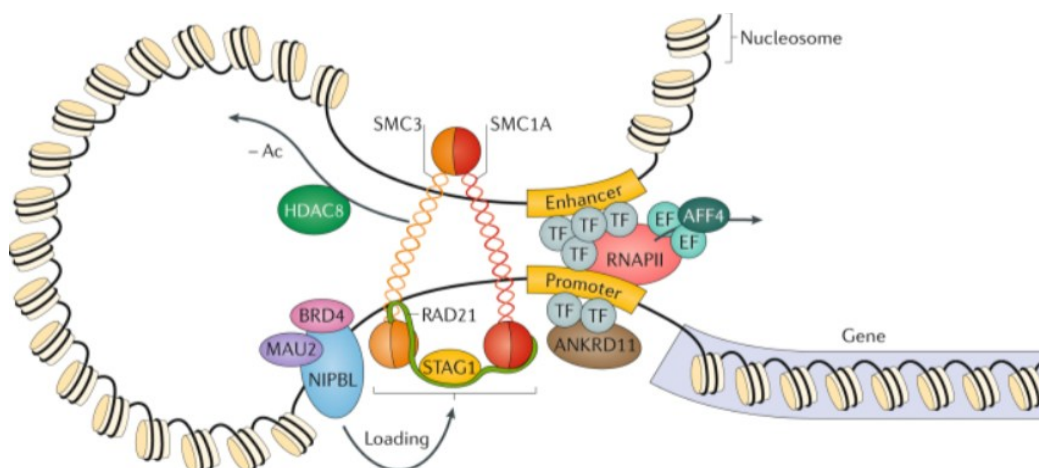


Figura 6. Complesso delle coesine e ciclo cellulare: tale complesso viene caricato sui cromosomi prima della replicazione del DNA (più precisamente in fase G1 nei lieviti o alla fine della telofase del ciclo cellulare precedente nelle cellule di mammifero) da NIPBL in associazione col suo partner molecolare MAU2. Tuttavia, la semplice associazione delle coesine al DNA non è sufficiente a garantire la coesione tra i cromatidi fratelli. Durante la fase S, infatti, il complesso viene stabilizzato attraverso l'acetilazione dei residui di lisina di SMC3 da parte delle acetiltrasferasi ESCO1 e ESCO2. Questa modificazione impedisce il rilascio prematuro delle coesine mediato da WAPL, consentendo l'instaurarsi di una coesione stabile tra le due molecole di DNA appena replicate. PDS5 può rafforzarne la coesione. Infine, l'istone deacetilasi HDAC8 rimuove i gruppi acetile dai residui di lisina nelle code N-terminali degli istoni (H2A, H2B, H3 e H4) della proteina SMC3, permettendo così il riciclo delle coesine durante il ciclo cellulare (Kline AD. et al., 2018).

Funzionalmente, tale complesso, conservato evolutivamente dagli organismi procarioti a quelli eucarioti, è stato descritto per la prima volta per il suo ruolo canonico fondamentale nella coesione dei cromatidi fratelli, importante per la corretta segregazione dei cromosomi durante la divisione cellulare (Chien R. et al., 2011).

Entrando più nel dettaglio, grazie all'interazione con le aderine e con l'aiuto dei fattori aggiuntivi, le coesine si assemblano in modo da formare una struttura chiusa a forma di anello sui filamenti di DNA prima della replicazione, quindi durante l'interfase, con una spaziatura di circa 5–10 kb, senza andare ad ostacolare l'apparato replicativo, motivo per cui dopo la fase "S" del ciclo cellulare, i due cromatidi fratelli risultano fisicamente associati tramite il legame intermolecolare operato dalle coesine.

Durante la mitosi, le coesine vengono progressivamente rimosse secondo un processo altamente regolato: nella profase la maggior parte delle coesine localizzate lungo i bracci cromosomici viene rimossa attraverso il cosiddetto "prophase pathway", che coinvolge WAPL e la fosforilazione di specifiche subunità del complesso; invece, le coesine localizzate a livello dei centromeri rimangono protette dalla proteina Shugoshin (SGO1), che recluta la fosfatasi PP2A impedendone la rimozione precoce.

Solo al passaggio metafase-anafase, l'attivazione del complesso APC/C determina la degradazione della securina e la conseguente attivazione della separasi, una proteasi che

cliva RAD21. La rottura dell'anello delle coesine permette la separazione dei cromatidi fratelli e la loro migrazione verso i poli opposti della cellula (Golov AK. e Gavrilov AA., 2024, Nasmyth K. e Haering CH., 2009).

Il secondo ruolo canonico delle coesine consiste nel contribuire a riparare il DNA danneggiato tramite ricombinazione omologa: ad esempio, in presenza di rotture a doppio filamento del DNA, esse reprimono la trascrizione nella cromatina (Sarogni P. et al., 2020), favorendo la corretta attivazione dei checkpoints del ciclo cellulare con l'obiettivo di ritardare la progressione del ciclo cellulare fino al ripristino dell'integrità del genoma (Callegari AJ. e Kelly TJ., 2007).

Il corretto funzionamento delle coesine è indispensabile per garantire la fedeltà della segregazione cromosomica. Alterazioni nella formazione, nel mantenimento o nella rimozione della coesione determinano errori di segregazione, instabilità genomica e accumulo di danni al DNA.

Sebbene oggi sia noto che le coesine svolgano anche importanti funzioni nella riparazione del DNA, nella regolazione trascrizionale e nell'organizzazione tridimensionale del genoma mediante il meccanismo di loop extrusion, il mantenimento della coesione tra cromatidi fratelli rappresenta la loro funzione biologica primaria e storicamente meglio caratterizzata. Questa attività costituisce il presupposto essenziale affinché ogni cellula figlia riceva una copia completa e identica del patrimonio genetico durante la divisione cellulare (Dorsett D. e Ström L., 2012).

Tuttavia, oltre alla loro funzione canonica nel mantenimento della coesione tra cromatidi fratelli, è stato ampiamente dimostrato che le coesine svolgono anche un ruolo non canonico come regolatori chiave dell'organizzazione tridimensionale della cromatina e dell'espressione genica sia nelle cellule proliferanti sia in quelle post-mitotiche poiché le coesine sono risultate altamente espresse anche in tessuti non in divisione, come il SNC.

Tutte queste funzioni sono indipendenti dalla segregazione cromosomica e risultano essenziali per il corretto mantenimento dell'omeostasi cellulare e per i programmi di differenziamento e sviluppo. In particolare, il complesso delle coesine agisce come un regolatore dinamico dell'architettura della cromatina attraverso il meccanismo della loop extrusion, un processo ATP-dipendente mediante il quale il complesso trasloca lungo il DNA formando anse (loops) che consentono di avvicinare regioni genomiche distanti tra

loro. Tale attività contribuisce alla formazione dei Topologically Associating Domains (TADs) e favorisce il contatto tra enhancer e promotori, modulando l'attivazione o la repressione della trascrizione genica (Davidson IF. e Peters JM., 2021).

Il processo di estrusione viene regolato principalmente dalla proteina CTCF, che agisce come barriera fisica arrestando la progressione delle coesine in corrispondenza di specifici siti di legame orientati in maniera convergente, stabilizzando così i domini cromatinici e preservando una corretta organizzazione del genoma (Van Ruiten MS. e Rowland BS., 2021).

L'attività architetturale delle coesine influenza direttamente l'espressione di numerosi geni coinvolti nella proliferazione, nel differenziamento cellulare e nello sviluppo embrionale.

La perdita o la riduzione della funzione del complesso altera, infatti, l'interazione tra elementi regolatori distali e promotori, determinando modificazioni trascrizionali spesso specifiche del tipo cellulare. È stato inoltre dimostrato che le coesine interagiscono con diversi regolatori epigenetici e fattori trascrizionali, contribuendo al mantenimento dell'identità cellulare e alla risposta a stimoli fisiologici e patologici. Sebbene il modello della loop extrusion rappresenti oggi il principale meccanismo attraverso cui vengono spiegate queste funzioni, numerose evidenze indicano che la regolazione trascrizionale esercitata dalle coesine dipende anche da interazioni locali con il macchinario trascrizionale e con complessi rimodellatori della cromatina, suggerendo un controllo multilivello dell'espressione genica (Arnould C., 2021).

Un ulteriore ruolo non canonico delle coesine riguarda il mantenimento della stabilità genomica durante la risposta al danno del DNA. In seguito alla formazione di rotture a doppio filamento (double-strand breaks, DSB), il complesso viene rapidamente reclutato nei siti di rottura, dove favorisce l'allineamento delle sequenze omologhe e facilita la riparazione mediante ricombinazione omologa. Inoltre, tale complesso contribuisce alla stabilizzazione delle forcelle di replicazione sottoposte a stress replicativo e coordina il reclutamento di numerosi fattori coinvolti nella DNA Damage Response (DDR). Alterazioni di questi meccanismi compromettono l'integrità del genoma e favoriscono l'accumulo di mutazioni, rappresentando uno dei principali eventi associati all'insorgenza di neoplasie e di diverse malattie dello sviluppo, note collettivamente come coesinopatie (Dorsett D. e Ström L., 2012).

Nel complesso, le evidenze attuali identificano il complesso delle coesine non soltanto come un regolatore della segregazione cromosomica, ma come un elemento chiave dell'organizzazione funzionale del genoma, capace di integrare struttura della cromatina, controllo trascrizionale e risposta al danno del DNA in un'unica rete di regolazione cellulare (Remeseiro S. e Losada A., 2013; Chien R., 2011).

2.6 GENI CAUSATIVI DI CdLS

La prima ipotesi relativa all'eziologia genetica della CdLS fu proposta da Opitz in una lettera all'editore pubblicata su *Lancet* nel 1964, nella quale veniva suggerita una modalità di trasmissione autosomica recessiva (Opitz JM. et al., 1964), oggi smentita perché la maggior parte delle mutazioni ha ereditarietà autosomica dominante, supportata dal fatto che circa il 99% dei casi descritti in letteratura si presenta in forma sporadica.

Nel 1978, Wilson e collaboratori descrissero una marcata somiglianza fenotipica tra la CdLS e la sindrome da duplicazione del braccio lungo del cromosoma 3 (3q), ipotizzando che una forma di aneuploidia parziale potesse rappresentare un possibile meccanismo eziopatogenetico (Wilson GN. et al., 1974), anche se un'analisi clinica più approfondita evidenziò discrepanze significative rispetto al fenotipo classico della CdLS.

Successivamente, Tonkin ET. et al. (2004) analizzando il punto di rottura di una traslocazione cromosomica t(5;13)(p13.1; q12.1) in un paziente con fenotipo tipico, individuarono il primo gene causativo, *NIPBL*, mentre Krantz ID. et al. (2004) giunsero alla stessa conclusione attraverso studi di linkage genomico condotti in famiglie con più individui affetti.

In un secondo tempo, nel 2006, è stato identificato il secondo gene causativo, *SMC1A*, responsabile di circa il 5% dei casi e associato a un fenotipo generalmente più lieve rispetto a quello osservato nei pazienti con mutazioni in *NIPBL* (Musio A. et al., 2006).

Nel 2007, ulteriori evidenze hanno implicato anche il gene *SMC3*, ed infine, con le tecniche di sequenziamento di nuova generazione nel 2018 sono stati scoperti altri quattro geni causativi in individui con fenotipo non classico, quali *RAD21*, *HDAC8*, *ANKRD11*, *BRD4*, confermando così ancora una volta l'enorme eterogeneità genetica che porta gli studiosi a descrivere questa sindrome come un vero e proprio spettro. Infine,

circa il 15-20% degli individui con fenotipo CdLS classico è caratterizzato da mosaicismi soprattutto in *NIPBL*, considerato uno dei fattori alla base della notevole variabilità di espressione clinica della condizione.

2.6.1 *NIPBL*

NIPBL (“Nipped-B-Like Prot”) codifica per una proteina di grandi dimensioni (2500 aa) appartenente alla famiglia delle aderine, denominata delangina, omologa al prodotto del gene *Nipped-B* presente in *Drosophila melanogaster*.

Esso è il gene più frequentemente mutato nei pazienti con CdLS; infatti, in circa il 70% dei casi è possibile individuare una variante patogenetica, di cui circa il 3% è rappresentata da microdelezioni o delezioni intrageniche, oltre a un numero significativo di varianti a mosaico in individui con fenotipo classico.

Nelle cellule umane e murine sono presenti due principali isoforme generate tramite splicing alternativo, che differiscono nella porzione C-terminale ricca di ripetizioni HEAT organizzate in una struttura ricurva a forma di uncino, mentre la regione N-terminale di *NIPBL* è in gran parte non strutturata.

Il suo partner funzionale, *MAU2*, presenta una struttura prevalentemente elicoidale costituita da molteplici ripetizioni tetratricopeptidiche (TPR) e interagisce con l'estremità N-terminale di *NIPBL* per formare un eterodimero fondamentale per il caricamento del complesso delle coesine sulla cromatina.

Studi condotti in diversi organismi modello hanno dimostrato che *MAU2* svolge anche un ruolo protettivo nei confronti di *NIPBL*, prevenendone la degradazione (Alonso-Gil D. e Losada A., 2023).

2.6.2 *SMC1A* e *SMC3*

Le proteine *SMC1A* (Structural Maintenance of Chromosomes protein 1A) e *SMC3* (Structural Maintenance of Chromosomes protein 3) sono componenti fondamentali del complesso delle coesine.

Le mutazioni nel gene *SMC1A* sono spesso eterozigoti di tipo missenso o inserzioni/delezioni in frame e determinano generalmente un quadro clinico più lieve, con minori anomalie strutturali rispetto ai soggetti con mutazioni in *NIPBL*, anche se rimane costante la presenza di un certo grado di deficit cognitivo, suggerendo un ruolo

fondamentale di *SMC1A* nello sviluppo cerebrale embrionale. È inoltre noto che *SMC1A* è soggetto a inattivazione del cromosoma X, infatti, in alcuni casi le femmine risultano meno gravemente colpite rispetto ai maschi (Deardorff MA. et al., 2007; Rohatgi S. et al., 2010, Sarogni P. et al., 2019, Figura 7).

Invece, per quanto riguarda il gene *SMC3*, sono state identificate mutazioni in circa il 2% dei pazienti con CdLS, che sono prevalentemente di tipo missenso, sebbene siano state individuate anche mutazioni nonsenso.

Infine, mutazioni in *SMC3* sono state identificate anche in pazienti con caratteristiche cliniche sovrapponibili alla CdLS, come disabilità intellettiva, bassa statura e anomalie congenite, ma che non soddisfano pienamente i criteri diagnostici della forma classica o non classica della sindrome (Sarogni P. et al., 2019, Figura 7).

2.6.3 *RAD21*

Ad oggi sono stati descritti solo circa 23 pazienti con varianti in *RAD21*, indicando che tali mutazioni rappresentano meno dell'1% dei casi di CdLS.

Le alterazioni identificate includono delezioni eterozigoti e mutazioni missenso, con effetti dominanti negativi o perdita di funzione.

Il numero limitato di casi non consente ancora di definire in modo preciso una correlazione genotipo-fenotipo, sebbene sia evidente che i pazienti portatori di varianti patogeniche in questo gene mostrino generalmente una forma non classica della sindrome, con un quadro clinico ancora più lieve rispetto a quelli con mutazioni in *SMC1A* (Deardorff MA. et al., 2012).

2.6.4 *HDAC8*

Invece, per quanto riguarda *HDAC8* sono stati identificati diversi individui portatori di varianti patogenetiche, che rappresentano circa il 5% dei casi (Sarogni P. et al., 2019, Figura 7).

È interessante notare che nonostante *HDAC8* sia localizzato sul cromosoma X, a differenza di *SMC1A*, può sfuggire ai meccanismi di inattivazione. Di conseguenza, anche le femmine portatrici di varianti patogenetiche in questo gene possono manifestare il fenotipo, con anomalie dello sviluppo che possono interessare arti, vertebre ed estremità, oltre a possibili difetti di accrescimento o sottosviluppo.

2.6.5 *BRD4*

Altro gene è *BRD4*, associato per la prima volta all'eziologia di CdLS quando venne individuata una delezione de novo in un paziente con un fenotipo non classico di questa sindrome che causa una ridotta capacità di interazione della proteina codificata da questo gene con gli istoni acetilati di *NIPBL*, con conseguente sequestro di quest'ultima.

2.6.6 *ANKRD11*

Infine, l'ultimo gene causativo di CdLS è *ANKRD11* (Ankyrin Repeat Domain) di cui sono state descritte solo cinque varianti spontanee in pazienti con fenotipo non classico perché le mutazioni in questo gene sono più comunemente associate a un'altra rara patologia genetica, la sindrome di *KBG*, il cui nome deriva dalle iniziali delle prime tre famiglie descritte nel 1975 e che mostra una parziale sovrapposizione con CdLS: infatti, i pazienti presentano frequentemente bassa statura, anomalie dello sviluppo di arti, vertebre ed estremità e, nella maggior parte dei casi, un certo grado di ritardo dello sviluppo o disabilità intellettiva (Parenti I. et al., 2021; Liu J. et al., 2025).

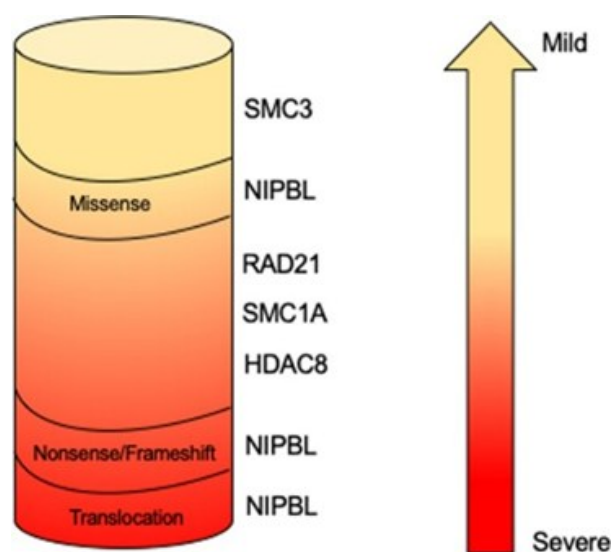


Figura 7. Correlazione genotipo–fenotipo nella sindrome di Cornelia de Lange (Sarogni P. et al., 2019). Le varianti patogenetiche troncanti di *NIPBL* determinano un fenotipo più severo, mentre le mutazioni missenso e le delezioni in frame nei geni *HDAC8*, *NIPBL*, *RAD21*, *SMC1A* e *SMC3* sono associate a un fenotipo più lieve.

2.7 RELAZIONE TRA IL COMPLESSO DELLE COESINE E IL PATHWAY CANONICO DI WNT

Nei modelli CdLS, con mutazioni nei geni che codificano per le proteine del complesso delle coesine, è stata osservata una down-regolazione della via canonica del pathway di WNT perché è stata evidenziata una ridotta espressione di uno dei suoi target molecolari, ossia la ciclina D1 (CCND1) (Fazio G. et al., 2016). Poiché questa via di segnalazione intracellulare è coinvolta in tutte le fasi dello sviluppo del sistema nervoso centrale ed è fondamentale, in particolare, per lo sviluppo del rombencefalo, è plausibile che la sua disfunzione nella CdLS contribuisca probabilmente al ritardo neurocognitivo, ai difetti di differenziazione neuronale e ai disturbi comportamentali riscontrati nei pazienti.

Il pathway di WNT si articola in due vie principali, quella canonica e quella non canonica, la quale comprende a sua volta sia il pathway *PCP* (*Planar Cell Polarity*), che regola l'organizzazione del citoscheletro e quindi la forma cellulare, sia la via del calcio, che controlla le concentrazioni intracellulari di calcio.

È bene specificare che nella Sindrome di Cornelia de Lange è la prima via, quella canonica, ad essere perturbata in quanto è stato dimostrato che essa svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi dei tessuti, regolando la proliferazione, il differenziamento, la migrazione cellulare e lo sviluppo del SNC (Avagliano L. et al., 2017).

Entrando più nel dettaglio del pathway canonico, la famiglia WNT comprende 19 glicoproteine secrete nell'uomo, caratterizzate da specifiche modificazioni post-traduzionali, tra cui la palmitoleazione catalizzata dall'enzima Porcupine, indispensabile per la loro secrezione e per il legame con i recettori cellulari. Dopo la sintesi nel reticolo endoplasmatico, le proteine WNT vengono trasportate alla membrana plasmatica grazie alla proteina Wntless (WLS/GPR177), che ne consente il rilascio nello spazio extracellulare. Questi passaggi rappresentano un importante punto di regolazione della via di segnalazione e costituiscono oggi uno dei principali bersagli terapeutici per l'inibizione del pathway WNT in ambito oncologico (Clevers H. e Nusse R., 2012) (Willert K. e Nusse R., 2012).

La caratteristica distintiva del pathway canonico è la regolazione della stabilità della β -catenina, una proteina dotata di una duplice funzione biologica. Oltre a partecipare alle giunzioni aderenti attraverso l'interazione con E-caderina, la β -catenina agisce come co-

attivatore trascrizionale nel nucleo, controllando l'espressione di numerosi geni coinvolti nella crescita e nella proliferazione cellulare.

La disponibilità intracellulare della β -catenina rappresenta pertanto il principale elemento regolatore dell'intera via di segnalazione. In assenza del ligando WNT (stato "WNT OFF", Figura 8A), la concentrazione citoplasmatica della β -catenina viene mantenuta a livelli estremamente bassi grazie all'azione del cosiddetto destruction complex, costituito principalmente dalle proteine Axin, APC (Adenomatous Polyposis Coli), GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β) e CK1 α (Casein Kinase 1 α). All'interno di questo complesso, CK1 α avvia la fosforilazione della β -catenina, seguita dall'azione di GSK3 β che completa la fosforilazione di specifici residui amminoacidici presenti all'estremità N-terminale della proteina; la β -catenina fosforilata viene quindi riconosciuta dalla ubiquitina ligasi β -TrCP, ubiquitinata e successivamente degradata dal proteasoma.

Di conseguenza, la sua concentrazione nel citoplasma rimane insufficiente per consentirne il trasporto nel nucleo. In queste condizioni, i fattori di trascrizione della famiglia TCF/LEF rimangono associati a proteine corepressorie, come Groucho/TLE, determinando il silenziamento dei geni bersaglio della via WNT (Niehrs C., 2012)

L'attivazione del pathway ("WNT ON", Figura 8B) (de Jaime-Soguero et al., 2018)) si verifica quando un ligando WNT si lega contemporaneamente ai recettori Frizzled (FZD) e al co-recettore LRP5 o LRP6 presenti sulla membrana cellulare. Tale interazione induce il reclutamento della proteina citoplasmatica Dishevelled (DVL), che promuove la fosforilazione del dominio intracitoplasmatico di LRP5/6 e il conseguente reclutamento di Axin alla membrana. Questo evento determina la disgregazione funzionale del destruction complex e impedisce la fosforilazione della β -catenina. La proteina sfugge quindi alla degradazione proteasomiale, si accumula progressivamente nel citoplasma e successivamente trasloca nel nucleo. Una volta raggiunto il nucleo, la β -catenina si lega ai fattori di trascrizione TCF/LEF sostituendo i complessi repressori e reclutando numerosi co-attivatori della trascrizione di numerosi geni coinvolti nella proliferazione, nella sopravvivenza cellulare, nella progressione del ciclo cellulare e nel mantenimento delle proprietà staminali.

Tra i principali geni bersaglio figurano *MYC*, che favorisce la crescita cellulare; *CCND1*, codificante per la ciclina D1, coinvolta nella progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare; *LGR5*, considerato uno dei più importanti marcatori delle cellule

staminali adulte; *CD44*, implicato nell'adesione e nella migrazione cellulare; e *AXIN2*, che svolge un ruolo di feedback negativo ricostituendo progressivamente il destruction complex e limitando l'intensità della risposta al segnale (Clevers H. e Nusse R., 2012).

La trasduzione del segnale WNT è ulteriormente modulata da numerosi regolatori extracellulari. Tra questi, le proteine della famiglia Dickkopf (DKK), in particolare DKK1, inibiscono la segnalazione legandosi al co-recettore LRP5/6 e impedendo la formazione del complesso recettoriale.

Analogamente, le secreted Frizzled-related proteins (sFRPs) sequestrano direttamente i ligandi WNT nello spazio extracellulare, limitandone la disponibilità. Al contrario, le proteine R-spondin potenziano la segnalazione WNT attraverso il legame con i recettori LGR4, LGR5 e LGR6, inattivando le ubiquitina ligasi transmembrana RNF43 e ZNRF3, normalmente responsabili della degradazione dei recettori Frizzled. Questo meccanismo determina un aumento della densità dei recettori sulla membrana cellulare e amplifica la sensibilità della cellula ai ligandi WNT (Schuijers J. e Clevers H., 2012)

Dal punto di vista fisiologico, il pathway WNT/ β -catenina svolge un ruolo fondamentale durante tutte le fasi dello sviluppo embrionale: per esempio, contribuisce alla definizione dell'asse corporeo, alla gastrulazione, allo sviluppo del sistema nervoso centrale, alla formazione degli arti, dell'apparato cardiovascolare e di numerosi altri organi.

Nell'organismo adulto, la segnalazione WNT mantiene l'omeostasi dei tessuti caratterizzati da un elevato turnover cellulare, quali l'epitelio intestinale, il follicolo pilifero, la cute e il compartimento ematopoietico. In particolare, nel criptocolo intestinale il gradiente di attivazione del pathway WNT è essenziale per preservare la popolazione di cellule staminali LGR5-positive, responsabili del continuo rinnovamento dell'epitelio intestinale (Anastas JN. e Moon RT., 2013).

L'alterazione della segnalazione WNT costituisce uno dei principali eventi molecolari coinvolti nella tumorigenesi: più nello specifico, l'attivazione persistente della β -catenina induce un'aumentata proliferazione cellulare, inibisce l'apoptosi, favorisce la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), aumenta le capacità invasive e contribuisce al mantenimento delle cellule staminali tumorali, promuovendo progressione, metastatizzazione e resistenza ai trattamenti farmacologici. Per tali motivi, negli ultimi

anni il pathway WNT è diventato uno dei principali bersagli della ricerca traslazionale (Anastas JN. e Moon RT., 2013).

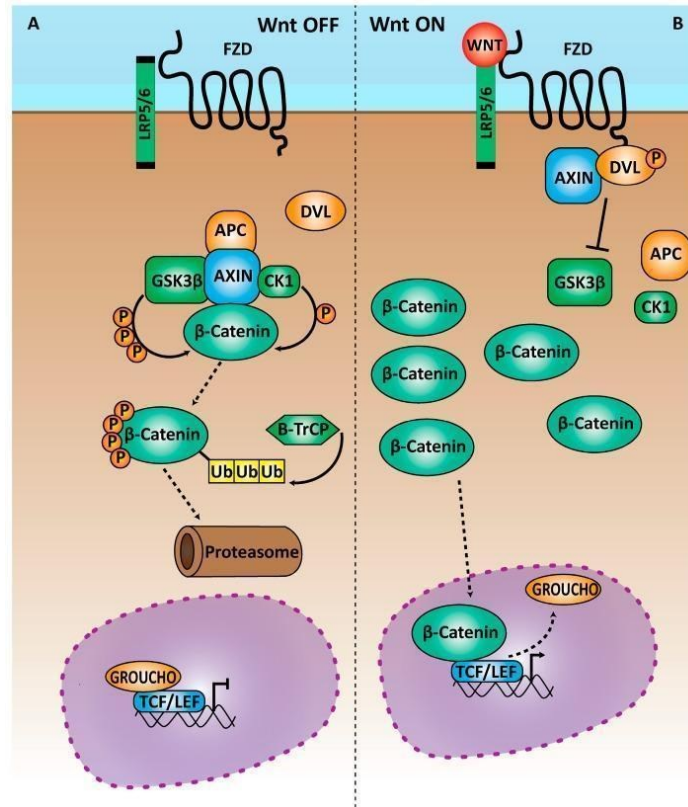


Figura 8. Via canonica del pathway di WNT in assenza (A) e in presenza (B) del ligando del recettore FZD (de Jaime-Soguero et al., 2018).

Oltre al pathway canonico β -catenina-dipendente, la famiglia delle proteine WNT è in grado di attivare una serie di vie di segnalazione alternative, collettivamente definite vie non canoniche di WNT. Queste vie sono caratterizzate dal fatto che la loro attivazione avviene indipendentemente dall'accumulo della β -catenina e dalla trascrizione mediata dai fattori TCF/LEF.

L'attivazione di una determinata via dipende dalla combinazione tra il ligando WNT, il recettore Frizzled (FZD), i co-recettori disponibili e il contesto cellulare; ligandi quali WNT5A e WNT11 sono generalmente associati all'attivazione delle vie non canoniche, sebbene la distinzione tra ligandi canonici e non canonici non sia assoluta, poiché uno stesso ligando può indurre risposte differenti a seconda del tipo cellulare e dei recettori espressi (Minami Y. et al., 2010).

Le principali vie non canoniche comprendono il pathway della Planar Cell Polarity (PCP) e il pathway WNT/Ca²⁺, entrambi coinvolti nella regolazione dell'organizzazione del citoscheletro, della polarità cellulare, della migrazione, dell'adesione e dei movimenti morfogenetici durante lo sviluppo embrionale e nei tessuti adulti (Niehrs C., 2012).

La via della Planar Cell Polarity (PCP) controlla l'orientamento delle cellule all'interno del piano di un tessuto, coordinando la disposizione spaziale delle cellule rispetto ai loro vicini. Questo meccanismo è essenziale durante l'embriogenesi per processi quali l'allungamento dell'asse corporeo, la gastrulazione, la neurulazione, la chiusura del tubo neurale e l'organizzazione di numerosi epiteli (VanderVorst K. et al., 2019). Nell'adulto, il pathway PCP continua a svolgere un ruolo importante nella migrazione cellulare, nella rigenerazione tissutale e nella risposta ai danni.

L'attivazione della via inizia con il legame di un ligando WNT, prevalentemente WNT5A o WNT11, ai recettori della famiglia Frizzled (FZD) e ai co-recettori ROR1, ROR2 oppure RYK. Il legame del ligando determina il reclutamento della proteina citoplasmatica Dishevelled (DVL), che rappresenta uno dei principali punti di convergenza tra le vie canoniche e non canoniche di WNT.

A differenza del pathway β -catenina-dipendente, nella via PCP Dishevelled attiva una serie di piccole GTPasi appartenenti alla famiglia Rho, in particolare RhoA e Rac1. L'attivazione di RhoA induce la fosforilazione della chinasi ROCK (Rho-associated protein kinase), che promuove la formazione di fibre di actina e l'aumento della contrattilità cellulare attraverso la regolazione della miosina II. Parallelamente, Rac1 attiva la cascata delle MAP chinasi tramite JNK (c-Jun N-terminal kinase), modulando la trascrizione di geni coinvolti nella migrazione, nella polarizzazione e nel rimodellamento del citoscheletro.

L'attivazione coordinata delle vie RhoA/ROCK e Rac1/JNK determina una profonda riorganizzazione del citoscheletro di actina, favorendo la formazione di protrusioni cellulari, la polarizzazione della cellula e la migrazione direzionale. Tali meccanismi risultano fondamentali durante i movimenti di convergenza ed estensione dell'embrione e, successivamente, nei processi di riparazione tissutale (VanderVorst K et al., 2019).

Dal punto di vista fisiologico, il pathway PCP regola numerosi eventi dello sviluppo, tra cui l'orientamento delle ciglia dell'epitelio respiratorio, la disposizione stereociliare delle

cellule ciliate cocleari e la formazione di strutture altamente organizzate come la cute e il sistema nervoso.

Alterazioni dei geni coinvolti nella via PCP sono state associate a malformazioni congenite, in particolare difetti di chiusura del tubo neurale, cardiopatie congenite e anomalie scheletriche (Kumawat K. e Gosens R., 2016)

Per quanto riguarda la via WNT/ Ca^{2+} , anche questa via viene generalmente attivata dai ligandi WNT5A e WNT11 attraverso il legame con i recettori Frizzled, spesso in associazione con ROR2 oppure con specifici recettori tirosin-chinasici. Dopo l'attivazione del recettore, Dishevelled promuove l'attivazione della proteina G eterotrimerica e della fosfolipasi C (PLC) che catalizza l'idrolisi del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP_2), generando due importanti secondi messaggeri: inositolo-1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG) (Antara De., 2011). L' IP_3 si lega ai propri recettori localizzati sulla membrana del reticolo endoplasmatico inducendo il rilascio di calcio nel citoplasma.

L'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} determina l'attivazione di numerose proteine calcio-dipendenti, tra cui la Protein Kinase C (PKC), la Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) e la fosfatasi Calcineurina. L'attivazione di PKC contribuisce alla regolazione del citoscheletro, della proliferazione cellulare e della risposta infiammatoria. La chinasi CaMKII interviene invece nel controllo della migrazione, della polarità cellulare e della plasticità del citoscheletro. Parallelamente, la calcineurina defosforila il fattore di trascrizione NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), consentendone la traslocazione nel nucleo, dove promuove l'espressione di geni coinvolti nello sviluppo embrionale, nell'angiogenesi, nella risposta immunitaria e nella sopravvivenza cellulare (Minami Y. et al., 2010).

Oltre ad attivare specifiche cascate di segnalazione, il pathway WNT/ Ca^{2+} esercita un'importante funzione di regolazione negativa sulla via canonica WNT/ β -catenina. Numerosi studi hanno infatti dimostrato che PKC, CaMKII e NLK (Nemo-like kinase), attivata indirettamente dalla via del calcio, possono limitare la trascrizione mediata dalla β -catenina, contribuendo a mantenere l'equilibrio tra le differenti modalità di segnalazione WNT.

Dal punto di vista fisiologico, la via WNT/ Ca^{2+} partecipa alla regolazione della migrazione cellulare, dello sviluppo cardiovascolare, della morfogenesi embrionale,

dell'angiogenesi e della risposta immunitaria. Nei tessuti adulti essa contribuisce inoltre alla regolazione del metabolismo osseo, della funzione cardiaca e del rimodellamento tissutale.

Nel complesso, le vie non canoniche di WNT costituiscono una rete di segnalazione altamente dinamica che opera in stretta integrazione con il pathway canonico β -catenina-dipendente. L'equilibrio tra queste differenti modalità di trasduzione del segnale è fondamentale per garantire il corretto sviluppo dell'organismo, il mantenimento dell'omeostasi tissutale e la risposta ai diversi stimoli fisiologici e patologici (Niehrs C., 2012).

2.8 LITIO COME POSSIBILE STRATEGIA TERAPEUTICA IN CdLS

Attualmente non esiste una terapia specifica per la sindrome di Cornelia de Lange e il trattamento dei pazienti è prevalentemente sintomatico e multidisciplinare. Negli ultimi anni, tuttavia, numerosi studi hanno evidenziato come la comprensione dei meccanismi molecolari alla base della malattia abbia aperto nuove prospettive terapeutiche.

Al fine di valutare un possibile miglioramento del fenotipo, nei nostri laboratori, all'Università degli Studi di Milano, e grazie ai nostri collaboratori sono stati analizzati gli effetti dell'utilizzo di carbonato di litio come attivatore del pathway canonico di WNT, dal momento che è ormai noto da tempo l'impiego di questo composto in psichiatria come trattamento "gold standard" per il trattamento del disturbo bipolare, grazie alla sua capacità di stabilizzare l'umore, intervenendo sia nelle fasi maniacali sia in quelle depressive e contribuendo alla prevenzione delle ricadute e del rischio suicidario (Riedinger MA., 2023).

Più nello specifico, dal punto di vista molecolare, il suo principale meccanismo d'azione consiste nell'inibizione della Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β), una serina/treonina chinasi che rappresenta uno dei componenti fondamentali del *destruction complex* del pathway canonico di WNT. L'inibizione di GSK-3 β impedisce la fosforilazione della β -catenina, favorendone l'accumulo nel citoplasma e la successiva traslocazione nel nucleo, dove la proteina attiva la trascrizione dei geni bersaglio della via WNT. Attraverso questo meccanismo il litio è in grado di mimare l'attivazione fisiologica del pathway WNT, promuovendo proliferazione, differenziamento cellulare e sopravvivenza neuronale (Grazioli P. et al., 2021; Snitow ME. et al., 2021).

Il razionale biologico dell'utilizzo del litio deriva dall'osservazione che le mutazioni nei geni delle coesine, in particolare *NIPBL*, determinano una ridotta attività della via WNT/ β -catenina durante lo sviluppo embrionale. Tale alterazione compromette la proliferazione delle cellule progenitrici neurali, la neurogenesi e il corretto sviluppo del sistema nervoso centrale, contribuendo alla comparsa di anomalie cerebrali e del deficit cognitivo caratteristici della sindrome (Grazioli P. et al., 2018).

Date le evidenze scientifiche e l'attuale incurabilità della CdLS, il litio è stato selezionato come potenziale strategia terapeutica volta a migliorare le disabilità comportamentali e intellettive comunemente associate a questa sindrome, impiegando diversi modelli sperimentali: cellule staminali pluripotenti indotte di origine umana (hiPSCs) e murine, ma anche modelli di *Drosophila melanogaster*.

In particolare, nelle linee linfoblastoidi derivate da pazienti affetti da CdLS, il trattamento con litio ha determinato un aumento della proliferazione cellulare, una riduzione dell'apoptosi e un incremento dell'espressione della Ciclina D1 (CCND1), uno dei principali geni bersaglio della β -catenina. Il recupero dell'espressione di Ciclina D1 rappresenta un'importante conferma sperimentale dell'effettiva riattivazione della via canonica di WNT da parte del litio e suggerisce che il farmaco possa correggere almeno in parte le alterazioni trascrizionali conseguenti al difetto delle coesine (Grazioli P. et al., 2021).

Risultati analoghi sono stati osservati in cellule staminali neurali murine con ridotta espressione di *nipbl* dove il trattamento con litio ha ripristinato i normali livelli di proliferazione e ha favorito il differenziamento verso il destino neuronale, suggerendo una correzione almeno parziale dei difetti neurogenetici indotti dalla disfunzione delle coesine (Grazioli P. et al., 2021).

Parallelamente, esemplari adulti di *Drosophila melanogaster* portatori di un allele *loss-of-function* nel gene ortologo di *NIPBL* (che sta infatti per “*Nipped-B Like Protein*”), allevati su un substrato arricchito con litio come attivatore del pathway WNT, hanno evidenziato un recupero statisticamente significativo della morfologia dei *mushroom bodies*, strutture del sistema nervoso centrale fondamentali per l'apprendimento (Grazioli P. et al., 2021, Figura 9).

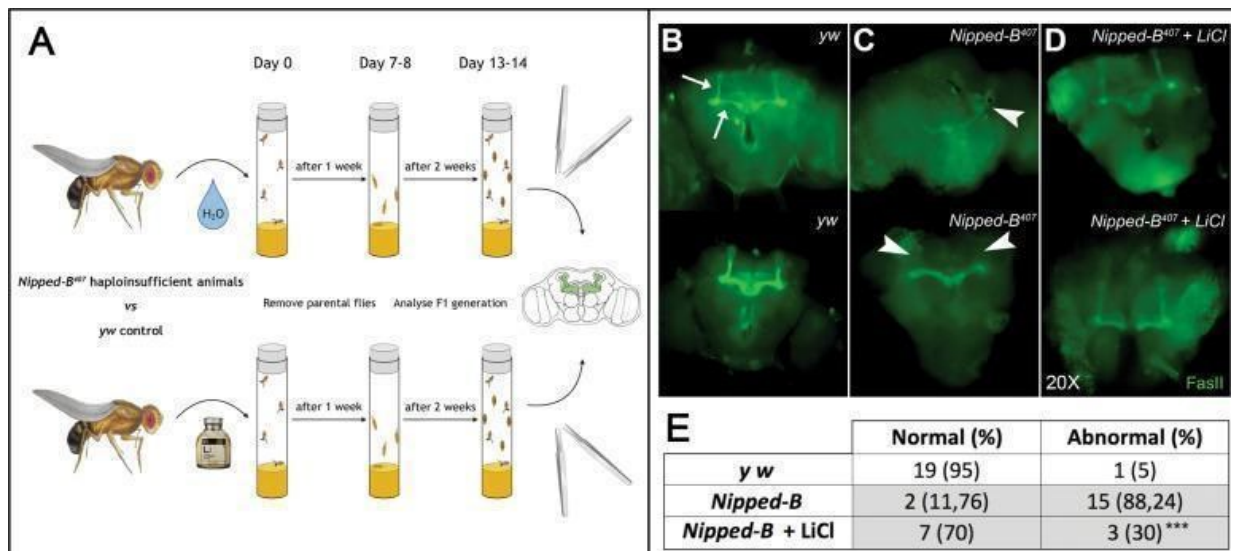


Figura 9. (modificata da Grazioli P. et al., 2021): A) Rappresentazione schematica del protocollo di trattamento farmacologico. B–D) I mushroom bodies di animali adulti di *Drosophila*, marcati con anti-FasII, sono mostrati in verde: B) nei controlli yw è stata osservata una morfologia normale dei mushroom bodies, in cui i lobi α , β e γ possono essere distinti in base ai loro specifici pattern di proiezione (freccie); C) negli adulti aplosufficienti per Nipped-B407 è stata osservata una morfologia anomala dei mushroom bodies, con una struttura contorta (punta della freccia nel cervello superiore) oppure con assenza di entrambi i lobi α (punta della freccia nel cervello inferiore); D) il recupero della morfologia dei mushroom bodies è evidenziato negli adulti aplosufficienti per Nipped-B407 in seguito al trattamento con LiCl. E) La tabella riporta il numero totale e la percentuale tra le parentesi di mushroom bodies adulti normali o anormali nel controllo y w, nel caso Nipped-B e in Nipped-B+LiCl, dimostrando ancora una volta come il trattamento con cloruro di litio migliori la differenziazione neuronale in *Drosophila*.

L'interesse nei confronti del litio è stato ulteriormente rafforzato da studi più recenti condotti su linee di cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSCs) che sono state differenziate prima in precursori neurali (hNPC) e poi in organoidi cerebrali, infine trattati con un inibitore specifico della proteina HDAC8, coinvolta nella patogenesi della sindrome di Cornelia de Lange (CdLS). In seguito al trattamento con cloruro di litio, queste cellule hanno mostrato un significativo miglioramento della proliferazione dei precursori neurali, una maggiore efficienza del differenziamento neuronale e un

riequilibrio tra proliferazione e morte cellulare. Inoltre, gli organoidi cerebrali trattati mostravano un'organizzazione strutturale più vicina a quella osservata nei controlli sani, suggerendo che l'attivazione della via WNT possa correggere alterazioni precoci dello sviluppo cerebrale caratteristiche della sindrome (Parodi C. et al., 2026).

Oltre agli effetti sulla neurogenesi, il litio possiede proprietà neuroprotettive documentate anche in altre patologie neurologiche. L'inibizione di GSK-3 β determina infatti una riduzione dell'apoptosi, un aumento dell'espressione di fattori neurotrofici quali *BDNF*, una maggiore plasticità sinaptica e un miglioramento della sopravvivenza neuronale. Parallelamente, il farmaco modula numerosi pathway intracellulari coinvolti nella risposta allo stress cellulare, nell'autofagia e nei processi infiammatori. Tali proprietà potrebbero contribuire agli effetti benefici osservati nei modelli sperimentali di CdLS, andando oltre la semplice riattivazione della segnalazione WNT (Snitow ME. et al., 2021; Kline AD. et al., 2018).

Sulla base di questi risultati, il nostro laboratorio e centri clinici (“Neuropsichiatria dell’infanzia e dell’adolescenza ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda di Milano” – Prof.ssa Aglaia Vignoli, “Struttura Complessa di Neuropsichiatria dell’Infanzia e dell’Adolescenza(UONPIA) Fondazione IRCSS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano” – Dott.ssa Paola Francesca Ajmone, “Unità Operativa Complessa di Pediatria, Centro Fondazione Mariani per il Bambino Fragile, ASST Lariana, Ospedale Sant’Anna di Como” – Dr. Angelo Selicorni) hanno presentato il progetto “*Cornelia de Lange Syndrome: assessing positive effects of Lithium treatment*” (*Closer*), un’iniziativa di ricerca nazionale che prevede un trial clinico prospettico della durata di 52 settimane con l’obiettivo di verificare sicurezza ed efficacia del carbonato di litio come prima strategia terapeutica concreta di questa sindrome ad oggi ancora non trattabile, accompagnata da un attento monitoraggio clinico attraverso visite periodiche, esami ematochimici ed elettrocardiogramma eseguiti presso la Neuropsichiatria dell’infanzia e dell’adolescenza ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda di Milano, oltre alla raccolta sistematica dei dati clinici. Gli outcomes principali includono la valutazione di eventuali miglioramenti nei disturbi del comportamento, nelle capacità comunicative, nel funzionamento sociale, nella qualità del sonno e, più in generale, nella qualità della vita dei pazienti (Associazione Nazionale Sindrome di Cornelia de Lange APS, 2024; Grazioli P. et al., 2021).

2.9 STRESS OSSIDATIVO COME FATTORE PREDISPONENTE AL DANNO AL DNA IN CdLS

Negli ultimi anni è emerso come l'instabilità genomica osservata nella sindrome di Cornelia de Lange non sia attribuibile esclusivamente alle alterazioni della funzione delle coesine, ma anche alla presenza di un marcato squilibrio dell'omeostasi redox cellulare. Numerose evidenze sperimentali indicano infatti che le cellule dei pazienti con CdLS presentano un aumento dello stress ossidativo basale, una ridotta capacità di contrastare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e una maggiore suscettibilità al danno ossidativo del DNA, contribuendo allo sviluppo del fenotipo clinico della malattia (Mannini et al., 2013; Cucco F. e Musio A., 2016).

Lo stress ossidativo rappresenta una condizione caratterizzata da uno squilibrio tra la produzione di specie ossidanti e la capacità dei sistemi antiossidanti cellulari di neutralizzarle.

In condizioni fisiologiche, le ROS vengono continuamente prodotte durante il metabolismo cellulare, principalmente a livello della catena respiratoria mitocondriale, e comprendono molecole quali l'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e il radicale ossidrilico ($\bullet OH$). A basse concentrazioni queste specie svolgono un'importante funzione di segnalazione intracellulare; tuttavia, quando la loro produzione supera le capacità di difesa della cellula, si instaurano processi di ossidazione che colpiscono lipidi, proteine, RNA e DNA, determinando alterazioni strutturali e funzionali delle macromolecole cellulari (Meneghini R., 1997)

A supporto di ciò, nel 2012 Gimigliano A. et al. hanno definito le vie biochimiche coinvolte in CdLS, analizzando il profilo proteomico di linee cellulari linfoblastoidi CdLS portatrici di mutazioni nei geni chiave delle coesine, *SMC1A* e *SMC3*. Gli autori di questo studio, tramite un'analisi quantitativa di elettroforesi bidimensionale differenziale su gel a fluorescenza (2D-DIGE) seguita da spettrometria di massa (MS), hanno identificato in totale 46 proteine espresse in maniera differenziale tra le linee CdLS e quelle di controllo, la maggior parte delle quali è risultata sottoregolata.

Entrando più nel dettaglio dei risultati, sedici delle 46 proteine (34,8%) appartengono alla via metabolica di sintesi degli enzimi glicolitici, tra cui alfa-enolasi, fruttosio-bisfosfato aldolasi A e C e ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi; sette (15,3%) proteine identificate svolgono un ruolo nell'organizzazione del citoscheletro, tra cui la

proteina 3 correlata all'actina, la statina e la cofilina-1; quattordici delle 46 (30,4%) proteine sono coinvolte nei percorsi cellulari e di destino proteico, tra cui l'annessina A6, l'endoplasmica e la proteina da shock termico da 71 kDa, mentre il 13% riguarda l'elaborazione della struttura dell'RNA. Infine, tre proteine (6,5%), ovvero la perossiredossina III, la proteina 7 della malattia di Parkinson e il superossido dismutasi [Cu-Zn], appartengono al percorso antiossidante e di detossificazione.

Tramite un saggio immunoenzimatico (ELISA) dopo derivatizzazione con 2,4-dinitrofenilidrazina, è stato misurato anche il livello globale di stress ossidativo nelle linee cellulari CdLS e in quelle di controllo, al fine di calcolare il contenuto di carbonili proteici che è risultato significativamente più elevato nelle prime rispetto alle seconde, (Gimigliano A. et al., 2012; Figura 10).

Questi risultati suggeriscono che la deregolazione trascrizionale conseguente al difetto del complesso delle coesine coinvolga anche geni fondamentali per il controllo dello stato redox cellulare, predisponendo le cellule a un danno ossidativo cronico.

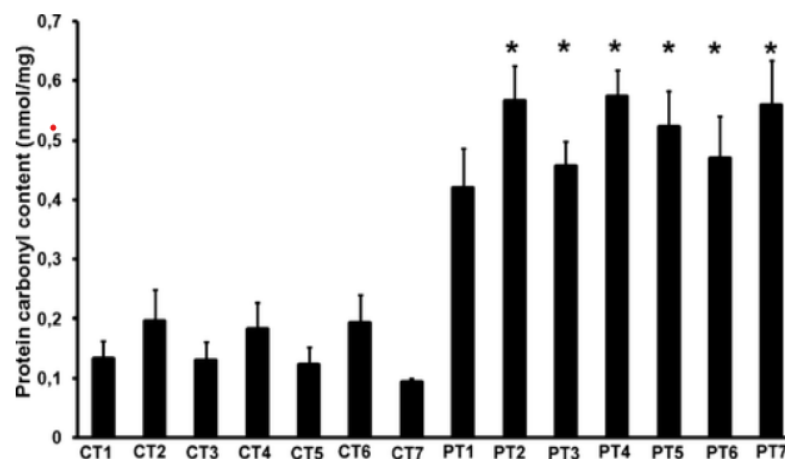


Figura 10. Quantità di contenuto di carbonili proteici nelle linee cellulari di controllo e CdLS (Gimigliano A. et al., 2012)

Oggi è noto che l'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno e/o la riduzione delle difese antiossidanti possono causare danni al DNA, perdita del potenziale di membrana e riduzione della sintesi di ATP, portando in ultima analisi alla morte cellulare. In altre parole, l'aumento dello stress ossidativo contribuisce direttamente al danno genomico attraverso differenti meccanismi. Le ROS possono infatti reagire con le basi azotate del DNA provocando modificazioni ossidative, tra cui la formazione della

8-oxo-7,8-diidroguanina (8-oxoG), inducendo errori di appaiamento durante la replicazione del DNA. Inoltre, le ROS possono determinare la formazione di siti abasici, rotture a singolo filamento (single-strand breaks, SSBs) e, indirettamente, rotture a doppio filamento (double-strand breaks, DSBs). L'accumulo di tali danni attiva le principali vie della DNA Damage Response (DDR), inducendo arresto del ciclo cellulare, senescenza o apoptosi qualora il danno risulti irreparabile.

Nel contesto della sindrome di Cornelia de Lange, il problema risulta ulteriormente aggravato dalla ridotta efficienza dei meccanismi di riparazione del DNA. Le coesine, infatti, come ampiamente discusso, oltre al loro ruolo nella coesione dei cromatidi fratelli e nell'organizzazione tridimensionale della cromatina, partecipano attivamente al reclutamento dei complessi proteici coinvolti nella riparazione delle rotture del DNA, in particolare attraverso il meccanismo di ricombinazione omologa.

Mutazioni nei geni *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* e *HDAC8* compromettono tali processi, determinando una maggiore sensibilità agli agenti genotossici e un aumento dell'instabilità cromosomica. Di conseguenza, il danno ossidativo prodotto dalle ROS tende ad accumularsi nel tempo, amplificando progressivamente le alterazioni genomiche.

Non a caso, infatti, oltre alla disregolazione dell'espressione genica, negli individui con sindrome di Cornelia de Lange si osservano frequentemente anomalie cromosomiche spontanee, sia strutturali sia numeriche (Di Nardo M. et al., 2024).

Le prime evidenze sperimentali di questa aumentata suscettibilità al danno del DNA risalgono agli studi di Vrouwe e collaboratori, i quali dimostrarono che i fibroblasti derivati da pazienti con CdLS risultavano particolarmente sensibili all'esposizione ad agenti genotossici quali afidicolina, mitomicina C e radiazioni ionizzanti. Le cellule mostravano un'aumentata frequenza di aberrazioni cromosomiche e una ridotta capacità di completare correttamente i processi di riparazione mediante ricombinazione omologa, suggerendo un ruolo diretto delle coesine nel mantenimento dell'integrità genomica (Vrouwe MG. et al., 2007).

Inoltre, se esposte ai raggi X durante la fase G2 del ciclo cellulare (dove la riparazione del DNA dipende dalla corretta coesione tra cromatidi fratelli), mostrano un aumento significativo, proporzionale alla dose, di scambi tra cromatidi fratelli (SCE) e rotture a doppio filamento (DSB), come raffigurato in Figura 11 (Di Nardo M. et al., 2024).

Dunque, è probabile che la down-regolazione delle proteine coinvolte nei processi antiossidanti e di detossificazione, riducendo e rallentando la capacità delle cellule di questi pazienti di riparare efficacemente il DNA danneggiato, sia tra i principali responsabili dell'invecchiamento precoce e dell'instabilità genomica (Van Remmen H. et al., 2003).

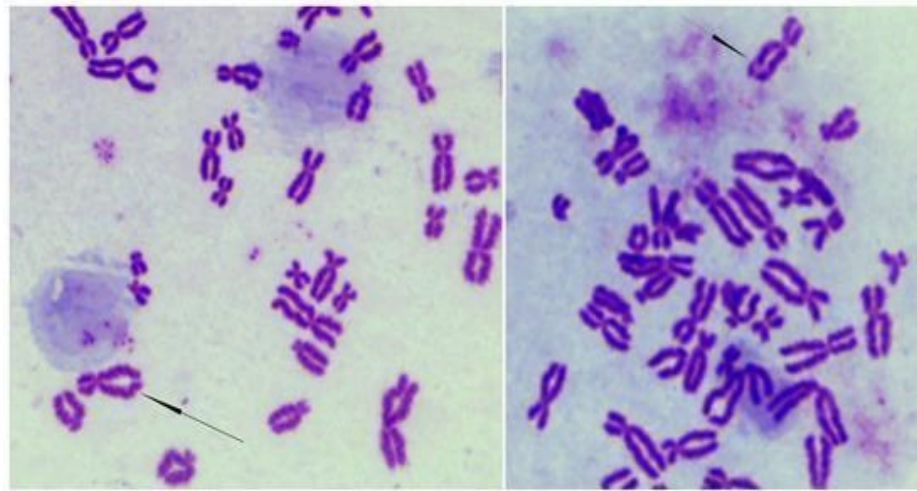


Figura 11. Metafasi parziali colorate con Giemsa che mostrano una rottura cromatidica (indicata da una freccia) e una lacuna cromatidica (indicata da una freccia) durante la progressione della coltura cellulare in vitro delle cellule CdL510 (a sinistra) e CdL248 (a destra), rispettivamente (Di Nardo M. et al., 2024).

Come ulteriore indicatore di instabilità cromosomica, è stato indagato anche il numero di foci di γ -H2AX, risultato maggiore nelle cellule CdLS dopo 30 minuti di esposizione a 2 Gy di irradiazione rispetto ai controlli (Figura 12., $P < 0,05$, Cukrov et al., 2018).

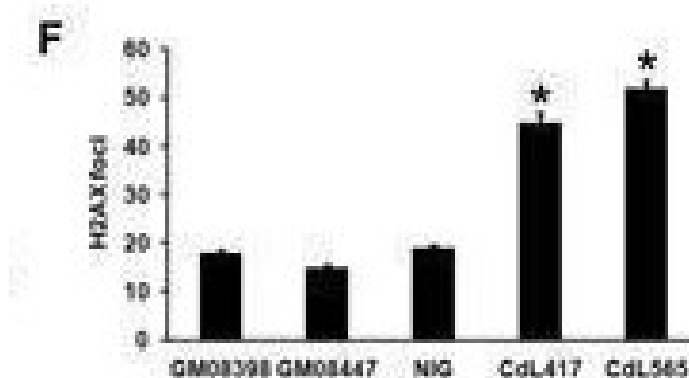


Figura 12. Media dei foci gamma-H2AX dopo irradiazione con 2 Gy

Dunque, nel complesso possiamo affermare che l'aumento dello stress ossidativo nelle cellule dei pazienti con CdLS, dovuto a sua volta ad una down-regolazione delle proteine coinvolte in questo processo cellulare, contribuisce fortemente all'instabilità genomica tipica di questa sindrome. In altri termini, l'accumulo eccessivo delle specie reattive dell'ossigeno compromette i sistemi di riparazione del DNA, portando all'insorgenza progressiva di mutazioni e disfunzioni cellulari.

3. SCOPO DELLO STUDIO

L'elaborato di tesi ha l'obiettivo di visualizzare e quantificare il danno al DNA a livello cellulare sia negli individui affetti da sindrome di Cornelia de Lange (CdLS) e inclusi nel trial clinico che prevede la somministrazione di carbonato di litio, sia nei soggetti affetti da sindrome di Kleeftstra (KS) non partecipanti allo studio, facendo il confronto con i soggetti sani mediante l'analisi del sangue venoso periferico.

La valutazione dell'integrità genomica rappresenta un aspetto di particolare interesse nello studio di queste patologie, poiché consente di approfondire i meccanismi molecolari alla base della loro fisiopatologia e di individuare eventuali alterazioni nei processi di mantenimento e riparazione del DNA, che potrebbero contribuire al fenotipo clinico osservato.

Per il raggiungimento di tale obiettivo è stato impiegato il *Comet Test*, noto anche come *Single-cell Gel Electrophoresis (SCGE)*, una tecnica di laboratorio altamente sensibile, semplice, rapida e versatile, ampiamente utilizzata per la rilevazione del danno al DNA a livello della singola cellula.

Il principio della metodica si basa sull'incorporazione delle cellule in un gel di agarosio, seguita dalla lisi delle membrane cellulari e nucleari e dalla successiva applicazione di un campo elettrico. Durante l'elettroforesi, i frammenti di DNA o le molecole contenenti rotture migrano verso l'anodo, formando una caratteristica struttura costituita da una "testa", corrispondente al DNA integro, e da una "coda", costituita dal DNA danneggiato. L'estensione e l'intensità della coda risultano direttamente proporzionali all'entità del danno genomico presente nella cellula.

Nella sua versione alcalina, il Comet Test permette di rilevare principalmente le rotture a singolo filamento (Single-Strand Breaks, SSB), nonché i siti alcali-labili, che rappresentano una forma precoce di danno al DNA.

Attraverso specifiche modifiche del protocollo sperimentale, come l'impiego di condizioni neutre o l'utilizzo di enzimi di riparazione del DNA (ad esempio Fpg ed Endonucleasi III), la tecnica può essere estesa anche all'identificazione di rotture a doppio filamento (Double-Strand Breaks, DSB), danni ossidativi alle basi azotate, legami crociati tra DNA e proteine o tra filamenti di DNA e alterazioni associate ai processi apoptotici (Olive PL. e Banath JP., 2006).

Grazie alla sua elevata sensibilità e alla possibilità di analizzare il danno a livello della singola cellula, il Comet Test rappresenta uno strumento particolarmente utile nella ricerca biomedica, trovando applicazione in ambiti quali la tossicologia genetica, il biomonitoraggio ambientale, la farmacologia e lo studio di numerose patologie caratterizzate da instabilità genomica.

Nel presente studio, il Comet assay è stato impiegato per due differenti tipologie di analisi. In una prima fase, la metodica è stata utilizzata per confrontare il livello di danno al DNA al T0, quindi prima dell'inizio della somministrazione di carbonato di litio nei pazienti affetti da sindrome di Cornelia de Lange (CdLS) e nei pazienti con sindrome di Kleeftstra (KS) con quello di soggetti di controllo, al fine di valutare l'eventuale presenza di una maggiore suscettibilità al danno genomico e contribuire a una migliore comprensione dei meccanismi biologici coinvolti in queste sindromi.

In una seconda fase, il Comet assay è stato impiegato per monitorare longitudinalmente le variazioni dell'entità del danno genomico esclusivamente nei pazienti con CdLS arruolati nel trial clinico e sottoposti a trattamento con carbonato di litio. In particolare, i livelli di danno al DNA sono stati confrontati tra il tempo basale (T0), precedente l'inizio della terapia, e i successivi punti temporali del trattamento, al fine di valutare l'eventuale effetto del carbonato di litio sulla riduzione del danno genomico.

4. MATERIALI E METODI

4.1 PROGETTO CLoSER: ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI

Il Comet assay è stato effettuato su prelievi di sangue venoso periferico provenienti da pazienti affetti da CdLS appartenenti a un trial clinico prospettico e aperto della durata di 52 settimane con arruolamento ancora attivo, finalizzato a includere almeno 34 soggetti pediatrici affetti da CdLS con mutazione nel gene *NIPBL* (ad oggi sono stati arruolati 10 pazienti, 8 dei quali hanno già completato il trial clinico), condotto presso tre centri clinici lombardi (ASST Niguarda, ASST Lariana e Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano).

Tale dimensione campionaria è stata calcolata mediante test di Wilcoxon, ipotizzando una riduzione clinicamente significativa del punteggio ABC, una scala che misura la sintomatologia psichiatrica e i disturbi comportamentali anche nei pazienti con disabilità intellettiva (−16 punti) rispetto al baseline e considerando un tasso di drop-out del 10%. Più nello specifico, i criteri di inclusione per l'arruolamento dei pazienti in questo progetto di ricerca sono (ClinicalTrials.gov, 2024):

- Età > 4 anni
- Peso corporeo entro i limiti normali dell'intervallo di riferimento per la CdLS, in base all'età e all'altezza.
- Diagnosi di CdLS basata su criteri clinici condivisi e su una mutazione confermata nel gene *NIPBL*.
- Terapia farmacologica stabile per 4 settimane prima dell'inizio dello studio.
- Consenso scritto firmato dal genitore/tutore legale/rappresentante prima della visita di screening.
- Capacità di assumere il farmaco in studio fornito in capsule o gocce (per i pazienti più giovani e quelli con difficoltà di deglutizione) o in combinazione con cibi/bevande
- Il curante del paziente deve essere in grado di comprendere le istruzioni e partecipare consapevolmente allo studio.

Invece, i criteri di esclusione sono:

- Il paziente sta partecipando a un altro studio clinico.
- Prolungamento dell'intervallo QT, disfunzione tiroidea, insufficienza renale, insufficienza epatica, leucopenia o altri disturbi medici clinicamente significativi al momento (come determinato dallo sperimentatore), diversi da quelli direttamente correlati alla CdLS
- Intervallo QTcF all'ECG superiore a 450 ms
- Diabete mellito grave o disturbo metabolico ereditario
- Prima e durante lo studio è vietata l'assunzione concomitante di specifiche classi farmacologiche potenzialmente interferenti, tra cui antidepressivi, antipsicotici, antiepilettici, ACE-inibitori, diuretici e altri farmaci noti per interagire con il litio

I pazienti risultati idonei, sulla base di questi criteri di ammissibilità, sono stati reclutati previo consenso informato firmato personalmente o dal loro rappresentante legale, oltre a ricevere un documento informativo circa la raccolta di materiale biologico e i contatti utili per eventuali chiarimenti o per la rinuncia allo studio in qualsiasi momento.

I partecipanti seguiranno un protocollo strutturato in diverse fasi (Figura 13): una valutazione basale (T0) presso l'UONPIA del Policlinico di Milano per raccogliere dati clinici ed effettuare esami ematochimici completi, analisi delle urine, ECG, ma anche test cognitivi (Leiter-R, Vineland) e scale comportamentali (ABC).

Una settimana dopo la fase T0, ha inizio la terapia vera e propria ("Start Drug Treatment", *SDT*) che prevede la somministrazione di carbonato di litio alla dose di 10 mg/kg due volte al giorno, con intervallo di 12 ore, adattabile in base alla tollerabilità individuale.

In caso di effetti avversi (es. sintomi gastrointestinali, tremori, affaticamento, debolezza muscolare), sono previste modifiche della posologia o sospensione del trattamento tramite riduzione graduale del dosaggio; invece, nei casi di intolleranza persistente, il paziente verrà ritirato dallo studio.

Durante il trattamento, nel nostro laboratorio vengono inoltre misurati biomarcatori di stress ossidativo e vengono effettuati prelievi ematici per generare linee cellulari linfoblastoidi derivate dai pazienti, destinate ad analisi genetiche e molecolari.

Sono inoltre previste visite periodiche di follow-up (monitoraggio dei livelli sierici di litio e valutazione degli effetti avversi) a intervalli regolari (T1 = 2 settimane $\pm$ 3 giorni dopo SDT, T2 = 2 settimane $\pm$ 3 giorni dopo T1, T3 = 1 settimana dopo T2, T4 = 1

settimana dopo T3, T5 = 1 settimana dopo T4, T6 = 1 settimana dopo T5) presso l'ospedale Niguarda e l'ASST Lariana, fino alla valutazione finale di sicurezza ed efficacia (T7 = 3 mesi $\pm$ 1 settimana dopo T6), con ripetizione dei test eseguiti al baseline al Policlinico per garantire continuità assistenziale (ClinicalTrials.gov, 2024).

L'endpoint primario è rappresentato dalla variazione del punteggio alla scala ABC dopo il trattamento, mentre esiti secondari significativi sono miglioramento delle capacità comunicative, cognitive, della qualità del sonno e dei comportamenti autistici.

Al termine dello studio, ai pazienti che mostreranno beneficio clinico sarà garantita la prosecuzione del trattamento, assicurando continuità assistenziale e monitoraggio della sicurezza.



Figura 13. Disegno dello studio: studio prospettico della durata di 52 settimane per valutare l'efficacia del carbonato di litio in CdLS.

4.2 COMET ASSAY: PRINCIPIO DELLA TECNICA E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Nel mio progetto di ricerca, per la valutazione del danno al DNA è stato utilizzato il kit *OxiSelect™ Comet Assay (3-well slides)* (OxiSelect™ Comet Assay Kit, STA-351, Cell Biolabs, USA, Figura 14), basato sulla tecnica di elettroforesi su gel a singola cellula (SCGE).

I componenti principali del kit comprendono: vetrini pretrattati per comet assay, agarosio specifico, colorante fluorescente Vista Green DNA Dye (10000 $\times$), soluzione di EDTA (500 mM) e tampone di lisi 10 $\times$.

Il colorante è stato conservato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, mentre gli altri reagenti sono stati mantenuti a temperatura ambiente. Tra i materiali non forniti dal kit sono stati utilizzati NaCl, NaOH, etanolo al 70%, tampone TE (10 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA), PBS privo di Mg^{2+} e Ca^{2+} ed acqua distillata.

Prima dell'utilizzo, l'agarosio, conservato a una temperatura di $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, è stato sciolto mediante incubazione nel termoblocco a $90\text{--}95\text{ }^{\circ}\text{C}$ e successivamente mantenuto a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ all'interno di una provetta Eppendorf per evitare la solidificazione; anche i puntali sono stati scaldati e mantenuti a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante l'intera durata del test.

Dall'altra parte, il colorante fluorescente è stato diluito 1:10000 in tampone TE e conservato a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, al riparo dalla luce, per un massimo di tre settimane.

Invece, il tampone di lisi è stato preparato miscelando NaCl, EDTA, soluzione di lisi $10\times$ e acqua distillata, con aggiunta opzionale di DMSO (utile per campioni contenenti eme), e portato a pH 10 mediante NaOH 10 N. La soluzione è stata raffreddata a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ prima dell'uso. Sia per la denaturazione del DNA sia per la corsa elettroforetica è stata preparata e utilizzata la stessa soluzione alcalina (300 mM NaOH, pH >13 , 1 mM EDTA), più sensibile per la rilevazione di rotture del DNA a singolo e doppio filamento e siti labili agli alcali. Infine, in alternativa, il protocollo prevede l'uso di tampone TBE per analisi meno sensibili durante la corsa elettroforetica (OxiSelect™ Comet Assay Kit, STA-351, Cell Biolabs, USA).

4.3 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E DEI VETRINI

Per ogni partecipante CdLS idoneo e incluso nello studio sono state preparate sotto cappa un'aliquota da 250 μL di sangue scongelato.

Tali aliquote sono state prima centrifugate a circa $700 \times g$ per 2 minuti a 2712 rpm. È stato così ottenuto un pellet, successivamente lavato con 1 mL di PBS privo di Mg^{2+} e Ca^{2+} al fine di eliminare i detriti cellulari e staccare le cellule dal fondo della provetta. Dopo un'ulteriore centrifuga e i lavaggi successivi, le cellule sono state risospese in 500 μL di PBS freddo.

A questo punto, per ogni campione si è proceduto a mescolare 10 μL di sospensione cellulare con 90 μL di agarosio (rapporto 1:10). Successivamente, sono stati prelevati 75

μL della miscela per ciascun campione, distribuendoli su un vetrino a tre pozzetti in modo da garantire una copertura uniforme di ciascun pozzetto.

Il vetrino, trasferito e mantenuto orizzontalmente all'interno di un contenitore chiuso per ricreare il buio, è stato incubato in frigo a 4 °C per 30 minuti per consentire la solidificazione dell'agarosio.

Successivamente, il contenitore con all'interno il vetrino è stato incubato con il tampone di lisi fino alla completa copertura del vetrino, per 60 minuti e a 4 °C al buio. Questo passaggio è fondamentale per permettere la rottura delle membrane cellulari e nucleari.

Per permettere il rilassamento e la denaturazione del DNA, il tampone di lisi è stato lentamente aspirato e sostituito con la soluzione alcalina, per un'incubazione di 30 minuti a 4 °C al buio.

Dopo l'equilibratura in soluzione alcalina per elettroforesi, il vetrino è stato trasferito in una camera elettroforetica e sottoposto a un campo elettrico con un voltaggio pari a 11 V ($\sim 1 \text{ V/cm}$, quindi in base alla distanza tra i due elettrodi) per 30 minuti a 4 °C.

Al termine della corsa elettroforetica, durante la quale il DNA frammentato migra più velocemente e percorre una distanza maggiore rispetto al DNA intatto, mantenendo il vetrino sempre in posizione orizzontale, sono stati effettuati tre lavaggi con acqua deionizzata fredda, ciascuno della durata di 2 minuti.

Infine, dopo aver aspirato tutta l'acqua, il vetrino è stato disidratato con etanolo al 70% e lasciato asciugare a 37 °C per 30 minuti, o comunque fino a completa evaporazione dell'etanolo.

L'ultima fase del comet assay prevede l'incubazione e quindi la colorazione di ciascuno dei tre pozzetti del vetrino con 100 μL di un colorante fluorescente per DNA diluito (Vista Green) per circa 15 minuti a temperatura ambiente e al buio, per evitare il decadimento della fluorescenza a causa dei raggi UV (OxiSelect™ Comet Assay Kit, STA-351, Cell Biolabs, USA).

In conclusione, le immagini dei vetrini (15-20 circa a seconda della qualità del vetrino, escludendo i replicati tecnici) sono state acquisite mediante microscopia a fluorescenza utilizzando il filtro verde (488) e un obiettivo 10 $\times$.

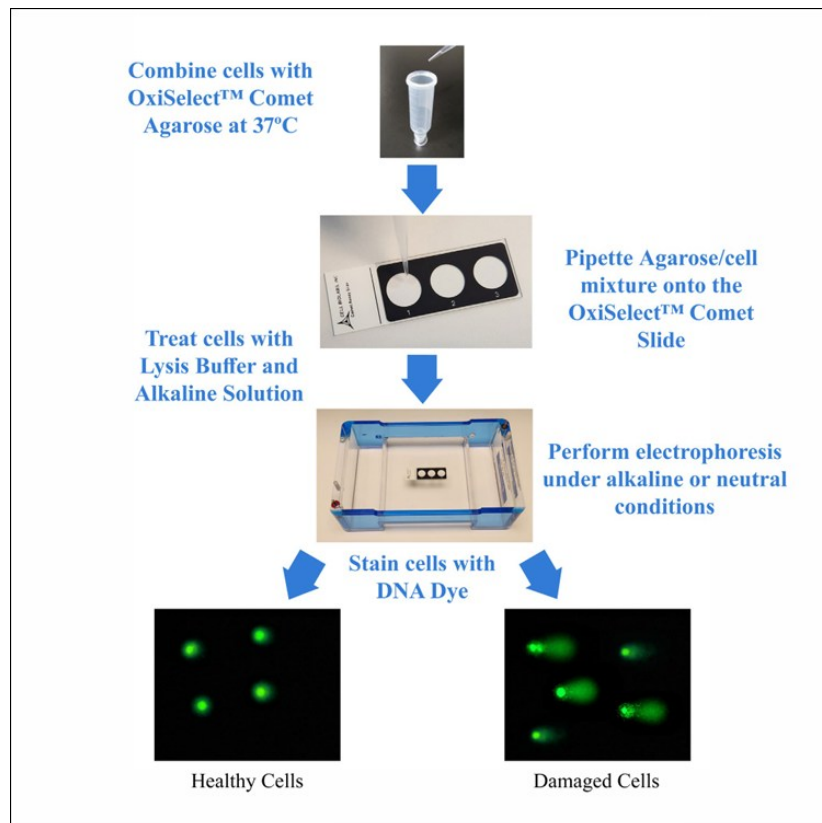


Figura 14. Passaggi, in sintesi, del Comet assay: 1) miscela sangue congelato con agarosio a 37 °C, 2) preparazione vetrini, 3) corsa elettroforetica in condizioni alcaline, 4) osservazione in microscopia a fluorescenza (OxiSelect™ Comet Assay Kit, STA-351, Cell Biolabs, USA).

4.4 FORMAZIONE DELLE COMETE AL MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

La migrazione durante la corsa elettroforetica nel Comet assay è il passaggio chiave che genera la forma “a cometa”, da cui appunto prende il nome questo saggio. Dopo la lisi, il DNA resta intrappolato nella matrice di agarosio, ma è libero da membrane e proteine. Per questo motivo, quando si applica un campo elettrico, il DNA che ha una carica negativa (per via dei gruppi fosfato) migra dal polo negativo (catodo) verso il polo positivo (anodo). Tuttavia, non tutto il DNA si muove allo stesso modo:

- Il DNA integro (non danneggiato) è molto lungo e superavvolto, quindi si muove con difficoltà nella rete dell’agarosio, rimanendo concentrato vicino al punto di partenza a formare una “testa”.

- Il DNA danneggiato forma frammenti più corti e rilassati, che riescono a “filtrare” più facilmente tra i pori del gel. Questi frammenti, essendo più leggeri, migrano verso l’anodo più velocemente e percorrendo una distanza più lunga, formando una “coda”.

Dunque, la struttura finale al microscopio a fluorescenza ricorda proprio una cometa: una testa luminosa (DNA intatto) seguita da una coda più o meno lunga e intensa. Maggiore è il danno al DNA, maggiore sarà la quantità di materiale che migra; quindi più lunga e marcata sarà la coda.

In questo progetto, il danno al DNA (visualizzabile come la coda delle comete che si generano durante la corsa elettroforetica nel Comet Assay) è stato quantificato usando il programma ImageJ che ci ha permesso di misurare quattro diversi parametri che includono:

- percentuale DNA breaks (visualizzati come comete al microscopio a fluorescenza e misurata come il numero di comete rispetto al numero totale di cellule per ciascuna immagine acquisita di ciascun paziente/controllo)
- percentuale di DNA nella coda ($100 \times \text{intensità del DNA nella coda} / \text{Intensità del DNA cellulare}$)
- lunghezza della coda
- momento della coda (inteso come il prodotto tra percentuale di DNA nella coda e lunghezza della coda).

Nel mio progetto di tesi questi parametri sono stati valutati sul sangue congelato di nove pazienti affetti da CdLS, quattro pazienti affetti da KS e due controlli, al fine di metterli a confronto per evidenziare eventuali differenze significative nella quantità di danno al DNA tra le due sindromi e tra queste e i controlli.

In particolare, dopo aver contato per ogni immagine acquisita di ciascun paziente CdLS, KS e dei controlli CTR esclusivamente le comete e le cellule sane chiaramente distinguibili (con un testa/coda ben definite le prime e con un struttura tondeggiante/ovale le seconde, non includendo invece nel conteggio né le restanti cellule di difficile interpretazione né gli artefatti riconducibili al background), abbiamo dapprima voluto confrontare la percentuale di DNA breaks (% di comete) misurata al tempo T0, quindi prima dell’inizio della somministrazione di carbonato di litio, nei tre gruppi di studio.

4.5 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita utilizzando il software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

I dati sono stati considerati secondo una distribuzione normale e sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard (SD).

Per il confronto tra due gruppi indipendenti è stato utilizzato il t-test di Welch per campioni indipendenti (test t di Student per campioni indipendenti con correzione di Welch), che non richiede l'assunzione di omogeneità delle varianze tra i gruppi confrontati.

Tale test è stato applicato sia al confronto della percentuale di DNA breaks tra i pazienti con sindrome di Cornelia de Lange ai diversi time point (T0 vs T5 e T1 vs T5), considerando i gruppi come indipendenti, poiché non tutti i pazienti erano rappresentati in entrambi i tempi di campionamento; sia al confronto della percentuale di DNA breaks tra i tre gruppi sperimentali al tempo T0 (controlli sani, pazienti con sindrome di Kleefstra e pazienti con sindrome di Cornelia de Lange), mediante confronti a coppie.

Lo stesso approccio statistico è stato utilizzato anche per l'analisi dei parametri quantitativi del Comet Assay (Tail Length, Tail Moment e % Tail DNA) nei singoli pazienti affetti da sindrome di Cornelia de Lange. Per ciascun paziente sono stati eseguiti confronti a due a due (pairwise comparisons) tra tutti i time point disponibili, applicando il t-test di Welch per campioni indipendenti e assumendo una distribuzione gaussiana dei dati.

Per tutti i confronti sono stati calcolati gli intervalli di confidenza al 95% (IC95%) e la significatività statistica è stata fissata a $p < 0,05$.

I livelli di significatività sono stati riportati nei grafici secondo la seguente convenzione:

- ns = non significativo ($p \geq 0,05$);
- * = $p < 0,05$;
- ** = $p < 0,01$;
- *** = $p < 0,001$;
- **** = $p < 0,0001$.

5. RISULTATI

5.1 LA PERCENTUALE DI DNA BREAKS INDICA UN DANNO AL DNA Più ELEVATO NEI PAZIENTI KS E UNA LIMITATA VARIAZIONE NEI PAZIENTI CDLS

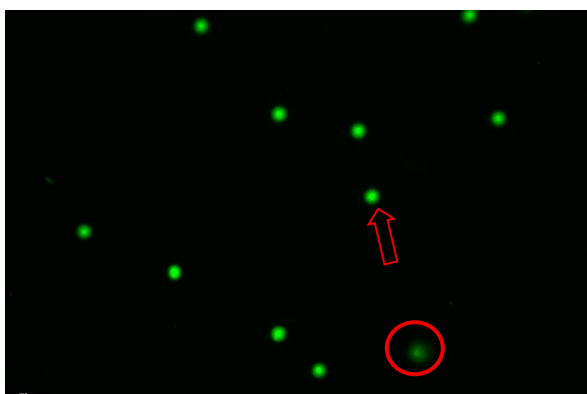
Dopo aver contato per ogni immagine acquisita di ciascun paziente CdLS, KS e dei controlli CTR sia le comete che le cellule sane (Fig 15), abbiamo dapprima voluto confrontare la percentuale di DNA breaks (% di comete) misurata al tempo T0, quindi prima dell'inizio della somministrazione di carbonato di litio, nei tre gruppi di studio, come raffigurato nel grafico 1.

Osservando quest'ultimo, ciò che emerge è che il gruppo KS presenta un percentuale più elevato di danno al DNA, accompagnato da una maggiore dispersione dei dati individuali, come evidenziato anche dall'analisi statistica che conferma che la percentuale delle comete è significativamente maggiore in questi pazienti con sindrome di Kleeftstra rispetto ai controlli sani ($p < 0,0001$, ****) e rispetto ai pazienti con sindrome di Cornelia de Lange ($p < 0,0001$, ****). che infatti hanno valori intermedi, superiori rispetto ai controlli ma inferiori rispetto ai pazienti KS.

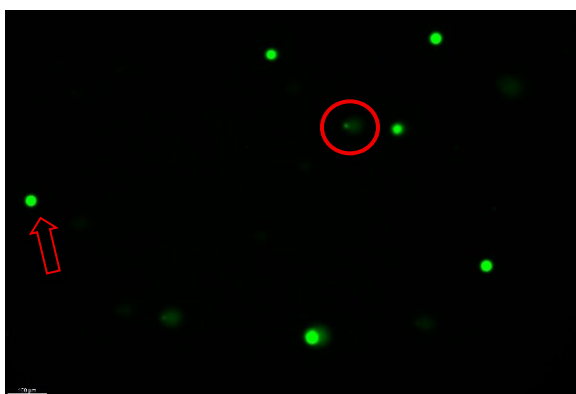
Inoltre, è stata osservata una differenza significativa anche tra il gruppo CdLS e i controlli sani ($p = 0,0018$, **), indicando una maggiore frequenza di danno al DNA nei pazienti affetti da Cornelia de Lange rispetto ai soggetti di controllo.

Per tutti questi motivi, ne consegue che il gruppo CTR evidenzia la percentuale media di comete più bassa, suggerendo un minor livello di danno genomico basale. Infine, la distribuzione dei singoli punti evidenzia una certa variabilità intra-gruppo, particolarmente marcata nel gruppo KS.

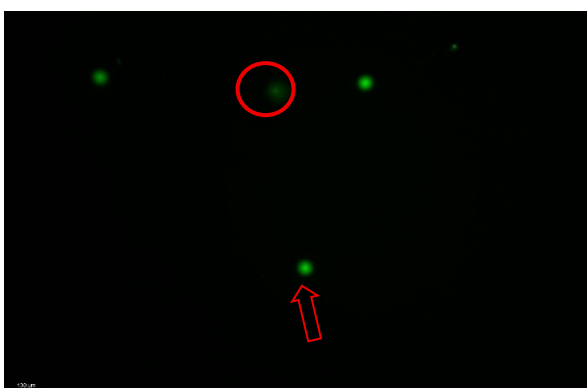
a.



b.



c.



d.

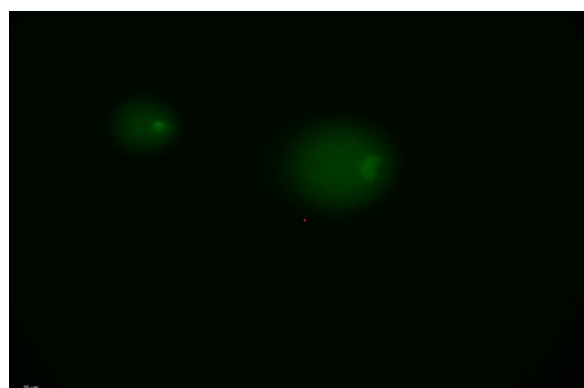


Figura 15. Immagini acquisite mediante microscopia a fluorescenza con un obiettivo 10×, relative a pazienti con sindrome di Kleeftstra (a), pazienti con sindrome di Cornelia de Lange (b) e controlli sani (c). L'immagine d) mostra un ingrandimento di due comete. Le comete sono identificate dal cerchio rosso, mentre le cellule sane sono identificate dalla freccia rossa.

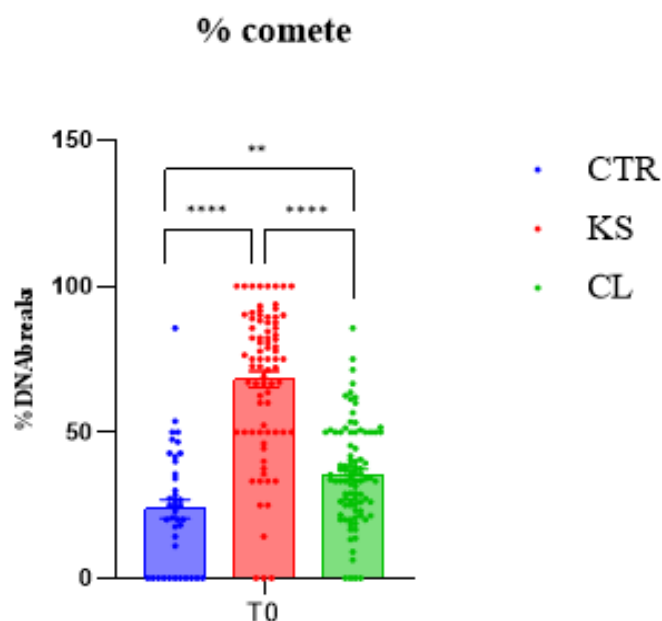


Grafico 1. Percentuale di DNA breaks (% comete) al tempo T0 nei tre gruppi sperimentali (CTR in blu, KS in rosso e CL in verde). L'analisi statistica è stata eseguita mediante Welch's unpaired t-test (= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$).*

Nel contesto del trial clinico, abbiamo anche voluto studiare nel tempo gli effetti della somministrazione di carbonato di litio nei pazienti CdLS inclusi nello studio, come mostra il grafico 2 che confronta la percentuale di DNA breaks nei pazienti CdLS ai tempi T0 e T5.

L'analisi descrittiva evidenzia una marcata variabilità dei valori osservati all'interno di entrambi i time point. Al tempo T0 la distribuzione dei dati risulta più ampia e caratterizzata da valori mediamente più elevati, mentre al tempo T5 si osserva una riduzione della percentuale di cellule cometa, accompagnata da una minore dispersione dei dati. Sebbene siano presenti alcuni valori elevati in entrambi i gruppi, la maggior parte delle osservazioni al T5 tende a concentrarsi su percentuali inferiori rispetto al T0.

L'analisi statistica mediante t-test di Welch per campioni indipendenti ha rilevato che tale differenza è altamente significativa ($t = 9,743$; $df = 34,95$; $p < 0,0001$, ***). In particolare, la percentuale media di cellule cometa è risultata pari a 48,47% al T0 e a 19,49% al T5, con una differenza media di -28,98%.

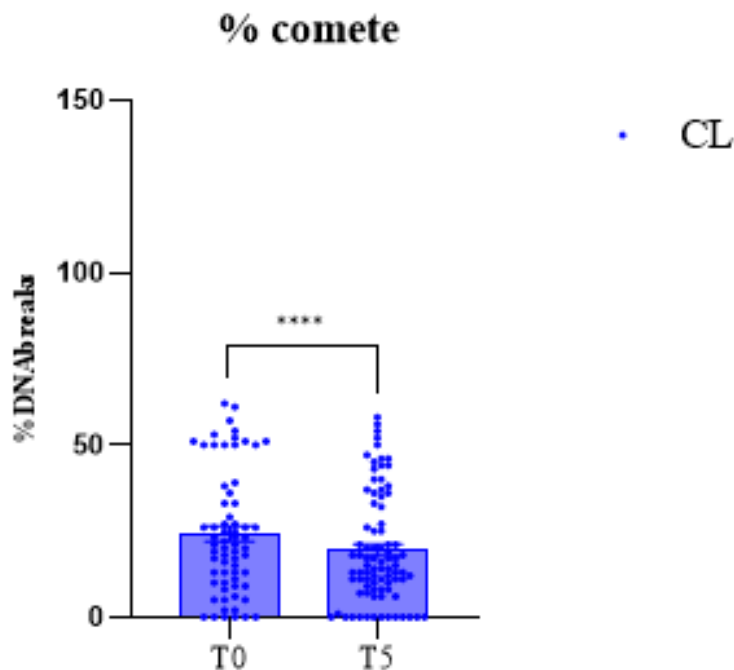


Grafico 2. Percentuale di DNA breaks (% comete) nei pazienti con sindrome di Cornelia de Lange (CL): confronto tra i tempi T0 e T5. L'analisi statistica è stata eseguita mediante Welch's unpaired t-test (= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$).*

Infine, abbiamo ripetuto l'analisi prendendo in considerazione i tempi T1 e T5, come riportato nel grafico 3 dove si osserva un incremento del valore medio della percentuale di DNA breaks al tempo T5 rispetto al tempo T1, accompagnato da un'elevata variabilità interindividuale, particolarmente evidente al tempo T5. Alcuni soggetti presentano infatti valori sensibilmente superiori alla media.

Nel complesso, questi dati suggeriscono un aumento del danno al DNA tra T1 e T5 nei pazienti con sindrome di Cornelia de Lange, come confermato anche dall'analisi statistica mediante t-test di Welch per campioni indipendenti che evidenzia la presenza di una differenza altamente significativa tra i due time point ($t = 4,057$; $df = 183,9$; $p < 0,0001$, ****): infatti, la percentuale media di cellule cometa è aumentata da 33,99% al T1 a 53,82% al T5, con una differenza media di 19,83%.

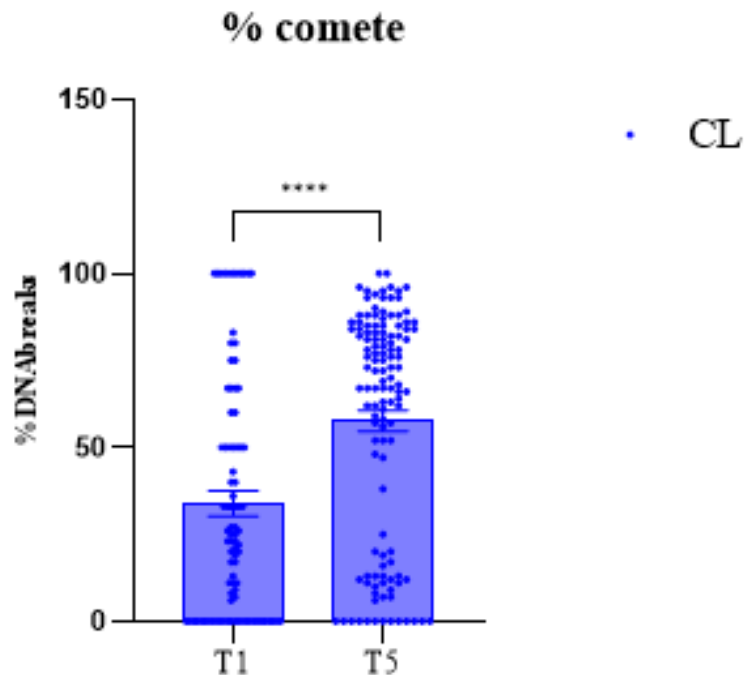


Grafico 3. Percentuale di DNA breaks (%comete) nei pazienti con sindrome di Cornelia de Lange (CL): confronto tra i tempi T1 e T5. L'analisi statistica è stata eseguita mediante Welch's unpaired t-test (= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$).*

5.2 L'ANALISI DELLA TAIL LENGTH CONFERMA UN'ELEVATA ETEROGENEITÀ DEL DANNO AL DNA

Per valutare il danno al DNA, è stata inoltre effettuata un'analisi comparativa dei valori di Tail Length (TailLen), parametro che rappresenta la lunghezza della coda delle comete misurata mediante il software ImageJ, nei nove pazienti affetti da sindrome di Cornelia de Lange (CL_001, CL_002, CL_003, CL_004, CL_005, CL_006, CL_007, CL_008 e CL_010). Le misurazioni sono state eseguite nei diversi time point previsti dallo studio (T0, T1, T3, T4, T5 e T6, ove disponibili). Come riportato nella Figura 16, ciascun punto corrisponde a una singola osservazione, mentre la barra orizzontale rappresenta la media $\pm$ errore standard.

L'analisi dettagliata dei grafici mostrati in Figura 16 evidenzia che, nel paziente CL_001, sono disponibili misurazioni ai tempi T1 e T3. I valori di Tail Length risultano distribuiti entro un intervallo simile nei due time point, sebbene si osservi una lieve tendenza

all'aumento della media al tempo T3. In entrambi i prelievi è inoltre presente una moderata variabilità dei dati individuali. L'analisi statistica tra i due tempi non evidenzia differenze significative ($p=0,5410$, ns).

Per il paziente CL_002 sono disponibili misurazioni ai tempi T1, T3, T5 e T6. I valori registrati ai tempi T1 e T3 risultano relativamente elevati e sono caratterizzati da una marcata dispersione. Al tempo T5 si osserva una diminuzione della lunghezza media della coda delle comete rispetto ai primi due prelievi, mentre al T6 la media mostra un lieve incremento rispetto al T5, pur essendo quest'ultimo rappresentato da un numero limitato di osservazioni. L'analisi statistica mostra una differenza significativa tra T1 e T5 ($p=0,0021$, **) e tra T3 e T5 ($p=0,0105$, *), mentre il confronto tra T1 e T3 risulta non significativo ($p=0,6931$, ns).

Nel paziente CL_003 sono stati analizzati i time point T1, T5 e T6. I valori di Tail Length si mantengono complessivamente elevati in tutte le determinazioni. Rispetto al T1, si evidenzia una riduzione della media al tempo T5, seguita da un successivo incremento al T6, associato a una moderata variabilità intra-campione. Tuttavia, le differenze tra i vari tempi non risultano statisticamente significative, indicando un andamento sostanzialmente stabile ($p_{T1-T5}=0,2539$, $p_{T1-T6}=0,8469$, $p_{T5-T6}=0,6289$).

Per il paziente CL_004 sono disponibili misurazioni ai tempi T0, T1, T5 e T6. Il time point T1 presenta la maggiore dispersione dei dati, comprendendo anche alcuni valori particolarmente elevati rispetto agli altri tempi di osservazione. Al T5 si rileva una riduzione della lunghezza media della coda, mentre al T6 si osserva un nuovo incremento della media, accompagnato da una moderata variabilità dei dati. L'analisi statistica evidenzia una differenza significativa tra T1 e T5 ($p=0,118$, *), mentre i confronti T0-T1, T5-T6, T0-T5, T0-T6 e T1-T6 risultano non significativi (rispettivamente $p=0,1434$; $0,3358$; $0,5511$; $0,8239$; $0,1728$).

Nel paziente CL_005 sono disponibili misurazioni ai tempi T1, T5 e T6. Il confronto tra T5 e T6 evidenzia un incremento della lunghezza media della coda delle comete al T6 rispetto al T5, associato a una maggiore concentrazione dei valori attorno alla media. Tale aumento risulta statisticamente altamente significativo ($p=0,0007$, ***).

Per il paziente CL_006 sono riportate misurazioni ai tempi T3 e T6. Anche in questo caso si osserva un aumento statisticamente significativo ($p=0,0043$, **) della Tail

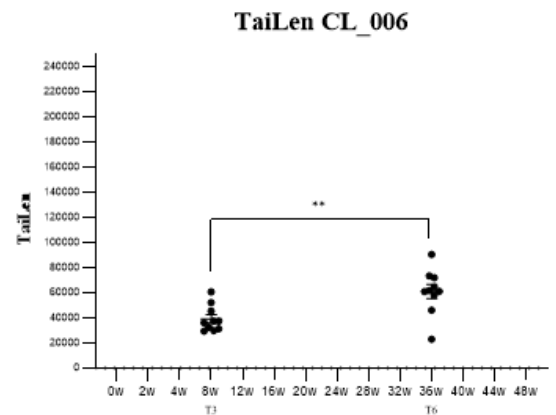
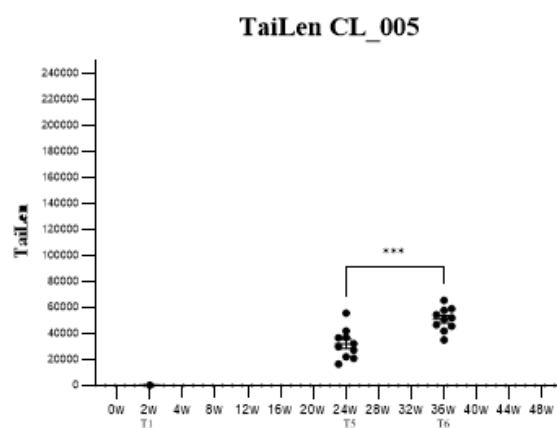
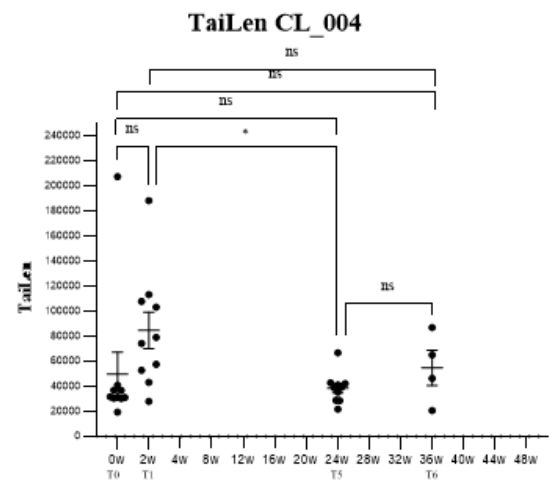
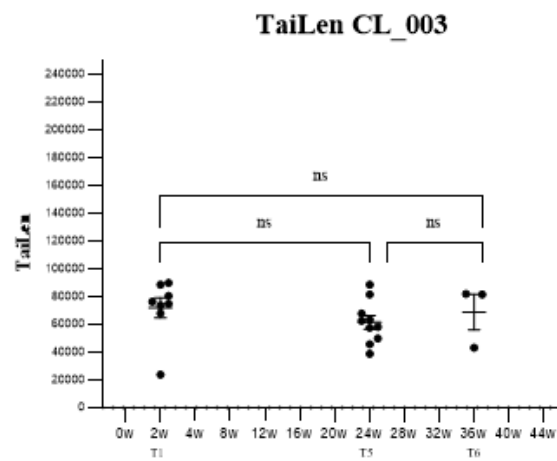
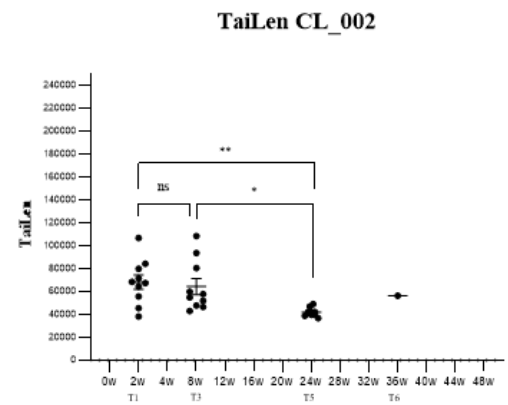
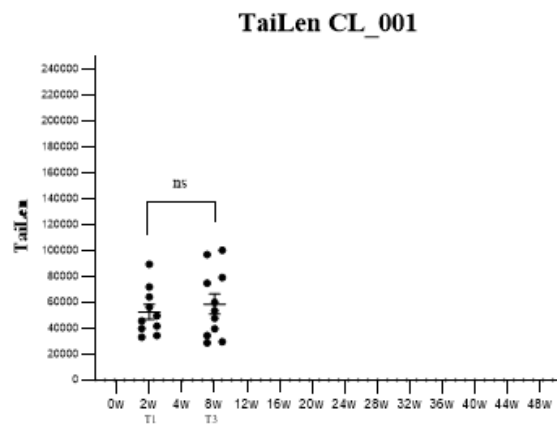
Length al tempo T6 rispetto al T3, accompagnato da una dispersione dei dati leggermente superiore.

Nel paziente CL_007 sono disponibili i time point T0, T4 e T5. Al tempo T0 i valori risultano pressoché assenti o estremamente ridotti, mentre nei successivi prelievi si osserva un netto incremento della lunghezza della coda sia al T4 sia al T5, con valori medi tra loro comparabili e una moderata dispersione dei dati individuali, come osservato nell'analisi statistica che non ha evidenziato alcuna differenza significativa tra questi tempi ($p_{T4-T5} = 0,2085$, ns). Al contrario, il confronto tra T0 e T4 e T0 e T5 evidenzia una differenza altamente significativa ($p < 0,0001$, ****), confermando il netto aumento della Tail Length dopo il basale.

Per il paziente CL_008 sono disponibili misurazioni ai tempi T3, T4 e T5. I valori di Tail Length risultano relativamente elevati in tutti i time point considerati. Dopo un lieve incremento osservabile tra T3 e T4, al tempo T5 si evidenzia una riduzione della media. Tuttavia, l'elevata variabilità intercellulare comporta l'assenza di differenze statisticamente significative tra i diversi time point ($p_{T4-T5} = 0,0988$ e $p_{T3-T5} = 0,5524$), ad eccezione del confronto tra i tempi T3-T4 ($p = 0,0478$, *)

Il paziente CL_010 presenta misurazioni ai tempi T0, T3 e T5. I valori di Tail Length si mantengono sostanzialmente stabili durante l'intero periodo di osservazione, mostrando soltanto variazioni di modesta entità e una limitata dispersione dei dati. Tutti i confronti statistici risultano non significativi ($p_{T0-T3} = 0,915$; $p_{T3-T5} = 0,0763$; $p_{T0-T5} = 0,8649$).

Nel complesso, l'analisi della Tail Length mette in evidenza un'elevata eterogeneità sia tra i diversi pazienti sia tra i differenti time point analizzati. Alcuni soggetti, come CL_005 e CL_006, mostrano un progressivo incremento della lunghezza della coda nel corso del follow-up, mentre altri, come CL_002 e CL_008, evidenziano una riduzione in specifici intervalli temporali. In altri casi, quali CL_001, CL_003 e CL_010, i valori rimangono sostanzialmente stabili nel tempo. Una marcata variabilità intra-individuale è riscontrabile nella maggior parte dei pazienti analizzati, sebbene con ampiezza differente tra i vari time point. Tale variabilità risulta particolarmente evidente nel paziente CL_004, che presenta alcuni valori estremamente elevati al primo prelievo, e nel paziente CL_008, caratterizzato da un'ampia distribuzione dei dati in tutti i campioni esaminati.



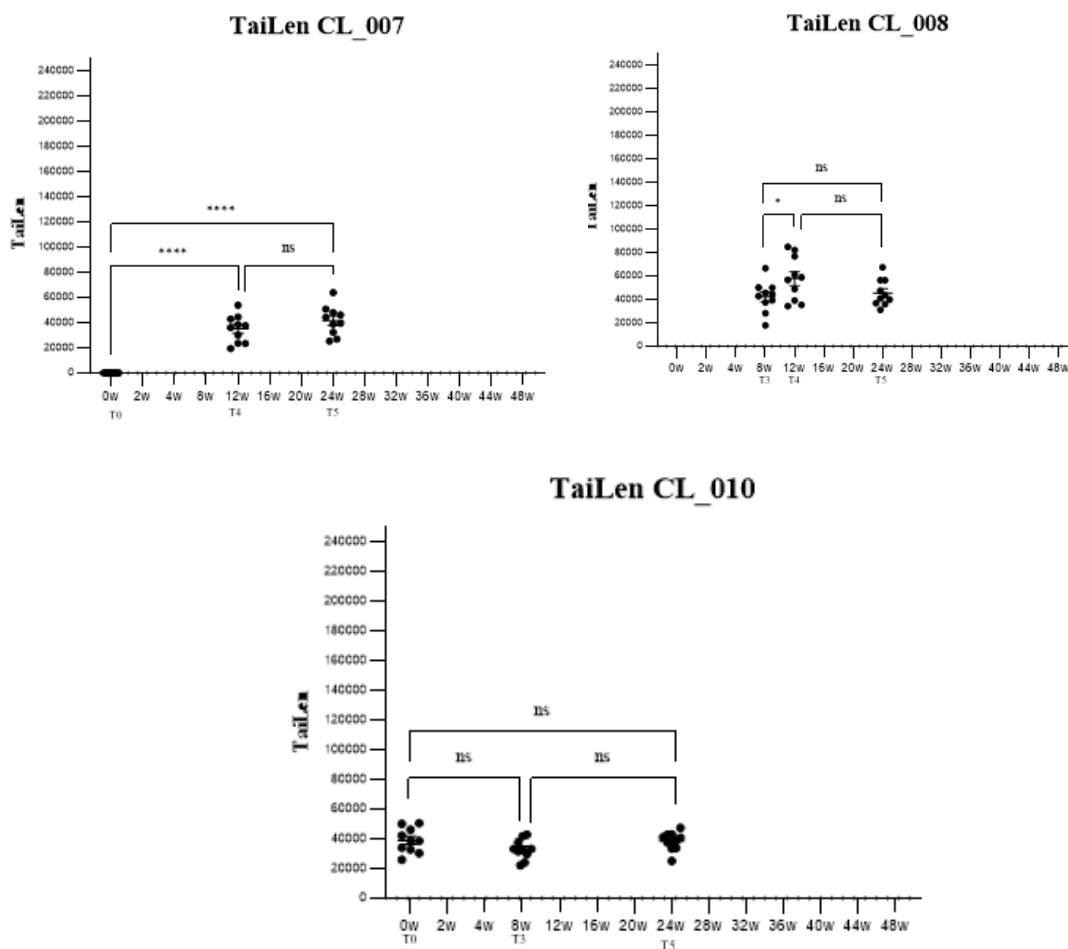


Figura 16. Lunghezza della coda delle comete (Tail Length) nei pazienti con sindrome di Cornelia de Lange. L'analisi statistica è stata eseguita mediante Welch's unpaired t-test (= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$), valutando per ciascun paziente confronti a due a due (pairwise comparisons) tra tutti i time point disponibili.*

5.3 L'ANDAMENTO DEL TAIL MOMENT RISULTA ETEROGENEO NEI PAZIENTI CDLS

Nella Figura 17 abbiamo ripetuto la stessa analisi prendendo in considerazione i valori del parametro Tail Moment (momento della coda) nei nove pazienti affetti da sindrome di Cornelia de Lange (CL_001, CL_002, CL_003, CL_004, CL_005, CL_006, CL_007, CL_008 e CL_010) ai diversi time point dello studio (T0, T1, T3, T4, T5 e T6, ove

disponibili). Ogni punto rappresenta una singola osservazione sperimentale; le barre indicano la media $\pm$ errore standard.

Più nello specifico, nel paziente CL_001 sono disponibili misurazioni ai tempi T1 e T3. I valori di Tail Moment risultano generalmente contenuti in entrambi i time point, con una lieve tendenza all'aumento della media al tempo T3 rispetto al T1 e una moderata variabilità intra-campione, dovuta alla presenza di alcuni valori più elevati. Il confronto statistico tra i due tempi non evidenzia differenze significative ($p = 0,3983$, ns).

Per il paziente CL_002 sono riportati i dati ai tempi T1, T3, T5 e T6. I valori osservati ai tempi T1 e T3 mostrano una moderata variabilità, mentre ai tempi T5 e T6 il Tail Moment risulta complessivamente inferiore e distribuito in un intervallo più ristretto. L'analisi statistica evidenzia una differenza significativa tra T3 e T5 ($p = 0,0280$, *), mentre il confronto tra T1 e T3 ($p = 0,0740$, ns) e quello tra T1 e T5 ($p = 0,0855$, ns) non risultano significativi.

Nel paziente CL_003 sono disponibili i time point T1, T5 e T6. I valori di Tail Moment risultano relativamente bassi in tutte le determinazioni. Si osserva un lieve incremento del valore medio a T5 rispetto a T1, seguito da una riduzione a T6. Il confronto tra T5 e T6 è risultato statisticamente significativo ($p = 0,0380$; *), mentre i confronti T1–T5 e T1–T6 non hanno raggiunto la significatività statistica (rispettivamente, $p = 0,6624$ e $p = 0,0806$).

Per il paziente CL_004 sono disponibili misurazioni ai tempi T0, T1, T5 e T6. Il tempo T1 presenta la maggiore variabilità, con la presenza di alcuni valori particolarmente elevati rispetto agli altri time point. Nei successivi time point (T5 e T6) il Tail Moment risulta notevolmente inferiore e distribuito in un intervallo più ristretto. Nonostante l'evidente differenza osservabile a livello descrittivo, tutti i confronti statistici riportati nella figura 17 risultano non significativi (rispettivamente $p_{T0-T1} = 0,7812$; $p_{T1-T5} = 0,1191$; $p_{T5-T6} = 0,5801$, $p_{T0-T5} = 0,3733$; $p_{T0-T6} = 0,3951$; $p_{T1-T6} = 0,1309$), verosimilmente a causa dell'elevata variabilità dei dati.

Nel paziente CL_005 sono riportati i dati relativi ai time point T1, T5 e T6. I valori di Tail Moment risultano complessivamente bassi in tutti i prelievi e mostrano una variabilità intra-campione contenuta. A T6 si osserva una lieve riduzione della media rispetto a T5; tuttavia, il confronto tra i due time point non evidenzia una differenza statisticamente significativa ($p = 0,1303$; ns).

Per il paziente CL_006 sono disponibili misurazioni ai tempi T3 e T6. I valori di Tail Moment risultano superiori al tempo T6 rispetto al T3, con una moderata dispersione dei dati e la presenza di alcuni valori più elevati, senza però alcuna significatività statistica ($p = 0,3260$, ns).

Nel paziente CL_007 sono riportate misurazioni ai tempi T0, T4 e T5. Al tempo T0 i valori risultano molto bassi, mentre ai successivi time point si osserva un lieve incremento del Tail Moment, più evidente al tempo T5. La variabilità rimane comunque contenuta. L'analisi statistica evidenzia una differenza significativa tra T0 e T4 ($p = 0,0011$, **) e tra T0 e T5 ($p = 0,0358$, *), mentre il confronto tra T4 e T5 risulta non significativo ($p = 0,5033$, ns).

Per il paziente CL_008 sono disponibili misurazioni ai tempi T3, T4 e T5. I valori risultano moderatamente elevati al tempo T4 rispetto al T3, mentre al tempo T5 si osserva una lieve riduzione della media. In tutti i prelievi è presente una moderata dispersione dei dati individuali. Dal punto di vista statistico, il confronto tra T3 e T4 risulta significativo ($p = 0,0252$, *), mentre i confronti T3-T5 ($p = 0,2195$, ns) e T4-T5 ($p = 0,1924$, ns) non evidenziano differenze significative.

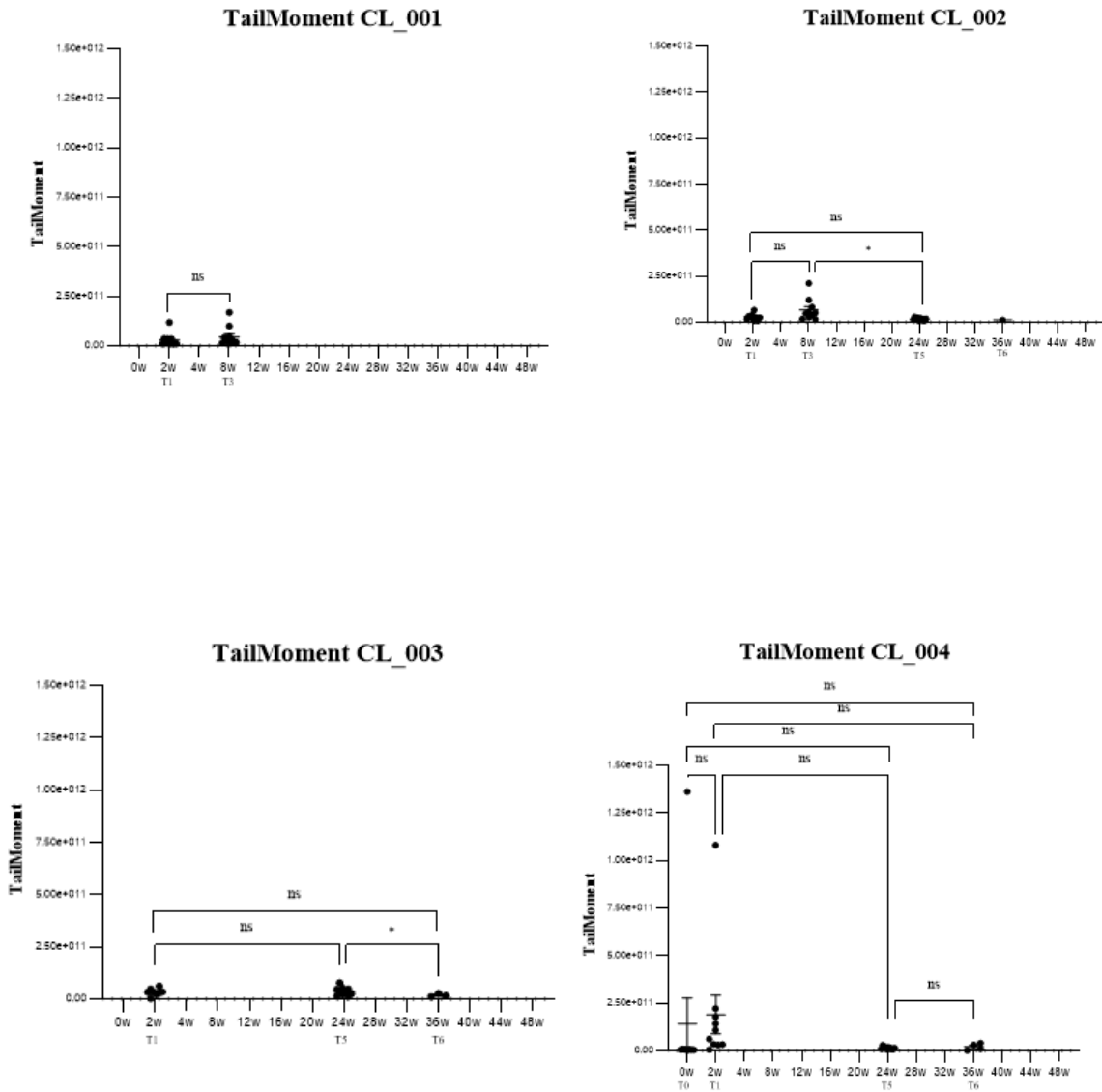
Nel paziente CL_010 sono disponibili misurazioni ai tempi T0, T3 e T5. Il Tail Moment rimane sostanzialmente stabile durante il periodo di osservazione, con valori medi simili tra i diversi time point e una limitata variabilità dei dati. Tutti i confronti statistici risultano non significativi (rispettivamente $p_{T0-T3} = 0,6424$; $p_{T3-T5} = 0,3713$, $p_{T0-T5} = 0,6972$).

Nel complesso, anche l'analisi del Tail Moment, così come quella della TailLength, evidenzia una marcata eterogeneità tra i pazienti con sindrome di Cornelia de Lange, sia in termini di valori medi sia di distribuzione delle singole osservazioni. Nella maggior parte dei soggetti i valori rimangono relativamente contenuti durante il follow-up, sebbene siano presenti variazioni individuali tra i diversi time point.

Dunque, tali variazioni osservate risultano prevalentemente paziente-specifiche e, nella maggior parte dei casi, non raggiungono la significatività statistica, ad eccezione del paziente CL_002 che mostra una riduzione significativa del Tail Moment tra T3 e T5, mentre nel paziente CL_008 si osserva un lieve ma significativo aumento tra T3 e T4. Negli altri pazienti (CL_001, CL_004, CL_005, CL_006 e CL_010) non emergono

differenze statisticamente significative tra i diversi time point, nonostante in alcuni casi siano osservabili variazioni descrittive delle medie o della dispersione dei dati.

In generale, quindi, possiamo affermare che non emerge una tendenza comune a tutti i pazienti nel corso del follow-up. I dati evidenziano piuttosto un'elevata variabilità interindividuale e interindividuale e intraindividuale del parametro Tail Moment, con differenze sia tra i soggetti sia tra i diversi time point analizzati.



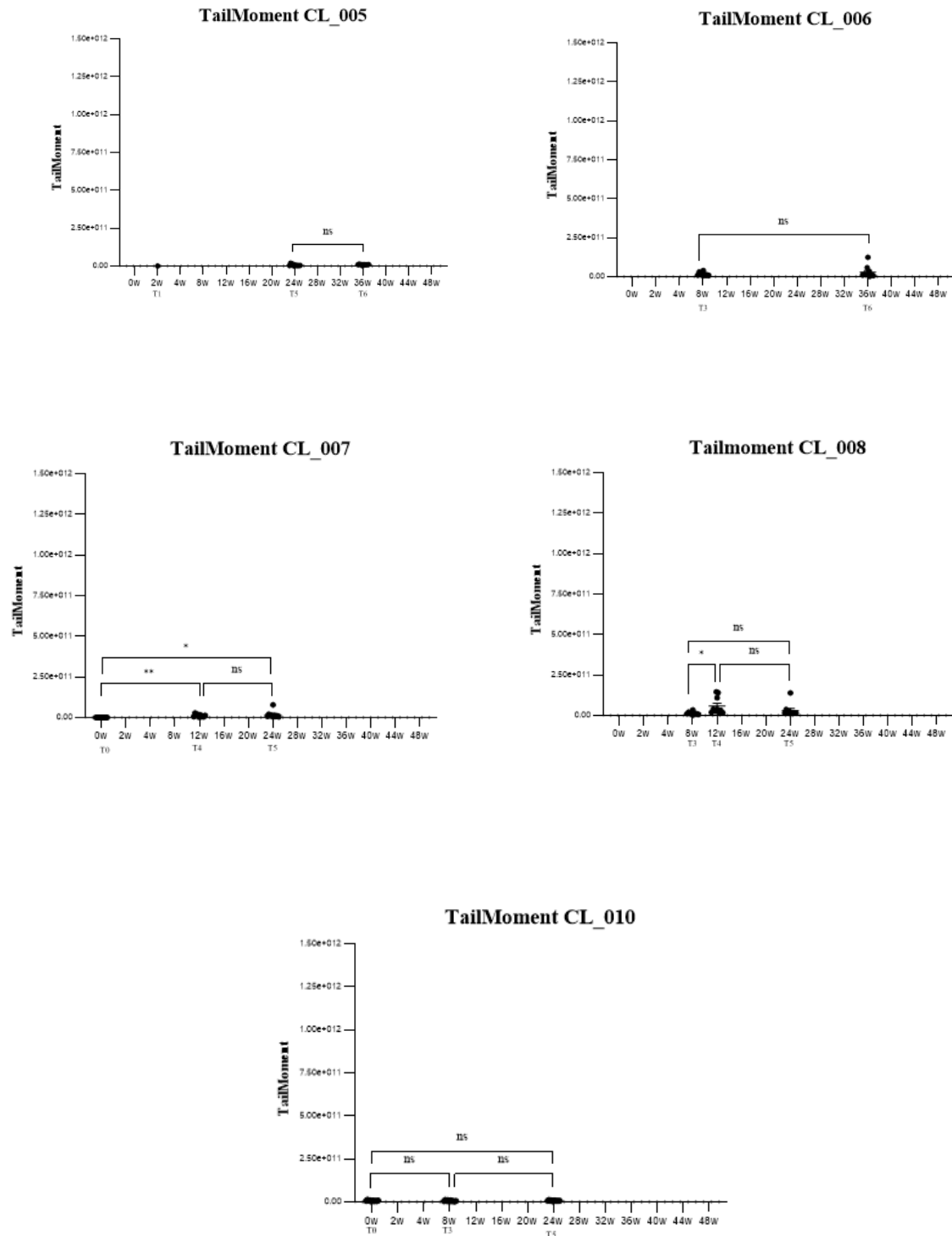


Figura 17. Momento della coda delle comete (Tail Moment) nei pazienti con sindrome di Cornelia de Lange. L'analisi statistica è stata eseguita mediante Welch's unpaired t-test (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$), valutando per ciascun paziente confronti a due a due (pairwise comparisons) tra tutti i time point disponibili.

5.4 LA PERCENTUALE DI DNA NELLA CODA RIMANE GENERALMENTE ELEVATA E STABILE NEI PAZIENTI CDLS

Infine, abbiamo analizzato i valori dell'ultimo parametro, la %Tail DNA, ovvero la percentuale di DNA contenuto nella coda delle comete dei nove pazienti con sindrome di Cornelia de Lange ai diversi time point dello studio (T0, T1, T3, T4, T5 e T6, ove disponibili). Ogni punto rappresenta una singola osservazione sperimentale, mentre le barre indicano la media $\pm$ errore standard, come riportato nella Figura 18.

In particolare, nel paziente CL_001 sono disponibili misurazioni ai tempi T1 e T3. I valori della percentuale di Tail DNA risultano elevati e pressoché sovrapponibili nei due time point; infatti, non vi è significatività statistica tra i due time point ($p = 0,3830$, ns). La distribuzione dei dati evidenzia una limitata variabilità, con la maggior parte delle osservazioni concentrata intorno alla media.

Per il paziente CL_002 sono disponibili i dati ai tempi T1, T3, T5 e T6. La percentuale di Tail DNA rimane generalmente elevata durante tutto il periodo di osservazione. Si osserva una lieve riduzione della media al tempo T5 rispetto ai precedenti prelievi, seguita da un incremento al T6, con valori nuovamente confrontabili con quelli iniziali. Dal punto di vista statistico, la riduzione osservata al T5 risulta significativa sia nel confronto T1-T5 ($p < 0,0001$, ****) sia nel confronto T3-T5 ($p = 0,0005$, ***), mentre l'altro confronto tra T1-T3 non è significativo ($p = 0,0787$, ns).

Nel paziente CL_003 sono riportate misurazioni della % Tail DNA ai time point T1, T5 e T6. I valori risultano complessivamente comparabili nei tre prelievi. Si osserva un lieve incremento del valore medio a T5 rispetto a T1, seguito da una modesta riduzione a T6. Il tempo T1 mostra una maggiore dispersione dei dati, dovuta soprattutto alla presenza di un valore individuale più basso. Tuttavia, nessuno dei confronti effettuati risulta statisticamente significativo: T1-T5 ($p = 0,2612$), T5-T6 ($p = 0,7484$) e T1-T6 ($p = 0,3759$).

Per il paziente CL_004 sono disponibili misurazioni ai tempi T0, T1, T5 e T6. I valori della percentuale di Tail DNA risultano elevati in tutti i time point. Si osserva una lieve diminuzione della media al tempo T5 rispetto ai prelievi iniziali, seguita da un incremento al T6. La variabilità dei dati appare maggiore al tempo T1, mentre nei successivi controlli i valori risultano più omogenei. Nonostante tali differenze descrittive, tutti i confronti statistici riportati risultano non significativi ($p_{T0-T1} = 0$,

8629, $p_{T1-T5} = 0,6400$; $p_{T5-T6} = 0,4511$, $p_{T0-T5} = 0,3545$, $p_{T0-T6} = 0,9198$; $p_{T1-T6} = 0,9258$).

Nel paziente CL_005 sono disponibili misurazioni ai tempi T1, T5 e T6. Dopo un valore iniziale relativamente inferiore al tempo T1, la percentuale di Tail DNA aumenta al T5 e mostra un ulteriore lieve incremento al T6. I dati risultano distribuiti in maniera piuttosto uniforme. L'incremento osservato tra T5 e T6 risulta statisticamente significativo ($p = 0,0051$, **).

Per il paziente CL_006 sono riportati i valori ai tempi T3 e T6. Si osserva un incremento della percentuale di Tail DNA al tempo T6 rispetto al T3, accompagnato da una limitata variabilità tra le osservazioni. Tale aumento risulta statisticamente altamente significativo ($p = 0,0005$, ***).

Nel paziente CL_007 sono disponibili misurazioni ai tempi T0, T4 e T5. I valori della percentuale di Tail DNA risultano elevati in tutti i campioni. Al tempo T4 si osserva una lieve riduzione della media rispetto al T0, mentre al tempo T5 il parametro aumenta nuovamente raggiungendo valori comparabili o leggermente superiori a quelli iniziali. L'analisi statistica evidenzia una differenza significativa tra T0 e T4 ($p = 0,0112$, *), mentre il confronto tra T4 e T5 risulta altamente significativo ($p = 0,0064$, **). Il confronto tra T0 e T5 non evidenzia invece differenze significative ($p = 0,8932$, ns).

Per il paziente CL_008 sono disponibili misurazioni ai tempi T3, T4 e T5. I valori della percentuale di Tail DNA risultano elevati e relativamente stabili durante tutto il periodo di osservazione. Si osserva un lieve incremento al tempo T4, seguito da una modesta riduzione al T5, senza sostanziali variazioni dell'andamento complessivo. Tuttavia, solo il confronto tra T3 e T4 risulta statisticamente significativo ($p = 0,0237$, *), mentre i restanti confronti T4-T5 ($p = 0,0751$, ns) e T3-T5 ($p = 0,2435$, ns).

Nel paziente CL_010 sono riportati i dati ai tempi T0, T3 e T5. La percentuale di Tail DNA rimane sostanzialmente costante nei diversi time point, con valori medi molto simili e una moderata dispersione dei dati individuali. Tutti i confronti statistici risultano non significativi ($p_{T0-T3} = 0,5589$; $p_{T3-T5} = 0,0751$; $p_{T0-T5} = 0,0537$).

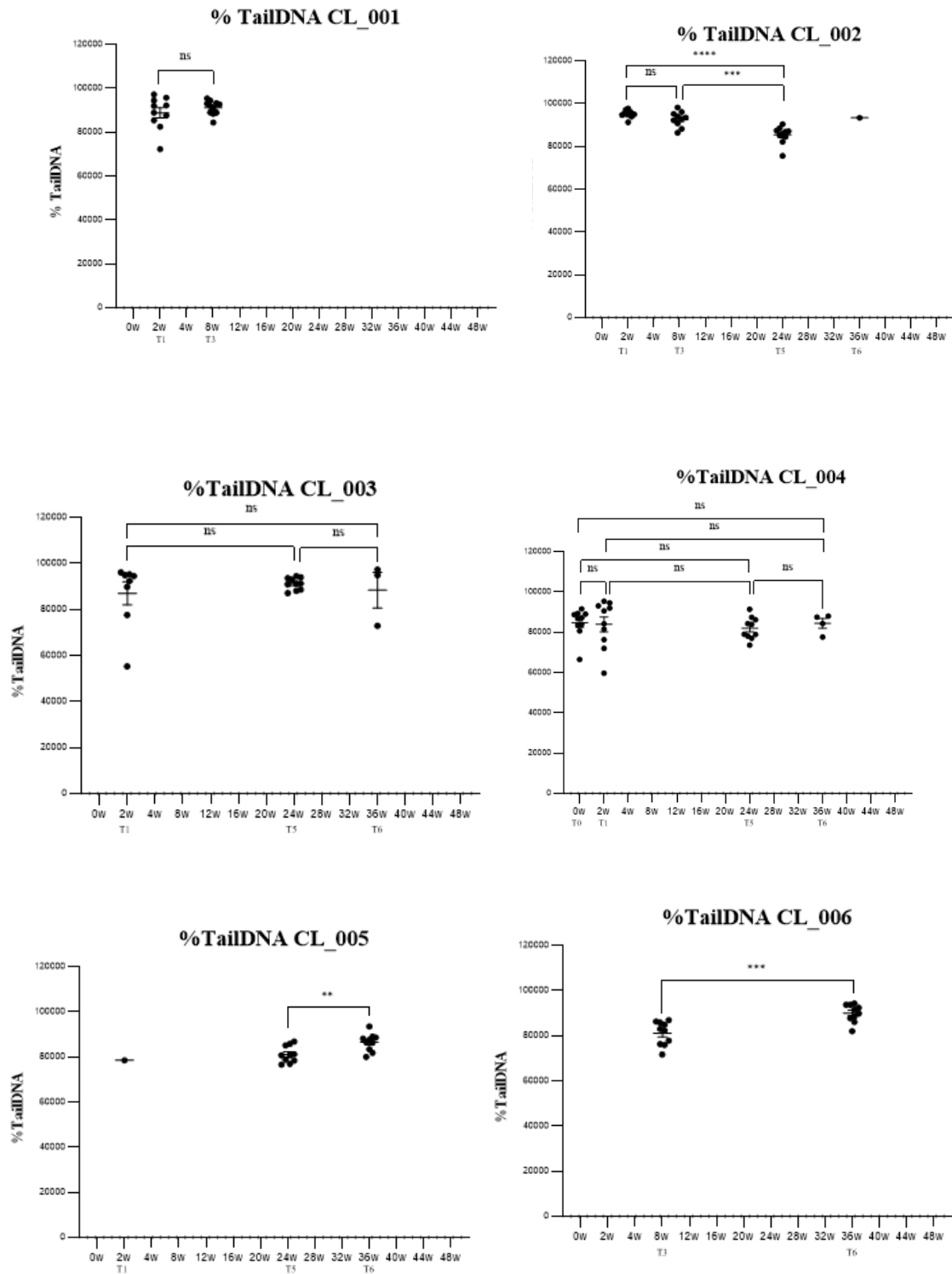
Sulla base di questi risultati, possiamo dichiarare che in generale l'analisi della percentuale di DNA presente nella coda delle comete evidenzia valori generalmente elevati in tutti i pazienti con sindrome di Cornelia de Lange e nei diversi time point considerati.

La variabilità intra-individuale risulta generalmente contenuta nella maggior parte dei pazienti, sebbene alcuni time point, in particolare il T1 dei pazienti CL_003 e CL_004, mostrino una maggiore dispersione delle osservazioni.

Nel complesso la maggior parte dei soggetti mostra una sostanziale stabilità del parametro nel corso del follow-up, con oscillazioni di modesta entità tra i diversi prelievi. Le differenze statisticamente significative risultano circoscritte ad alcuni pazienti.

In particolare, CL_002 mostra una significativa riduzione della % Tail DNA al T5 rispetto ai prelievi precedenti (T1-T5**** e T3-T5***), seguita da un recupero dei valori al T6. I pazienti CL_005 e CL_006 evidenziano un incremento significativo del parametro nei controlli successivi (T5-T6 e T3-T6, rispettivamente), mentre CL_007 presenta una riduzione significativa tra T0 e T4, seguita da un incremento significativo tra T4 e T5, con valori finali non differenti dal basale. Nei restanti pazienti (CL_001, CL_003, CL_004 e CL_010) non emergono differenze statisticamente significative tra i diversi time point.

Infine, anche in questo ultimo caso non emerge un andamento uniforme della percentuale di Tail DNA comune a tutti i soggetti analizzati, evidenziando una marcata eterogeneità individuale nella distribuzione del danno al DNA.



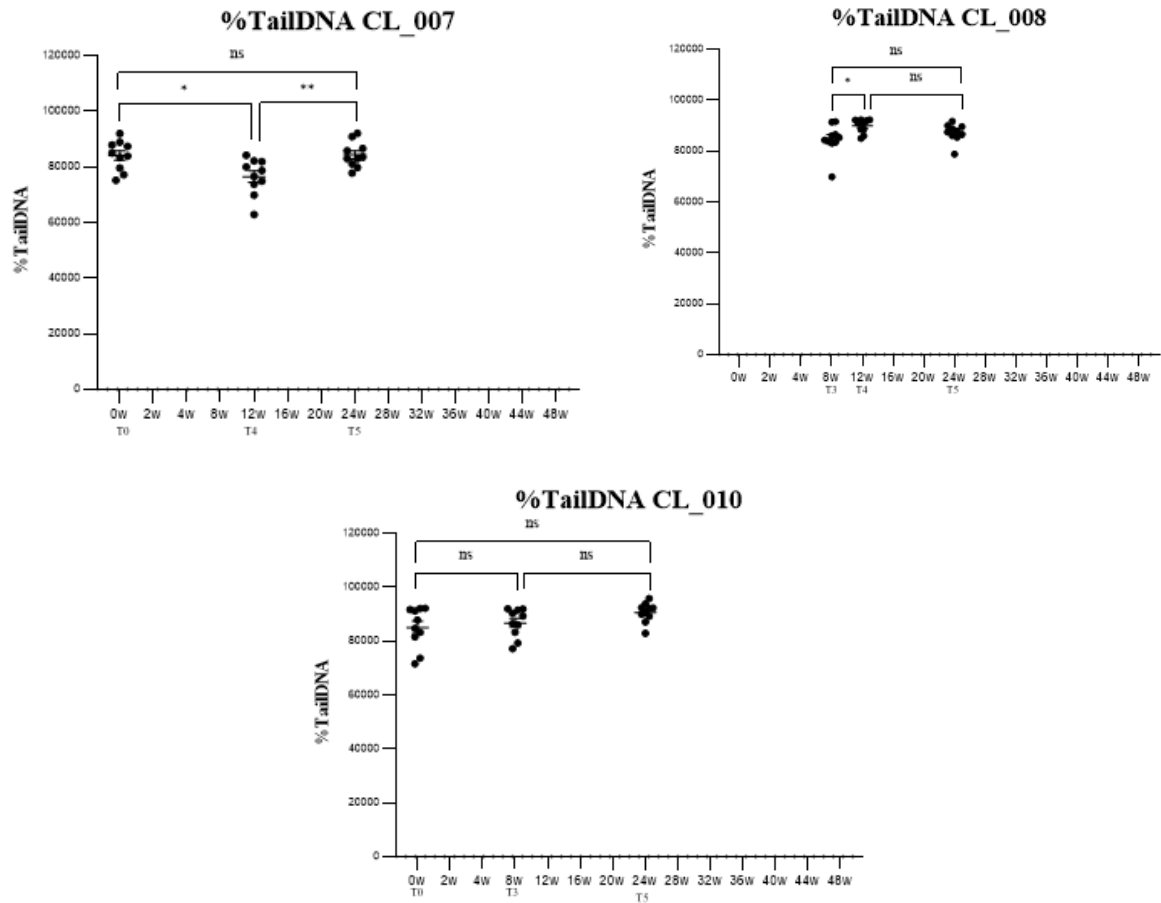


Figura 18. Percentuale di DNA nella coda delle comete (% Tail DNA) nei pazienti con sindrome di Cornelia de Lange. L'analisi statistica è stata eseguita mediante Welch's unpaired t-test ($=p < 0,05$; $=p < 0,01$; $=p < 0,001$; $=p < 0,0001$), valutando per ciascun paziente confronti a due a due (pairwise comparisons) tra tutti i time point disponibili.

6. DISCUSSIONE

L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare il livello di danno al DNA nei pazienti affetti da sindrome di Cornelia de Lange (CdLS) e in quelli affetti da sindrome di Kleeftstra (KS) mediante alkaline Comet Assay, tecnica ampiamente utilizzata per la rilevazione di rotture del DNA a singolo filamento, siti alcalino-labili e danno ossidativo a livello della singola cellula (Collins AR., 2004; Azqueta A. e Collins AR., 2013). Per una caratterizzazione più completa del danno genomico sono stati analizzati quattro differenti parametri: la percentuale di DNA breaks visualizzati come comete al microscopio a fluorescenza, la Tail Length, il Tail Moment e la percentuale di DNA presente nella coda della cometa (% Tail DNA).

Il primo dato emerso riguarda il confronto tra i tre gruppi sperimentali al basale (T0), ovvero i pazienti CdLS, i pazienti KLFs e i controlli CTR: la percentuale maggiore di DNA breaks è stata riscontrata nei pazienti affetti da sindrome di Kleeftstra rispetto ai pazienti con sindrome di Cornelia de Lange e ai controlli sani. I pazienti CdLS presentano valori intermedi, superiori rispetto ai controlli ma inferiori rispetto ai soggetti KS. Sebbene l'ampia variabilità osservata e la limitata numerosità del campione suggeriscano cautela nell'interpretazione dei dati, tali risultati indicano una maggiore suscettibilità al danno genomico nei pazienti affetti da entrambe le sindromi rispetto ai soggetti sani.

Per quanto riguarda il confronto tra i diversi time point nei pazienti con CdLS, l'analisi statistica ha evidenziato risultati apparentemente discordanti: il confronto tra T0 e T5 ha mostrato una significativa riduzione della percentuale di cellule cometa ($p < 0,0001$), mentre il confronto tra T1 e T5 ha evidenziato un incremento statisticamente significativo dello stesso parametro ($p < 0,0001$). Tali risultati potrebbero sembrare contrastanti se interpretati come una progressione temporale della medesima popolazione.

Tuttavia, è importante sottolineare che i due confronti sono stati effettuati su gruppi di pazienti non completamente sovrapponibili, poiché non è stato possibile ottenere campioni biologici da tutti i soggetti in ciascun time point. Pertanto, le differenze osservate riflettono il comportamento di sottogruppi differenti della coorte studiata e non consentono di descrivere un'evoluzione temporale univoca del danno al DNA nella

popolazione complessiva né di attribuire con certezza le variazioni osservate all'effetto del trattamento con carbonato di litio.

Questo aspetto rappresenta una delle principali limitazioni dello studio e deve essere considerato nell'interpretazione dei risultati. La ridotta numerosità campionaria e la difficoltà nel reperire campioni longitudinali completi costituiscono problematiche frequenti negli studi sulle malattie rare e limitano la possibilità di identificare un andamento temporale comune. Nonostante ciò, l'analisi evidenzia che il danno al DNA è presente nei pazienti con CdLS e che la sua entità può variare considerevolmente tra individui e tra i diversi momenti del follow-up.

L'analisi dei tre parametri quantitativi del Comet Assay (Tail Length, Tail Moment e % Tail DNA) conferma questa osservazione nei pazienti CdLS: infatti, nessuno dei parametri mostra un andamento temporale uniforme nei nove pazienti analizzati. Alcuni soggetti presentano un incremento dei valori nel corso del follow-up, altri una riduzione, mentre in diversi casi i parametri rimangono sostanzialmente stabili. Questa elevata variabilità rappresenta uno degli aspetti più rilevanti emersi dal presente lavoro.

Dal punto di vista biologico, tale eterogeneità appare plausibile considerando l'estrema variabilità clinica e genetica che caratterizza la sindrome di Cornelia de Lange. È noto, infatti, che la malattia è causata da mutazioni in diversi geni appartenenti al complesso delle coesine (*NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* e *HDAC8*), responsabili di differenti livelli di compromissione funzionale. Le alterazioni del complesso delle coesine non influenzano esclusivamente la segregazione cromosomica, ma svolgono un ruolo fondamentale nell'organizzazione tridimensionale della cromatina, nella regolazione dell'espressione genica e nei meccanismi di risposta al danno del DNA (Olley G. et al., 2021; Kline AD. et al., 2018; Musio A et al., 2006).

Di conseguenza, pazienti portatori di differenti varianti genetiche possono presentare una diversa capacità di mantenere la stabilità genomica. Come precedentemente trattato, negli ultimi anni numerosi studi ((Mannini et al., 2013; Cucco F. e Musio A., 2016) hanno evidenziato come la CdLS sia caratterizzata anche da un importante stato di stress ossidativo cronico. È stato dimostrato che cellule provenienti da pazienti CdLS presentano un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), associato ad alterazioni mitocondriali, incremento del danno ossidativo alle biomolecole e ridotta

efficienza dei sistemi antiossidanti (Mikołajczyk A, et al., 2024; Kumar R, et al., 2022). L'accumulo di ROS determina un aumento dei danni al DNA, favorendo la comparsa di rotture a singolo filamento e siti alcalino-labili, esattamente il tipo di danno rilevato mediante Comet Assay (Collins AR., 2004; Collins AR, 1997).

Olley e collaboratori hanno inoltre dimostrato che cellule derivate da pazienti con sindrome di Cornelia de Lange presentano un'attivazione persistente della risposta al danno del DNA (DNA Damage Response, DDR) e una ridotta efficienza dei processi di riparazione genomica (Olley G. et al., 2021). In particolare, è stata osservata una persistente fosforilazione di H2AX (γ -H2AX), indice di danno genomico, associata ad alterazioni dei meccanismi di ricombinazione omologa e riparo delle rotture del DNA (Olley G. et al., 2021). Queste osservazioni supportano l'ipotesi che il maggiore danno rilevato mediante Comet Assay possa essere la conseguenza non solo di una maggiore produzione di DNA breaks, ma anche di una ridotta capacità cellulare di eliminarli.

I risultati ottenuti nel presente studio sembrano essere coerenti con queste evidenze: la persistenza di valori elevati di % Tail DNA e degli altri parametri suggerisce la presenza di uno stato relativamente stabile di instabilità genomica. È possibile che il danno al DNA rappresenti una caratteristica cronica della malattia piuttosto che un fenomeno evolutivo rapidamente progressivo.

Tra i parametri analizzati, la % Tail DNA appare quello maggiormente stabile: infatti, nel presente studio, sebbene alcuni pazienti presentino variazioni statisticamente significative nel corso del follow-up, la maggior parte dei soggetti mantiene valori relativamente elevati e comparabili nei diversi time point. Questo andamento suggerisce che il livello di danno genomico rimanga sostanzialmente stabile durante il periodo di osservazione: questo dato è particolarmente interessante poiché la %Tail DNA è considerata il parametro quantitativo più robusto e riproducibile del Comet Assay. Infatti, secondo Collins e collaboratori, essa rappresenta il miglior indicatore della quantità di DNA migrato nella coda della cometa ed è direttamente proporzionale all'entità delle rotture del DNA (Collins AR., 2004; Azqueta A. e Collins AR., 2013).

Anche il Tail Length ha mostrato una notevole variabilità tra i pazienti: questo parametro riflette principalmente la distanza di migrazione dei frammenti di DNA durante l'elettroforesi e può essere influenzato dalla dimensione dei DNA breaks e dalla

distribuzione dei frammenti stessi. In alcuni soggetti, come CL_005 e CL_006, è stato osservato un incremento della lunghezza della coda nei controlli successivi, mentre altri pazienti hanno mostrato una riduzione o un andamento sostanzialmente stabile (Collins AR et al., 1997; Azqueta A. e Collins AR., 2013). Tuttavia, nella maggior parte dei casi, i confronti tra i diversi time point non raggiungono la significatività statistica, suggerendo che le variazioni osservate riflettano prevalentemente differenze biologiche individuali piuttosto che un effetto costante nel tempo. Considerata la sensibilità di questo parametro alle condizioni sperimentali, la sua interpretazione dovrebbe essere sempre integrata con quella della % Tail DNA.

Il Tail Moment, che rappresenta un parametro composito derivante dalla combinazione della lunghezza della coda e della quantità di DNA migrato, ha mostrato un comportamento analogo. Anche in questo caso non emerge un andamento comune a tutti i soggetti, ma piuttosto una marcata eterogeneità individuale, con differenze statisticamente significative limitate solo ad alcuni confronti specifici, mentre nella maggior parte dei pazienti il parametro rimane sostanzialmente stabile durante il follow-up.

Tale osservazione è in accordo con quanto riportato dall'International Comet Assay Working Group, secondo cui il Tail Moment, pur essendo un indice molto utilizzato, risulta generalmente più variabile rispetto alla % Tail DNA e maggiormente influenzato dalle condizioni sperimentali e dalla distribuzione dei danni al genoma (Collins AR. et al., 1997; Azqueta A. e Collins AR., 2013).

L'insieme di questi risultati dimostra come l'elevata variabilità clinica osservata tra i pazienti rappresenti uno degli aspetti più rilevanti del presente studio. Essa potrebbe riflettere molteplici fattori biologici, tra cui la gravità del fenotipo clinico, l'età dei pazienti, eventuali terapie farmacologiche, la presenza di processi infiammatori intercorrenti, lo stato nutrizionale e la diversa efficienza dei sistemi antiossidanti (Olley G. et al., 2021; Kumar R, et al., 2022).

Inoltre, la letteratura sottolinea come il Comet Assay presenti una fisiologica variabilità biologica, soprattutto quando viene applicato a cellule ematiche provenienti da differenti individui (Collins AR., 2004; Azqueta A. e Collins AR., 2013).

Per quanto riguarda il confronto con i pazienti affetti da sindrome di Kleeftstra, il maggiore danno osservato nel gruppo KS potrebbe essere correlato alle alterazioni

epigenetiche conseguenti alla perdita di funzione di EHMT1, una istone-metiltransferasi coinvolta nel mantenimento della struttura della cromatina. Sebbene gli studi disponibili siano ancora limitati, è stato ipotizzato che la deregolazione epigenetica possa influenzare indirettamente anche la stabilità genomica e la risposta al danno del DNA. Pertanto, i dati ottenuti rappresentano un interessante punto di partenza per futuri studi comparativi tra differenti sindromi dello sviluppo associate a difetti della regolazione cromatinica.

Tuttavia, il presente studio presenta limitazioni. La principale riguarda la ridotta numerosità del campione, inevitabile nel caso di malattie genetiche rare come la sindrome di Cornelia de Lange e la sindrome di Kleeftstra.

Inoltre, il numero di time point disponibili non è uniforme per tutti i pazienti, rendendo difficile un confronto diretto dell'evoluzione temporale del danno genomico e richiedendo l'analisi di sottogruppi parzialmente differenti.

Un'ulteriore limitazione è rappresentata dal fatto che il Comet Assay consente di quantificare il danno al DNA, ma non permette di distinguere se esso derivi prevalentemente da un incremento della produzione di rotture genomiche o da una ridotta capacità di riparazione di esse (Collins AR., 2004; Azqueta A. e Collins AR., 2013).

Nonostante tali limitazioni, i risultati ottenuti da questo studio contribuiscono ad ampliare le conoscenze sul danno genomico nella sindrome di Cornelia de Lange e nella sindrome di Kleeftstra. L'insieme dei risultati suggerisce che i pazienti presentino un aumentato livello di instabilità genomica rispetto ai controlli sani e che tale condizione sia caratterizzata da una notevole eterogeneità individuale. Studi futuri, condotti su casistiche più ampie e integrando il Comet Assay con biomarcatori di stress ossidativo (quali 8-idrossi-2'-deossiguanosina, malondialdeide o capacità antiossidante totale) e con l'analisi dei meccanismi molecolari di DNA damage response, potranno contribuire a chiarire ulteriormente il ruolo dello stress ossidativo e della compromissione dei sistemi di riparo del DNA nella fisiopatologia delle due sindromi (Olley G. et al., 2021; Kumar R. et al., 2022).

7. CONCLUSIONI

Il presente studio ha contribuito ad approfondire la valutazione del danno al DNA nei pazienti affetti da sindrome di Cornelia de Lange e nei pazienti affetti da sindrome di Kleefstra mediante l'impiego del Comet Assay, una metodica in grado di rilevare alterazioni dell'integrità genomica con elevata sensibilità (Collins AR., 2004; Azqueta A. e Collins AR., 2013).

Da una parte, il confronto tra i tre gruppi di studio ha evidenziato un aumento significativo della percentuale di cellule cometa nei pazienti affetti da entrambe le sindromi rispetto ai controlli sani, con valori significativamente più elevati nei pazienti con sindrome di Kleefstra rispetto ai pazienti con sindrome di Cornelia de Lange. Questi risultati confermano la presenza di un'aumentata instabilità genomica nelle due patologie e suggeriscono un coinvolgimento più marcato dei meccanismi responsabili del mantenimento dell'integrità del DNA nei pazienti KS.

Dall'altra, l'analisi congiunta dei diversi parametri considerati (% DNA breaks, Tail Length, Tail Moment e % Tail DNA) ha permesso di ottenere una visione complessiva dello stato del DNA nei pazienti inclusi nello studio: ciascuno di essi ha fornito informazioni complementari sul danno al DNA. In altre parole, la valutazione combinata dei diversi parametri ha consentito di descrivere il fenomeno in maniera più completa rispetto all'utilizzo di un singolo indice, confermando l'importanza di un'analisi multiparametrica nella caratterizzazione dell'integrità del DNA: la percentuale di cellule cometa ha consentito di stimare la frequenza del danno cellulare, mentre Tail Length, Tail Moment e % Tail DNA hanno permesso di caratterizzarne l'entità e le caratteristiche.

L'analisi longitudinale dei pazienti con CdLS non ha evidenziato un andamento temporale uniforme dei parametri studiati. Sebbene alcuni confronti abbiano mostrato differenze statisticamente significative, queste risultano limitate a specifici pazienti o a particolari intervalli temporali e non delineano una tendenza comune all'intera coorte. Analogamente, i confronti effettuati sulla percentuale di cellule cometa tra i diversi time point hanno evidenziato risultati differenti in funzione dei gruppi analizzati, verosimilmente influenzati dalla non completa sovrapposizione dei pazienti disponibili nei diversi momenti del follow-up. Pertanto, i dati ottenuti non consentono di attribuire con certezza le variazioni osservate all'evoluzione naturale della malattia o all'effetto del trattamento con carbonato di litio.

In ogni caso, nel complesso, i risultati mettono in evidenza una marcata eterogeneità sia interindividuale sia intraindividuale: alcuni pazienti mostrano un incremento dei parametri di danno nel corso del follow-up, altri una loro riduzione, mentre in numerosi casi i valori rimangono sostanzialmente stabili.

Tra i parametri analizzati, la % Tail DNA è risultata quello con l'andamento più costante, confermandosi il parametro quantitativo più stabile e riproducibile del Comet Assay, mentre Tail Length e Tail Moment hanno evidenziato una maggiore variabilità, in accordo con quanto riportato in letteratura (Collins AR., 2004; Azqueta A. e Collins AR., 2013).

Nonostante ciò, l'assenza di un trend comune durante il periodo di osservazione non riduce il valore dei risultati ottenuti, al contrario mette in evidenza la complessità biologica delle due sindromi.

Dunque, sebbene non sia stato possibile individuare un andamento temporale comune durante il follow-up, i risultati hanno evidenziato come il danno al DNA rappresenti un fenomeno comune e presente nei soggetti affetti, con una notevole variabilità sia intra sia interindividuale.

Questa eterogeneità, osservata sia tra pazienti diversi sia nei differenti time point dello stesso soggetto, suggerisce che l'instabilità genomica possa essere influenzata da molteplici fattori, tra cui il differente assetto genetico, la variabilità fenotipica tipica della sindrome e altri elementi biologici e clinici ancora non completamente chiariti (Kline AD. et al., 2018; Musio A. et al., 2006).

Tali osservazioni confermano la complessità di queste sindromi e dimostrano come la fisiopatologia alla base di esse non possa essere ricondotta esclusivamente al difetto del complesso delle coesine o alla mutazione nel gene EHMT1, ma coinvolga molteplici processi cellulari strettamente interconnessi.

Un aspetto di particolare interesse emerso da questo lavoro riguarda la sostanziale stabilità dei parametri del Comet Assay nel corso del follow-up: infatti, pur in presenza di oscillazioni individuali, non è stato osservato un progressivo incremento del danno al DNA, suggerendo che l'instabilità genomica possa rappresentare una caratteristica intrinseca della malattia piuttosto che un fenomeno progressivo nel periodo di osservazione considerato.

Dal punto di vista metodologico, il Comet Assay si è dimostrato uno strumento utile per lo studio del danno genomico nei pazienti con CdLS e KS (Collins AR., 2004; Azqueta A. e Collins AR., 2013). La valutazione combinata dei diversi parametri ha consentito di descrivere il fenomeno in maniera più completa rispetto all'utilizzo di un singolo indice, confermando l'importanza di un'analisi multiparametrica nella caratterizzazione dell'integrità del DNA.

Naturalmente, i risultati ottenuti devono essere interpretati alla luce di alcune limitazioni. La ridotta numerosità del campione, legata alla rarità della patologia, e la non omogenea disponibilità di campioni per tutti i time point rappresentano elementi che limitano la possibilità di generalizzare i risultati.

Inoltre, il Comet Assay fornisce una misura del danno al DNA in uno specifico momento biologico, ma non permette di identificare direttamente i meccanismi molecolari responsabili della sua insorgenza o della sua persistenza.

Nonostante queste limitazioni, il presente studio rappresenta uno dei pochi lavori che analizzano longitudinalmente il danno al DNA in pazienti affetti da sindrome di Cornelia de Lange e da sindrome di Kleefstra mediante Comet Assay e fornisce dati sperimentali che potranno costituire una base per studi futuri (Olley G. et al., 2021; Musio A. et al., 2006).

Sarà pertanto importante ampliare la casistica, includere un numero maggiore di controlli e integrare la valutazione del danno genomico con l'analisi di biomarcatori di stress ossidativo, funzionalità mitocondriale e attività dei sistemi di riparazione del DNA.

Un ulteriore aspetto di interesse riguarda la possibilità di correlare i parametri del Comet Assay con le caratteristiche cliniche e genetiche dei pazienti. L'identificazione di eventuali associazioni tra specifiche mutazioni, gravità del fenotipo e livello di danno genomico potrebbe contribuire a comprendere meglio la variabilità clinica che caratterizza entrambe le patologie e rappresentare un primo passo verso un approccio sempre più personalizzato allo studio della malattia. Un approccio integrato, infatti, consentirebbe di comprendere meglio i meccanismi patogenetici e di valutare l'eventuale impatto di strategie terapeutiche mirate alla riduzione dello stress ossidativo e al miglioramento dell'omeostasi cellulare.

In conclusione, questo studio conferma l'utilità del Comet Assay quale strumento di ricerca per la valutazione dell'integrità genomica. Sebbene siano necessari ulteriori studi

su popolazioni più ampie e con un monitoraggio longitudinale più uniforme, i risultati ottenuti rafforzano l'ipotesi che l'instabilità genomica rappresenti un elemento rilevante della CdLS e di KS e pongono le basi per future ricerche finalizzate a chiarire il significato biologico e clinico di tali alterazioni e a valutare l'efficacia di potenziali strategie terapeutiche mirate (Olley G. et al., 2021; Mikolajczyk A. et al., 2024).

8. RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo percorso, desidero dedicare alcune parole di sincera gratitudine a tutte le persone che, con il loro amore, la loro presenza e il loro sostegno, hanno reso possibile il raggiungimento di questo importante traguardo.

Il mio primo e più profondo ringraziamento va a Dio, che è stato la mia forza nei momenti di difficoltà, la mia guida nelle scelte e la mia speranza quando il cammino sembrava più impegnativo. La Sua presenza costante mi ha donato il coraggio di non arrendermi e di affrontare ogni ostacolo con fiducia. A Lui va tutta la mia riconoscenza per avermi accompagnata fino a questo momento.

Ringrazio con tutto il cuore i miei genitori, ai quali devo molto più di quanto le parole possano esprimere. Grazie per i sacrifici che avete affrontato con amore, per aver sempre creduto in me anche quando io stessa dubitavo delle mie capacità e per avermi insegnato il valore dell'impegno, dell'onestà e della perseveranza. Ogni traguardo raggiunto porta con sé una parte del vostro amore, della vostra educazione e del vostro esempio. Questa tesi è anche vostra.

Un ringraziamento speciale va alle mie amate sorelle, Estir e Nanne. Grazie per essere sempre state al mio fianco, per il vostro affetto, per gli incoraggiamenti e per aver condiviso con me gioie, difficoltà e momenti di crescita. Sapere di poter contare sul vostro sostegno è stato un dono prezioso che mi ha dato serenità e forza durante questo percorso. La vostra presenza nella mia vita rappresenta una ricchezza inestimabile.

Alla mia bimba, Rachele, voglio dedicare un pensiero speciale. Sei il dono più bello della mia vita e la motivazione più grande che mi spinge ogni giorno a dare il meglio di me stessa. Anche nei momenti più impegnativi, il tuo sorriso è stato la luce capace di restituirmi energia e speranza. Se talvolta il tempo dedicato allo studio mi ha sottratto momenti che avrei voluto trascorrere con te, aumentando i sensi di colpa dentro di me,

spero che un giorno tu possa comprendere che ogni sacrificio è stato fatto anche per offrirti un futuro e un esempio di determinazione, impegno e amore per i propri sogni.

Al mio amato marito, Kiri, sei stato il mio compagno di viaggio e il mio punto di riferimento durante tutto questo percorso. Grazie per la pazienza, per la comprensione, per avermi incoraggiata nei momenti di stanchezza e per aver creduto in me anche quando tutto sembrava difficile. Grazie per avermi fatto ridere e sorridere, non è scontato al giorno d'oggi avere un partner con il quale divertirsi e dividersi le responsabilità che la vita mette davanti ad ognuno di noi. Hai condiviso con me il peso dei sacrifici, sostenendomi con amore e serenità, permettendomi di continuare a credere in questo obiettivo. Senza il tuo supporto, questo traguardo sarebbe stato molto più difficile da raggiungere. Grazie per essere il fratello che non ho mai avuto, ma che ho sempre desiderato.

Desidero inoltre esprimere la mia più sincera gratitudine alla mia relatrice, la Prof.ssa Rossella Tricarico e al Laboratorio di Biologia Applicata e Genetica Medica dell'Università degli Studi di Milano, dove ho avuto l'opportunità di svolgere il mio tirocinio. Questa esperienza ha rappresentato un momento fondamentale del mio percorso formativo, permettendomi di crescere non solo dal punto di vista professionale, ma anche umano.

Un ringraziamento particolare va alla Prof.ssa Valentina Massa, per la fiducia accordatami, per la competenza, la disponibilità e la passione con cui mi ha guidata durante il tirocinio. Il suo esempio di professionalità, unito alla capacità di trasmettere conoscenze con entusiasmo e dedizione, ha rappresentato per me una fonte di ispirazione e un prezioso punto di riferimento.

Desidero ringraziare anche la Dott.ssa Chiara Parodi per la pazienza, la gentilezza e il costante supporto. Grazie per aver condiviso con me le Sue conoscenze, per avermi accompagnata con disponibilità nell'apprendimento delle attività di laboratorio e per aver reso questa esperienza così stimolante e significativa.

Infine, desidero ringraziare tutte le persone che, in modi diversi, hanno contribuito al mio percorso umano e accademico. Ogni parola di incoraggiamento, ogni gesto di affetto e ogni insegnamento ricevuto hanno lasciato un segno importante nella mia crescita personale e professionale.

9. BIBLIOGRAFIA

- Allanson, J. E., Hennekam, R. C., & Ireland, M. (1997). De Lange syndrome: subjective and objective comparison of the classical and mild phenotypes. *Journal of Medical Genetics*, 34(8), 645–650. <https://doi.org/10.1136/jmg.34.8.645>
- Alonso-Gil, D., & Losada, A. (2023). NIPBL and cohesin: new take on a classic tale. *Trends in Cell Biology*, 33(10), 860–871. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.03.006>
- Anastas, J. N., & Moon, R. T. (2013). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 13(1), 11–26. <https://doi.org/10.1038/nrc3419>
- Arbuzova, S., Nikolenko, M., Krantz, D., Hallahan, T., & Macri, J. (2003). Low first-trimester pregnancy-associated plasma protein-A and Cornelia de Lange syndrome. *Prenatal Diagnosis*, 23(10), 864. <https://doi.org/10.1002/pd.690>
- Arnould, C., Rocher, V., Finoux, A.-L., Clouaire, T., Li, K., Zhou, F., Caron, P., Mangeot, P. E., Ricci, E. P., Mourad, R., Haber, J. E., Noordermeer, D., & Legube, G. (2021). Loop extrusion as a mechanism for formation of DNA damage repair foci. *Nature*, 590(7847), 660–665. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03193-z>
- Avagliano, L., Grazioli, P., Mariani, M., Bulfamante, G. P., Selicorni, A., & Massa, V. (2017). Integrating molecular and structural findings: Wnt as a possible actor in shaping cognitive impairment in Cornelia de Lange syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0723-0>
- Avagliano, L., Parenti, I., Grazioli, P., di Fede, E., Parodi, C., Mariani, M., Kaiser, F. J., Selicorni, A., Gervasini, C., & Massa, V. (2020). Chromatinopathies: A focus on Cornelia de Lange syndrome. *Clinical Genetics*, 97(1), 3–11. <https://doi.org/10.1111/cge.13674>
- Aydin, H., Bucak, I. H., & Bagis, H. (2022). Kleeftstra Syndrome. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP*, 32(4), S76–S78. <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2022.Supp1.S76>
- Azqueta, A., & Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87(6), 949–968. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>

- Beratis, N. G., Hsu, L. Y., & Hirschhorn, K. (1971). Familial de Lange syndrome. Report of three cases in a sibship. *Clinical Genetics*, 2(3), 170–176.
- Bjornsson, H. T. (2015). The Mendelian disorders of the epigenetic machinery. *Genome Research*, 25(10), 1473–1481. <https://doi.org/10.1101/gr.190629.115>
- Bukowska-Olech, E., Majchrzak-Celińska, A., Przyborska, M., & Jamsheer, A. (2024). Chromatinopathies: insight in clinical aspects and underlying epigenetic changes. *Journal of Applied Genetics*, 65(2), 287–301. <https://doi.org/10.1007/s13353-023-00824-1>
- Callegari, A. J., & Kelly, T. J. (2007). Shedding light on the DNA damage checkpoint. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(6), 660–666. <https://doi.org/10.4161/cc.6.6.3984>
- Chien, R., Zeng, W., Ball, A. R., & Yokomori, K. (2011). Cohesin: a critical chromatin organizer in mammalian gene regulation. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 89(5), 445–458. <https://doi.org/10.1139/o11-039>
- Chong, K., Keating, S., Hurst, S., Summers, A., Berger, H., Seaward, G., Martin, N., Friedberg, T., & Chitayat, D. (2009). Cornelia de Lange syndrome (CdLS): prenatal and autopsy findings. *Prenatal Diagnosis*, 29(5), 489–494. <https://doi.org/10.1002/pd.2228>
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6), 1192–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>
- ClinicalTrials.gov. *Cornelia De Lange Syndrome: Assessing Positive Effects of Lithium Treatment* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); Identifier: NCT06789783. Available from: ClinicalTrials.gov – NCT06789783. Accessed July 8, 2026
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Collins, A. R., Dobson, V. L., Dusinská, M., Kennedy, G., & Stětina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375(2), 183–193. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(97\)00013-4](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00013-4)
- Cucco, F., & Musio, A. (2016). Genome stability: What we have learned from cohesinopathies. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 172(2), 171–178. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31492>

- Cukrov, D., Newman, T. A. C., Leask, M., Leeke, B., Sarogni, P., Patimo, A., Kline, A. D., Krantz, I. D., Horsfield, J. A., & Musio, A. (2018). Antioxidant treatment ameliorates phenotypic features of SMC1A-mutated Cornelia de Lange syndrome in vitro and in vivo. *Human Molecular Genetics*, 27(17), 3002–3011. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy203>
- Davidson, I. F., & Peters, J.-M. (2021). Genome folding through loop extrusion by SMC complexes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 22(7), 445–464. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00349-7>
- De, A. (2011). Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(10), 745–756. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr079>
- De Jaime-Soguero, A., Abreu de Oliveira, W. A., & Lluís, F. (2018). The Pleiotropic Effects of the Canonical Wnt Pathway in Early Development and Pluripotency. *Genes*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/genes9020093>
- De Lange, C. (1933). Sur un type nouveau de dégénérescence (Typus degenerativus Amstelodamensis). *Archives de Médecine des Enfants*, 36, 713–719.
- De, A. (2011). Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(10), 745–756. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr079>
- Deardorff, M. A., Kaur, M., Yaeger, D., Rampuria, A., Korolev, S., Pie, J., Gil-Rodríguez, C., Arnedo, M., Loeys, B., Kline, A. D., Wilson, M., Lillquist, K., Siu, V., Ramos, F. J., Musio, A., Jackson, L. S., Dorsett, D., & Krantz, I. D. (2007). Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation. *American Journal of Human Genetics*, 80(3), 485–494. <https://doi.org/10.1086/511888>
- Deardorff, M. A., Raible, S. E., & Krantz, I. D. (1993). *Cornelia de Lange Syndrome*.
- Deardorff, M. A., Wilde, J. J., Albrecht, M., Dickinson, E., Tennstedt, S., Braunholz, D., Mönnich, M., Yan, Y., Xu, W., Gil-Rodríguez, M. C., Clark, D., Hakonarson, H., Halbach, S., Michelis, L. D., Rampuria, A., Rossier, E., Spranger, S., van Maldergem, L., Lynch, S. A., ... Kaiser, F. J. (2012). RAD21 mutations cause a human cohesinopathy. *American Journal of Human Genetics*, 90(6), 1014–1027. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.04.019>

- Di Nardo, M., Krantz, I. D., & Musio, A. (2024). Genome Instability and Senescence Are Markers of Cornelia de Lange Syndrome Cells. *Cells*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/cells13232025>
- Dorsett, D., & Ström, L. (2012). The ancient and evolving roles of cohesin in gene expression and DNA repair. *Current Biology: CB*, 22(7), R240-50. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.046>
- DuVall, G. A., & Walden, D. T. (1996). Adenocarcinoma of the esophagus complicating Cornelia de Lange syndrome. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 22(2), 131–133. <https://doi.org/10.1097/00004836-199603000-00012>
- Fahrner, J. A., & Bjornsson, H. T. (2019). Mendelian disorders of the epigenetic machinery: postnatal malleability and therapeutic prospects. *Human Molecular Genetics*, 28(R2), R254–R264. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz174>
- Fazio, G., Gaston-Massuet, C., Bettini, L. R., Graziola, F., Scagliotti, V., Cereda, A., Ferrari, L., Mazzola, M., Cazzaniga, G., Giordano, A., Cotelli, F., Bellipanni, G., Biondi, A., Selicorni, A., Pistocchi, A., & Massa, V. (2016). CyclinD1 Down-Regulation and Increased Apoptosis Are Common Features of Cohesinopathies. *Journal of Cellular Physiology*, 231(3), 613–622. <https://doi.org/10.1002/jcp.25106>
- Gimigliano, A., Mannini, L., Bianchi, L., Puglia, M., Deardorff, M. A., Menga, S., Krantz, I. D.,
- Musio, A., & Bini, L. (2012). Proteomic profile identifies dysregulated pathways in Cornelia de Lange syndrome cells with distinct mutations in SMC1A and SMC3 genes. *Journal of Proteome Research*, 11(12), 6111–6123. <https://doi.org/10.1021/pr300760p>
- Golov, A. K., & Gavrillov, A. A. (2024). Cohesin Complex: Structure and Principles of Interaction with DNA. *Biochemistry. Biokhimiia*, 89(4), 585–600. <https://doi.org/10.1134/S0006297924040011>
- Grazioli, P., Parodi, C., Mariani, M., Bottai, D., di Fede, E., Zulueta, A., Avagliano, L., Cereda, A., Tenconi, R., Wierzb, J., Adami, R., Iascone, M., Ajmone, P. F., Vaccari, T., Gervasini, C., Selicorni, A., & Massa, V. (2021). Lithium as a possible therapeutic strategy for Cornelia de Lange syndrome. *Cell Death Discovery*, 7(1), 34. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00414-2>

- Haseley, A., Wallis, K., & DeBrosse, S. (2021). Kleefstra syndrome: Impact on parents. *Disability and Health Journal*, 14(2), 101018. <https://doi.org/10.1016/j.dhjo.2020.101018>
- Izumi, K., Nakato, R., Zhang, Z., Edmondson, A. C., Noon, S., Dulik, M. C., Rajagopalan, R., Venditti, C. P., Gripp, K., Samanich, J., Zackai, E. H., Deardorff, M. A., Clark, D., Allen, J. L., Dorsett, D., Misulovin, Z., Komata, M., Bando, M., Kaur, M., ... Krantz, I. D. (2015). Germline gain-of-function mutations in AFF4 cause a developmental syndrome functionally linking the super elongation complex and cohesin. *Nature Genetics*, 47(4), 338–344. <https://doi.org/10.1038/ng.3229>
- Kleefstra, T., & de Leeuw, N. (1993). *Kleefstra Syndrome*
- Kleefstra, T., van Zelst-Stams, W. A., Nillesen, W. M., Cormier-Daire, V., Houge, G., Foulds, N., van Dooren, M., Willemsen, M. H., Pfundt, R., Turner, A., Wilson, M., McGaughran, J., Rauch, A., Zenker, M., Adam, M. P., Innes, M., Davies, C., López, A. G.-M., Casalone, R., ... Brunner, H. G. (2009). Further clinical and molecular delineation of the 9q subtelomeric deletion syndrome supports a major contribution of EHMT1 haploinsufficiency to the core phenotype. *Journal of Medical Genetics*, 46(9), 598–606. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.062950>
- Kline, A. D., Krantz, I. D., Sommer, A., Kliewer, M., Jackson, L. G., FitzPatrick, D. R., Levin, A. v, & Selicorni, A. (2007). Cornelia de Lange syndrome: clinical review, diagnostic and scoring systems, and anticipatory guidance. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 143A(12), 1287–1296. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31757>
- Kline, A. D., Moss, J. F., Selicorni, A., Bisgaard, A.-M., Deardorff, M. A., Gillett, P. M., Ishman, S. L., Kerr, L. M., Levin, A. v, Mulder, P. A., Ramos, F. J., Wierzbza, J., Ajmone, P. F., Axtell, D., Blagowidow, N., Cereda, A., Costantino, A., Cormier-Daire, V., FitzPatrick, D., ... Hennekam, R. C. (2018). Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. *Nature Reviews. Genetics*, 19(10), 649–666. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0031-0>
- Krantz, I. D., McCallum, J., DeScipio, C., Kaur, M., Gillis, L. A., Yaeger, D., Jukofsky, L., Wasserman, N., Bottani, A., Morris, C. A., Nowaczyk, M. J. M., Toriello, H., Bamshad, M. J., Carey, J. C., Rappaport, E., Kawauchi, S., Lander, A. D., Calof, A. L., Li, H.-H., ... Jackson, L. G. (2004). Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations

- in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nature Genetics*, 36(6), 631–635. <https://doi.org/10.1038/ng1364>
- Kuechler, A., Zink, A. M., Wieland, T., Lüdecke, H.-J., Cremer, K., Salviati, L., Magini, P., Najafi, K., Zweier, C., Czeschik, J. C., Aretz, S., Ende, S., Tamburrino, F., Pinato, C., Clementi, M., Gundlach, J., Mayla, C., Mazzanti, L., Wohlleber, E., ... Engels, H. (2015). Loss-of-function variants of SETD5 cause intellectual disability and the core phenotype of microdeletion 3p25.3 syndrome. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 23(6), 753–760. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.165>
 - Kumar, R., Landry, A. P., Guha, A., Vitvitsky, V., Lee, H. J., Seike, K., Reddy, P., Lyssiotis, C. A., & Banerjee, R. (2022). A redox cycle with complex II prioritizes sulfide quinone oxidoreductase-dependent H₂S oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 298(1), 101435. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101435>
 - Kumawat, K., & Gosens, R. (2016). WNT-5A: signaling and functions in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(3), 567–587. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2076-y>
 - Liu, J., Han, M., Zhang, X., Li, M., Liu, S., & Jiang, N. (2025). The genotype-phenotype association of retinitis pigmentosa in a Chinese population: Analysis of three new cases and literature review. *Molecular Vision*, 31, 282–295.
 - Luzzani, S., Macchini, F., Valadè, A., Milani, D., & Selicorni, A. (2003). Gastroesophageal reflux and Cornelia de Lange syndrome: typical and atypical symptoms. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 119A(3), 283–287. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.20191>
 - Macchini, F., Fava, G., Selicorni, A., Torricelli, M., Leva, E., & Valadè, A. (2010). Barrett's esophagus and Cornelia de Lange Syndrome. *Acta Paediatrica* (Oslo, Norway: 1992), 99(9), 1407–1410. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2010.01834.x>
 - Mannini, L., Cucco, F., Quarantotti, V., Krantz, I. D., & Musio, A. (2013). Mutation spectrum and genotype-phenotype correlation in Cornelia de Lange syndrome. *Human Mutation*, 34(12), 1589–1596. <https://doi.org/10.1002/humu.22430>
 - Mariani, M., Decimi, V., Bettini, L. R., Maitz, S., Gervasini, C., Masciadri, M., Ajmone, P., Kullman, G., Dinelli, M., Panceri, R., Cereda, A., & Selicorni, A. (2016). Adolescents and adults affected by Cornelia de Lange syndrome: A report of 73 Italian

- patients. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 172(2), 206–213. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31502>
- Marino, B., & Mileto, F. (2002). Criss-cross heart with d-ventricular loop. *Circulation*, 106(25), e223.
 - Meneghini, R. (1997). Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 23(5), 783–792. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(97\)00016-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00016-6)
 - Minami, Y., Oishi, I., Endo, M., & Nishita, M. (2010). Ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signaling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 239(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21991>
 - Musio, A., Selicorni, A., Focarelli, M. L., Gervasini, C., Milani, D., Russo, S., Vezzoni, P., & Larizza, L. (2006). X-linked Cornelia de Lange syndrome owing to SMC1L1 mutations. *Nature Genetics*, 38(5), 528–530. <https://doi.org/10.1038/ng1779>
 - Nasmyth, K., & Haering, C. H. (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. *Annual Review of Genetics*, 43, 525–558. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134233>
 - Nava, A. A., & Arboleda, V. A. (2024). The omics era: a nexus of untapped potential for Mendelian chromatinopathies. *Human Genetics*, 143(4), 475–495. <https://doi.org/10.1007/s00439-023-02560-2>.
 - Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(12), 767–779. <https://doi.org/10.1038/nrm3470>
 - Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23–29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>
 - Olley, G., Pradeepa, M. M., Grimes, G. R., Piquet, S., Polo, S. E., FitzPatrick, D. R., Bickmore, W. A., & Boumendil, C. (2021). Cornelia de Lange syndrome-associated mutations cause a DNA damage signalling and repair defect. *Nature Communications*, 12(1), 3127. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23500-6>

- Opitz, J. M. (1985). The Brachmann-de Lange syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 22(1), 89–102. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320220110>
- Opitz, j. M., segal, a. T., lehrke, r., & nadler, h. (1964). Brachmann/de lange syndrome. *Lancet* (London, England), 2(7367), 1019. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(64\)90980-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(64)90980-8).
- OxiSelect™ Comet Assay Kit, STA-351, Cell Biolabs, USA
- Pajkrt, E., Griffin, D. R., & Chitty, L. S. (2010). Brachmann-de Lange syndrome: definition of prenatal sonographic features to facilitate definitive prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 30(9), 865–872. <https://doi.org/10.1002/pd.2577>
- Parenti, I., Gervasini, C., Pozojevic, J., Graul-Neumann, L., Azzollini, J., Braunholz, D., Watrin, E., Wendt, K. S., Cereda, A., Cittaro, D., Gillessen-Kaesbach, G., Lazarevic, D., Mariani, M., Russo, S., Werner, R., Krawitz, P., Larizza, L., Selicorni, A., & Kaiser, F. J. (2016). Broadening of cohesinopathies: exome sequencing identifies mutations in ANKRD11 in two patients with Cornelia de Lange-overlapping phenotype. *Clinical Genetics*, 89(1), 74–81. <https://doi.org/10.1111/cge.12564>
- Parenti, I., Mallozzi, M. B., Hüning, I., Gervasini, C., Kuechler, A., Agolini, E., Albrecht, B., Baquero-Montoya, C., Bohring, A., Bramswig, N. C., Busche, A., Dalski, A., Guo, Y., Hanker, B., Hellenbroich, Y., Horn, D., Innes, A. M., Leoni, C., Li, Y. R., ... Kaiser, F. J. (2021). ANKRD11 variants: KBG syndrome and beyond. *Clinical Genetics*, 100(2), 187–200. <https://doi.org/10.1111/cge.13977>
- Parodi, C., Lettieri, A., Grazioli, P., di Fede, E., Grassi, S., Taci, E., Toscani, A., Prioni, S., Rebellato, S., Colombo, E. A., Rasetti, S., Cutarelli, A., Mariani, M., Corti, S., Finelli, P., Prinetti, A., Fazio, G., Selicorni, A., Conti, L., ... Massa, V. (2026). Lithium ameliorates neural differentiation restoring cell death balance in Cornelia de Lange syndrome 2D and 3D models. *Cell Death Discovery*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-026-03085-z>
- Remeseiro, S., & Losada, A. (2013). Cohesin, a chromatin engagement ring. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.10.013>
- Ren, R., Liu, Y., Liu, P., Zhao, J., Hou, M., Li, S., Chen, Z., & Yuan, A. (2024). Clinical characteristics and genetic analysis of four pediatric patients with Kleefstra syndrome. *BMC Medical Genomics*, 17(1), 290. <https://doi.org/10.1186/s12920-024-02065-5>

- Riedinger, M. A., van der Wee, N. J. A., Giltay, E. J., & de Leeuw, M. (2023). Lithium in bipolar depression: A review of the evidence. *Human Psychopharmacology*, 38(5), e2881. <https://doi.org/10.1002/hup.2881>
- Rohatgi, S., Clark, D., Kline, A. D., Jackson, L. G., Pie, J., Siu, V., Ramos, F. J., Krantz, I. D., & Deardorff, M. A. (2010). Facial diagnosis of mild and variant CdLS: Insights from a dysmorphologist survey. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 152A(7), 1641–1653. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33441>
- Russell, B. E., & Tan, W.-H. (2024). Chromatinopathies - from discovery to clinical diagnosis in the real world. *Human Genetics*, 143(4), 471–473. <https://doi.org/10.1007/s00439-024-02665-2>
- Russell, K. L., Ming, J. E., Patel, K., Jukofsky, L., Magnusson, M., & Krantz, I. D. (2001). Dominant paternal transmission of Cornelia de Lange syndrome: a new case and review of 25 previously reported familial recurrences. *American Journal of Medical Genetics*, 104(4), 267–276. <https://doi.org/10.1002/ajmg.10066>
- Sarogni, P., Pallotta, M. M., & Musio, A. (2020). Cornelia de Lange syndrome: from molecular diagnosis to therapeutic approach. *Journal of Medical Genetics*, 57(5), 289–295. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106277>
- Sarogni, P., Palumbo, O., Servadio, A., Astigiano, S., D'Alessio, B., Gatti, V., Cukrov, D., Baldari, S., Pallotta, M. M., Aretini, P., Dell'Orletta, F., Soddu, S., Carella, M., Toietta, G., Barbieri, O., Fontanini, G., & Musio, A. (2019). Overexpression of the cohesin-core subunit SMC1A contributes to colorectal cancer development. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 38(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1116-0>
- Schrier, S. A., Sherer, I., Deardorff, M. A., Clark, D., Audette, L., Gillis, L., Kline, A. D., Ernst, L., Loomes, K., Krantz, I. D., & Jackson, L. G. (2011). Causes of death and autopsy findings in a large study cohort of individuals with Cornelia de Lange syndrome and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 155A(12), 3007–3024. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34329>
- Schuijers, J., & Clevers, H. (2012). Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *The EMBO Journal*, 31(12), 2685–2696. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.149>

- Scolnick, D. M., Chehab, N. H., Stavridi, E. S., Lien, M. C., Caruso, L., Moran, E., Berger, S. L., & Halazonetis, T. D. (1997). CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Research*, 57(17), 3693–3696.
- Sekimoto, H., Osada, H., Kimura, H., Kamiyama, M., Arai, K., & Sekiya, S. (2000). Prenatal findings in Brachmann-de Lange syndrome. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 263(4), 182–184. <https://doi.org/10.1007/s0040400050278>
- Selicorni, A., Mariani, M., Lettieri, A., & Massa, V. (2021). Cornelia de Lange Syndrome: From a Disease to a Broader Spectrum. *Genes*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/genes12071075>
- Snitow, M. E., Bhansali, R. S., & Klein, P. S. (2021). Lithium and Therapeutic Targeting of GSK-3. *Cells*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/cells10020255>
- Tonkin, E. T., Wang, T.-J., Lisgo, S., Bamshad, M. J., & Strachan, T. (2004). NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nature Genetics*, 36(6), 636–641. <https://doi.org/10.1038/ng1363>
- Van Gils, J., Magdinier, F., Fergelot, P., & Lacombe, D. (2021). Rubinstein-Taybi Syndrome: A Model of Epigenetic Disorder. *Genes*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/genes12070968>
- Van Remmen, H., Hamilton, M. L., & Richardson, A. (2003). Oxidative damage to DNA and aging. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 31(3), 149–153. <https://doi.org/10.1097/00003677-200307000-00009>
- Van Ruiten, M. S., & Rowland, B. D. (2021). On the choreography of genome folding: A grand pas de deux of cohesin and CTCF. *Current Opinion in Cell Biology*, 70, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.12.001>
- VanderVorst, K., Dreyer, C. A., Konopelski, S. E., Lee, H., Ho, H.-Y. H., & Carraway, K. L. (2019). Wnt/PCP Signaling Contribution to Carcinoma Collective Cell Migration and Metastasis. *Cancer Research*, 79(8), 1719–1729. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2757>
- Vrouwe, M. G., Elghalbzouri-Maghrani, E., Meijers, M., Schouten, P., Godthelp, B. C., Bhuiyan, Z. A., Redeker, E. J., Mannens, M. M., Mullenders, L. H. F., Pastink, A., &

- Darroudi, F. (2007). Increased DNA damage sensitivity of Cornelia de Lange syndrome cells: evidence for impaired recombinational repair. *Human Molecular Genetics*, 16(12), 1478–1487. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm098>
- Wang, Z.-T., Chen, Z.-J., Jiang, G.-M., Wu, Y.-M., Liu, T., Yi, Y.-M., Zeng, J., Du, J., & Wang, H.-S. (2016). Histone deacetylase inhibitors suppress mutant p53 transcription via HDAC8/YY1 signals in triple negative breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 28(5), 506–515. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.02.006>
 - Westergaard, J. G., Sinosich, M. J., Bugge, M., Madsen, L. T., Teisner, B., & Grudzinskas, J. G. (1983). Pregnancy-associated plasma protein A in the prediction of early pregnancy failure. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 145(1), 67–69. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(83\)90341-1](https://doi.org/10.1016/0002-9378(83)90341-1)
 - Willert, K., & Nusse, R. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), a007864. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007864>
 - Wilson, G. N., Hieber, V. C., & Schmickel, R. D. (1978). The association of chromosome 3 duplication and the Cornelia de Lange syndrome. *The Journal of Pediatrics*, 93(5), 783–788. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(78\)81077-4](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(78)81077-4)
 - Woods, S. A., Robinson, H. B., Kohler, L. J., Agamanolis, D., Sterbenz, G., & Khalifa, M. (2014). Exome sequencing identifies a novel EP300 frame shift mutation in a patient with features that overlap Cornelia de Lange syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 164A(1), 251–258. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36237>
 - Yoshida, K., Müller, D. J., & Desarkar, P. (2023). Psychiatric manifestations of Kleefstra syndrome: a case report. *Frontiers in Psychiatry*, 14, 1174195. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2023.1174195>