

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN
CITOGENETICA UMANA
DIRETTORE: CH.MA PROF.SSA ORSETTA ZUFFARDI**

**CARATTERIZZAZIONE DI CROMOSOMI
MARKER CON FLUORESCENCE IN SITU
HYBRIDIZATION**

**SPECIALIZZANDA: DR.SSA ELISABETTA BARO
MATRICOLA: 267266/58**

ANNO ACCADEMICO 2000/01

INDICE

INTRODUZIONE	pag 3
MATERIALI E METODI	pag 5
RISULTATI	pag 6
Caso 1	pag 6
Caso 2	pag 9
Caso 3	pag 13
Caso 4	pag 15
Caso 5	pag 20
Caso 6	pag 22
DISCUSSIONE	pag 25
Caso 1	pag 25
Caso 2	pag 27
Caso 3	pag 28
Caso 4	pag 29
Caso 5	pag 30
Caso 6	pag 31

CONCLUSIONI	pag 33
BIBLIOGRAFIA	pag 38
RINGRAZIAMENTI	pag 42

INTRODUZIONE

I cromosomi marker sono un gruppo eterogeneo di cromosomi variamente riarrangiati tradizionalmente descritti anche come ESACs (Extra Structurally Abnormal Chromosomes), cromosomi soprannumerari, accessori e B-chromosomes (quando associati a normalità fenotipica). Il cariotipo 47, +mar comporta una duplicazione (trisomia parziale) o in alcuni casi una triplicazione (tetrasomia parziale) del materiale che costituisce il marker.

Possono essere di origine familiare, la maggior parte di questi ESACs sono costituiti dalle braccia corte e dal materiale pericentromerico di cromosomi acrocentrici o dalla cromatina pericentromerica di altri autosomi. Questi possono essere scoperti casualmente in individui normali, spesso in seguito a diagnosi prenatale.

Alcuni markers sono molto piccoli e facilmente persi durante la divisione cellulare, e ciò crea una condizione di mosaicismo che si incontra anche come mosaicismo familiare.

La trasmissione familiare di un ESAC contenente materiale geneticamente attivo portando ad una aneuploidia funzionale parziale è stata osservata raramente in alcuni casi di mosaicismo (Urioste et al. 1994) e vi è rischio riproduttivo se l'individuo protetto da una particolare distribuzione tissutale ha la linea anormale rappresentata nelle gonadi.

L'individuazione di un marker in diagnosi prenatale richiede quindi l'esame del cariotipo parentale: se uno dei genitori ha il cariotipo 47, +mar non esiste rischio di anomalità fetale, la presenza di una condizione di mosaicismo rende più difficile una predizione per il feto.

Se l'ESAC rivela essere un piccolo cromosoma derivativo dovuto ad una segregazione 3:1 in un genitore portatore di traslocazione bilanciata, vi sono sicuramente anomalità fenotipiche.

L'uso di tradizionali tecniche di colorazione (QFQ, GTG, AgNOR, CBG, DA DAPI) per la caratterizzazione dei cromosomi marker assieme alla recente introduzione della Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) con l'uso di probes centromero, cromosoma e locus specifici ha reso possibile la miglior definizione dell'origine e della struttura degli ESACs.

In questo lavoro viene presentata l'analisi cromosomica e i dati clinici di un gruppo di 6 pazienti con cromosomi marker de novo, venuti alla nostra osservazione in seguito a diagnosi prenatale (3 casi) o postnatale (3 casi). In

tutti, dopo l'analisi citogenetica di routine, si è caratterizzato il cromosoma marcatore attraverso l'uso della citogenetica molecolare (FISH).

MATERIALI E METODI

Gli amniociti sono stati coltivati usando metodiche standard in situ e flasks, e processati dopo 6-10 giorni.

I linfociti sono stati stimolati con PHA e coltivati per 72 h e i cromosomi analizzati dopo colorazione QFQ e DA-DAPI.

Gli studi di citogenetica molecolare (FISH) sono stati condotti usando probes commerciali (Cytocell, Oncor) centromero-specifici, whole chromosome paints o probes locus specifici (gentilmente forniti dal Prof. Rocchi, Bari) a seconda dei casi.

RISULTATI

Clinica e citogenetica

Caso 1

Il primo caso è quello di una bambina nata da genitori non consanguinei alla 39° settimana di gestazione dopo una gravidanza riferita regolare. Il peso alla nascita era 2740 g (25° percentile), la lunghezza 49 cm (\leq 50° percentile) e la circonferenza cranica 32 cm ($<$ 10° percentile). Presentava una alterata termoregolazione transitoria e i seguenti dismorfismi: deformazione cranio-facciale sinistra plagiocefalica, facies ampia e asimmetrica, anomalia del padiglione auricolare bilaterale con elice eccessivamente ripiegato. L'ecografia cerebrale rilevava un volume lievemente aumentato dei ventricoli laterali. A due mesi e mezzo si evidenziava plagiocefalia con fontanella anteriore molto ampia (4-5 cm X 4-5 cm), turricefalia e dismorfismo facciale (lieve ipertelorismo e occhi infossati, strabismo), anomalia dei padiglioni auricolari piccoli ($<$ 3° percentile), filtro corto, retrognazia, pliche flessorie delle mani poche e profonde. Lo sviluppo

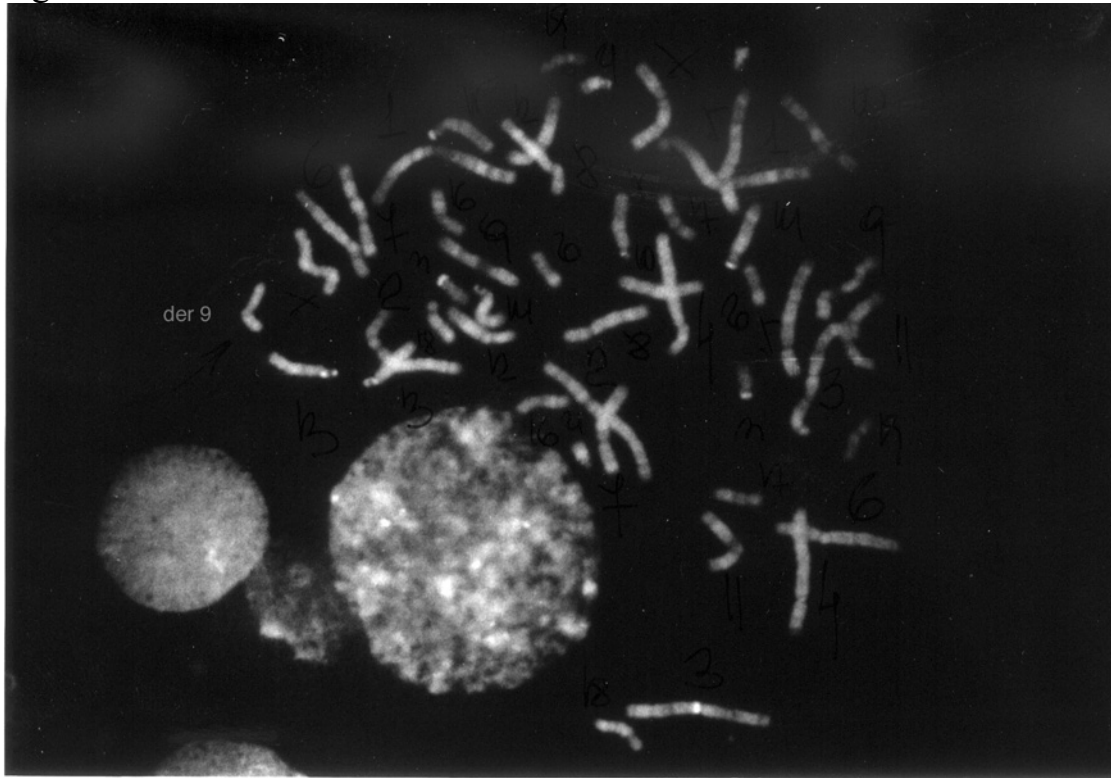
psicomotorio era apparentemente normale. A tre mesi e mezzo il peso era 6950 g (75° percentile), la lunghezza 60,5 cm (50° percentile) e la circonferenza cranica 39.5 cm (10° percentile), la facies ampia con deficit del muscolo depressore del labbro destro, lieve ipotonia del capo e del tronco, inoltre l'occhio sinistro era privo di movimenti di abduzione e adduzione, e l'occhio destro presentava nistagmo. All'ecografia cerebrale i ventricoli laterali erano dilatati (dx 14.2 mm, sx 12.8 mm), cisterna magna ampia ed emiatrofia cerebellare sinistra. La ricostruzione in 3D dello scheletro cranio facciale metteva in evidenza la pervietà delle principali strutture della base e della volta con marcata apertura della fontanella bregmatica. A sei mesi si evidenziava un lieve ritardo delle acquisizioni psicomotorie.

Il caso arrivò alla nostra osservazione dopo aver eseguito la ricerca di mutazioni per craniosinostosi risultata negativa.

Si eseguì quindi una mappa cromosomica su sangue periferico (QFQ banding) in cui tutte le metafasi esaminate mostrarono un cariotipo femminile a 47 cromosomi con extra-cromosoma soprannumerario: 47, XX, + ESAC (figura 1).

Venne quindi eseguita un'indagine FISH allo scopo di caratterizzare il cromosoma marcatore soprannumerario utilizzando il Chromobrobe Multiprobe System Octochrome (Cytocell), contenente le librerie genomiche specifiche per i 22 autosomi e i 2 gonosomi.

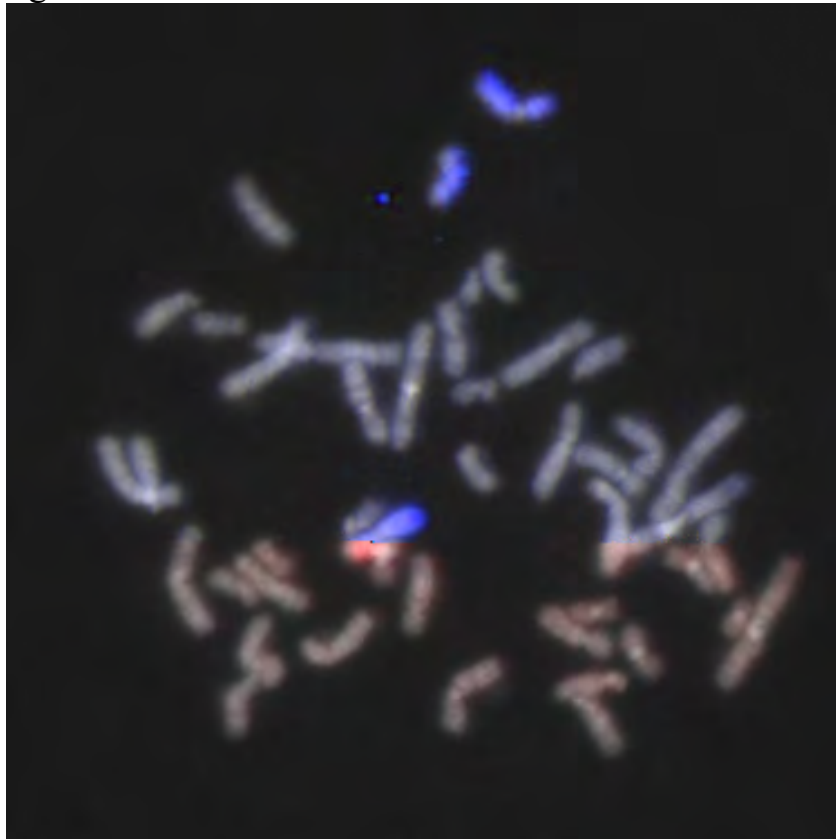
Figura 1



Caso 1: *der (9)*, *QFQ* banding

Il cromosoma marcatore diede segnale di ibridazione con la libreria genomica specifica per il cromosoma 9 (figura 2) consentendo di stabilirne l'origine da tale cromosoma. Il cariotipo del probando era quindi: 47, XX, + ish *der (9)* (*wcp9+*).

Figura 2



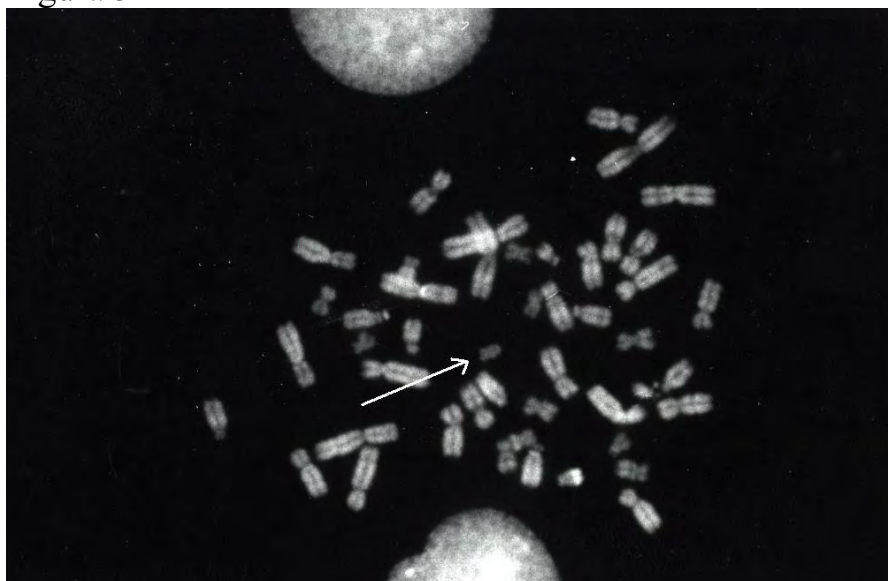
Caso 1: wcp (9+)

Caso 2

Il secondo caso è quello di un neonato con diagnosi fetale di mosaicismo per un cromosoma marker non caratterizzato affetto da cardiopatia (ritorno venoso anomalo totale) e anomalia di Duane (anomalia dello sviluppo dovuta a simultanea denervazione dei muscoli retto mediale e laterale dell'occhio). Il paziente fu sottoposto all'età di 10 giorni a intervento di correzione chirurgica (per l'anomalia cardiaca) senza complicanze. All'età di 30 mesi non si riscontrano altre anomalie e lo sviluppo psicomotorio è nella norma. La mappa cromosomica su sangue periferico (QFQ, DA-DAPI)

evidenziò la presenza di due linee cellulari, una normale (5 metafasi su 35), una 47 cromosomi con presenza di marker soprannumerario (30 metafasi su 35). Il marker era dicentrico DA-DAPI negativo (figura 3).

Figura 3



Caso 2: +der (22) QFQ banding

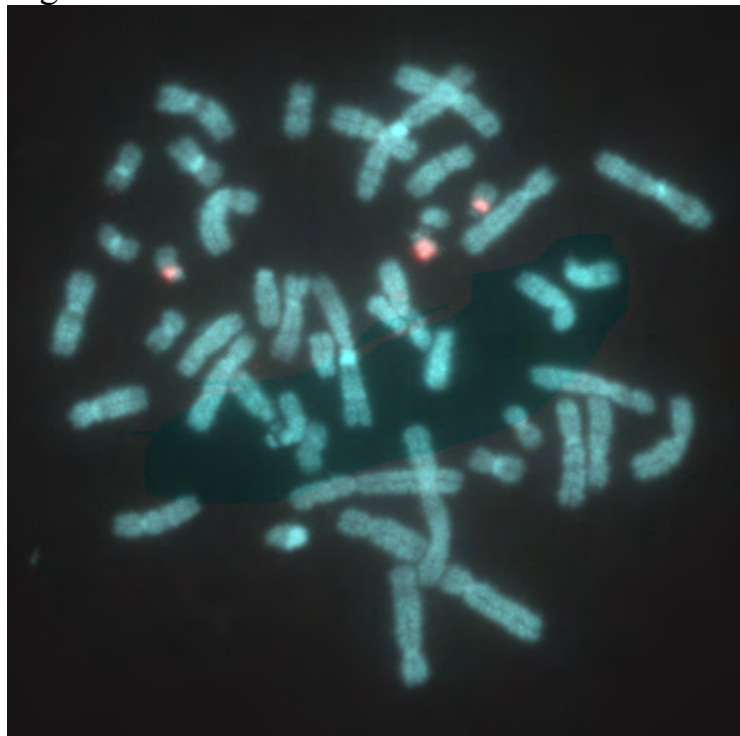
Si eseguì indagine FISH utilizzando la sonda D22Z4 (Oncor) che mappa nella regione 22-centromerica, la sonda D13Z1/D21Z1 (Oncor) che mappa nelle regioni 21/13 centromeriche, la sonda D22S75 (Oncor) che mappa nella regione di DiGeorge e lo YAC849E9 (contenente i marcatori WI-3127, KI-1547-2, WI-7709, WI-362) che mappa nella regione 22q11.2.

Si ottennero 2 segnali di ibridazione per la sonda centromerica indicando la presenza di due centromeri, non vi era segnale per la sonda della regione di DiGeorge che era fatta coibridare con la sonda alfoide per il 13 e il 21

escludendo contemporaneamente l'origine del marker da tali cromosomi e l'assenza della regione di DiGeorge, mentre lo YAC849E9 (prossimale alla regione di DiGeorge) dava segnale di ibridazione.

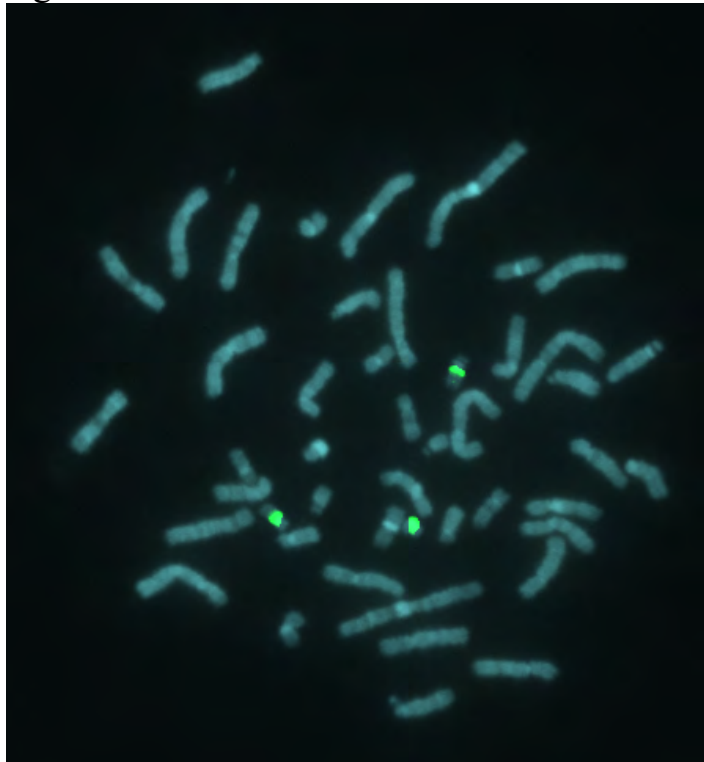
Il cariotipo era quindi: 46, XY / 47, XY, + mar.ish dic (22) (D22Z4++, YAC849E9+, D22S75-) (figure 4-6).

Figura 4



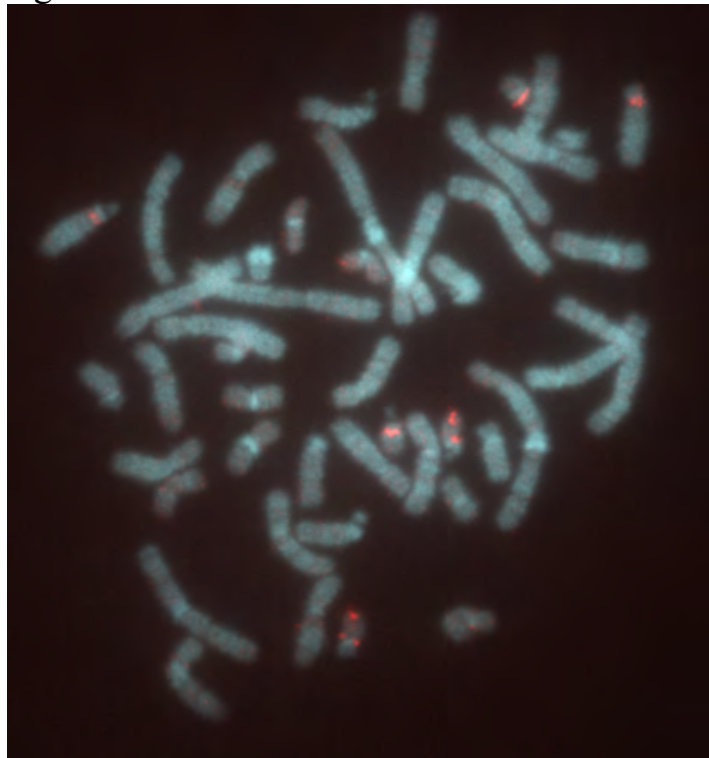
Caso 2: Alfoide 22

Figura 5



Caso 2: YAC 849E9

Figura 6



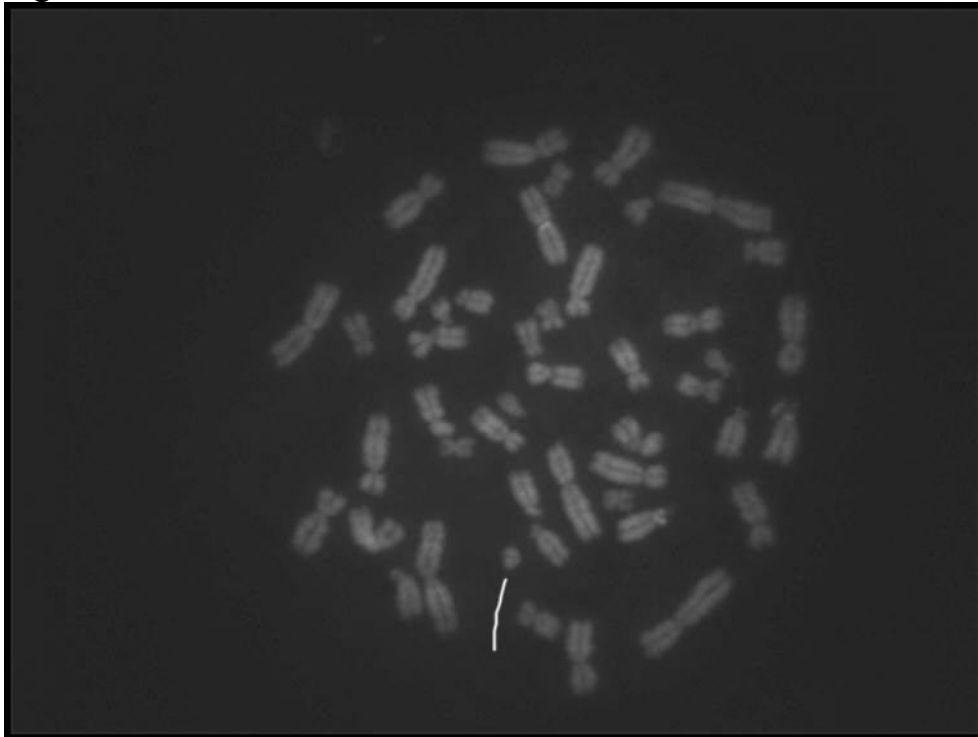
Caso 2: D22S75 probe

Caso 3

Il terzo caso è quello di una bambina di 6 anni, di bassa statura con sospetta Sindrome di Turner.

La mappa cromosomica su sangue periferico (QFQ banding) evidenziò un cariotipo con due linee: una a 45 cromosomi con monosomia X (42 metafasi su 64), una a 46 cromosomi con monosomia X e piccolo cromosoma marcatore ring-like (22 metafasi su 64) (figura 7).

Figura 7



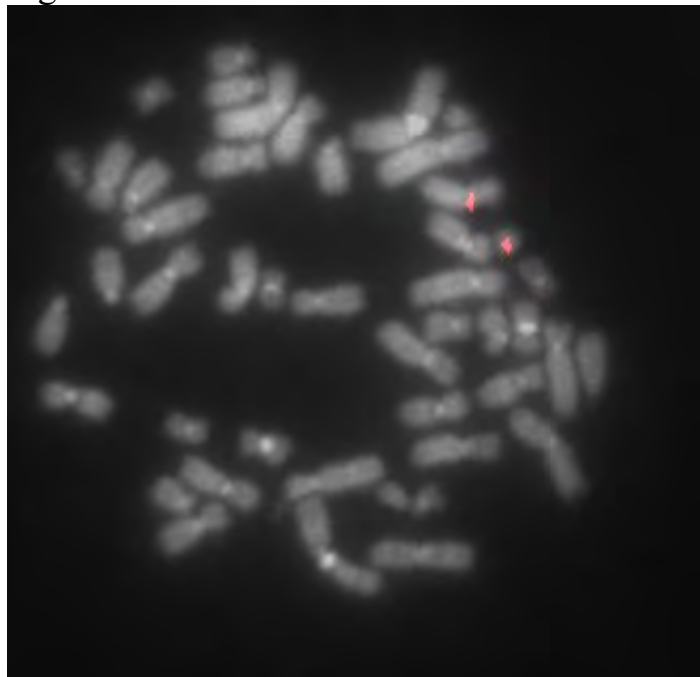
Caso 3: ring (X) QFQ banding

Si effettuò analisi FISH utilizzando le sonde DXZ1 e DYZ3 (Oncor), specifiche rispettivamente per le sequenze centromeriche dei cromosomi X e Y.

L'ibridazione in situ con la sonda alfoide specifica della regione centromerica del cromosoma Y non mostrò segnale di ibridazione sul cromosoma marcatore, indicando che questo non originava dal cromosoma Y. L'ibridazione in situ con la sonda alfoide specifica della regione centromerica della regione X mostrò segnale di ibridazione sul cromosoma marcatore consentendo di definirlo come monocentrico derivativo dell'X.

Il probando presentava quindi il seguente cariotipo: 45, X / 46, X, ish r (X) (DXZ1+) (figura 8).

Figura 8



Caso 3: X alfoide

Caso 4

Il quarto caso è relativo ad una diagnosi prenatale su liquido amniotico effettuata per età materna avanzata (39 anni).

Dopo colorazione standard (QFQ banding) delle colture di amniociti in situ, si riscontrò la presenza di due linee cellulari, una a 45 cromosomi con monosomia X (1 coltura, 1 colonia, 4 metafasi), una a 46 cromosomi con un cromosoma X e un piccolissimo marcatore (3 colture, 11 colonie, 26 metafasi) (Figura 9).

Figura 9



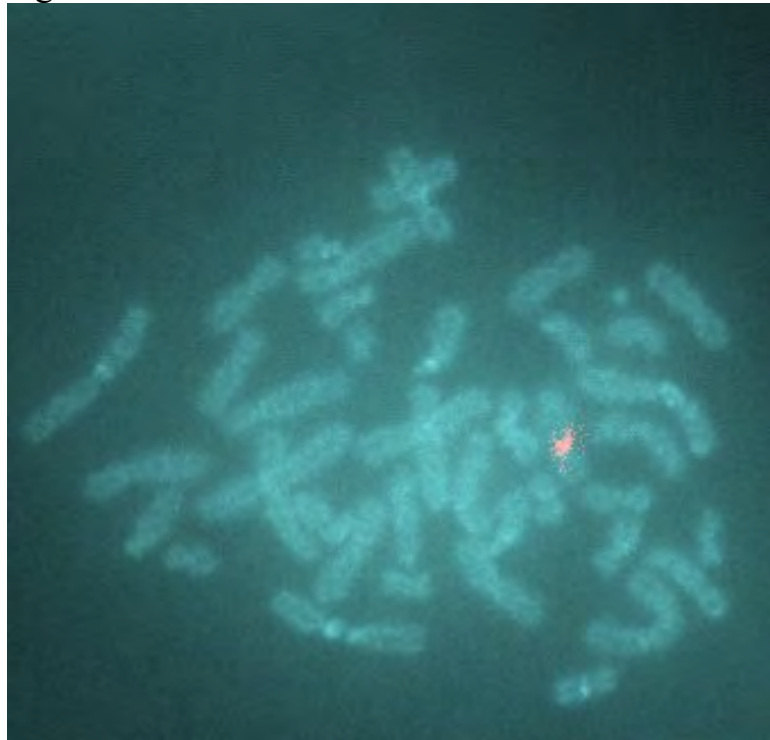
Caso 4: der (Y) QFQ banding

L'analisi FISH ,condotta allo scopo di caratterizzare il cromosoma marcatore, venne eseguita utilizzando le seguenti sonde:

- Libreria genomica specifica per il cromosoma Y (wcpY)
- Libreria genomica specifica per il cromosoma X (wcp X)
- DYZ3, specifica per le sequenze centromeriche del cromosoma Y
- DXZ1, specifica per le sequenze centromeriche del cromosoma X
- Sonda specifica per il locus SRY, che mappa in Yp11.3

L'ibridazione in situ con la sonda alfoide specifica della regione centromerica del cromosoma X non mostrò segnale di ibridazione sul cromosoma marcatore indicando che questo non origina dal cromosoma X. Le ibridazioni in situ con la libreria genomica del cromosoma Y e con la sonda lafoide specifica della regione centromerica del cromosoma Y consentirono di stabilire che il cromosoma marcatore è costituito interamente da sequenze specifiche del cromosoma Y ed è monocentrico. L'ibridazione in situ con la libreria genomica del cromosoma X, in grado di rilevare anche sequenze corrispondenti alla regione pseudoautosomica del braccio corto del cromosoma Y, indicarono la presenza, sul cromosoma derivativo, di sequenze della regione pseudoautosomica. L'ibridazione in situ con la sonda plasmidica specifica per il locus SRY, che mappa in Yp11.3, confermò la presenza della sequenza bersaglio (figure 10-14).

Figura 10



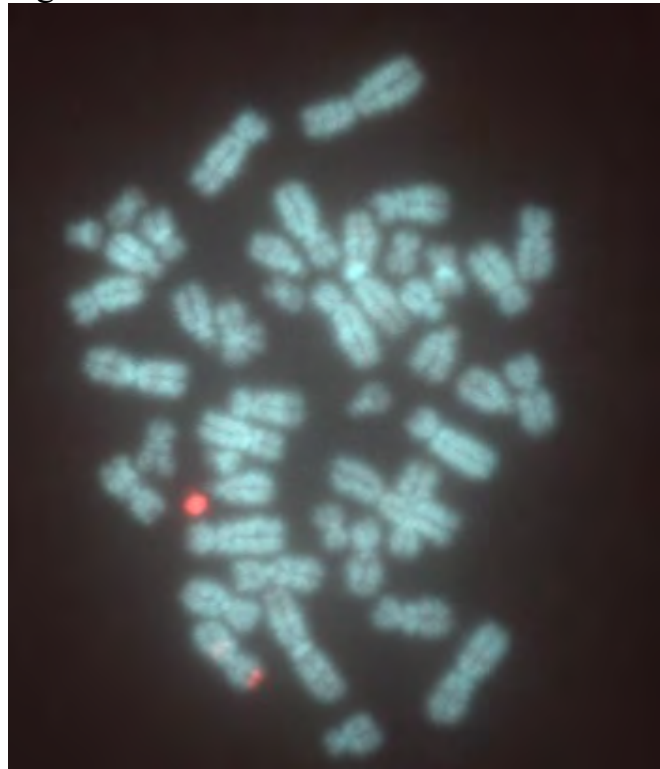
Caso 4: X alfoide

Figura 11



Caso 4: Y alfoide

Figura 12



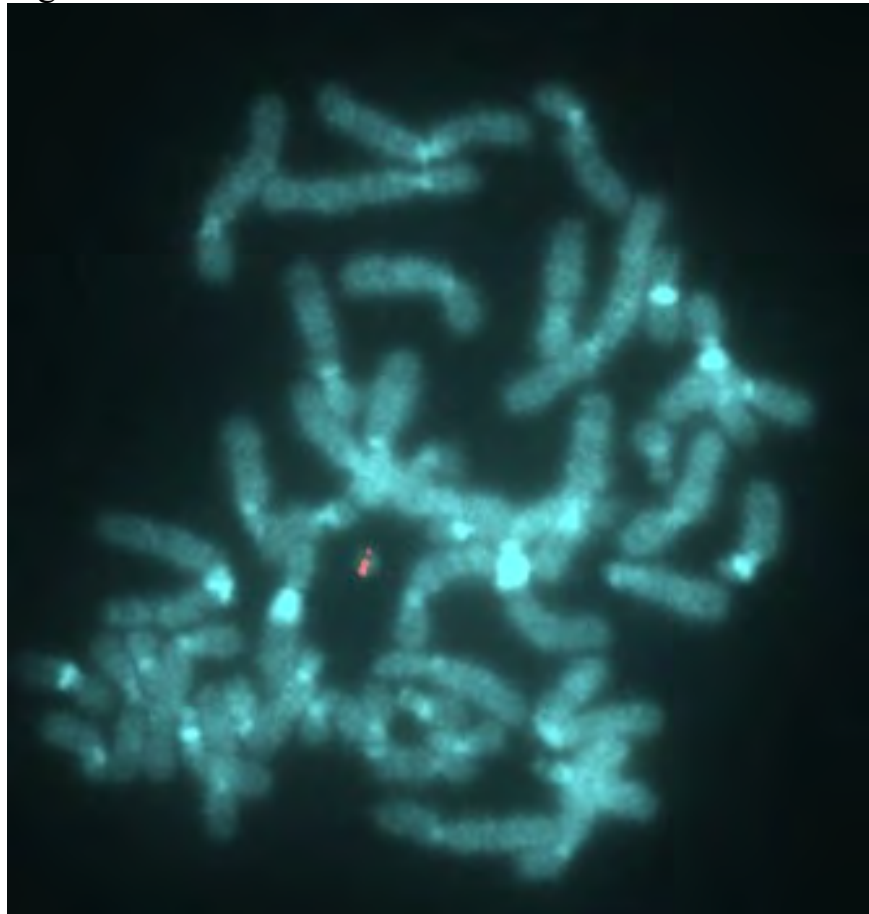
Caso 4: wcp Y

Figura 13



Caso 4: wcp X

Figura 14



Caso 4: Probe SRY

Il monitoraggio ecografico della gravidanza evidenziò un normale sviluppo dei genitali maschili. Ciò venne confermato dalla nascita di un bambino eumorfico con gonadi normali.

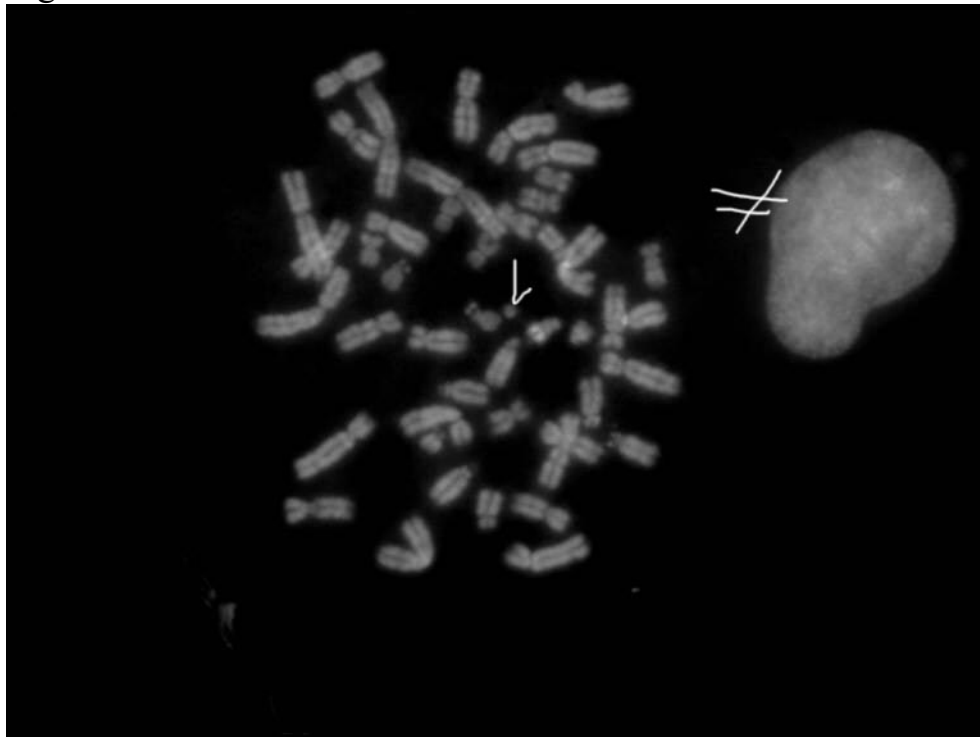
L'analisi del cariotipo sul sangue periferico permetteva il riscontro di una sola metafase 45,X su 150 esaminate.

Caso 5

Il quinto caso è una diagnosi prenatale su liquido amniotico effettuata per età materna avanzata (43 anni).

L'esame del cariotipo con colorazione standard (QFQ banding) su colture in situ evidenziò la presenza di due linee cellulari: una maschile normale (3 colture, 7 colonie, 88 metafasi) e una 47 cromosomi con un piccolo marcatore soprannumerario (2 colture, 4 colonie miste, 20 metafasi su 25) (Figura 15).

Figura 15



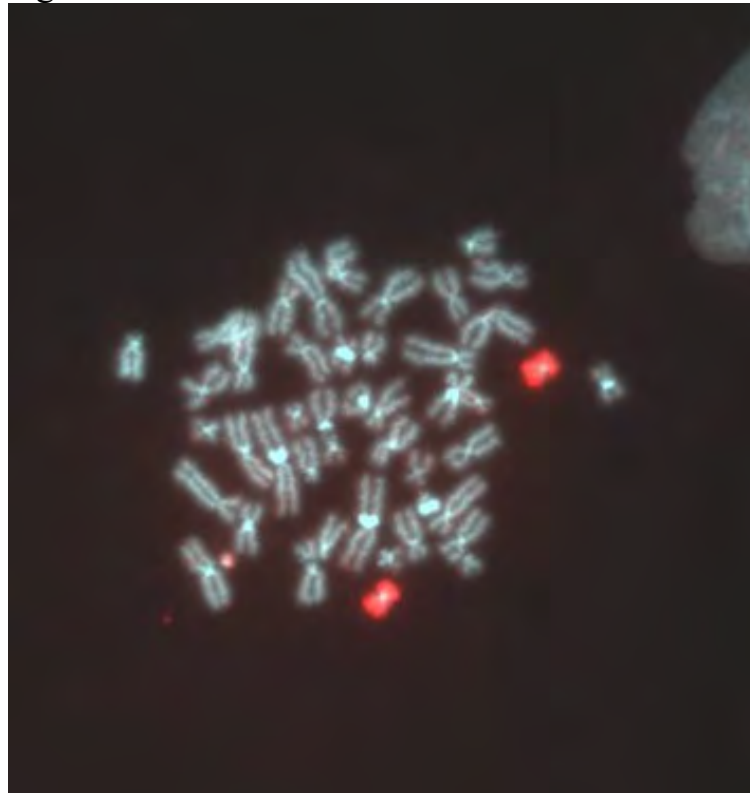
Caso 5: +der (19) QFQ banding

Venne eseguita un'analisi citogenetica molecolare allo scopo di caratterizzare il marcatore, utilizzando il Chromoprobe Multiprobe-System Octochrome (Cytocell) contenente le librerie genomiche specifiche per i 22 autosomi e i 2 gonosomi.

Il cromosoma marcatore diede segnale di ibridazione con la libreria genomica specifica per il cromosoma 19 consentendo di stabilire l'origine del cromosoma soprannumerario.

Il cariotipo del feto era quindi: 46, XY / 47, XY, + ish der (19) (wcp19+) (Figura 16).

Figura 16



Caso 5: wcp 19+

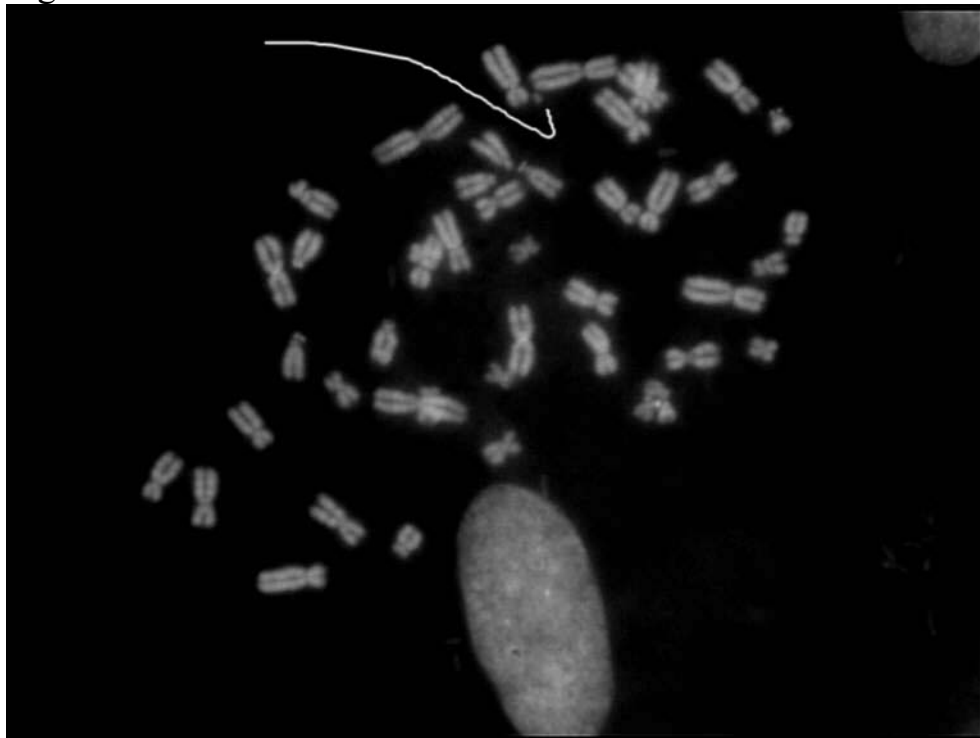
I genitori decisero di proseguire la gravidanza che è attualmente in corso, il monitoraggio ecografico non rivelò la presenza di malformazioni.

Caso 6

Il sesto caso è una diagnosi prenatale su liquido amniotico effettuata per età materna (35anni).

L'esame del cariotipo (QFQ, DA-DAPI) evidenziò la presenza di due linee cellulari, una femminile normale e una 47 cromosomi con piccolissimo cromosoma soprannumerario DA-DAPI negativo. Tutte le colonie (18) erano miste tranne 2 (1 tutta normale, una tutta 47 cromosomi)(Figura 17).

Figura 17

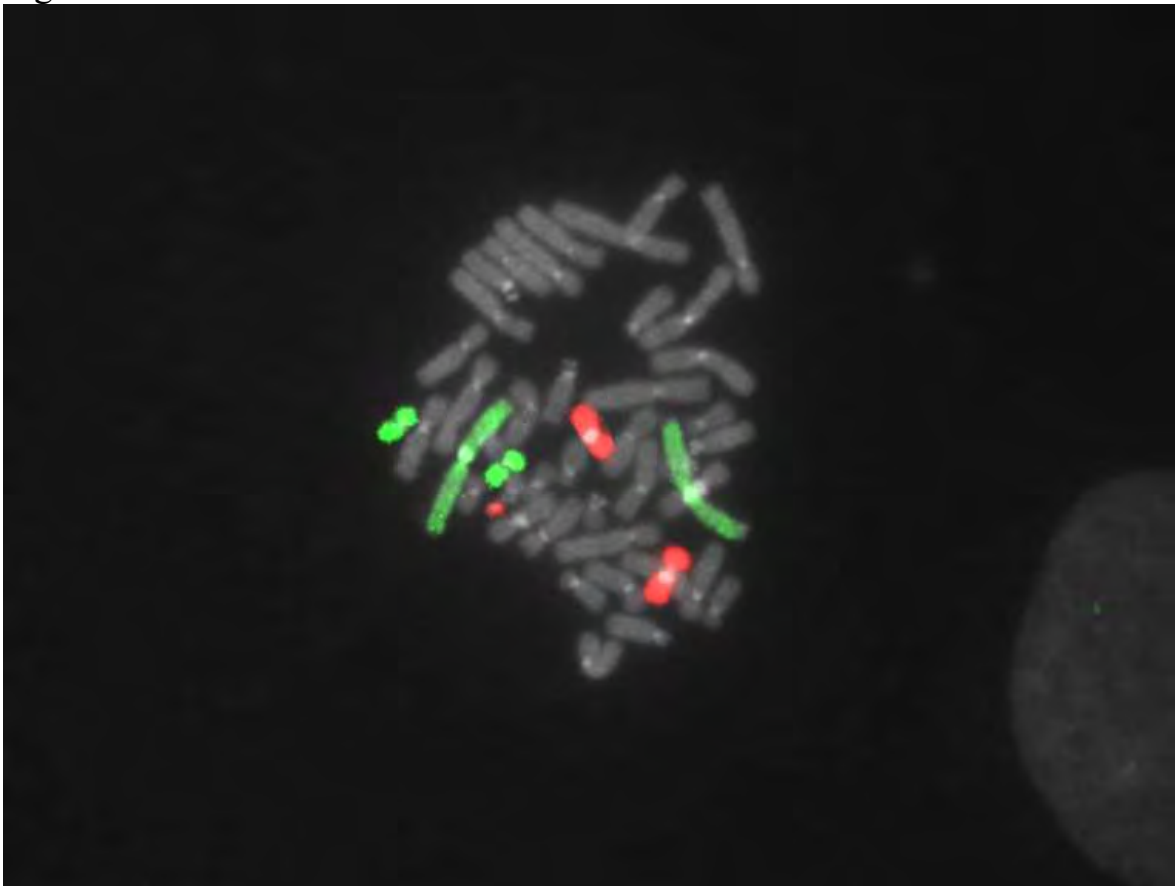


Caso 6: + der (16) QFQ banding

Nell'indagine FISH condotta allo scopo di caratterizzare il marker si utilizzarono terne di sonde painting cromosoma specifiche (Oncor). La terna 1;16;19 mostrò positività per il cromosoma 16 indicando l'origine del marcatore da tale cromosoma.

Il cariotipo del feto era quindi: 46, XX / 47, XX, + mar.ish der (16) (wcp 16 +) (Figura 18).

Figura 18



Caso 6: wcp 16 +

I genitori decisero di proseguire la gravidanza che terminò con un parto prematuro. Il neonato presentò seri problemi respiratori (imputabili allo stato

di immaturità) che richiesero un lungo periodo di degenza ma non segni di anomalie né di dismorfismi.

DISCUSSIONE

Caso 1

47, XX, +ish der(9)

Crolla (1998, Review) riportò 7 casi di markers derivanti dal cromosoma 9 (con esclusione degli iso 9p con caratteristiche fenotipiche ben definite): 4 diagnosi prenatali (PND) e 3 postnatali (Tabella 1). In 3 casi (tutte PND) il marker era di origine materna, il fenotipo era normale in 2 casi e non conosciuto in 1.

In un caso di diagnosi prenatale, l'ESAC era de novo e il fenotipo normale.

Nei 3 casi postnatali vi era ritardo psicomotorio senza dismorfismi facciali in un caso de novo, dismorfismi facciali, micrognazia, riduzione di lunghezza di una gamba e costole addizionali in un caso con concomitante trisomia 9 a mosaico, ritardo mild dello sviluppo nell'ultimo caso con concomitante + der(6).

Tutti i casi tranne uno erano in condizione di mosaicismo.

Il caso da noi riscontrato non presenta analogie con i casi della letteratura, dove sono riportati esempi di markers di piccole dimensioni e con effetti fenotipici in 2 soli casi non sovrapponibili al nostro.

I casi di tetrasomia 9p (isocromosomi 9p soprannumerari) riportati in letteratura (16 casi) (Leichtmann et al. 1996) hanno permesso di delineare un fenotipo sindromico le cui principali caratteristiche sono: basso peso alla nascita, bassa statura, microcefalia, brachicefalia, fronte larga, ipertelorismo, orecchie basse e malformate, micrognazia, collo corto, anomalie cardiache, anomalie genitali, ipoplasia delle unghie, inoltre solo il 25% dei pazienti supera il primo anno di vita. Queste manifestazioni fenotipiche non si sovrappongono con quelle del nostro caso presentante plagiocefalia, turricefalia e asimmetria facciale come caratteristiche peculiari.

E' di nostro interesse poter approfondire le indagini citogenetiche molecolari allo scopo di definire la struttura fine del cromosoma in esame.

TABELLA 1: Marker cromosoma 9

Diagnosi	Origine parentale				Forma del marker	Mosaicismo	Fenotipo/Follow-up
	DN	MT	PT	ND			
Prenatale	1				Min	40 %	Normale
Prenatale		1			Ring	Non mosaico	Normale
Prenatale		1			Min	80 %	Normale
Prenatale		1			Submeta	30 %	Non noto
Postnatale	1				Ring	36 %	Ritardo psicomotorio, non dimorfismi
Postnatale				1	Non noto	70 %	Micrognazia, una gamba più corta, trisomia 9 a mosaico
Postnatale	1				Ring	39%	Ritardo mild, dimorfismi lievi

DN: De novo; MT: materna; PT: paterna; ND; Nondeterminata

Caso 2

46, XY / 47, XY, +mar.ish dic(22)(D22Z4++, YAC849E9+, D22S75-)

Uno dei markers più conosciuti in quanto causa di una specifica sindrome (Cat Eye Syndrome o Schmid-Fraccaro Sindrome) è l'inv dup 22.

Le anomalie più frequentemente riscontrate sono: coloboma dell'iride, atresia anale, fessure palpebrali oblique, appendici preauricolari, malformazioni cardiache e renali, ritardo mentale medio lieve o assente.

La variabilità del fenotipo clinico è però enorme anche all'interno di una medesima famiglia e va da individui marginalmente affetti a pazienti con full pattern di malformazioni.

Solitamente l'inv dup (22) origina de novo, è comunque da effettuarsi il cariotipo parentale data l'ampia variabilità fenotipica.

I breakpoints che danno origine a tale marker sono raccolti in due clusters che coprono 2 intervalli. Questi colocalizzano con i breakpoints (prossimali e distali) della DiGeorge Sindrome per la presenza di Low Copy Repeats, LCR22, (Eldmann, 1999) adiacenti ad ogni intervallo che mediano gli eventi ricombinativi causa dei riarrangiamenti. L'ampia variabilità fenotipica che si riscontra in questa sindrome non correla però con le dimensioni della duplicazione, per cui la determinazione dell'esatto punto di breakpoint non ha attualmente alcun valore prognostico (McTaggart, 1998).

Nel nostro caso la mancanza di segnale di ibridazione con la sonda D22S75 che mappa nella regione di DiGeorge indica un punto di rottura prossimale rispetto a tale regione.

L'anomalia cardiaca presentata dal paziente (ritorno venoso anomalo totale) è una delle gravi malformazioni che si possono riscontrare nella Cat Eye Syndrome. L'anomalia di Duane è una malformazione che si riscontra più raramente (Cullen et al, 1993)

Caso 3

45, X / 46, X, ish r (X) (DXZ1+)

Piccoli ring X possono essere associati con un fenotipo severo che include ritardo mentale, dismorfismi e anomalie congenite, quando mancano del gene Xist in Xq13 (Tiny ring syndrome). Infatti, la perdita di Xist (necessario per il processo di inattivazione dell'X) determina una disomia funzionale per le sequenze contenute nel ring. Se invece Xist è presente vi è l'inattivazione selettiva dell' abn (X).

Turner (2000) ha studiato 47 femmine con cariotipo 45, X / 46, r (X): 7 di queste avevano un ring X Xist negativo, ma solo una (con un grande ammontare di materiale Xp) aveva un fenotipo severo, nelle altre vi era un fenotipo Turner. Il fenotipo mild delle sei pazienti era spiegato dal piccolo ammontare di materiale del cromosoma X presente nei piccoli ring e

mancante di sequenze la cui disomia funzionale causa un fenotipo severo. Inoltre la condizione di mosaicismo può aver portato all'assenza del ring in alcuni tessuti (come il cervello) implicati nell'estrinsecarsi del fenotipo. Nel nostro caso non vi è la presenza di un fenotipo severo ma Turner-like, da quanto emerso dalla letteratura non si può escludere l'assenza del gene Xist, la cui presenza non è stata testata causa la mancata disponibilità di ulteriore materiale.

Caso 4

45, X / 46, X, ish der (Y) (wcpY+, wcpX+, SRY+, DYZ3+)

Il riscontro in diagnosi prenatale di un cariotipo 45, X / 46, X, der(Y) con presenza del gene SRY (che codifica per il Testis Determining Factor), non permette una precisa definizione del possibile fenotipo che può essere quanto mai variabile. Si può riscontrare una tipica sindrome di Turner, una condizione di ambiguità genitale, di anormale differenziazione del tratto genitale o la presenza di gonadi maschili normali (con eventuale infertilità in caso di mancanza del locus AZF). Il fenotipo Turner e quello maschile con anomalie genitali sono ad alto rischio per la trasformazione neoplastica della gonade disgenetica con lo sviluppo del gonadoblastoma, un tumore di per sé non invasivo che può però evolvere in disgerminoma.

Il locus del gonadoblastoma (GBY) mappa in Yp in prossimità del centromero e comprende 5 geni candidati. Tra questi il gene TSPY (Testis Specific Protein Y-encoded) risulta essere iperespresso all'interno delle cellule tumorali e quindi sicuramente coinvolto nel processo di oncogenesi (Robinson 1999, Muller 1999, Hildebrand 1999).

Nel nostro caso, la condizione di normalità dei genitali del bambino (che presenta un livello basso di mosaicismo con la linea 45, X) potrebbe ridurre il rischio di gonadoblastoma.

Caso 5

46, XY / 47, XY, + ish der (19) (wcp19+)

In letteratura sono riportati 8 casi di cromosomi marker derivanti dal cromosoma 19 (Crolla 1998 Review, Stankiewicz 2000) . Sette casi (Tabella 2) sono diagnosi prenatali: uno di origine materna con fenotipo normale alla nascita; 6 de novo di cui 3 normali, 1 con fenotipo non conosciuto, 2 con fenotipo anormale (un paziente presentava testa larga, prominente frontale, ipotonia e ritardo dello sviluppo, il rimanente probando presentava ipotonia, dismorfismi craniofacciali con microcefalia, ipertelorismo, sviluppo psicomotorio moderatamente ritardato. L'unico caso postnatale riguardava un bambino con severa ipotonia e ritardo dello sviluppo, il cariotipo parentale non era conosciuto.

Da quanto emerge dai dati della letteratura non è prevedibile il possibile fenotipo nel caso da noi riscontrato, la cui gestazione è ancora in corso.

TABELLA 2: Marker cromosoma 19

Diagnosi	Origine parentale				Forma del marker	Mosaicismo	Fenotipo/Follow-up
	DN	MT	PT	ND			
Prenatale	1				Ring	17 %	Normale
Prenatale	1				Ring	42%	Normale
Prenatale	1				Min	82%	Normale
Prenatale	1				Ring	60%	Testa larga, fronte protrudente, ipotonia, ritardo dello sviluppo
Prenatale		1			Min	50 %	Normale
Prenatale	1				Ring	Non mosaico	Non noto
Postnatale				1	Min	50%	Severa ipotonia, ritardo dello sviluppo
Prenatale	1				Ring	36%	Ipotonia, dimorfismi craniofacciali

DN: De novo; MT: materna; PT: paterna; ND; Non determinata

Caso 6

46, XX / 47, XX, + ish der (16) (wcp 16+)

In letteratura sono riportati 9 casi di cromosomi marker derivanti dal 16 (Crolla 1998 Review, Paoloni et al 1998, Hastings et al 1999, Sanz et al 2000, Hengstschlager et al 2001). Vi sono 7 diagnosi prenatali, in un solo caso (tab.4) con il marker di origine paterna, la gravidanza fu interrotta e il feto non fu esaminato; gli altri casi erano de novo, in 3 casi con la gravidanza interrotta: in uno non si conosce il fenotipo del feto, negli altri due il fenotipo

del feto era normale. Nei rimanenti 3 casi nacquero dei bambini riferiti normali fino all'età rispettivamente di 9, 10 e 17 mesi.

Un caso postnatale era di origine materna e presentava microcefalia, anomalie facciali minori, ritardo mentale e spasticità mentre la madre era normale, il secondo caso (l'unico non a mosaico) presentava un ritardo mentale mild e comportamento psicotico.

Anche nel nostro caso, come in altri riportati in letteratura, si è riscontrata normalità in presenza di un piccolo marker DA-DAPI negativo (quindi non di origine eterocromatica). E' però necessario un follow-up a lungo termine (nel nostro come negli altri casi) per poter verificare l'assenza di ritardo mentale e di eventuali turbe del comportamento.

TABELLA 3: Marker cromosoma 16

Diagnosi	Origine parentale				Forma del marker	Mosaicismo	Fenotipo/Follow-up
	DN	MT	PT	ND			
Prenatale	1				Min	90 %	Normale (a 17 mesi)
Prenatale	1				Min	75%	TOP (fenotipo non noto)
Prenatale			1		Ring	50%	TOP (feto non esaminato)
Postnatale		1			Min	75%	Microcefalia, anomalie facciali minori, severo ritardo mentale
Postnatale	1				Min	Non mosaico	Lieve ritardo mentale e comportamento psicotico
Prenatale	1				Ring	50%	Normale (a 10 mesi)
Prenatale	1				Non noto	65%	Normale (dopo TOP)
Prenatale	1				Min	20%	Normale (a 9 mesi)
Prenatale	1				Min	13%	Normale (a 20 settimane), TOP

DN: De novo; MT: materna; PT: paterna; ND; Non determinata.

CONCLUSIONI

La prevalenza alla nascita degli ESACs è stimata tra 0.14 e 0.72 per 1000 (Jacobs et al. 1974; Hamerton et al. 1975; Nielsen et al. 1975; Nielsen et al. 1991), tra 0.4 e 1.5 per 1000 in diagnosi prenatale (Sachs et al. 1987; Warburton 1991; Blennow et al. 1994), mentre tra i ritardati mentali tale incidenza sale al 3.27 per 1000 (Buckton et al. 1985).

Cromosomi marker (de novo) non familiari conferiscono al feto un rischio non facilmente quantificabile. L'uso di tradizionali tecniche di colorazione (QFQ, GTG, AgNOR, CBG, DA DAPI) per la caratterizzazione dei cromosomi marker spesso non è di ausilio a causa di un insufficiente pattern di bandeggio. Per questo, molti markers diagnosticati negli anni precedenti la scorsa decade sono rimasti non caratterizzati.

L'introduzione della Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) usando probes centromero, cromosoma e locus specifici ha reso possibile definire l'origine cromosomica.

Più recentemente l'uso del Reverse Chromosome Painting (micro-FISH) ha dato un aiuto addizionale nel determinare l'origine cromosomica più in dettaglio (Corter et al. 1992; Thangavelu et al. 1994; Viersbach et al. 1994;

Blennow et al. 1995; Müller-Nava et al. 1995; Viersbach et al. 1998; Anderlid et al. 2001).

L'applicazione combinata di queste tecniche permette di ottenere una buona caratterizzazione dei cromosomi marker e mira a incrementare la conoscenza relativa al rischio di anomalie fenotipiche legate all'individuazione di tali cromosomi.

Primo dell'avvento degli studi di FISH il rischio di anomalie fenotipiche associate alla presenza di un cromosoma marker *de novo* aveva una stima del 13% (10.9% satellitati, 14.7% non satellitati) e si basava sul follow-up di diagnosi prenatali (Warburton 1991). Con l'introduzione della FISH, gli studi effettuati con tale metodica hanno permesso di calcolare un rischio medio fetale del 16.3% che diventa 28.6% quando il marker è di origine autosomica non acrocentrica, infatti il 25% dei markers derivati da acrocentrici mancano di satelliti, e in studi non FISH possono essere considerati non acrocentrici e quindi falsare la figura di rischio (Crolla 1998).

A tutt'oggi, solo parte degli ESACs è stata ben caratterizzata citogeneticamente permettendo una precisa correlazione genotipo-fenotipo.

Gli ESACs più frequenti sono gli inv dup (15) (il 50% di tutti gli ESACs), sono markers dicentrici bisatellitati, non sempre isodicentrici.

Un altro ESAC ben conosciuto è l'inv dup (22) che causa la Sindrome dell'occhio di gatto, la regione duplicata è variabile (Mears 1994; Crolla

1997) e la duplicazione non sempre è simmetrica. La maggior parte dei casi originano de novo ma esistono casi di trasmissione familiare, anche in condizione di mosaicismo.

Causano sindromi ben definite anche l'iso (18p) e l'iso (12p) (Sindrome di Pallister-Killiam).

I markers derivanti dai gonosomi rappresentano un gruppo particolare. Essi possono essere soprannumerari o affiancare un cariotipo 45, X spesso in condizione di mosaicismo. Il der (Y) sovranumerario in un cariotipo 47, XY, + der (Y) non dà effetti fenotipici mentre in un cariotipo 46, X, der (Y) spesso in mosaico con una linea 45, X può dare disgenesia gonadica.

Il der (X) può dare anomalie fenotipiche qualora manchi del gene Xist necessario per il processo di inattivazione dell'X creando una condizione di disomia funzionale.

Quindi, con l'eccezione di alcuni ESACs, nella maggior parte dei casi non è ancora possibile definire delle chiare correlazioni tra l'origine cromosomica e il possibile effetto fenotipico di un cromosoma marker.

D'altra parte, i pochi casi riportati in letteratura hanno evidenziato che la presenza di eucromatina è associata più frequentemente ad anomalie fenotipiche.

Una dettagliata caratterizzazione molecolare dei markers in individui normali ed anormali assieme ad un follow-up a lungo termine possono aiutare ad identificare le aree del genoma che sono più sensibili ad uno sbilanciamento.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BM Anderlid, S Sahlen, J Schoumans, E Holmberg, I Ahsgren, G Mortier, F Speleman and E Blennow. *Detailed characterization of 12 supernumerary ring chromosomes using micro-FISH and search for uniparental disomy*. Am J Med Gen 2001; 99: 223-233.
- 2) E Blennow, H Bui, U Kristoffersson, M Vujic, G Anneren, E Holberg and M Nordenskjold. *Swedish survey on extra structurally abnormal chromosomes in 39105 consecutive prenatal diagnoses: prevalence and characterization by fluorescence in situ hybridization*. Prenatal Diagnosis 1994; 14: 1019-1028.
- 3) E Blennow, KB Nielsen, H Telenius, NP Carter, U Kristoffersson, E Holmberg, C Gilberg, M Nordenskjold. *Fifty probands with extra structurally abnormal chromosomes characterized by fluorescence in situ hybridization*. A J Med Gen 1995; 55: 85-94.
- 4) KE Buckton, G Spowart, MS Newton, HJ Evans. *Forty-four probands with additional "marker" chromosome*. Hum Genet 1985; 69: 353-370.
- 5) NP Carter, MA Ferguson-Smith, MT Perryman, H Telenius, AH Pelmeur, MA Leversha, MT Glacy, SL Wood, K Cook, HM Dyson, ME Ferguson-Smith, LR Willat. *Reverse chromosome painting: A method for rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics*. J Med Genet 1992; 29: 299-307.
- 6) JA Crolla, P Howard, C Mitchell, FL Long, NR Denis. *A molecular and FISH approach to determining karyotype and phenotype correlations in six patients with supernumerary marker(22) chromosomes*. Am J Med Genet 1997; 72: 440-447.

- 7) John A Crolla. *FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15: II. Review of literature.* Am J Med Gen 1998; 75: 367-381.
- 8) P Cullen, CS Rodgers, DF Callen, VM Connolly, H Eyre, P Fells, H Gordon, RM Winter, RV Thakker. *Association of familial Duane anomaly and urogenital abnormalities with a bisatellited marker derived from chromosome 22.* Am J Med Genet. 1993 Nov 1;47(6):925-30.
- 9) L Edelmann RK Pandita, E Spiteri, B Funke, R Goldberg, N Palanisamy, RS Chaganti, E Magenis, RJ Shprintzen. *A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11.* Hum Mol Genet 1999; 8 (7): 1157-67.
- 10) JL Hamerton, N Canning, M Ray, S Smith. *A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants. Incidence of chromosome abnormalities.* Clin Genet 1975; 8: 223-243.
- 11) RJ Hastings, DL Nisbet, K Waters, T Spencer, LS Chitty. *Prenatal detection of extra structurally abnormal chromosomes (ESACs): new cases and review of the literature.* Prenat Diagn 1999; 19: 436-445.
- 12) M Hengstschlager, D Bettelheim, R Drahonsky, J Deutinger and G Bernaschek. *Prenatal diagnosis of a de novo supernumerary marker derived from chromosome 16.* Prenat Diagn 2001; 21: 477-480.
- 13) R Hildenbrand, W Schroder, E Brude, A Schepler, R Konig, HJ Stutte, J Arnemann. *Detection of TSPY protein in a unilateral microscopic gonoblastoma of a Turner mosaic patient with a Y-derived marker chromosome.* J Pathol 1999; 189: 623-626.
- 14) PA Jacobs, M Meville, S Ratcliffe. *A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants.* Ann Hum Genet 1974; 37: 359-367.
- 15) LG Leichtman, JL Zackowski, PD Storto and A Newlin. *Non-mosaic tetrasomy 9p in a liveborn infant with multiple congenital anomalies: Case report and comparison with trisomy 9p.* Am J Med Gen 1996; 63: 434-437.

- 16) KE McTaggart, ML Budarf, DA Driscoll, BS Emanuel, P Ferreira, HE McDermid. *Cat eye syndrome chromosome breakpoint clusterig: identification of two intervals also associated with 22q11 deletion syndrome breakpoints*. Cytogenet Cell Genet 1998; 81 (3-4): 222-8.
- 17) AJ Mears, H El-Shanti, JC Murray, HE McDermid and SR Patin. *Minute supernumerary ring chromosome 22 associated with cat eye syndrome: further delineation of the critical region*. Am J Hum Genet 1995; 57: 667-673.
- 18) J Muller, EM Ritzen, SA Ivarsson, E Rajpert-De Meyts, NE Skakkebaek. *Management of males with 45,X/46,XY gonadal dysgenesis*. Horm Res 1999; 52: 11-14.
- 19) J Muller-Navia, A Nebel, D Oehler, U Theile, B Zabel, E Schleiermacher. *Microdissection and DOP-PCR-based reverse chromosome painting as a fast and reliable strategy in the analysis of various structural chromosome abnormalities*. Prenat Diagn 1996; 16: 915-922.
- 20) J Nielsen, K Rasmussen. *Extra marker chromosome in newborn children*. Hereditas 1975; 81: 221-224
- 21) J Nielsen, M Wohlert. *Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark*. Hum Genet 1991; 87: 81-83.
- 22) ES Sachs, JO van Hemel, JC den Hollander, MGJ Jahoda. *Marker chromosomes in a series of 10,000 prenatal diagnoses. Cytogenetic and follow up studies*. Prenatal Diagn 1987; 7: 81-89.
- 23) DO Robinson, P Dalton, PA Jacobs, K Mosse, MM Power, DH Skuse, JA Crolla. *A molecular and FISH analysis of structurally abnormal Y chromosomes in patients with Turner syndrome*. J Med Genet 1999; 36: 279-284.
- 24) A Paoloni-Giacobino, MA Morris, SP Dahoun. *Prenatal supernumerary r(16) chromosome chracterized by multiprobe FISH with normal pregnancy outcome*. Prenat Diagn 1998; 18: 751-752.

- 25) R Sanz, MA Anabitarde, ME Querejcta, et al. *Rapid identification of a small dicentric supernumerary marker derived from chromosome 16 with a modified FISH technique on amniotic fluid.* Prenat Diagn 2000; 20: 63-65.
- 26) P Stankiewicz, E Bocian, K Jakubow-Durska, E Obersztyn, E Lato, H Starke, K Mroczek, T Mazurczak. *Identification of supernumerary marker chromosomes derived from chromosomes 5, 6, 19, and 20 using FISH.* J Med Genet 2000; 37: 114-20.
- 27) M Thangavelu, E Pergament, R Espinosa, SK Bohlander. *Characterization of marker chromosomes by microdissection and fluorescence in situ hybridization.* Prenat Diagn 1994; 14: 583-588.
- 28) C Turner, NR Dennis, SH Skuse, PA Jacobs. *Seven ring (X) chromosomes lacking the XIST locus, six with an unexpectedly mild phenotype.* Hum Genet 2000; 106 (1): 93-100.
- 29) M Urioste, G Visedo, A Sanchis, C Sentis, A Villa, P Ludena, JL Hortiguera, ML Martinez-Frias and J Fernandez-Piqueras. *Dynamic mosaicism involving an unstable supernumerary der(22) chromosome in cat eye syndrome.* Am J Med Genet 1994; 49: 77-82.
- 30) R Viersbach, G Schwanitz, MM Nothen. *Delineation of marker chromosomes by reverse chromosome painting using only a small number of DOP-PCR amplified microdissected chromosomes.* Hum Genet 1994; 93: 663-667.
- 31) R Viersbach, H Engels, U Gamerdinger and M Hansmann. *Delineation of supernumerary marker chromosomes in 38 patients.* Am J Med Gen 1998; 76: 351-358.
- 32) D. Warburton. *De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints.* Am J Hum Genet 1991; 49: 995-1013.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare va al *Dr. Lamberto Camurri* il cui impegno e la cui opera ha reso possibile la stesura di questo lavoro.

Si ringraziano inoltre per il contributo dato:

la Dr.^{ssa} D. Giardino,

il Prof. C. Zorzi per il caso 1;

la Dr.^{ssa} E. Lenzini per i casi 2, 3, 6;

Il Dr.^{ssa} A. Busatto per il caso 4;

Il Dr. M. Tresoldi e il Dr Sormani per il caso 5;

la Dr.^{ssa} G. Pregolato

la Dr.^{ssa} E. Lippi

la Dr.^{ssa} L. Visentin.

Si ringraziano inoltre i genitori dei piccoli pazienti per il cortese contributo.