Ring14 syndrome (R14S) is a rare severe genetic disorder. Since it was first observed in 1971 [1], fewer than 90 cases have been described in the literature. Children with this syndrome show a complex clinical neuro-developmental phenotype, encompassing intellectual disability, aggressive/hyperactive behavior and drug-resistant epilepsy. Drug-resistant epilepsy usually arises within the first months of life and is a determinant factor of prognosis [2]. R14S is caused by the rearrangement of chromosome 14 into a ring-shaped structure originated from two breakpoints fused together, with co-occurring terminal deletions of various sizes. This loss of genetic material has been hypothesized as being causative of the disease. However, individuals carrying comparable 14q linear deletions do not exhibit epilepsy, suggesting that the deletion alone cannot explain the more severe clinical manifestation [3]. The different mechanisms underlying ring formation are still obscure and a clear genotype/phenotype correlation is further shaded by the co-occurrence of chromosome 14 rearrangements and the unknown degree of r14 mosaicism in epilepsy-related areas of the brains.

We hypothesized that the chromosome circularization itself causes significant disruption to the normal interactions between genetic loci, ultimately leading to perturbations of gene expression underlying disease pathogenesis. This is also suggested by the observation that other diseases with clinical manifestations of drug-resistant epilepsy have been described as ring syndromes [3].

Supported by Ring14 International, we analyzed cell lines of 10 R14S patients and 5 parents from the Telethon Network of Genetic Biobanks, to investigate how the ring formation impacts on the three-dimensional architecture of the chromosome. To this end, we used a technique called Genome-Wide Chromosome Conformation Capture (Hi-C). DNA is like a long thread crumpled inside a cell nucleus. It folds into loops, bringing distant parts into closer contacts to cooperate. Unlike usual sequencing methods, which return the linear sequence of adjacent bases in a chromosome, Hi-C reveals “long-range” interactions between contact regions in our genome distant even millions of bases. Hi-C maps these contacts, showing how the genome organizes itself and how this organization can be disrupted in disease. The genome uses this looping strategy to control gene expression by bringing a distant regulatory element into close proximity of its target gene.: genomic events disrupting this organization have therefore potential to trigger pathogenic cascades. With Hi-C, we reconstructed the structural ring events as “head-tail” contacts in the chromosome, precisely mapping the 14q terminal deletions of varying sizes (100 Kb–5 Mb) previously detected with cytogenetics or microarrays. Moreover, we observed other regions of intra-chromosomal long-range interactions that were independent from the ring junctions that are not necessarily structural chromosomal changes. Some of them emerged as “hot spot” regions, as they were shared by all or most of the cases but were never present in their parents. Possibly, deregulation of elements in these contact-prone regions leads at least in part to perturbations in molecular pathways underlying the disease. We also performed transcriptome sequencing, also known as RNA-seq, on the same cell lines. RNA-seq is another powerful technique that provides a “snapshot” of gene expression in the cell by sequencing all mRNAs at the same time. RNA-seq singled-out some genes that were aberrantly expressed in R14S patients and we are now trying to understand if there is a link with the observed patterns of intra-chromosomal r(14) interactions.

We intend to replicate these findings in other R14S patients’ cell lines and to use complementary molecular techniques and statistical analyses to confirm these observations and perform integration of the different data layers produced in this and in other ongoing projects. We are utterly open to collaboration with other research groups that share with us the interest in unlocking the mechanisms underlying this challenging disease.

La sindrome Ring14 (R14S) è una rara malattia genetica. Da quando è stata osservata per la prima volta nel 1971 [1], sono stati descritti in letteratura meno di 90 casi. I bambini con questa sindrome mostrano un fenotipo clinico neuro-evolutivo complesso, che comprende disabilità intellettiva, comportamento aggressivo/iperattivo ed epilessia farmaco-resistente. L'epilessia farmaco-resistente di solito si manifesta entro i primi mesi di vita ed è un fattore determinante della prognosi [2]. La R14S è causata dal riarrangiamento del cromosoma 14 in una struttura a forma di anello originata da due punti di rottura fusi insieme, con delezioni terminali concomitanti di varie dimensioni. Si è ipotizzato che questa perdita di materiale genetico sia causa della malattia. Tuttavia, gli individui portatori di delezioni lineari 14q comparabili agli stessi eventi osservati nei r(14) non presentano epilessia, il che suggerisce che la delezione da sola non possa spiegare la manifestazione clinica più grave [3]. I diversi meccanismi alla base della formazione dell'anello sono ancora oscuri e una chiara correlazione genotipo/fenotipo è ulteriormente offuscata dalla co-occorrenza di riarrangiamenti del cromosoma 14 e dal grado sconosciuto di mosaicismo r(14) nelle aree del cervello correlate all'epilessia.

Abbiamo ipotizzato che la stessa circolarizzazione cromosomica abbia un impatto significativo sulle normali interazioni tra loci genetici, portando infine a perturbazioni dell'espressione genica che possano essere associate alla patogenesi della malattia. Ciò è anche suggerito dall'osservazione che altre malattie con manifestazioni cliniche di epilessia farmaco-resistente sono state descritte come sindromi ad anello [3].

Con il supporto di Ring14 International, abbiamo analizzato linee cellulari di 10 pazienti R14S e 5 genitori della Telethon Network of Genetic Biobanks, per indagare in che modo la formazione dell'anello influisca sull'architettura tridimensionale del cromosoma. A tal fine, abbiamo utilizzato una tecnica chiamata Genome-Wide Chromosome Conformation Capture (Hi-C). Il DNA è come un lungo filo accartocciato all'interno del nucleo di una cellula. Si ripiega in loop, avvicinando parti distanti per farle cooperare. A differenza dei metodi “normali” di sequenziamento, che restituiscono la sequenza lineare di basi adiacenti in un cromosoma, Hi-C rivela le interazioni a lungo raggio tra regioni di contatto nel nostro genoma distanti anche milioni di basi. Hi-C mappa questi contatti, mostrando come il genoma normalmente si organizza e come questa organizzazione possa essere interrotta in caso di malattia. Il genoma utilizza questa strategia di “looping” per controllare l'espressione genica portando un elemento regolatore, linearmente distante, in prossimità del suo gene “target”: gli eventi genomici che interrompono questa organizzazione hanno quindi il potenziale di innescare a valle eventi molecolari inerenti alla patologia. Con l’aiuto dell’Hi-C, abbiamo ricostruito le giunzioni dell’anello come contatti "testa-coda" nel cromosoma, mappando con precisione le delezioni terminali sul cromosoma 14q di dimensioni variabili (100 Kb–5 Mb) precedentemente rilevate con citogenetica o microarray. Inoltre, abbiamo osservato altre regioni di interazioni intra-cromosomiche a lungo raggio che risultano indipendenti dalle giunzioni ad anello e che dunque non necessariamente rappresentano cambiamenti di struttura del cromosoma. Alcune di esse sono emerse come regioni "hot spot", poiché la presenza di interazioni in tali regioni è condivisa da tutti o dalla maggior parte dei casi ma non dai genitori. Forse, la deregolamentazione degli elementi in queste regioni soggette a formare nuovi contatti potrebbe portare a perturbazioni nei “pathway” molecolari alla base della malattia. Abbiamo anche eseguito il sequenziamento del trascrittoma, noto anche come RNA-seq, sulle stesse linee cellulari. RNA-seq è un'altra potente tecnica che fornisce un’ “istantanea” dell'espressione genica nella cellula sequenziando tutti gli mRNA contemporaneamente. RNA-seq ha individuato alcuni geni che espressi in modo anomalo nei pazienti R14S e ora stiamo cercando di capire se esista un collegamento con le anomalie di interazioni intra-cromosomiche r(14) che abbiamo osservato in questi modelli cellulari. Abbiamo intenzione di replicare queste osservazioni in altre linee cellulari di pazienti R14S e di utilizzare tecniche molecolari complementari e analisi statistiche per confermare queste ipotesi, nonché di eseguire l'integrazione dei diversi livelli di dati prodotti in questo e in altri progetti in corso. Siamo aperti alla collaborazione con altri gruppi di ricerca che condividono con noi l'interesse nello studio dei meccanismi alla base di questa malattia ancora per molti aspetti misteriosa.

1. Zollino M, Seminara L, Orteschi D, Gobbi G, Giovannini S, Giustina ED, Frattini D, Scarano A, Neri G. 2009. The ring 14 syndrome: Clinical and molecular definition. Am J Med Genet Part A 149A:1116–1124.
2. Rinaldi, B., Vaisfeld, A., Amarri, S. et al. Guideline recommendations for diagnosis and clinical management of Ring14 syndrome—first report of an ad hoc task force. Orphanet J Rare Dis 12, 69 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0606-4>
3. Vaisfeld A, Spartano S, Gobbi G, Vezzani A, Neri G. Chromosome 14 deletions, rings, and epilepsy genes: A riddle wrapped in a mystery inside an enigma. Epilepsia. 2021; 62: 25–40. https://doi.org/10.1111/epi.16754