

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

LUIGI DE CARLI

**La topografia del genoma umano: metodi di analisi  
citologico-molecolari**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 80 (1986), n.3, p. 159–182.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1986\\_8\\_80\\_3\\_159\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1986_8_80_3_159_0)>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>



LUIGI DE CARLI

LA TOPOGRAFIA DEL GENOMA UMANO:  
METODI DI ANALISI CITOLOGICO-MOLECOLARI



LUIGI DE CARLI

LA TOPOGRAFIA DEL GENOMA UMANO: METODI  
DI ANALISI CITOLOGICO-MOLECOLARI (\*)

## LIVELLI DI ANALISI GENETICA

L'analisi genetica ha fundamentalmente lo scopo di individuare i costituenti unitari del materiale ereditario e di definirne l'ordinamento. Lo studio dei cromosomi, come strutture microscopicamente visibili, consente, nelle condizioni più favorevoli, quali sono ad esempio quelle dei cromosomi giganti delle ghiandole salivari di *Drosophila*, di ottenere una risoluzione a livello del singolo gene. L'analisi genetica formale basata sulla misura della ricombinazione dei caratteri permette di scendere al di sotto di questo limite separando frazioni di gene. L'analisi molecolare del DNA con le tecniche chimico-enzimatiche oggi disponibili realizza l'obiettivo ultimo della genetica che è quello della ricostruzione dell'intero genoma in termini di sequenze di nucleotidi. Nel caso dell'Uomo, questo dato esiste solo per un cromosoma extranucleare, quello del mitocondrio, da taluni indicato come cromosoma M o 25° cromosoma. La sua organizzazione è di tipo procariotico essendo costituito da un filamento di DNA circolarizzato formato da 16.569 nucleotidi, dei quali è determinata la sequenza completa equivalente a 5.523 codoni. Su questa sequenza sono stati individuati i tratti corrispondenti, ai geni per l'RNA ribosomale, a 22 geni per gli RNA di trasporto e a 13 geni codificanti per proteine (Anderson *et al.*, 1981). Un cromosoma nucleare medio è formato da un numero di nucleotidi 8.000 volte superiore, anche se il contenuto genico in proporzione è molto più basso, per la presenza di DNA ridondante e di sequenze non codificanti. La sequenza nucleotidica completa è nota solo per alcuni geni o tratti limitati di DNA cromosomico nucleare. In totale il numero di nucleotidi, finora ordinati in sequenze nel genoma umano, è di pochi milioni. Si tratta di una frazione ancora molto piccola, dal momento che l'intero assetto cromosomico di una cellula umana è formato da  $2.9 \times 10^9$  nucleotidi. Anche se è necessario, ed oggi è possibile, giungere alla risoluzione nel singolo nucleotide del materiale genetico, per capirne il contenuto di informazione ed il modo con cui questa informazione viene trasferita nelle strutture e nelle funzioni dell'organismo, la localizzazione di

(\*) Conferenza tenuta nella seduta dell'8 febbraio 1986.

geni sui cromosomi non si riduce ad un semplice esercizio topografico ma rappresenta ancora una tappa essenziale nell'analisi genetica. Infatti dalla conoscenza della posizione relativa dei geni sui cromosomi si possono trarre importanti conclusioni, sia sul modo con cui essi si trasmettono da una generazione all'altra, sia sul modo con cui essi interagiscono nella manifestazione di un carattere.

Diverse informazioni, tratte sia da sistemi procariotici che eucariotici, indicano che l'attivazione genica è legata ad una geometria ben definita. Gruppi di geni, funzionalmente correlati possono entrare in azione e cessare la loro attività congiuntamente, in quanto coordinati spazialmente; l'effetto di geni regolatori dipende dalla configurazione in « cis » o in « trans » rispetto ai geni che essi controllano; la espressione di funzioni cellulari specializzate negli organismi superiori è, in alcuni casi, come quello della sintesi di anticorpi, legata a riarrangiamenti cromosomici. La trasposizione di un oncogene cellulare, coinvolto nei processi normali di sviluppo, in una sede cromosomica diversa da quella di origine può scatenare un processo neoplastico. Un esempio tipico è quello dell'oncogene *myc* che in condizioni normali si trova localizzato in una regione ben individuata del braccio lungo del cromosoma 8; per effetto di una traslocazione il gene viene trasferito sul braccio lungo del cromosoma 14 in contiguità con le sequenze che regolano la sintesi della catena pesante delle immunoglobuline. Questa trasposizione determina l'attivazione dell'oncogene e l'insorgenza del processo neoplastico nel linfoma di Burkitt (Klein, 1983). È quindi essenziale per capire il meccanismo di variazione cellulare sia in senso normale, nel differenziamento, che in quello patologico nello sviluppo dei tumori, conoscere la distribuzione dei geni sui cromosomi.

Il mappaggio genico può diventare risolutivo per il chiarimento dei processi di attivazione e repressione genica quando dalla fase di ordinamento dei geni sui cromosomi si passa a quella della determinazione delle sequenze nel DNA. Ciò vale non solo per le regioni codificanti del genoma, ma anche per quelle non codificanti, come gli elementi ad alta e media ripetitività distribuiti uniformemente o concentrati in talune regioni cromosomiche. Per queste ultime sequenze è stato ipotizzato un ruolo nel controllo della meccanica cromosomica e della regolazione dell'attività dei geni. C'è in un secondo motivo importante che giustifica la costruzione di una mappa genetica completa dell'Uomo. Esso interessa il campo della medicina, dove la topografia del genoma è rilevante non solo per la conoscenza delle basi molecolari delle malattie genetiche, che può offrire utili indicazioni per una correzione fenotipica, ma anche per la diagnosi prenatale, fondamentale per la consulenza genetica (Davies, 1981).

Sono circa 80 le malattie genetiche determinabili nel primo trimestre di gravidanza: la disponibilità di sonde molecolari, ossia frammenti di DNA purificati, di cui sia nota la posizione sul cromosoma, può aumentare notevolmente il potenziale diagnostico ed aprire la via anche ad interventi di correzione genetica. Anche se il trasferimento genico *in vivo* si trova in una fase sperimentale ancora incerta, si può prevedere che esso possa avere applicazioni in campo umano in un futuro non lontano (Anderson, 1984).

## STORIA

La prima localizzazione di un gene umano data al 1911, quando E.B. Wilson della Columbia University, confrontando il modo di trasmissione del carattere cecità ai colori con quello dei cromosomi X e Y, concluse che il gene responsabile doveva essere localizzato sul cromosoma X. Più di un centinaio di geni sono stati successivamente assegnati a questo cromosoma, con lo stesso metodo.

I geni umani finora identificati attraverso l'ereditarietà dei caratteri da essi controllati sono più di 3.000, circa il 5% del totale atteso. La stima del numero dei geni nell'Uomo può essere effettuata, con larga approssimazione, sulla base di dati molecolari riguardanti la varietà di RNA messaggeri e di pro-



Fig. 1. - Marcatore citologico («uncoiler») associato al gruppo sanguigno Duffy (modificata da Mc Kusik, 1981).

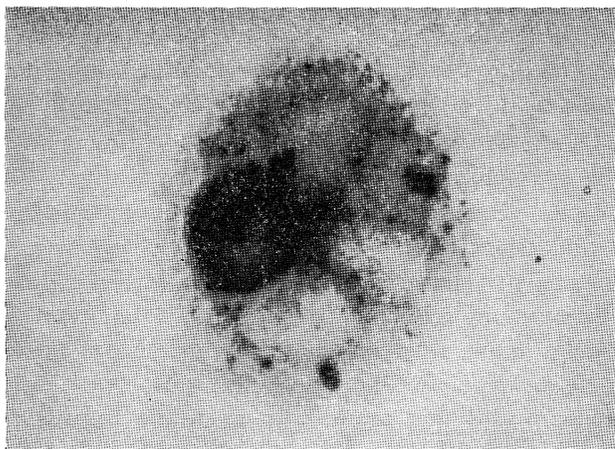
teine presenti in diversi tipi di cellule e sulla base di dati e di valutazioni teoriche della genetica di popolazione riguardanti le frequenze di mutazioni, il numero di loci mutabili ed il carico genetico sopportabile, ovvero compatibile con la sopravvivenza. Combinando questi due criteri, si arriva ad una stima di circa 60.000 geni, identificabili come sequenze uniche codificanti per proteine, con funzione propria o con funzione regolatoria, e per gli RNA, ribosomali e di trasferimento.

L'idiogramma cromosomico umano, ossia la rappresentazione grafica dei cromosomi ordinati in coppie di omologhi, era noto fin dal 1956, grazie ai fondamentali contributi di Tijo e Levan. Tuttavia esso rimase vuoto di geni sulle 22 coppie di autosomi fino al 1968. In questo anno Donahue localizzò il primo gene autosomico umano, quello per il gruppo sanguigno Duffy sul braccio lungo del cromosoma No. 1, in corrispondenza di un segmento despiralizzato (uncoiled) vicino al centromero (fig. 1) (Donahue *et al.*, 1968).

METODI DI MAPPAGGIO GENICO :  
ALTERNATIVE ALL'ANALISI GENETICA FAMILIARE

Il metodo convenzionale per localizzare la posizione dei geni sui cromosomi è quello dell'incrocio tra individui geneticamente definiti, che serve a rivelare nella progenie nuove combinazioni di caratteri rispetto a quelle parentali. Queste combinazioni sono dovute al riassortimento di interi cromosomi o di segmenti di cromosomi, durante la maturazione delle cellule sessuali, negli organismi superiori, o durante la coniugazione, nei batteri. La frequenza di ricombinazione, essendo in relazione alle distanze fisiche dei vari punti del cromosoma, può essere utilizzata per costruire una mappa genetica. Questo metodo ha una validità generale e si applica ai virus, come agli organismi complessi, in quanto la linearità dell'ordinamento dei geni è una caratteristica universale. L'incrocio programmato, negli organismi superiori, è soggetto a restrizioni o è precluso, come nell'Uomo. La genetica umana è stata finora basata in prevalenza su studi familiari, spesso limitati e laboriosi. Nuove possibilità si sono create con la scoperta della parasessualità nelle cellule somatiche, che evita l'incrocio e con l'avvento della genetica molecolare che consente l'analisi diretta del DNA. Processi parasessuali furono chiamati per la prima volta da Pontecorvo nel 1953 dei fenomeni di segregazione e ricombinazione, dovuti ad interscambio e a perdita cromosomica, messi in evidenza nelle cellule vegetative di un fungo filamentoso, l'*Aspergillus nidulans* (Pontecorvo *et al.*, 1954). Con lo stesso termine, in una accezione più ampia, possono essere definiti eventi come la trasformazione, la trasduzione e l'eterocariosi, che consistono essenzialmente nel trasferimento di materiale genetico da un organismo all'altro oppure nella fusione di cellule somatiche. Pontecorvo fu il primo a suggerire che meccanismi analoghi a quelli rivelati nei funghi filamentosi potessero operare anche negli organismi superiori (Pontecorvo, 1959). Aveva destato impressione un articolo pubblicato nel 1955 da Haldane, una delle menti più lungimiranti della genetica, intitolato « Alternative al sesso ». In esso si preconizzava lo sviluppo della genetica somatica, basata su meccanismi di segregazione e ricombinazione in cellule diverse da quelle germinali, e si sottolineava il significato delle ricerche di Pontecorvo. I modelli proposti apparivano plausibili anche perché esisteva un precedente classico, ad opera di Curt Stern, che già nel 1936 aveva messo in evidenza fenomeni di interscambio somatico in *Drosophila melanogaster*, uno degli organismi geneticamente meglio conosciuti. Le previsioni di Pontecorvo si sono confermate con la scoperta dell'ibridazione cellulare. Questo fenomeno, rivelato per la prima volta da Barski e collaboratori nel 1960 in cellule di topo coltivate *in vitro*, può verificarsi spontaneamente, come evento sporadico. Ma può essere indotto con alta efficienza da vari agenti biologici e chimici, in particolare da virus Sendai, un virus parainfluenzale, sperimentato per la prima volta da Harris, e da glicole polietilenico, usato inizialmente dai biologi vegetali ed in seguito applicato alle cellule animali da Pontecorvo. Il meccanismo è quello della formazione di un prodotto di fusione, un sincizio, tra due o più cellule. A questa fase definibile citologicamente come omocariosi, quando le cellule

**a**



**b**

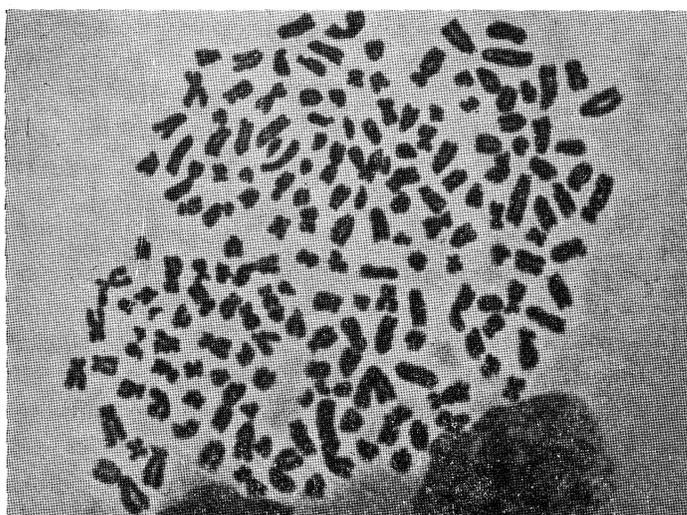
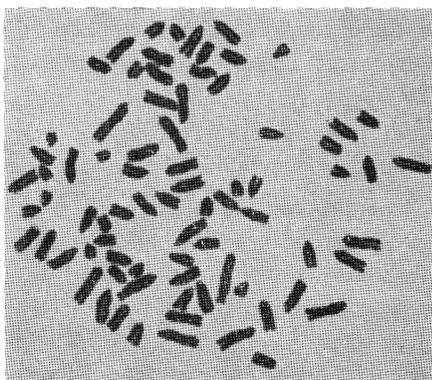
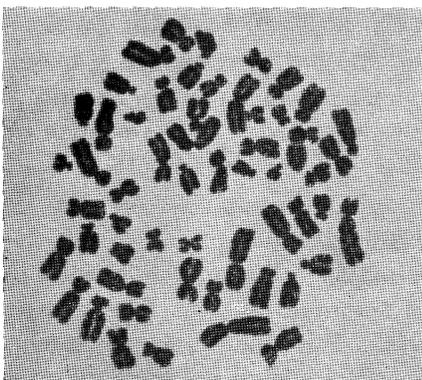


Fig. 2. - *a*) Prodotto di fusione tra cellule positive e negative per la fosfatasi alcalina, rivelata istochimicamente. *b*) Piastre metafasiche: di una cellula umana (in alto a sinistra), di topo (in alto a destra) e del loro ibrido.

sono geneticamente uguali, o eterocariosi, quando sono diverse, segue quella della fusione nucleare che porta all'ibrido vero e proprio in cui sono sommati i due corredi cromosomici. La fusione può essere indotta non soltanto fra cellule del medesimo tessuto od organismo, ma anche fra cellule di individui diversi o di individui appartenenti a specie diverse o addirittura a categorie sistematiche più distanti (fig. 2).

L'ibridazione cellulare sarebbe certamente rimasta solo una curiosità, o avrebbe avuto applicazioni limitate solo al campo della genetica fisiologica, se, contemporaneamente, non fossero state sviluppate tecniche quantitative per il trattamento di popolazioni cellulari. Già nel 1955 Puck aveva messo a punto una tecnica di facile impiego per la produzione massiva *in vitro* di cloni, ossia di colonie derivate da singole cellule. Questa innovazione non rappresentava solo un progresso metodologico, ma comportava anche un cambiamento nel modo di concepire l'insieme delle cellule di un tessuto, visto non più solo come una unità morfo-funzionale, ma anche come una popolazione di individui, ognuno dei quali capace di dare, nelle condizioni artificiali della coltura, una progenie di elementi identici. Su tali popolazioni cellulari, attivamente proliferanti *in vitro*, si prospettava la possibilità di applicare schemi di analisi genetica, inducendo processi di parasessualità analoghi a quelli scoperti nei microorganismi, essenzialmente, fusioni cellulari e trasformazione mediata da DNA.

La produzione *in vitro* di colonie da cellule singole con alta efficienza era, fino a qualche anno fa, considerata una caratteristica esclusiva di linee cellulari stabilizzate *in vitro* in seguito ad un processo di trasformazione cellulare indotta da agenti fisici, chimici o da virus, quasi sempre legata ad estese alterazioni nel numero e nella struttura di cromosomi. Tale condizione rappresenta una notevole limitazione per l'analisi genetica per la quale l'euploidia, almeno come stato iniziale, è un requisito essenziale. L'identificazione e la purificazione di fattori di crescita, che condizionano la proliferazione isolata, ha consentito di superare questo ostacolo per alcuni tipi di cellule. Un sistema modello al riguardo è quello della coltura di linfociti T capaci di dare singolarmente colonie in presenza di interleuchine e di agenti mitogeni (Paul *et al.*, 1981).

Un altro fondamentale avanzamento tecnico nel trattamento *in vitro* di popolazioni cellulari si è avuto con l'introduzione, ad opera di Littlefield nel 1964, di un sistema selettivo basato sulla complementazione di deficienze biochimiche presenti nelle cellule parentali, che permettono la sopravvivenza differenziale della cellula ibrida. Il sistema HAT (dai componenti: Hypoxantine, Aminopterin, Thymidine) è ancora oggi uno dei mezzi selettivi più usati, con pochi altri che sono stati successivamente messi a punto seguendo un analogo principio.

La produzione quantitativa di colonie cellulari *in vitro* e la selezione massiva, nonché l'isolamento clonale, sono procedimenti tipici della genetica dei microorganismi, che, proprio per queste affinità metodologiche, ha dato un contributo essenziale ai primi sviluppi della genetica di cellule umane coltivate *in vitro* (De Carli e Nuzzo, 1973; De Carli, 1961, 1985).

METODO DELLA PERDITA CROMOSOMICA  
IN IBRIDI CELLULARI INTERSPECIFICI

La possibilità di riunire in un unico citoplasma cellulare due nuclei geneticamente diversi è interessante sia per studi di fisiologia genetica, che mirano a chiarire i meccanismi di espressione dell'informazione genetica sia per studi di topografia, volti a localizzare sui cromosomi la sede del controllo genetico dei caratteri.

Il primo dato che ha dimostrato come la fusione di cellule in coltura *in vitro* può essere utilizzata per l'analisi genetica nell'Uomo è stato ottenuto nel 1967 da Weiss e Green, che, in un ibrido Uomo-topo, furono in grado di identificare il cromosoma umano, il numero 17, sul quale è localizzato il gene che controlla la sintesi di un enzima specifico, la timidina cinasi. Il metodo sfrutta un comportamento tipico degli ibridi ottenuti fra cellule di specie diverse, che si manifesta nella tendenza a perdere rapidamente, nel corso delle divisioni successive, cromosomi di una delle due specie parentali. Nell'ibrido Uomo-topo vengono eliminati preferenzialmente cromosomi umani, al punto che dopo poche generazioni cellulari l'ibrido contiene l'intero corredo cromosomico del topo e pochi, o al limite un solo cromosoma umano. Analizzando una serie sufficiente di ibridi e correlando la presenza di un cromosoma umano ben identificato con la presenza di uno specifico carattere, del quale possa essere biochimicamente determinata l'origine umana, può essere raggiunta la prova che il gene, che controlla il carattere in esame, è localizzato su quel cromosoma (fig. 3).

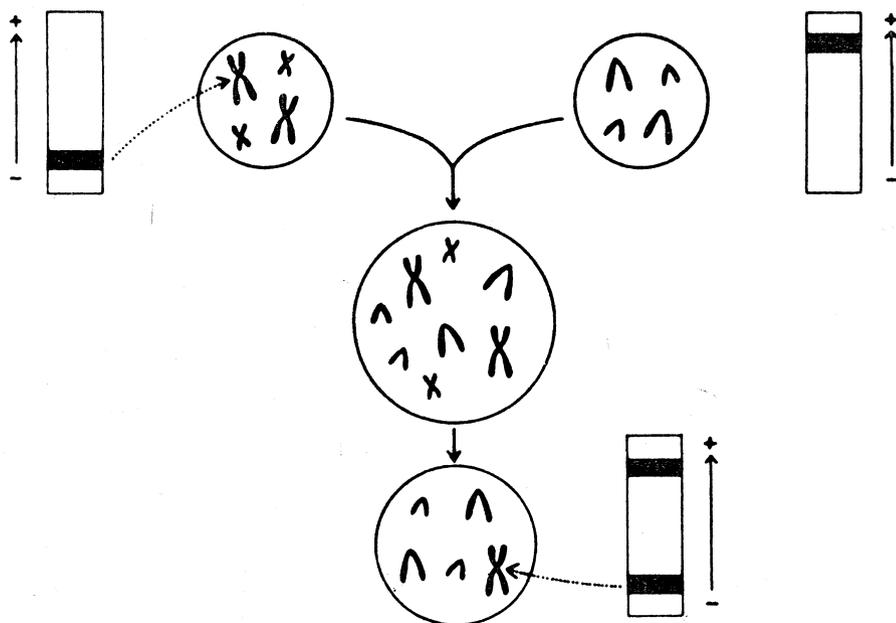


Fig. 3. - Schema illustrativo del metodo della perdita cromosomica in ibridi interspecifici. La presenza del gene da mappare è rivelata dal tracciato elettroforetico della proteina corrispondente.

Il metodo consiste essenzialmente in uno studio statistico dell'associazione fra cromosomi, citologicamente riconoscibili, e caratteri, manifestati a livello cellulare, e rientra nella definizione classica dell'analisi citogenetica. Con lo stesso criterio può essere stabilita l'associazione fra due caratteri e possono essere così formati dei gruppi di concatenazione costituiti da un insieme di geni, che trovano posto su un determinato cromosoma. È facile rendersi conto che il principio è analogo a quello applicato nella genetica dell'incrocio, anche se il potere di risoluzione è diverso, trattandosi di localizzazione, che ha come ambito l'intera lunghezza del cromosoma visualizzato con le tecniche di colorazione convenzionali.

L'introduzione delle colorazioni differenziali, iniziata con l'uso di fluorocromi (Caspersson *et al.*, 1970) ed estesa ad altri procedimenti, basati sulla denaturazione e rinaturazione del DNA e su trattamenti con enzimi, che producono un bandeggio caratteristico e riproducibile sul cromosoma, ha aumentato la precisione e l'efficienza del metodo di localizzazione. La posizione dei geni può essere così ristretta ad una regione cromosomica delimitata da specifiche bande.

La tecnica del bandeggio cromosomico è stata ulteriormente affinata con tecniche basate sulla sincronizzazione delle colture cellulari e sull'arresto della mitosi, in un momento che va dalla tarda profase alla metafase (Yunis *et al.*, 1978). Si tratta di una tecnica particolarmente delicata, il cui successo dipende da un tempismo perfetto, dato che queste fasi della mitosi si completano nel giro di pochi minuti. Le cellule vengono bloccate al confine tra la fase G 1 e la fase S con ametopterina. L'incubazione successiva, in assenza dell'inibitore ed un breve trattamento con colcemid portano all'accumulo di cellule in mitosi con una elevata proporzione (circa il 75%) di tarde profasi, di prometafasi e di metafasi precoci. Il numero di bande, nettamente distinguibili dopo colorazione con colorante Wright, aumenta più che proporzionalmente con la precocità della fase e quindi con la lunghezza del cromosoma essendo pari a 514 per la metafase precoce, 691 per la prometafase e 1027 per la profase avanzata (fig. 4).

Mediante un trattamento combinato con bromodeossiuridina e attinomicina D il numero di bande può essere portato a 2.000 (Yunis, 1981). In questo modo può essere graduata la sensibilità del metodo di analisi cromosomica, secondo il tipo di applicazione. È evidente che per il mappaggio genico la più alta risoluzione è un requisito essenziale. I metodi di bandeggio ad alta risoluzione hanno contribuito in maniera decisiva a ridurre il divario tra misure citologiche, misure genetiche e molecolari. Si può infatti oggi incominciare a stabilire, per quanto grossolanamente, una equivalenza tra banda colorata visibile microscopicamente con le tecniche a più alta risoluzione, distanza genetica in termini di unità di ricombinazione o centimorgan e numero di nucleotidi in chilobasi. Il rapporto secondo una stima approssimata potrebbe essere: 1 banda = 2 centimorgan = 2.500 chilobasi.

La possibilità di individuare regioni ristrette del cromosoma, con le varie tecniche di colorazione differenziali e con l'analisi dei cromosomi profasici, ha dato l'avvio alla costruzione di una vera e propria mappa citologica dell'Uomo

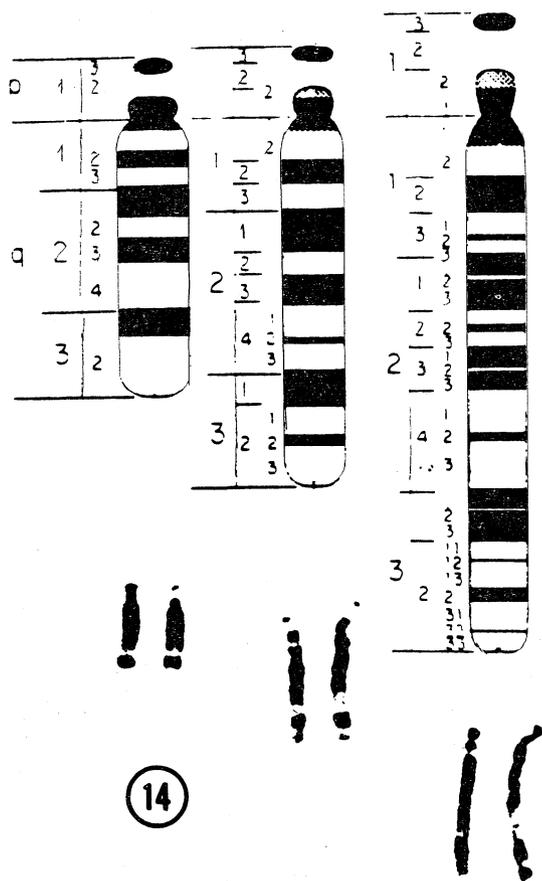


Fig. 4. - Cromosoma umano No 14 con bandeggi a diverso grado di risoluzione.

consistente non più in una rappresentazione dei vari elementi del corredo cromosomico affiancati da un elenco di caratteri, ma in una distribuzione di punti sui cromosomi riprodotti schematicamente nella loro morfologia fine.

Il cosiddetto « mappaggio regionale » mediante ibridazione somatica tecnicamente procede nello stesso modo dell'assegnazione di un carattere ad un determinato cromosoma. Il dato viene ottenuto da uno studio della concordanza tra presenza di un carattere rivelabile nella cellula ibrida e presenza di un segmento cromosomico, che può derivare da una delezione o da una traslocazione. Una serie di ibridi portatori dello stesso cromosoma umano con delezioni in diversi punti consente una localizzazione genica nel tratto più breve del cromosoma presente in tutti gli ibridi che manifestano il carattere. Questo metodo, nella sua logica, è del tutto paragonabile a quello classico basato sullo studio dei cromosomi giganti delle ghiandole salivari di *Drosophila melanogaster* (Judd *et al.*, 1972) (fig. 7). È da notare che la risoluzione in questo sistema, in cui le variazioni cromosomiche vengono correlate con i dati di incrocio, è da 50 a 200 maggiore di quella ottenibile con i cromosomi metafasici normali. Una banda di un cromosoma gigante infatti corrisponde ad un tratto di DNA codificante per 1 o pochi geni, da con-

frontare con i 30-50 geni di una banda di un cromosoma normale analizzato con la massima risoluzione.

Le cellule umane parentali portatrici di traslocazioni e di delezioni possono essere derivate da individui affetti da varie condizioni patologiche associate ad aberrazioni cromosomiche. Esiste una ampia collezione di questi tipi cellulari nell'Human Genetic Mutant Cell Repository in Camden, New Jersey (1981), che viene arricchito continuamente di nuove linee cellulari e che rappresenta la fonte maggiore di materiale per gli studi sul mappaggio infracromosomico. La varietà di riarrangiamenti cromosomici utilizzabili può essere aumentata inducendo rotture cromosomiche mediante trattamenti con appropriati agenti chimici o fisici nelle cellule umane prima della fusione o nell'ibrido già formato contenente cromosomi umani (Burgerhaut *et al.*, 1977; Law and Kao, 1978).

Per determinare la distanza relativa di due geni che controllano caratteri espressi nella cellula e che sono stati assegnati ad uno specifico cromosoma può essere usato anche un metodo basato sul calcolo della frequenza di segregazione indotta da radiazioni. L'assunto è quello di una proporzionalità diretta tra distanza fra i loci in esame e frequenza di segregazione dei due geni nell'ibrido per effetto della rottura indotta dalle radiazioni. Questa tecnica di analisi genetica somatica, applicata da Gross e Harris per i cromosomi umani 1 e X (1977 *a, b*) e da Law e Kao per il cromosoma 12 (1978), è basata su un principio analogo a quello usato nella costruzione delle mappe genetiche nei sistemi sessuali, dove la rottura che separa due geni è quella che si determina spontaneamente nel crossing-over meiotico.

Un altro meccanismo, utilizzato largamente come strumento di analisi genetica dei microorganismi e che oggi va acquistando interesse anche per la genetica di cellule animali e vegetali, è la trasformazione mediante DNA. Nelle cellule degli organismi superiori questo processo si può indurre con DNA a diversi livelli di complessità: dalla forma molecolare del DNA, estratto con metodi chimici, all'intero cromosoma organizzato in strutture citologicamente visibili, isolato da cellule in divisione. Il primo esperimento di trasformazione con cellule di mammifero è stato effettuato con successo da Szibalska e Szibalski nel 1962, ma ha potuto essere convalidato solo recentemente. DNA estratto da cellule umane, messo a contatto di cellule deficienti per uno specifico enzima, era in grado di indurre stabilmente il carattere mancante nelle cellule riceventi, che lo trasmettevano regolarmente alla loro progenie. Esperimenti di questo tipo possono essere oggi riprodotti con tecniche migliorate su una varietà di linee cellulari con frazioni di DNA corrispondenti a geni noti o a sequenze di cui si intende determinare la funzione (Scangos e Ruddle, 1981).

L'impianto di DNA esogeno nel nucleo di una cellula può essere favorito dall'uso di particolari virus, che funzionano da vettori di sequenze di DNA purificate. Trasferimento genico ad alta frequenza è stato ottenuto mediante microiniezione di geni purificati nel nucleo di cellule di mammifero coltivate *in vitro* (Capecchi, 1980). L'informazione che può essere ricavata con questi esperimenti interessa la meccanica del genoma più che il mappaggio, inteso come

ordinamento dei singoli geni sui cromosomi. Tuttavia, studiando la frequenza con cui vengono trasferiti congiuntamente due geni, è possibile ottenere anche una stima della loro distanza relativa.

Interessante ai fini della localizzazione genica è anche il trapianto di interi cromosomi. Questa operazione offre la possibilità di applicare un metodo che appare complementare rispetto a quello illustrato in precedenza della perdita cromosomica in una cellula ibrida (De Carli e Larizza, 1978).



Fig. 5. - Cromosomi metafasici estratti da cellule di criceto in coltura.

La contemporanea comparsa di un nuovo cromosoma identificabile e di una nuova funzione in una cellula ricevente, consente di localizzare su quel cromosoma i determinanti genetici della funzione stessa. I cromosomi della cellula donatrice possono essere isolati facilmente durante la divisione cellulare, quando essi sono condensati e quindi facilmente trasferibili (fig. 5). L'incorporazione di cromosomi nelle cellule riceventi può essere ottenuta con una tecnica diretta di micromanipolazione oppure trattando le cellule riceventi con sospensioni di cromosomi isolati. Mc Bride e Ozer nel 1973 hanno riportato il primo esperimento di trapianto di cromosomi in cellule di criceto. La prova dell'avvenuto trasferimento del DNA cromosomico nella cellula e della sua attività biologica è stata fornita dalla comparsa di una attività enzimatica che era presente nelle cellule donatrici dei cromosomi e totalmente assente nella cellula ricevente. Un metodo equivalente a quello dell'incorporazione di cromosomi isolati è quella della fusione di microcellule con cellule intere. Le microcellule, contenenti materiale nucleare corrispondente a uno o pochi cromosomi, vengono ottenute per trattamento combinato con colchicina e citocalasina (Fournier e Ruddle, 1977).

APPLICAZIONI DELLE TECNICHE DEL DNA RICOMBINANTE ALLA GENETICA  
DELLE CELLULE SOMATICHE

Prima dell'avvento delle nuove tecniche di analisi chimico-enzimatica del DNA, che hanno permesso uno studio diretto della struttura del genoma, la presenza del gene negli esperimenti di mappaggio poteva essere riconosciuta solo attraverso il suo prodotto primario, la proteina. La localizzazione genica era quindi basata su una combinazione di tecniche citologiche, per l'identificazione dei cromosomi o delle regioni cromosomiche coinvolte, e di tecniche biochimiche per la determinazione della proteina enzimatica, strutturale o regolatoria, controllata dal gene da mappare. L'informatività del sistema era legata a due condizioni: l'espressività del gene a livello cellulare e la possibilità di distinguere, in genere mediante elettroforesi, la proteina umana da quella del topo o dell'hamster nell'ibrido interspecifico prodotto con cellule di una di queste due specie. In alcuni casi la limitazione dovuta alla mancata espressione dell'attività del gene umano da localizzare è stata superata, usando nell'incrocio una cellula di topo in grado di indurre nell'ibrido la funzione umana non espressa. È questo il caso ad esempio dell'incrocio tra cellule di epatoma di topo e linfociti umani che porta alla formazione di un ibrido con ritenzione di cromosomi umani e presenza di albumina umana (Malavista e Weiss, 1974). Gli anticorpi monoclonali hanno consentito di superare in larga parte i problemi derivanti dalla impossibilità di distinguere nell'ibrido con le tecniche biochimiche correnti i prodotti genici delle due specie parentali. Molte proteine enzimatiche di specie diverse mostrano reattività crociata all'antisiero policlonale prodotto nell'animale e quindi anche questo strumento dell'immunologia classica non è risolutivo. Con la tecnica degli ibridomi è possibile scomporre il mosaico antigenico in singoli determinanti e quindi ottenere antisieri specifici in grado di identificare mediante immunofluorescenza il prodotto umano nell'ibrido.

Le tecniche del DNA ricombinante e di determinazione di sequenze applicate alla genetica delle cellule somatiche hanno praticamente tolto ogni limitazione al mappaggio genico (Ruddle, 1981). Al prodotto genico si sostituisce la sonda molecolare, ossia un tratto di DNA corrispondente ad una specifica sequenza, isolata e riprodotta in numerose copie in un plasmide, una struttura cromosomica capace di replicazione autonoma in un ospite batterico. Le sonde molecolari possono essere di due tipi: il tratto di DNA può corrispondere ad uno specifico gene oppure ad un frammento anonimo di una regione codificante o non codificante del genoma. Nel primo caso l'ottenimento della sonda dipende dalla possibilità di purificare il prodotto proteico o l'RNA messaggero, nel secondo caso sono richieste soltanto tecniche appropriate di frazionamento del DNA. Inoltre la sonda di DNA può essere preparata ex novo o può essere prelevata da un pool preesistente di frammenti di DNA rappresentativi dell'intero genoma o di frazioni di genoma, clonati in un vettore adatto. Una collezione di frammenti di questo tipo, che costituisce una « library » o genoteca è stata

costruita per l'Uomo per la prima volta nel 1978 da DNA genomico totale di fegato fetale usando come vettore il batteriofago Charon 4 A (Maniatis *et al.*, 1978). Essa è formata da  $10^6$  frammenti di DNA della dimensione di 15-20.000 nucleotidi tra i quali può essere trovata praticamente qualsiasi sequenza presente nel genoma umano. Genoteche più ristrette sono quelle costituite da cDNA, ossia da DNA ottenuti per retrotrascrizione di RNA messaggero estratto da un particolare tessuto. Queste rappresentano una fonte adatta di sonde per geni attivi in quel tessuto. Genoteche possono anche essere costruite per specifici

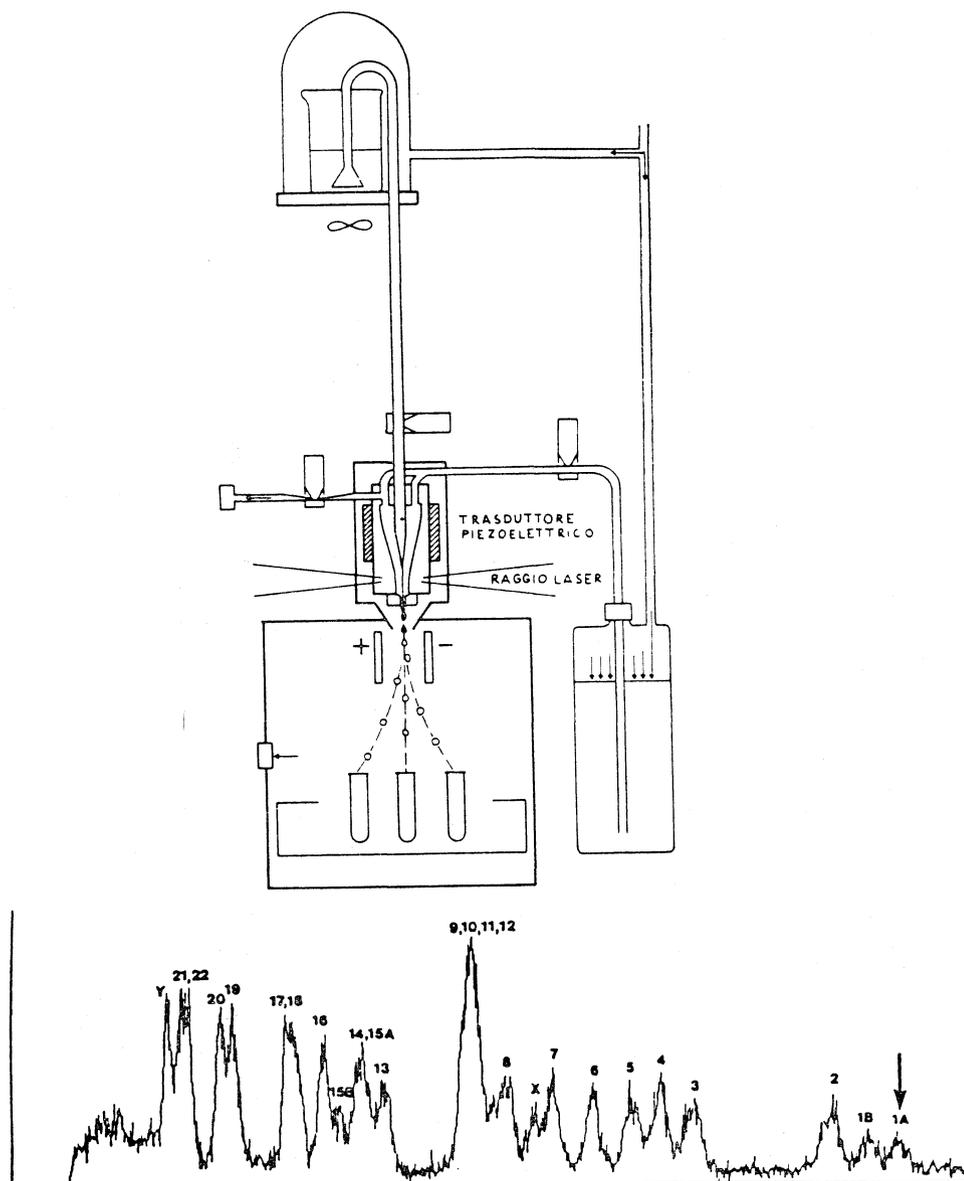


Fig. 6. - « Cell sorter » e cariotipo umano di flusso.

cromosomi umani, frazionati mediante citometro a flusso separatore o mediante isolamento di ibridi cellulari interspecifici portatori di un singolo cromosoma umano. L'uso della citometria a flusso nell'analisi e nella separazione dei cromosomi umani si va progressivamente affermando con il miglioramento del potere di risoluzione, che attualmente consente di discriminare per intensità di fluorescenza fino a 15 e a 20 popolazioni di cromosomi a seconda che vengono usati uno o due laser (Carrano *et al.*, 1979; Langlais *et al.*, 1982) (fig. 6). I cromosomi vengono preventivamente preparati in sospensione per estrazione da cellule coltivate arrestate in mitosi. Il DNA estratto dalla frazione cromosomica separata viene ridotto in frammenti e clonato in un vettore fagico. In questo modo è stata costruita una genoteca per il cromosoma X umano costituita da 50.000 fagi ricombinanti (Davies *et al.*, 1981).

La tecnica alternativa per l'isolamento di singoli cromosomi umani comporta la produzione di ibridi tra cellule umane e cellule di roditori e la selezione, dopo segregazione cromosomica, di prodotti contenenti un singolo cromosoma umano. È preferibile l'uso di ibridi uomo-hamster, perché in questi la perdita di cromosomi umani è più rapida. Un secondo vantaggio è quello di poter disporre in cellule di hamster di una serie di mutanti auxotrofici che consentono la selezione di ibridi stabili con diversi cromosomi umani, presenti singolarmente, in grado di complementare le varie deficienze. La preparazione della genoteca da ibridi con singoli cromosomi umani è ovviamente più complessa di quella richiesta per i cromosomi purificati con metodo citometrico, in quanto, una volta ottenuto l'ibrido, il DNA umano deve essere isolato da quello dell'altra specie parentale. Ciò viene ottenuto mediante una ibridazione molecolare con DNA umano mediamente ripetuto, al quale, in certe condizioni, non si lega quello dei fagi contenenti frammenti di DNA di topo o di hamster. In questo modo viene ottenuta una popolazione di frammenti di DNA di 10-20.000 nucleotidi, dai quali vengono selezionati con ulteriori digestioni e ibridazioni cloni corrispondenti a sequenze uniche di DNA del cromosoma isolato nell'ibrido.

È interessante osservare che sonde di DNA per la localizzazione di geni umani possono essere derivate anche da altre specie animali. Ciò è possibile per l'alto grado di omologia nelle sequenze nucleotidiche di geni che controllano specifiche funzioni biologiche, in particolare attività enzimatiche. Tale omologia determina, limitamente a queste sequenze, una ibridazione crociata tra il DNA umano e quello di altre specie. Questo effetto aumenta ulteriormente le potenzialità del metodo molecolare per il mappaggio genico nell'Uomo, in quanto consente di utilizzare una grande quantità di informazioni acquisite su organismi sperimentalmente più accessibili.

Qualunque sia l'origine della sonda di DNA, la localizzazione del gene corrispondente sul cromosoma può essere effettuata sempre utilizzando gli ibridi cellulari interspecifici con cromosomi umani residui interi o riarrangiati, a seconda che si proceda alla semplice attribuzione cromosomica o al mappaggio regionale. In un numero sufficiente di ibridi viene analizzato il cariotipo e contemporaneamente nel DNA da essi estratto viene saggiata la capacità di legare la sonda marcata per il gene da mappare con la tecnica di ibridazione moleco-

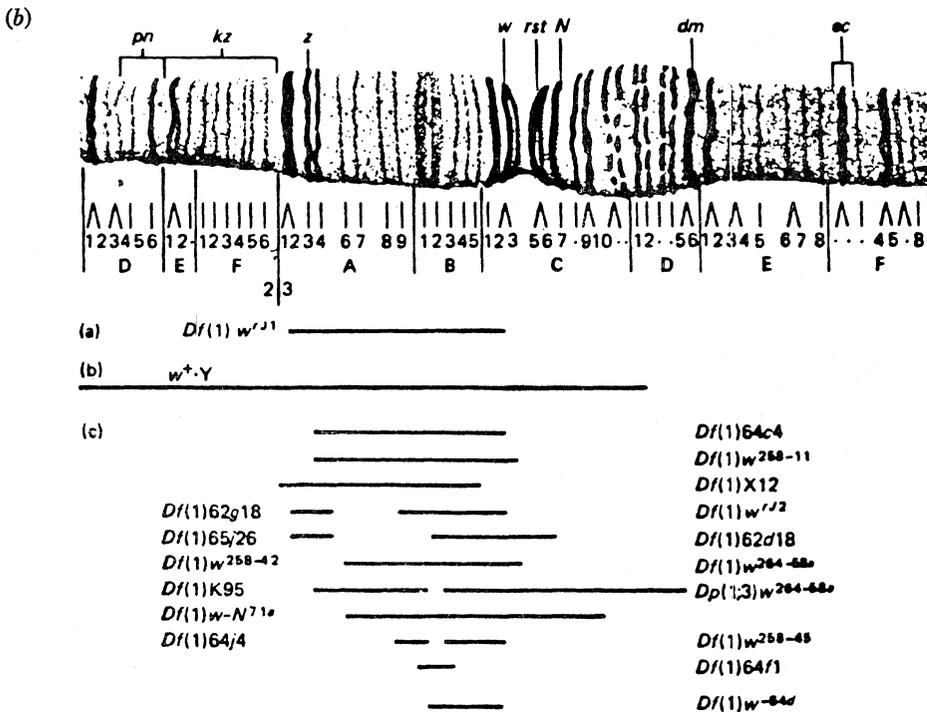
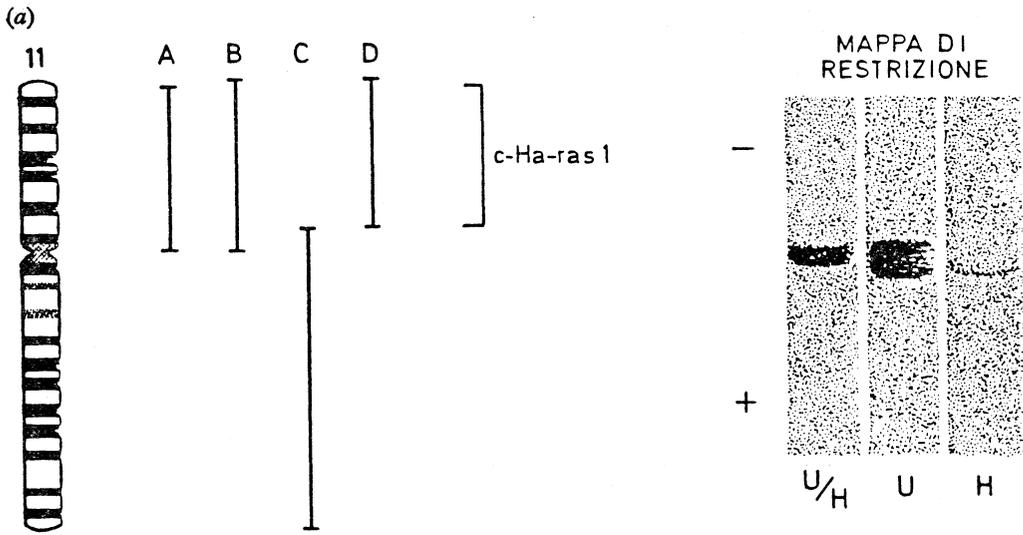


Fig. 7. - « Mappaggio per delezione » su cromosomi di ibridi cellulari uomo-topo analizzati con il bandeggio ad alta risoluzione abbinato all'analisi di restrizione del DNA, (a) e su cromosomi giganti di *Drosophila melanogaster* (b). Si noti l'analogia del principio, pur nella diversità dei sistemi.

lare in liquido o su filtro. Un esperimento tipico è riprodotto in fig. 7(a). La posizione del gene viene individuata sul cromosoma o sulla regione cromosomica che segrega concordemente con la banda generata dal legame con la sonda radioattiva.

La produzione ed il mantenimento in linee cellulari di un'ampia varietà di ibridi Uomo-roditore, ben caratterizzati citogeneticamente, ha notevolmente semplificato il lavoro del mappaggio genico basato su queste tecniche di genetica cellulare. Tuttavia l'instabilità cromosomica degli ibridi cellulari richiede molto spesso la loro produzione *ex novo*, la loro selezione e caratterizzazione. L'esigenza di rendere meno indaginoso il metodo, evitando lunghe fasi di messa a punto di sistemi cellulari, ha stimolato la ricerca di metodi di localizzazione genica più diretta. Uno di questi, già in uso da tempo, ma ritenuto non sufficientemente sensibile per il mappaggio di singoli geni o sequenze di DNA, è l'ibridazione *in situ*, ossia il trattamento diretto del preparato cromosomico con una sonda di DNA radioattiva e la rivelazione del suo legame con i siti omologhi del DNA cromosomico, mediante autoradiografia. Alcune modifiche tecniche, tra cui l'aggiunta di destran solfato, che accelera la velocità di ibridazione (Wahl *et al.*, 1979) hanno consentito di estendere l'applicazione del metodo da geni in copie multiple, come famiglie di geni ripetuti, a geni in copia unica (Gerhard *et al.*, 1981). L'ibridazione *in situ* a scopo di mappaggio richiede l'uso di cellule diploidi provenienti da colture primarie, come quelle di linfociti da sangue periferico, stimolate con fitoemoagglutinina, da ceppi di fibroblasti o da linee linfoblastoidi ai primi passaggi. La precisione della localizzazione cromosomica effettuata mediante l'analisi della distribuzione di grani autoradiografici in campioni di mitosi (fig. 8), dipende dalla qualità della preparazione e del bandeggio dei cromosomi. Combinando la tecnica del bandeggio ad alta risoluzione con quella dell'ibridazione *in situ* è possibile ottenere un mappaggio regionale accurato (Zabel *et al.*, 1983). Il numero di geni umani mappati, comprendendo nuovi dati e conferme di dati precedenti, mediante la tecnica dell'ibridazione *in situ* è quello che ha registrato nell'ultimo anno il più alto tasso di incremento. Ciò dimostra la potenzialità del metodo che può avere estese applicazioni non solo per la localizzazione di sequenze di DNA, sia endogene che esogene, integrate in seguito a processi di trasferimento genico mediato o no da virus, ma anche per la rivelazione di piccole anomalie cromosomiche non identificabili con le tecniche standard di analisi del cariotipo (Mattei *et al.*, 1985 a).

La localizzazione di un gene su un cromosoma può essere ottenuta anche con tecniche esclusivamente biochimico-molecolari, senza ricorso all'analisi morfologica dei cromosomi. La tecnica consiste nel separare al citometro a flusso i cromosomi mitotici isolati, come si è visto in precedenza per la preparazione di genoteche di specifici cromosomi, e nel determinare, mediante ibridazione in liquido o su filtro, la presenza di DNA complementare alla sonda del gene in esame, nelle diverse frazioni cromosomiche. Con questo metodo è stato recentemente localizzato sul cromosoma No 2 il gene per la fosfatasi alcalina placentare umana (Kam *et al.*, 1985). L'uso di riarrangiamenti cromosomici identificabili con l'analisi bivariata ad alta risoluzione in citometria a flusso potrà con-

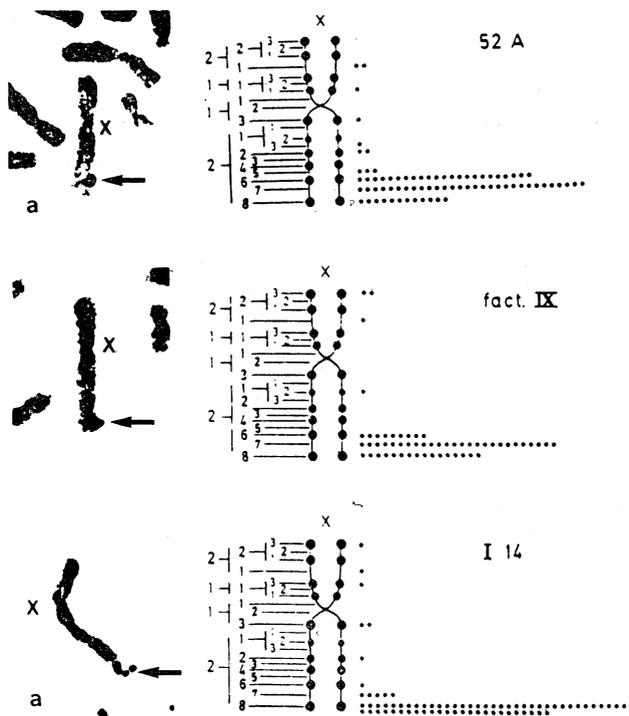


Fig. 8. - Ordinamento dei marcatori 52 A, fattore IX, e I 14, sul tratto subterminale del cromosoma X umano, stabiliti mediante ibridazione *in situ* delle sonde molecolari, accoppiata al bandeggio ad alta risoluzione (modificata da Mattei *et al.*, 1985).

sentire, con questo metodo interamente biochimico-molecolare, anche il mappaggio fine a livello di regioni cromosomiche.

#### STATO DELLA MAPPA GENICA DELL'UOMO

La mappa genica dell'Uomo, aggiornata ogni 2 anni a partire dal 1971 in Workshop internazionali interamente dedicati a questo argomento, si è progressivamente arricchita di informazioni al punto da non poter essere più presentata in forma di diagramma, ma piuttosto come catalogo dei marcatori elencati in ordine alfabetico, con la specificazione della loro natura e della posizione sul cromosoma. Si consideri che soltanto il cromosoma X, che mostra la topografia più dettagliata possiede circa 200 siti di mappaggio di cui 100 corrispondenti a loci di malattie e 100 a marcatori di DNA, distribuiti uniformemente sul cromosoma. La mappa genica generale è stata costruita sulla base di dati ottenuti mediante tutti i metodi di localizzazione disponibili, sia quelli classici formali che quelli citologico-molecolari. Essi comprendono: studi famigliari, ibridi somatici, effetti di dose genica, aberrazioni cromosomiche, tecniche di DNA ricombinante (analisi di restrizione) e ibridazione *in situ*. I siti di mappaggio si riferiscono ad una varietà di geni, di fenotipi e di sequenze, quali: enzimi o altre

proteine, antigeni riconosciuti da anticorpi monoclonali, marcatori di superficie cellulare, marcatori espressi in colture *in vitro*, malattie ereditarie, segmenti anomali di DNA, protooncogeni, pseudogeni e siti cromosomici fragili. Il numero totale di marcatori localizzati, secondo i dati riportati nell'ultimo Workshop sul mappaggio genico nell'Uomo (HGM 8, 1985), è pari a 1.390 con un incremento

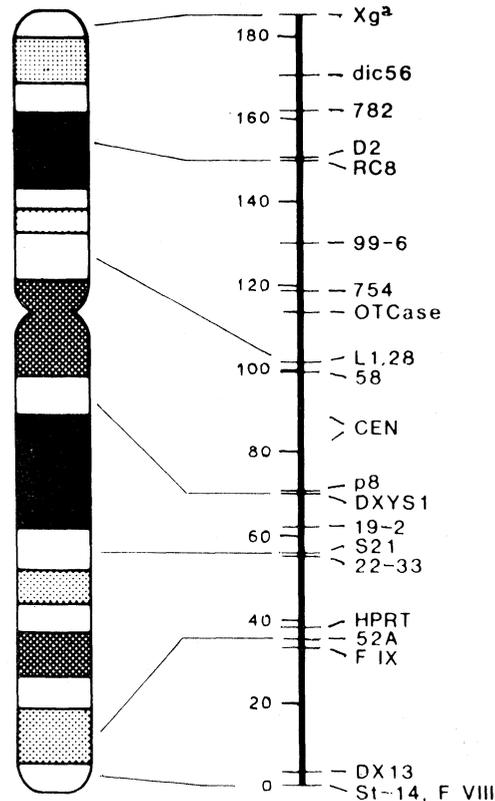


Fig. 9. - Mappa genica del cromosoma X umano: la rappresentazione citologica è confrontata con quella formale ricavata dai dati di linkage.

di 555 rispetto al 1983. Negli anni precedenti l'aumento annuo era stato in media di 50 nuovi geni o sequenze mappate. I rapidi progressi di questi ultimi anni sono dovuti certamente al crescente impiego delle sonde molecolari. Più del 60% dei geni risultano oggi mappati per questa via.

La mappa generale può convenientemente articolarsi in una serie di mappe specializzate, in cui è presentato il diagramma cromosomico con la topografia di particolari categorie di geni, che possono interessare la ricerca di base e la medicina applicata. Un esempio tipico è quello della mappa degli oncogeni e dei siti cromosomici fragili e delle aberrazioni cromosomiche associate a tumori (fig. 9).

*Nota:* il presente studio rientra nel Programma di interesse nazionale del M.P.I. « Genetica di cellule somatiche e citogenetica ».

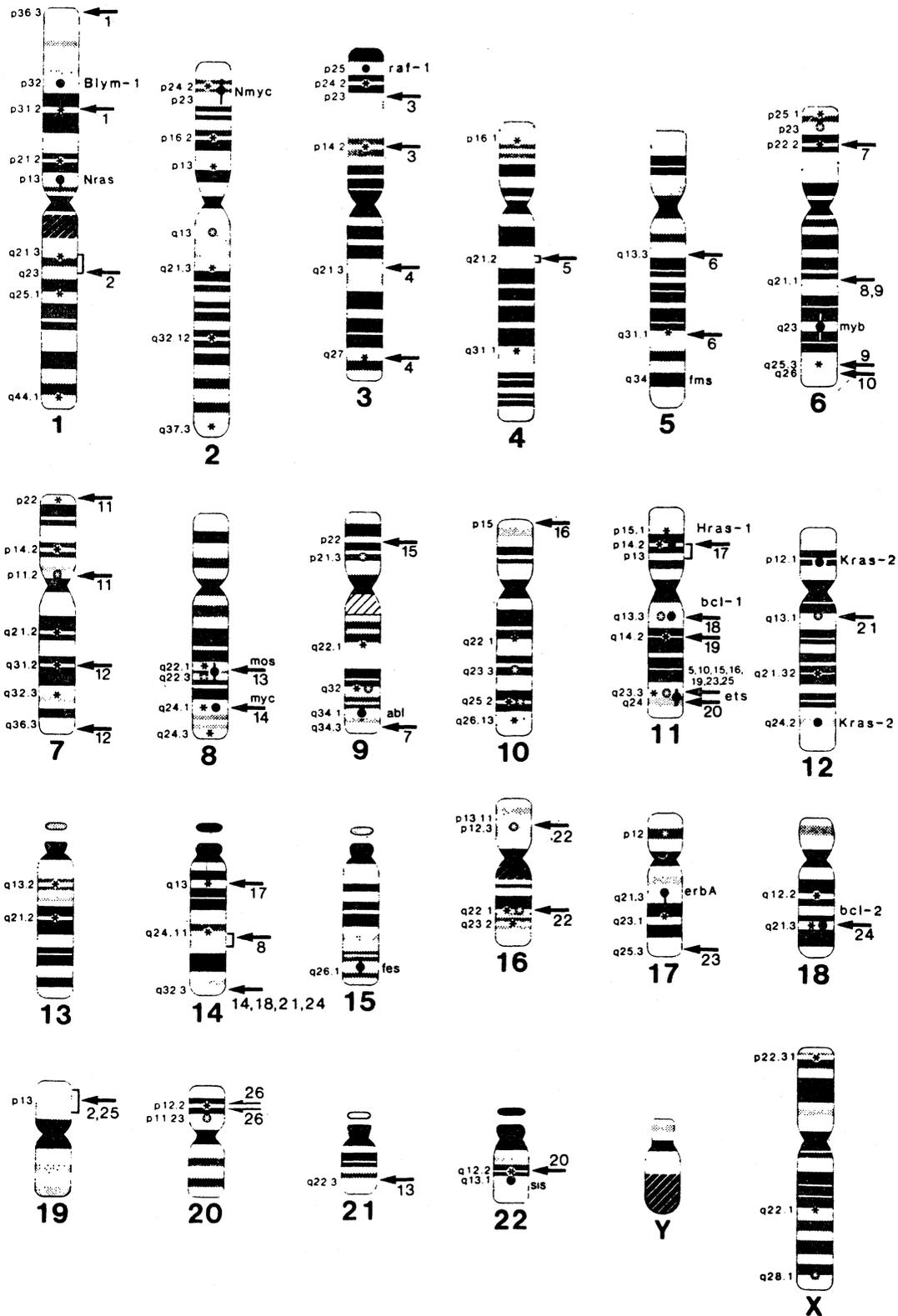


Fig. 10. - Mappa genica specializzata degli oncogeni umani (indicati dagli asterischi) (Yunis, 1981).

## BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON S., BANKIER A.T., BARRELL B.G., DE BRUIJN M.H.L., COULSON A.R., DROUIN J., EPERON I.C., NIERLICH D.P., ROE B.A., SANGER F., SCHREIER P.H., SMITH A.J.H., STADEN R. and YOUNG I.G. (1981) - *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. « Nature », 290, 457-465.
- ANDERSON W.F. (1984) - *Prospects of human gene therapy*. « Science », 226, 401-409.
- BARSKY G., SORIEUL S. and CORNEFERT F. (1960) - *Productions dans des cultures in vitro de deux souches cellulaires en association de cellules de caractère hybride*. « C.R. Acad. Sci. (Paris) », 251, 1825.
- BURGERHOUT W.G., LEUPE-DE SMITH S., JONGSMA A.P.M. (1977) - *Regional assignment of seven genes in chromosome 1 of man by use of man-chinese hamster somatic cell hybrids. II. Results obtained after induction of breaks in chromosome 1 by X-irradiation*. « Cytogenet. Cell Genet. », 18, 267-283.
- CAPECCHI M.R. (1980) - *High efficiency of transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells*. « Cell », 22, 479-488.
- CARRANO A.V., GRAY J.W., LANGLOIS R.G., BURKHART-SCHULTZ K.J., VAN DILLA M.A. (1979) - *Measurement and purification of human chromosomes by flow cytometry and sorting*. « Proc. Natl. Acad. Sci. USA », 76, 1382-1384.
- CASPERSSON T., ZECH L. and JOHANSSON C. (1970) - *Differential banding of alkilating fluorochromes in human chromosomes*. « Exp. Cell Res. », 60, 315-319.
- DAVIES K.E. (1981) - *The application on DNA recombinant technology to the analysis of the human genome and genetic diseases*. « Human Genet. », 58, 351-357.
- DAVIES K.E., YOUNG B.D., ELLES R.G., HILL M.E. and WILLIAMSON R. (1981) - *Cloning of a representative genomic library of the human X chromosome after sorting by flow cytometry*. « Nature », 293, 374-376.
- DE CARLI L. (1961) - *Prospettive di analisi genetica delle cellule somatiche di mammifero coltivate in vitro*. « Annali Sclavo », 3, 515-534.
- DE CARLI L. and NUZZO F. (1973) - *Analisi genetica di cellule somatiche di mammifero coltivate in vitro*. In: *Colture Cellulari*. Ed. Boringhieri, Torino.
- DE CARLI and LARIZZA L. (1978) - *Induced chromosome variation in cultured cell populations*. In: *Origins and Natural History of Cell Lines*. « Progress in Chemical and Biological Research », 26, 93-124.
- DE CARLI L. (1985) - *Come localizzare i geni sui cromosomi umani. La genetica delle cellule somatiche: trent'anni dopo*. « Rivista di Biologia », 78, 187-209.
- DONAHUE R.P., BIAS W.B., RENWICK J.H. and MCKUSICK V.A. (1968) - *Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man*. « Proc. Natl. Acad. Sci. USA », 61, 949-955.
- FOURNIER R.E.K. and RUDDLE F.H. (1977) - *Microcell-mediated transfer of murine chromosome into mouse, chinese hamster and human somatic cells*. « Proc. Natl. Acad. Sci. USA », 74, 319-323.
- GERHARD D.S., KAWASAKI E.S., BANCROFT F.C. and SZABO D. (1981) - *Localization of a unique gene by direct hybridization in situ*. « Proc. Natl. Acad. Sci. USA », 78, 3755-3759.
- GROSS S. and HARRIS H. (1977 a) - *Gene transfer by means of cell fusion. I. Statistical mapping of the human X-chromosome by analysis of radiation-induced gene segregation*. « J. Cell Sci. », 25, 17-37.
- GROSS S. and HARRIS H. (1977 b) - *Gene transfer by means of cell fusion. II. The mapping of eight loci on human chromosome 1 by statistical analysis of gene assortment in somatic cell hybrids*. « J. Cell Sci. », 25, 39-58.
- HALDANE J.B.S. (1955) - *Some alternatives to sex*. « New Biology », 19, 7-26.

- HGM 8 (1985) – *Helsinki Conference*. Eighth International Workshop on Human Gene Mapping. « Cytogenet. Cell Genet. », 40, 1-566.
- HUMAN GENETIC MUTANT CELL REPOSITORY (1981) – NIH Publ. 81-2011. 310 pp., 8th ed.
- JUDD B.H., SHEN M.W. and KAUFMANN T.C. (1972) – *The anatomy and function of a segment of the X-chromosome of Drosophila melanogaster*. « Genetics », 71, 139-156.
- KAM W., CLAUSER E., KIM Y.S., WAI KAN Y. and W.J. RUTTER (1985) – *Cloning, sequencing, and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA*. « Proc. Natl. Acad. Sci. USA », 82, 8715-8719.
- KLEIN G. (1983) – *Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell derived tumors in mice and in men*. « Cell », 32, 311-315.
- LANGLOIS R.G., YU L.C., GRAY J.W. and CARRANO A.V. (1982) – *Quantitative karyotyping of human chromosomes by dual beam flow cytometry*. « Proc. Natl. Acad. Sci. USA », 79, 7876-7880.
- LAW M.L. and KAO F.T. (1978) – *Induced segregation of human syntenic genes by 5-bromo-deoxyuridine and near-visible light*. « Somatic Cell Genet. », 4, 465-476.
- LITTLEFIELD J.W. (1964) – *Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants*. « Science », 145, 709-710.
- MALAWISTA S.E. and WEISS M.C. (1974) – *Expression of differentiated functions in hepatoma cell hybrids, high frequency of induction of mouse albumin production in rat hepatoma-mouse lymphoblast hybrids*. « Proc. Natl. Acad. Sci. USA », 71, 927-931.
- MANIATIS T., HARDISON R.C., LACY E., LANER J., O'CONNELL C., QUON D., SIM G.K. and EFSTRATIADIS A. (1978) – *The isolation of structural genes from libraries of eukaryotic DNA*. « Cell », 15, 687-701.
- MATTEI M.G., PHILIP N., PASSAGE E., MOISAN J.P., MANDEL J.L. and MATTEI J.F. (1985 a) – *DNA probe localization at 18 p 113 band by in situ hybridization and identification of a small supernumerary chromosome*. « Human Genet. », 69, 268-271.
- MATTEI M.G., BAETEMAN M.A., HEILIG R., OBERLE I., DAVIES K., MANDEL L. and MATTEI J.F. (1985 b) – *Localization by in situ hybridization of the coagulation factor IX gene and of two polymorphic DNA probes with respect to the fragile X site*. « Human Genet. », 69, 327-331.
- MC BRIDE O.W. and OZER H.L. (1973) – *Transfer of genetic information by purified metaphase chromosomes*. « Proc. Natl. Acad. Sci. USA », 70, 1258-1262.
- MC KUSICK V.A. (1981) – *The anatomy of human genome*. *Hospital Practice*, April 1981, 82-100.
- PAUL W.E., SREDIN B. and SCHWARTZ R.H. (1981) – *Long-term growth and cloning of non-transformed lymphocytes*. « Nature », 294, 697-699.
- PONTECORVO G., TARR-GLOOR E. and FORBES E. (1954) – *Analysis of mitotic recombination in Aspergillus nidulans*. « J. Genetics », 52, 226-237.
- PONTECORVO G. (1959) – *Panel discussion*. In: *Biochemistry of human genetics*. *Ciba Symposium*. (G. Wolsteinholme, C. O'Conner, J. Churchill and A. Churchill, eds.), p. 279-285.
- PUCK T.T. and MARCUS P.I. (1955) – *A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors*. « Proc. Natl. Acad. Sci. USA », 41, 432.
- RUDDLE F.H. (1981) – *A new era in mammalian gene mapping: somatic cell genetics and recombinant DNA methodologies*. « Nature », 294, 115-210.
- SCANGOS G.A. and RUDDLE F.H. (1981) – *Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells – a review*. « Gene », 14, 1.
- STERN C. (1936) – *Mitotic crossing-over and segregation in Drosophila melanogaster*. « Genetics », 21, 625-630.
- SZYBALSKA E.H. and SZYBALSKI W. (1962) – *Genetics of human cell lines*. IV. *DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait*. « Proc. Natl. Acad. Sci. USA », 48, 2026-2034.
- TJIO J.H. and LEVAN A. (1956) – *The chromosome number of man*. « Hereditas », 42, 1-6.

- WAHL G.M., STERN M. and STARK G.R. (1979) – *Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzylloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate.* « Proc. Natl. Acad. Sci. USA », 76, 3683-3687.
- WEISS M.C. and GREEN H. (1967) – *Human-mouse hybrid cells lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes.* « Proc. Natl. Acad. Sci. USA », 58, 1104.
- YUNIS J.J., SAWYER J.R. and BALL D.W. (1978) – *The characterization of high-resolution G-banded chromosomes of man.* « Chromosoma », 67, 293-307.
- YUNIS J.J. (1981) – *Mid-prophase human chromosomes: the attainment of 2.000 bands.* « Hum. Genet. », 56, 293.
- YUNIS J.J. (1981) – *Chromosomes and cancer: new nomenclature and future directions.* « Human Pathology », 12, 494-503.
- YUNIS J.J. and SORENG A.L. (1984) – *Constitutive fragile sites and cancer.* « Science », 226, 1199-1203.
- ZABEL B.U., NAYLOR S.L., SAKAGUKI A.Y., BELL G.I. and SHOWS T.B. (1983) – *High resolution chromosomal localization of human genes for amylase, proopiomelanocortin, somatostatin, and a DNA fragment (D3S1) by in situ hybridization.* « Proc. Natl. Acad. Sci. USA », 80, 6932-6936.