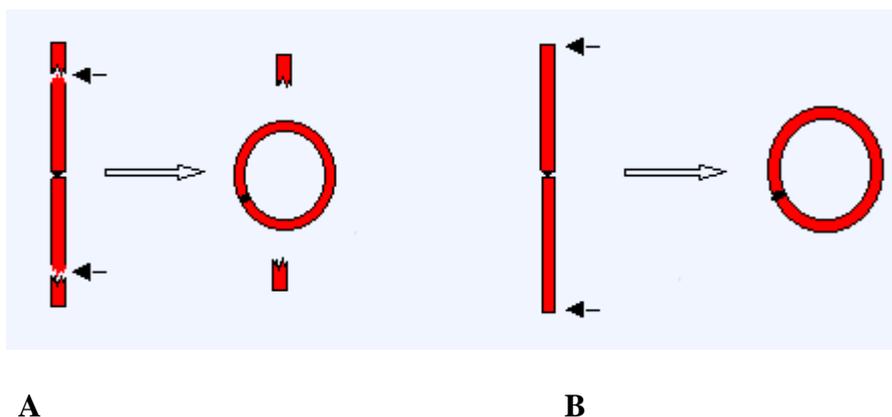


La sindrome “ring del cromosoma 14” è una patologia rara che si manifesta principalmente con ritardo psicomotorio, crisi epilettiche ad esordio molto precoce, anomalie retiniche e una facies caratteristica.

Gli individui affetti presentano un riarrangiamento ad anello di un cromosoma 14, in genere associato a delezioni di misura variabile del materiale genetico.

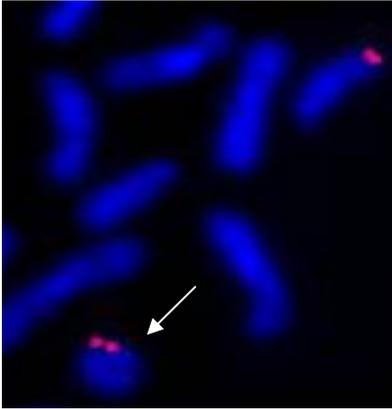
**Come si forma il ring?** Ci sono due teorie distinte in grado di spiegare la perdita o meno di materiale genetico.



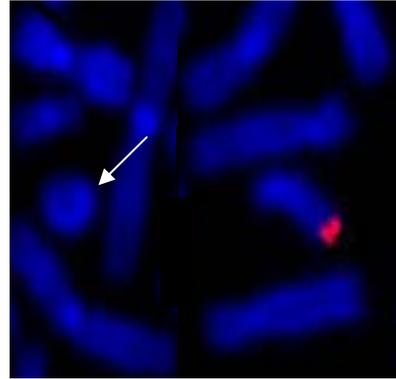
Un primo meccanismo (A) prevede il verificarsi di una rottura in ciascun braccio del cromosoma e la successiva fusione delle estremità rotte. Questo evento presuppone la perdita di materiale genetico localizzato nella porzione più distale dei bracci. Secondo un'altra teoria (B) la formazione del ring avverrebbe per fusione “end to end” delle estremità telomeriche dei due bracci del cromosoma. Pertanto la formazione del ring in questo caso andrebbe interpretata come un'alterazione della struttura del materiale genetico piuttosto che come un'alterazione del dosaggio genico.

Premesso questo, il mio lavoro consiste nell'effettuare uno studio clinico-genetico di famiglie con riarrangiamenti diversi a carico del cromosoma 14 (ring, traslocazioni e delezioni che interessano differenti regioni del cromosoma 14). Lo scopo di questo studio è quello di valutare il rischio di ricorrenza familiare, ed analizzare specifiche correlazioni genotipo-fenotipo per la sindrome ring 14.

Per ogni famiglia viene eseguito dapprima un esame cromosomico (cariotipo), tramite analisi di almeno 100 cellule sia nel paziente che nei rispettivi genitori. Una volta fatto questo, è necessario caratterizzare più finemente il tipo di riarrangiamento cromosomico e per poter fare questo ci avvaliamo dell'uso di una tecnica che si chiama FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). Questa tecnica prevede l'uso di “sonde” specifiche. Queste sonde, rese fluorescenti dall'aggiunta di un fluorocromo, altro non sono che tratti di DNA che riconoscono in maniera specifica alcune regioni cromosomiche e che andando a ibridarsi con queste ne riconoscono la presenza oppure no. Di seguito è riportato un esempio di immagine FISH, relativamente al caso di un paziente portatore di ring 14:



A



B

Come si può notare la tecnica FISH non consente il bandeggio; i cromosomi appaiono tutti uniformemente colorati in blu. In A il segnale fluorescente specifico per una determinata regione del braccio lungo del cromosoma 14 è presente sia sul cromosoma 14 normale che sul ring (freccia), per cui abbiamo la certezza che quella regione cromosomica è integra. In B è presente il segnale sul cromosoma 14 normale, mentre nel ring il segnale non è presente, a dimostrazione che in questo caso c'è una perdita di materiale cromosomico.

Naturalmente è necessario ricorrere all'uso seriale di molte sonde, ciascuna delle quali in grado di riconoscere una diversa regione cromosomica, ed estendere questo studio al numero maggiore possibile di pazienti, che andranno poi comparati tra loro, per poter stabilire delle precise correlazioni genotipo-fenotipo.

Come già detto in precedenza la formazione del ring in genere è associata a delezione di misura variabile del materiale cromosomico. Poiché è noto che il braccio corto del cromosoma 14 è costituito da materiale genetico ripetitivo, di nessuna importanza dal punto di vista delle manifestazioni fenotipiche, si può supporre, in prima analisi, che i casi di delezione terminale del braccio lungo del cromosoma 14 dovrebbero essere, in qualche modo, assimilabili a quelli con ring 14. In effetti, si nota una corrispondenza per quanto riguarda alcune caratteristiche quali l'ipotonìa, la microcefalia, il ritardo della crescita, i dismorfismi facciali; tuttavia, i dati in nostro possesso mostrano che questi tratti fenotipici **si manifestano con una severità più pronunciata nei pazienti portatori di ring** rispetto ai pazienti con la sola delezione terminale. Inoltre, alcuni segni clinici tipici della sindrome ring 14, quali **l'epilessia e le anomalie retiniche, non si osservano nei pazienti con la sola delezione terminale**. Questo è un aspetto molto interessante che ci dice come nella sindrome ring 14 non giocano un ruolo soltanto alcuni geni che vanno perduti, ma ci deve essere qualcos'altro, come dimostra anche il fatto che le stesse manifestazioni fenotipiche si osservano anche nei pazienti con ring completo.

Mentre un cromosoma lineare, anche se delecto, è stabile, il cromosoma ad anello è sempre instabile. Infatti, si può supporre che molte manifestazioni fenotipiche della sindrome ring 14 siano correlate **all'instabilità strutturale intrinseca del ring**: scambi tra cromatidi fratelli del ring in mitosi facilitano la produzione di altre aberrazioni cromosomiche quali doppi ring o ring intrecciati; questi possono essere trasmessi alle cellule figlie, oppure possono essere persi producendo cellule monosomiche (cioè con un solo cromosoma 14). Il risultato finale è la formazione continua di cellule con un corredo cromosomico sbilanciato e quindi con ridotta vitalità.

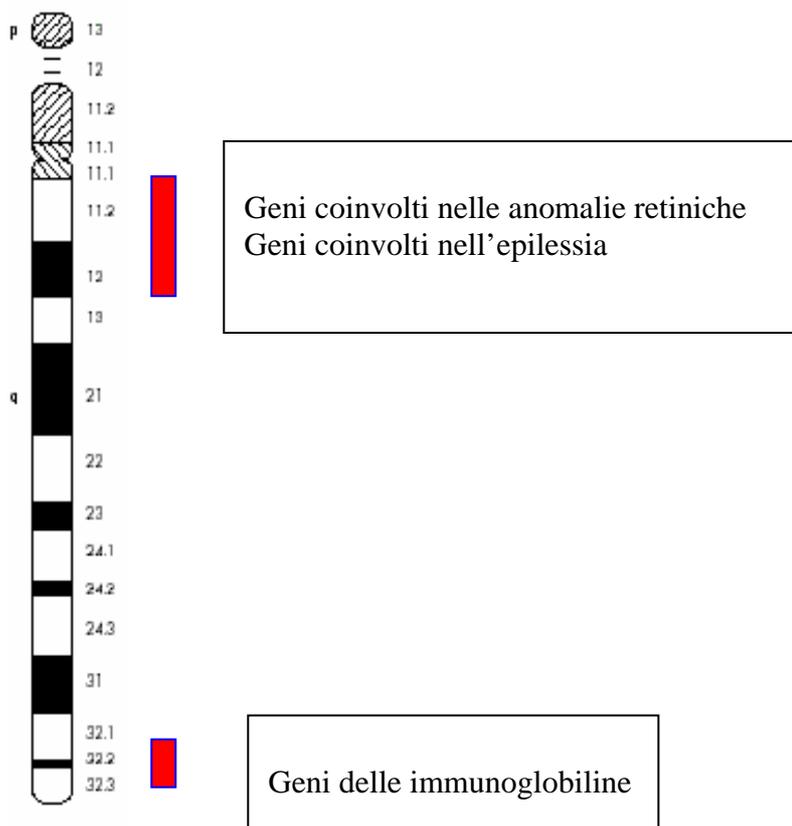
Da un punto di vista citogenetico, l'instabilità del ring si manifesta con il ritrovamento di cariotipi a mosaico negli individui portatori. Questa condizione di **mosaicismo** risulta spesso **dinamica**, in

quanto il numero e la struttura dei ring possono subire variazioni nelle cellule somatiche di uno stesso individuo in tempi diversi. In effetti, il ritrovamento più frequente negli individui affetti è la presenza di una seconda linea cellulare monosomica. Si può ipotizzare che la generazione continua di cellule monosomiche associate ad un inevitabile aumento di mortalità possa provocare una riduzione significativa delle cellule vitali in certo periodo dello sviluppo. Un tale fenomeno giocherebbe un ruolo fondamentale nella determinazione del fenotipo “ritardo di crescita”, e si può supporre che anche le crisi epilettiche potrebbero dipendere dal mosaicismo somatico nelle cellule del sistema nervoso centrale.

Inoltre, in presenza di una semplice delezione, abbiamo soltanto la perdita di geni, viceversa, nel caso di un ring, oltre alla perdita di geni si ha anche un'altra conseguenza: vengono trovati vicini fra loro geni che di norma sarebbero molto distanti. L'attività di questi geni, che pure sono intatti, può essere modificata per “**effetto di posizione**” e ciò contribuisce ulteriormente alle differenze che si notano fra semplice delezione e ring 14. Con il termine “effetto di posizione” si intende dire che nella nuova configurazione spaziale che si stabilisce con la formazione del ring, il telomero del braccio corto potrebbe causare un decremento dell'espressione dei geni ora adiacenti sul braccio lungo dello stesso cromosoma. Infatti, l'analisi comparata di casi con ring(14) e casi con delezione interstiziale di differenti regioni in 14q sembra dire che un possibile effetto di posizione su geni in 14q11.2q12, possa essere responsabile dei sintomi epilessia e retinopatia.

Infine, si può anche supporre che la formazione del ring possa cambiare la posizione del cromosoma anomalo all'interno del nucleo. Infatti, è noto che l'espressione genica è correlata con la posizione nucleare di un gene o di un locus genico, per cui nel cromosoma a ring, la trascrizione dei geni lungo il braccio lungo del cromosoma potrebbe essere influenzata, secondo un meccanismo ancora non noto, dal suo riposizionamento all'interno del nucleo.

Concludo con uno schema del cromosoma 14, che mostra la disposizione relativa dei geni implicati nelle principali manifestazioni cliniche:



## LA SINDROME DA RING 14

La sindrome "Ring del cromosoma 14" è una patologia rara con ritardo psicomotorio, epilessia, anomalie retiniche e facies caratteristiche. E' causata da un riarrangiamento ad anello del cromosoma 14 usualmente associato a delezioni di estensione variabile. Le manifestazioni cliniche variano molto nei singoli pazienti e solo in parte possono essere giustificate da delezione distale del braccio lungo del cromosoma 14. Sono invocati effetti di posizione, instabilità mitotica del ring e concomitante presenza di una linea con monosemia 14 completa.

### CENNI STORICI

La prima pubblicazione riguardante un caso di sindrome da Ring 14 si deve a Gilgenkrantz nel 1971. A dispetto delle variazioni nella anomalità cromosomica che includono differenze in punti di rottura, mosaicismo di trasferimento (Abe e altri 1978; Lippe e altri 1981), ed è apparente trisomia dovuta ad un anello di misura doppia (14 q 14 q) (Cantù e altri 1989; Mc Clintock 1983), la maggioranza di questi casi sono stati associati ad una sindrome clinica caratteristica. Le principali caratteristiche includono:

?? Ritardo nella crescita prenatale e postatale

?? Ritardo mentale

?? Colpi epilettici

?? Microcefalia e dimorfismo facciale distinto, che include faccia allungata, fessure delle palpebre sottili, epicanto, e dorso nasale ampio

Altre caratteristiche anomalie trovate solo in alcuni pazienti sono:

?? Anomalie della retina

?? Linfoedemi delle mani e dei piedi

?? Infezioni polmonari ricorrenti

L'esistenza di una distinta sindrome associata con il cromosoma Ring 14 viene riconosciuta fin dai primi rapporti, tuttavia un'attenta analisi dei casi pubblicati mostra un'ampia gamma di variabilità fenotipica che può essere dovuta a cariotipi diversi o a diverse età dei pazienti nel momento della valutazione o criteri diversi usati nel rapporto delle caratteristiche cliniche.

In parecchi casi la morfologia del cromosoma Ring mostrò grande variabilità, inclusi anelli duplicati o di varie forme. L'instabilità di questa struttura viene spiegata dalla formazione ponte-r o t t u r afusione originariamente osservato nella sostanza della pianta.

Il ritardo mentale è di solito serio e presente in tutti i casi conosciuti.

Una caratteristica di tutti i pazienti conosciuti con r(14) era l'**epilessia**. Non appare che la crisi sia basata su una grande anomalia del cervello. Tendono ad apparire dopo il periodo perinatale. Furono trovate anomalie nell'EEG in 16 casi su 20. Il Cat scannino o la pneumoencefalografia hanno mostrato dilatazione ventricolare e/o atrofia cerebrale. Furono riscontrate anche casi di atassia e ipotonia e nel 50% dei casi anomalie della retina.

Il rapporto femmina - maschio è di 2 a 1

### MANIFESTAZIONI CLINICHE

La sindrome del Ring 14 ha un gruppo di manifestazioni cliniche principali, noi stabiliamo questo fenotipo sulla base dell'osservazione dei pazienti, i pazienti sono pochi quindi il fenotipo non è ancora perfettamente delineato. Il ritardo dello sviluppo psicomotorio è praticamente costante, l'epilessia è quasi sempre presente, l'ipotonia muscolare, un segno peraltro molto aspecifico, è presente, la microcefalia è presente, il ritardo di crescita pre e postnatale. Queste sono le manifestazioni principali.

#### **CARATTERISTICHE FACCIALI**

?? ***Fronte alta e prominente***

?? ***Strabismo***

?? ***Iperptorismo, epi-/telecanto, blefarofimosi***

?? ***Andamento obliquo delle fessure palpebrali***

?? ***Sella nasale ipoplasia***

?? ***Narici antiverse***

?? ***Philtrum lungo***

?? ***Bordo mucoso del labbro superiore sottile***

?? ***Palato ogivale***

?? ***Micrognatia***

?? ***Orecchie a basso impianto***

Cerchiamo di caratterizzare meglio andando a vedere quali sono le *caratteristiche facciali*, generalmente una fronte alta e prominente, strabismo, ipertelorismo (aumentata distanza tra gli occhi), epiteleocanto (plica cutanea all'interno dell'occhio), blefarofimosi (brevità della fessura palpebrale). Andamento degli occhi obliquo dall'alto in basso e dall'interno all'esterno. Radice del naso schiacciato, narici antiverse, il filtrum, che è questa porzione che separa il naso dal bordo mucoso del labbro superiore, lungo, il bordo mucoso del labbro superiore sottile, il palato ogivale e la micrognatia (mento corto) e le orecchie a basso impianto.

Oltre a queste caratteristiche facciali la sindrome presenta altre anomalie:

?? ***Ritardo mentale (presente in tutti i casi di Ring 14)***

?? ***Epilessia (presente in tutti i casi di Ring 14)***

?? ***Ritardo nella crescita (si può verificare anche un ritardo prenatale)***

?? ***Microcefalia***

?? ***Retinite pigmentosa***

Queste caratteristiche sono il risultato di una media fatta sull'osservazione di casi clinici e quindi dobbiamo essere ben consapevoli del fatto che ogni paziente è un individuo a sé, ognuno ha le proprie caratteristiche, la propria individualità, e perciò ci può benissimo essere il caso che esce un pochino dalla media.

Ritengo opportuno inserire un breve approfondimento su due manifestazioni costanti nella Sindrome:

1) **Che cos'è l'epilessia**

L'epilessia è caratterizzata dalla ripetizione di crisi epilettiche, dovute ad una iperattività delle cellule nervose cerebrali (i cosiddetti "neuroni"). Si verifica infatti, paradossalmente, un eccesso di funzione del sistema nervoso: alcune cellule del

cervello incominciano a lavorare ad un ritmo molto superiore del normale, producendo la cosiddetta scarica epilettica ( che viene registrata con l'elettroencefalogramma) e la crisi epilettica ( che si riconosce dal resoconto o con l'osservazione).

Esistono due tipi di epilessia. Nel primo (epilessie primarie o idiomatiche) la tendenza a provocare la crisi è costituzionale; questi pazienti non presentano alcuna lesione cerebrale e sono dal punto di vista neurologico del tutto normali, a parte questa singolare caratteristica.

Nel secondo (epilessie secondarie o sintomatiche) che comprende la maggioranza dei pazienti, l'epilessia si sviluppa in seguito ad una lesione cerebrale. Si va da disturbi dell'ossigenazione cerebrale al momento della nascita (evento molto frequente), a malformazioni della corteccia cerebrale fino a tutte le patologie acquisite del cervello, come infezioni, traumi, tumori, disturbi circolatori. Ogni evento morboso che lede la corteccia cerebrale può infatti dare origine, nel corso degli anni, a un focolaio responsabile dell'epilessia. Questi pazienti presentano talora altri segni neurologici quali disturbi motori, ritardo dello sviluppo, deficit d'attenzione.

In un buon numero di casi non si riesce a trovare la causa, e l'epilessia viene definita criptogenetica.

### ***Le crisi***

Esse si rivelano con un breve ed improvviso disturbo delle funzioni nervose. Hanno in genere breve durata (meno di un minuto) e si possono manifestare con sintomi diversi da caso a caso, a seconda della funzione dei neuroni cerebrali coinvolti. Le crisi possono essere rare, ma nella maggior parte dei casi si ripetono frequentemente, anche molte volte nella giornata: Fra una crisi e l'altra non è presente solitamente alcun disturbo.

La manifestazione più importante è la sospensione improvvisa della coscienza con caduta a terra e comparsa di movimenti di tipo convulsivo (tremori e scosse muscolari). In altri casi la perdita di coscienza si accompagna ad azioni compiute in modo automatico (masticare, inghiottire, parlare, toccare o spostare oggetti), oppure a un blocco motorio. A volte la coscienza è conservata e il malato può avvertire sensazioni particolari quali lampi di luce, rumori, formicolii da una parte del corpo, gusti o odori strani, improvvise sensazioni di angoscia o euforia, la sensazione di essere in un sogno e immagini di ricordi di un passato.

Le crisi sono caratteristiche a causa della loro imprevedibilità, l'impossibilità di controllare in quel momento le funzioni nervose e il proprio comportamento, la breve durata (le crisi durano pochi secondi o pochi minuti, raramente più di dieci secondi), l'inizio e la fine sono improvvisi.

Questa introduzione sull'epilessia serve ad attirare l'attenzione sul fatto che l'epilessia è una costante delle manifestazioni della sindrome del Ring 14. Tra l'altro, la malformazione ad anello del cromosoma 14 è l'unica malformazione che si associa ad epilessia. Dato noto è che le crisi iniziano normalmente precocemente. Di solito cominciano nel 1 anno di vita. Sono crisi di diverso tipo, che

fin dall'inizio hanno una caratteristica: quella di tendere a ripetersi e di essere difficilmente controllabili con i farmaci. Quindi si pone come una delle cromosomopatie con l'epilessia grave e farmacoresistente. Le crisi sono prevalentemente tonico-cloniche generalizzate oppure di tipo mioclonico (cioè una scossa improvvisa). Sono probabilmente di origine frontale.

## **2) Che cos'è la retinite pigmentosa?**

Gruppo di malattie ereditarie della retina, caratterizzate dalla migrazione dei granuli di melanina dallo strato pigmentato della retina verso lo strato più anteriore della retina stessa. In molti casi si ha una perdita dell'acutezza visiva, che può portare all'ipovisione e progredire fino alla cecità. Studi recenti hanno dimostrato che alla base della retinite pigmentosa ci sono mutazioni di alcune proteine.

La Retinite pigmentosa è una malattia degenerativa che colpisce le cellule fotorecetttrici della retina uccidendole lentamente. In questo modo la capacità visiva del soggetto colpito viene progressivamente ridotta, fino a giungere in molti casi alla completa cecità. Le cause che determinano questa infermità sono ancora sconosciute e di conseguenza non esiste alcuna cura per i malati. L'unica informazione certa è l'origine genetica della Retinite Pigmentosa.

I principali sintomi che possono indurre il medico a sospettare di trovarsi di fronte a un caso di Retinite Pigmentosa sono essenzialmente due:

? ? Cecità Crepuscolare e Notturna

Cioè la difficoltà a vedere in condizioni di scarsa illuminazione o problemi di adattamento nel passare dagli ambienti illuminati a quelli oscuri.

? ? Restringimento del campo visivo

Si manifesta con la difficoltà nel percepire gli oggetti posti lateralmente, oppure con l'inciampare nei gradini o negli ostacoli bassi. La velocità di progressione della malattia e l'età di comparsa dei sintomi variano in relazione a molti fattori tra cui il modello di trasmissione genetico.

Il decorso della malattia ha una durata estremamente variabile ma è comunque sempre progressivo ed invalidante. Nella maggioranza dei casi i sintomi precedentemente descritti si aggravano, il campo visivo si restringe sempre di più fino a chiudersi completamente. Compaiono poi altri disturbi come l'abbagliamento, l'incapacità di distinguere i colori, ed una particolare forma di cataratta. L'esito finale è purtroppo in molti casi la cecità assoluta.

## **ANALISI CROMOSOMICA**

I citogenisti sono gli scienziati specializzati nello studio dei cromosomi.

Normalmente vengono analizzati i cromosomi contenuti nei globuli bianchi (linfociti) di una persona. Si possono anche analizzare i cromosomi di altri tessuti del corpo umano, come il midollo osseo, la pelle, le cellule dei villi coriali o nel liquido amniotico.

Le cellule devono essere esaminate in uno stadio adeguato, quando cioè i cromosomi sono integri.

In questo stadio (chiamato metafase) i cromosomi sono colorati con preparati diversi. Il colorante usato più spesso si chiama **GIEMSA** e questa tecnica induce nei cromosomi dei bendaggi **G (GBANDED)**. Se i cromosomi vengono analizzati quando sono leggermente meno compatti, i bendaggi si vedono meglio, le perdite e le aggiunte di DNA possono essere facilmente identificate. Questo ultimo tipo di analisi si chiama **ALTA RISOLUZIONE**. I diagrammi dei cromosomi che mostrano i bendaggi sono detti **IDEOGRAMMI**. Tra le più recenti metodiche di analisi dei cromosomi ricordiamo la tecnica **FISH (FLUORESCENT IN-SITU HYBRIDIZATION)**, cioè la tecnica di ibridazione fluorescente in situ.

Il patrimonio cromosomico di una persona è chiamato **CARIOTIPO**.

Il c a r i o t i p o di una persona sottoposta a una valutazione genetica viene espresso da un codice standardizzato, denominato **ISCN (INTERNATIONAL SYSTEM FOR HUMAN CYTOGENETIC NOMENCLATURE)**, cioè Sistema Internazionale per la Nomenclatura della Citogenetica Umana.

In generale il codice ISCN è formulato in modo da rivelare subito il numero dei cromosomi contenuti in ogni cellula del corpo umano; successivamente viene identificato il cromosoma sessuale e infine l'eventuale disordine cromosomico.

Ogni punto di rottura nel cromosoma è descritto da un sistema numerico standardizzato che si basa sui bendaggi G. Così i bendaggi permettono ai cromosomi di essere mappati in **REGIONI**, e a loro volta suddivise in **BANDE** e **SOTTOBANDE**.

Qualche esempio:

46, XX Cariotipo normale di una femmina (XX) con 46 cromosomi

46, XY Cariotipo normale di un maschio (XY) con 46 cromosomi

46, XX, del (8)(p23.1 ter) Cariotipo di una femmina che presenta una **delezione** del cromosoma

8 . Questo significa che il cromosoma 8 si è rotto nel braccio corto(p) nella regione 2, banda 3, sottobanda 1. Il resto del braccio corto, dal punto di rottura a quella che era la parte terminale (ter), è andato perso.

P e r c i ò la banda 8p23.1 è il punto di rottura di questa delezione.

46,XY, r(14) Cariotipo di un maschio; una copia del cromosoma 14 si è riagganciata ad anello.

