

Lezioni di genetica medica

Specializzazioni

2014

Programma, parte 1

genetica umana generale

- Il genoma umano: geni ed organizzazione
- Next generation sequencing (NGS), l'exoma
- Eterogeneità clinica ed eterogeneità genetica
- Penetranza ed espressività, anticipazione
- Omozigosità ed eterozigosità composta
- Aploinsufficienza
- Meccanismo dello splicing e sue alterazioni
- Classi di mutazioni puntiformi, transizione e trasversione, conservative, missenso, nonsenso, nonstop
- Inserzioni, delezioni con frame-shift e non, duplicazioni, conversione genica
- Significato patologico delle varie classi di variazioni del DNA: alleli equivalente, amorfico, ipomorfico, ipermorfico, neomorfico e antimorfico
- Nomenclatura delle variazioni genetiche e refertazione

Programma, parte 2: la consulenza e le cromosopatie

- La consulenza genetica: rischio riproduttivo dipendente ed indipendente dal partner
- Diagnostica prenatale e presintomatica
- L'analisi del cariotipo e i bandeggi, la FISH
- Cariotipo molecolare mediante arrayCGH
- Aneuploidie negli aborti e rischio di ricorrenza
- Triploidia da doppio corredo paterno o materno, tetraploidia
- Il cromosoma X e la sua inattivazione, regioni PAR
- Trisomie autosomiche e dei cromosomi sessuali
- Le monosomie, la sindrome di Turner
- Delezioni cromosomiche, inversioni paracentriche e pericentriche
- Traslocazioni sbilanciate e bilanciate, robertsoniane, markers cromosomici
- Delezioni e duplicazioni submicroscopiche (s. di Williams, s. di DiGeorge, s. Cri du Chat)

Programma, parte 3

genetica medica mendeliana

- Malattie mendeliane monoalleliche con mutazioni *de novo* (craniosonostosi, acondroplasia)
- Malattie mendeliane monoalleliche a trasmissione autosomica dominante (neurofibromatosi, s. di Marfan, rene policistico, osteogenesi imperfetta)
- Malattie mendeliane monoalleliche legate al cromosoma X (distrofia muscolare di Duchenne e Becker, emofilia, ritardi mentali legati all'X)
- Malattie mendeliane bialleliche a trasmissione autosomica recessiva (fibrosi cistica, alfa e beta talassemia, amiotrofia spinale, emocromatosi, glicogenosi)

Programma, parte 4, eccezioni all'eredità mendeliana

- Mutazioni dinamiche in regioni non codificanti (X-fragile, distrofia miotonica) e codificanti (corea di Huntington, atassie spino-cerebellari)
- Mutazioni in regioni cromosomiche con imprinting (Prader-Willi, sindrome di Angelman, Beckwith-Wiedemann, Silver-Russel) disomia uniparentale
- Mutazioni del DNA mitocondriale (MERFF, MELAS, LHON, KS, s. di Leigh)
- Predisposizione genetica
- Caratteri multifattoriali
- studi GWAs

Testi consigliati

- Neri-Genuardi
Genetica umana e medica
Editore Elsevier Masson
- Moncharmont-Leonardi
Patologia Generale
Editore Idelson Gnocchi
- Strachan-Read
Genetica Molecolare Umana
Editore Zanichelli
- Lewis
Genetica Umana
Editore Piccin
- Sito web <http://www.vincenzonigro.it> (glossario)

Caratteri complessi



Vincenzo Nigro

Dipartimento di Patologia Generale
Seconda Università degli Studi di Napoli



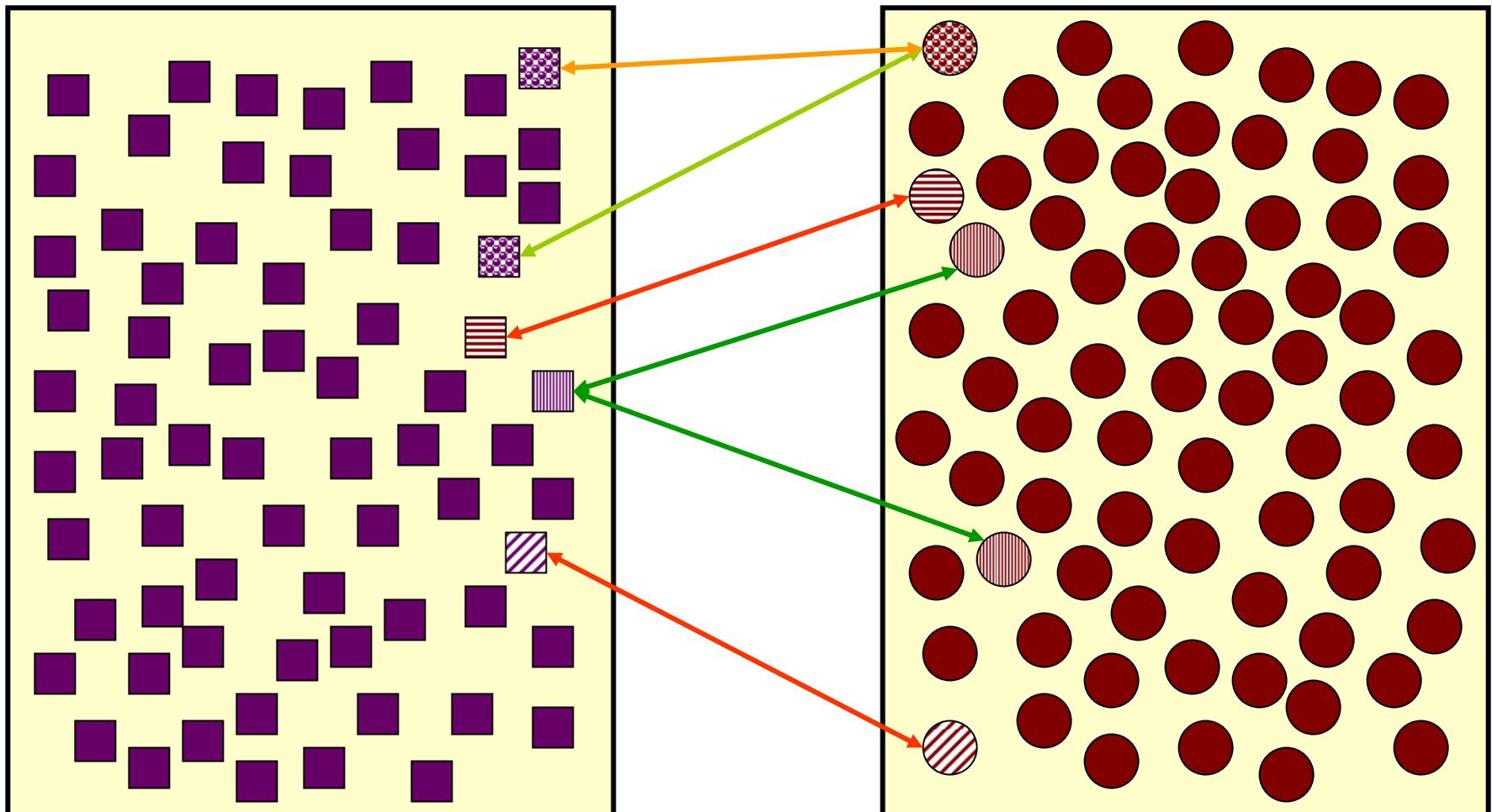
Telethon Institute of Genetics and Medicine
(TIGEM)

Caratteri non mendeliani

(non dipendenti dal genotipo in un singolo locus)

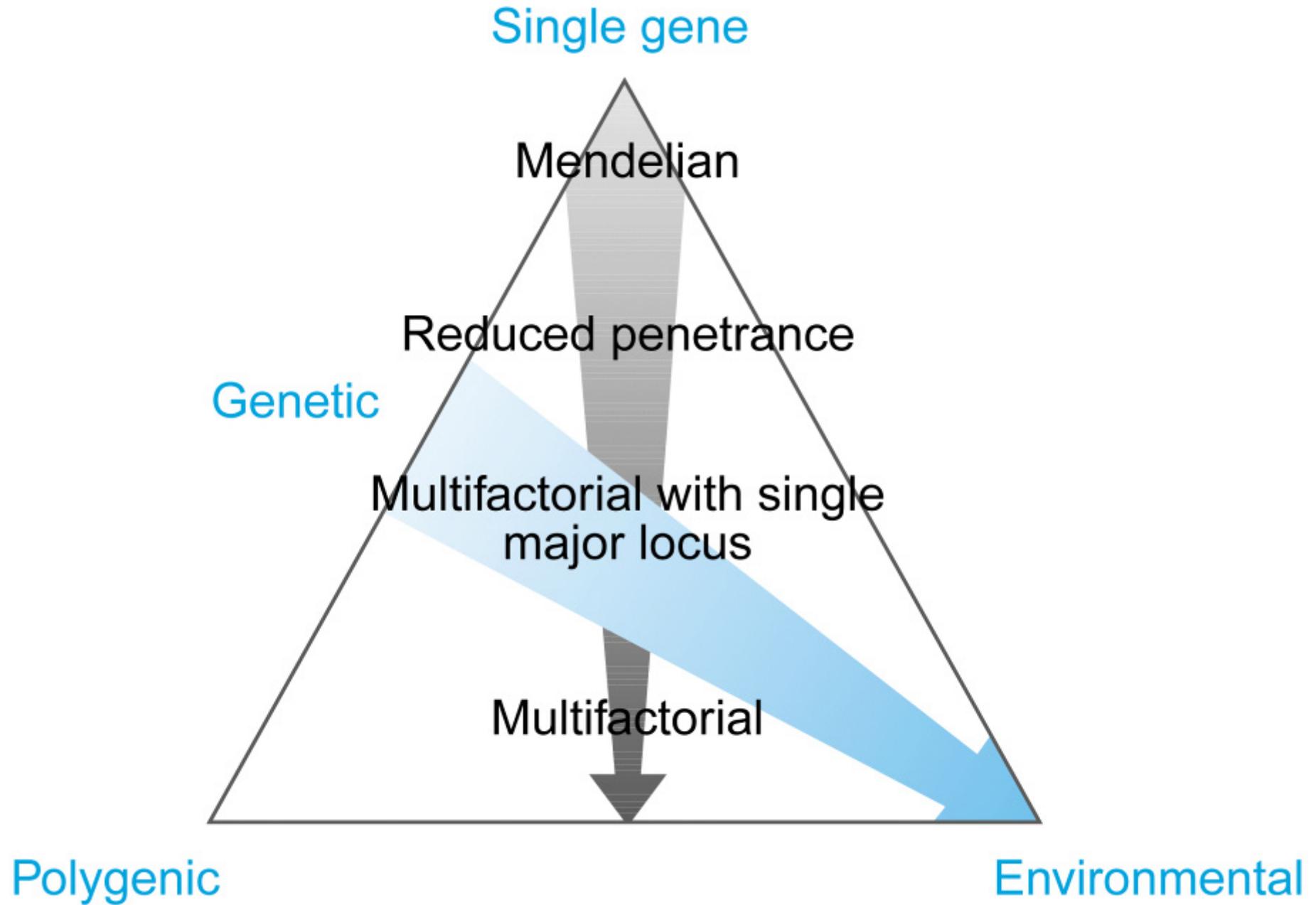
- **continui (quantitativi)**
- **discontinui (dicotomi)**

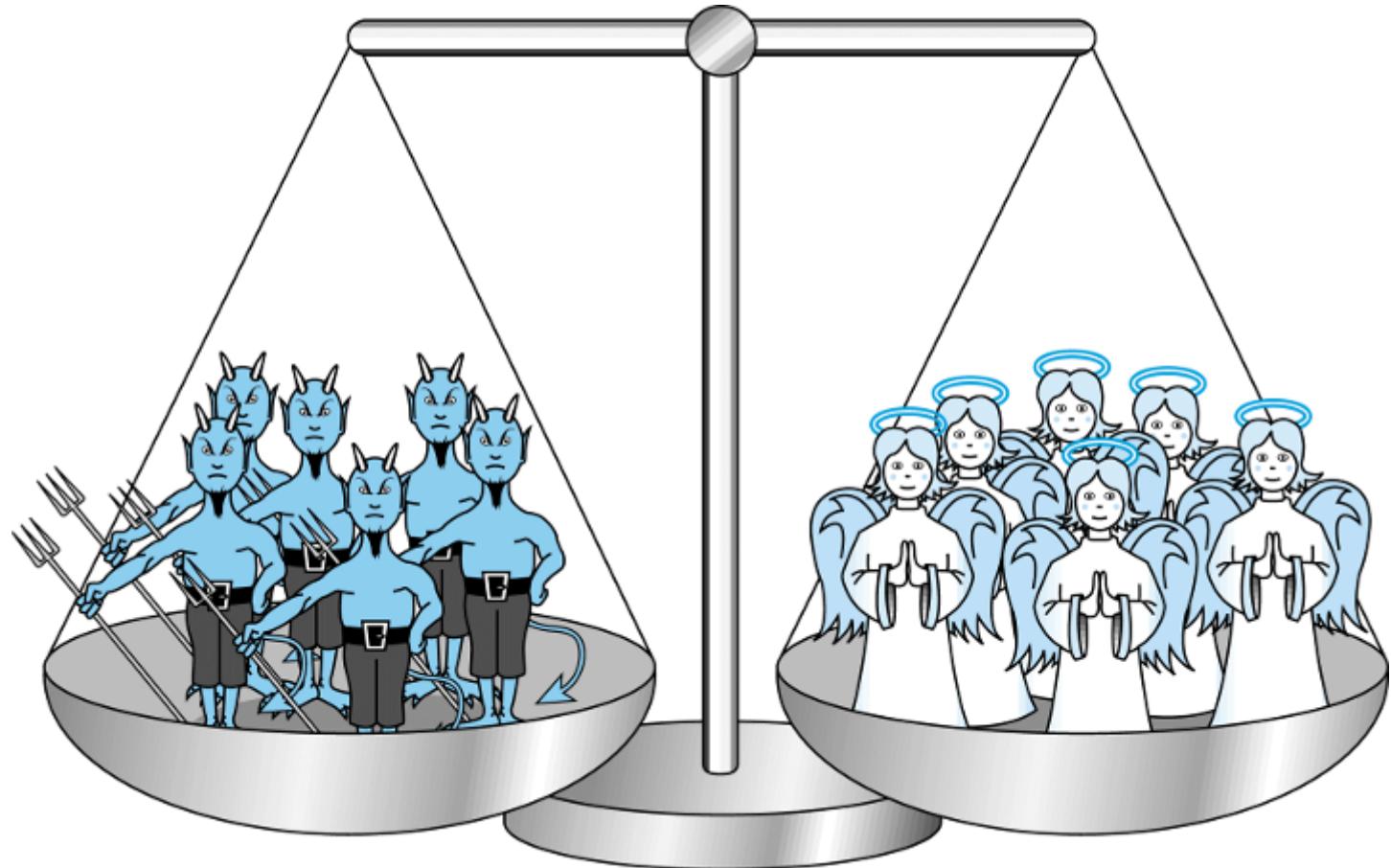
Rapporto genotipo-fenotipo



~25,000 gene e altri elementi di regolazione

Tratti genetici o malattie





L'ereditabilità delle malattie comuni è dovuta a geni multipli ciascuno con un piccolo effetto

GWA: genome-wide association

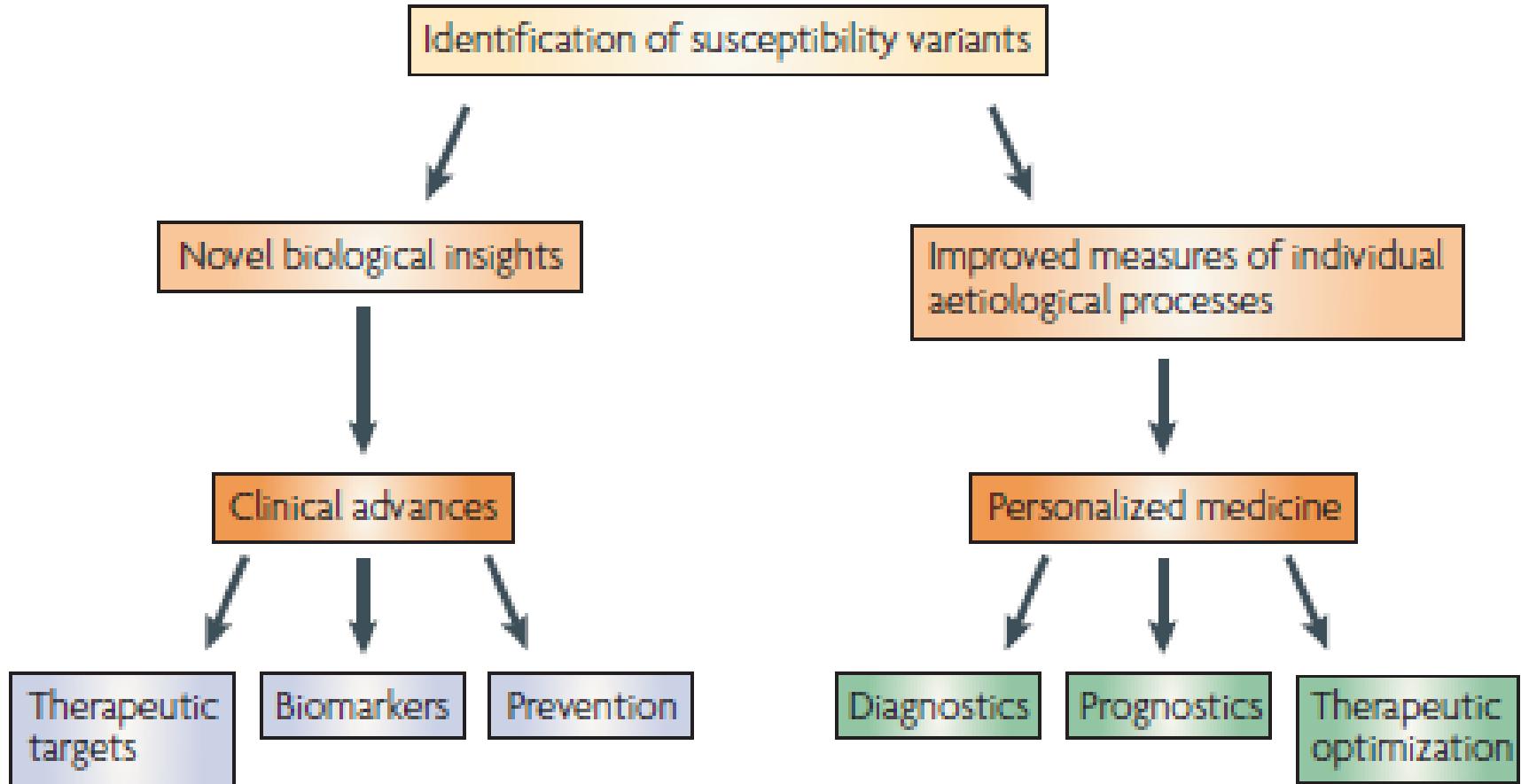
Tag SNP: representative SNP in a region of the genome with high linkage disequilibrium to other variants

Linkage disequilibrium (LD): association of alleles at two or more sites on the same chromosome that are inherited together more often than expected by chance

Polymorphism: a form of genetic variation in which each allele occurs in at least 1% of the population

Single nucleotide polymorphism (SNP): site within the genome that differs by a single nucleotide base across different individuals

Haplotype: a combination of alleles at multiple linked sites on a single chromosome that are transmitted together



un carattere non Mendeliano ha una componente genetica?

- i genitori trasmettono
 - i geni
 - l’ambiente (questo vale specialmente per caratteri quali IQ e i disordini psichiatrici)
- anche le abitudini alimentari, il clima, ecc.
- Occorre provare il ruolo dei geni al di là della ricorrenza familiare

geni condivisi

- gemelli monozigoti
- fratelli, genitori-figli
- fratellastri, zii-nipoti
- cugini I grado
- cugini II grado
- 1/1 consanguinità
- 1/2 consanguinità
- 1/4 consanguinità
- 1/8 consanguinità
- 1/32 consanguinità

gemelli monozigoti MZ

- hanno lo stesso sesso
- hanno gli stessi alleli
- hanno gli stessi polimorfismi
- se femmine, hanno un differente pattern di inattivazione dell'X
- hanno un differente repertorio di immunoglobuline
- hanno un differente TCR
- spesso hanno un ambiente più simile

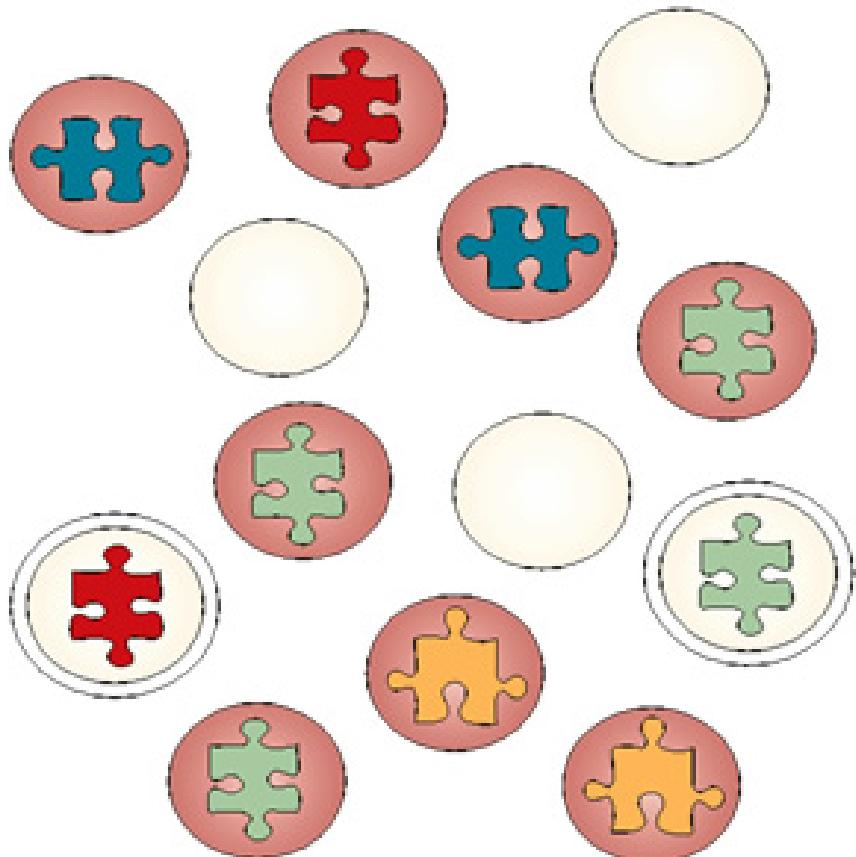
gemelli dizigoti DZ

- hanno lo stesso sesso nel 50% dei casi
- hanno il 50% degli alleli in comune
- hanno il 50% dei polimorfismi in comune

Occorre considerare il rapporto MZ/DZ che può essere inferiore a 2 o superiore a 2 in funzione del numero dei geni coinvolti

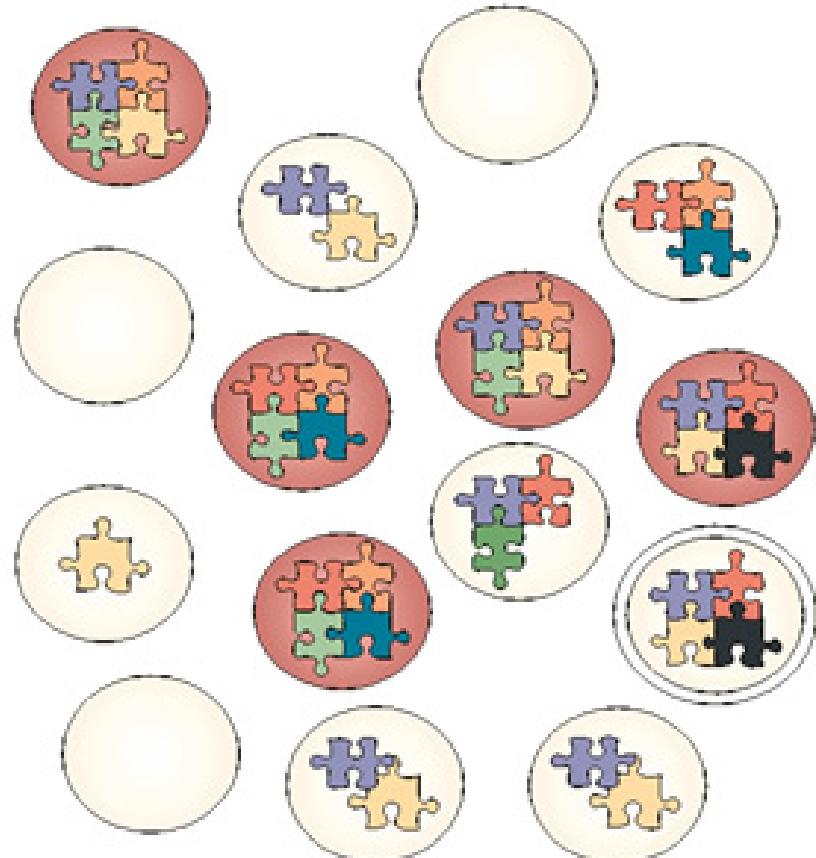
a

Heterogeneity



Different risk alleles individually produce the same phenotype

Polygenicity



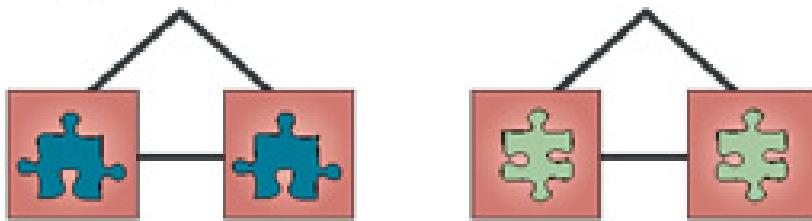
Combinations of risk alleles are required to produce a phenotype

● Affected

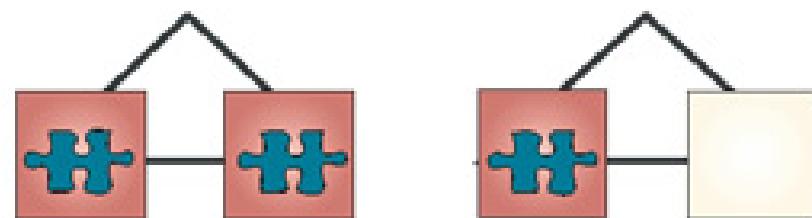
○ Unaffected

◎ Non-penetrance

Heterogeneity

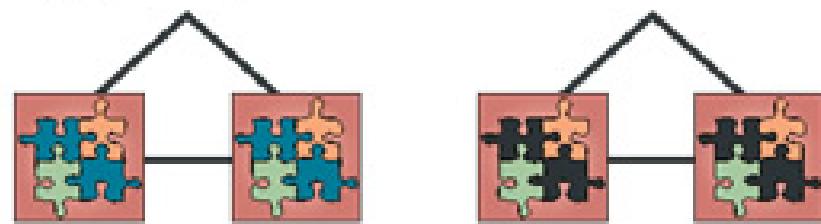


Monozygotic

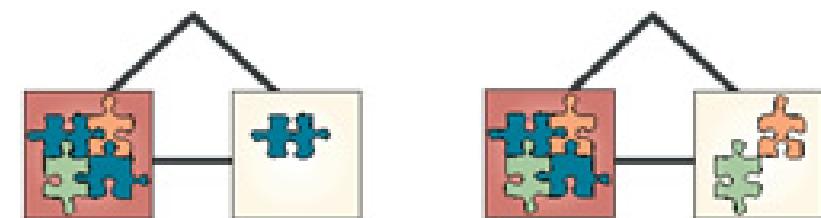


Dizygotic

Polygenicity



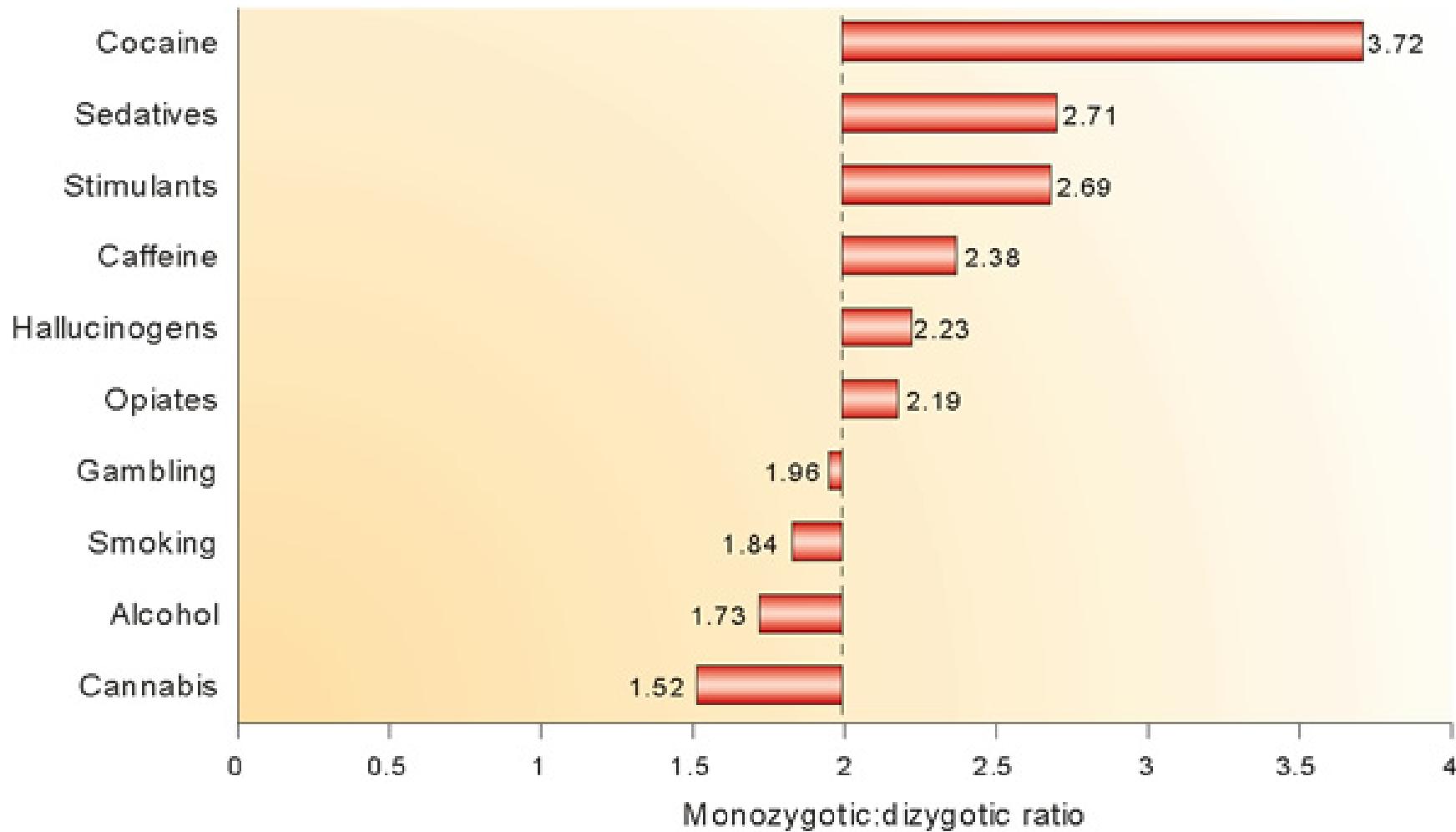
Monozygotic



Dizygotic

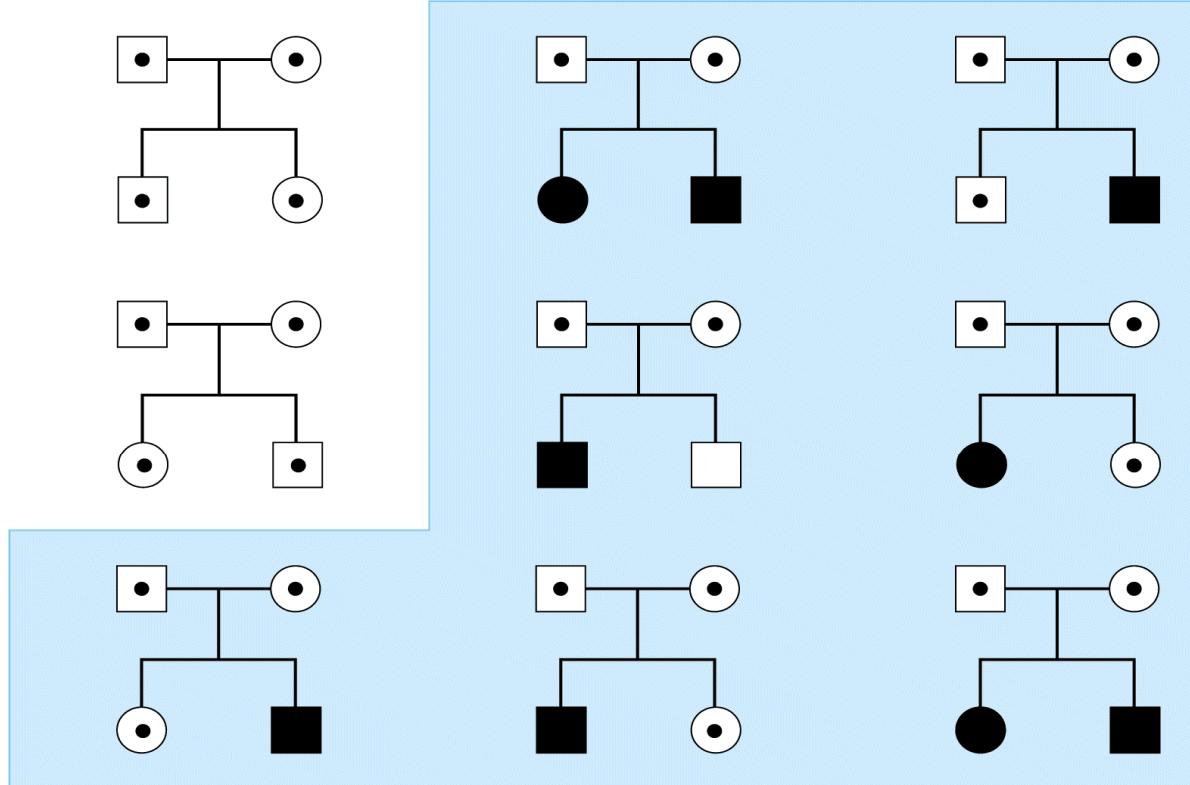
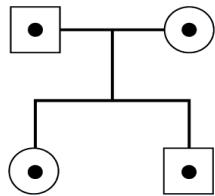
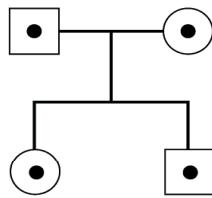
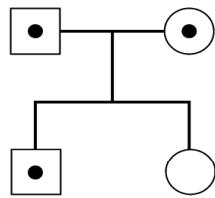
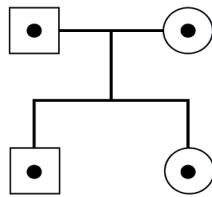
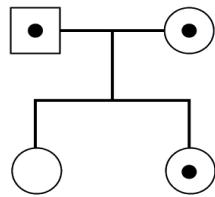
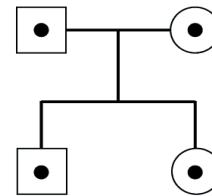
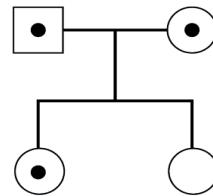
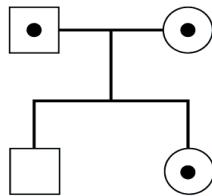
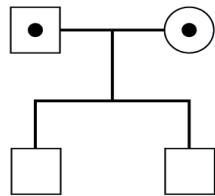
■ Affected

□ Unaffected



Errori sistematici di accertamento

- quanti figli affetti ha un coppia di portatori di un tratto recessivo?
- $\frac{1}{4}$?
- se hanno due figli
- 8/14 (sarebbero 8/32, ma in 9 famiglie non ci sono affetti)



correzione (LI-Mantel) $p = (R-S)/(T-S)$

R = numero di figli affetti

S = numero dei figli affetti singoli

Analisi parametrica *richiede un preciso modello di trasmissione*

una piccola parte degli affetti può avere condizioni Mendeliane indistinguibili dalla maggioranza non Mendeliana e l'identificazione della causa Mendeliana potrebbe essere di aiuto

Breast Cancer (11 loci), Alzheimer (AD1-AD15) ALS (1-8)

Per caso molti fattori di suscettibilità sono presenti nella maggior parte delle persone studiate e quindi si considera un gene che fa spostare l'equilibrio (Hirschsprung)

Analisi nonparametrica

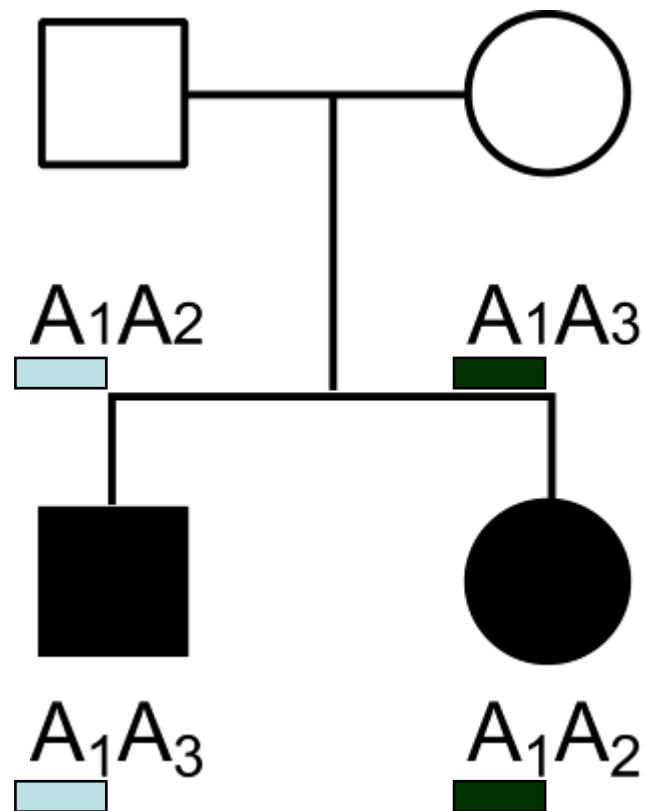
Senza un modello

Non si sa a priori se la trasmissione è dominante o recessiva o mista o poligenica, ecc

Si valuta quanta parte si condivide dei segmenti di DNA nelle famiglie o nelle popolazioni

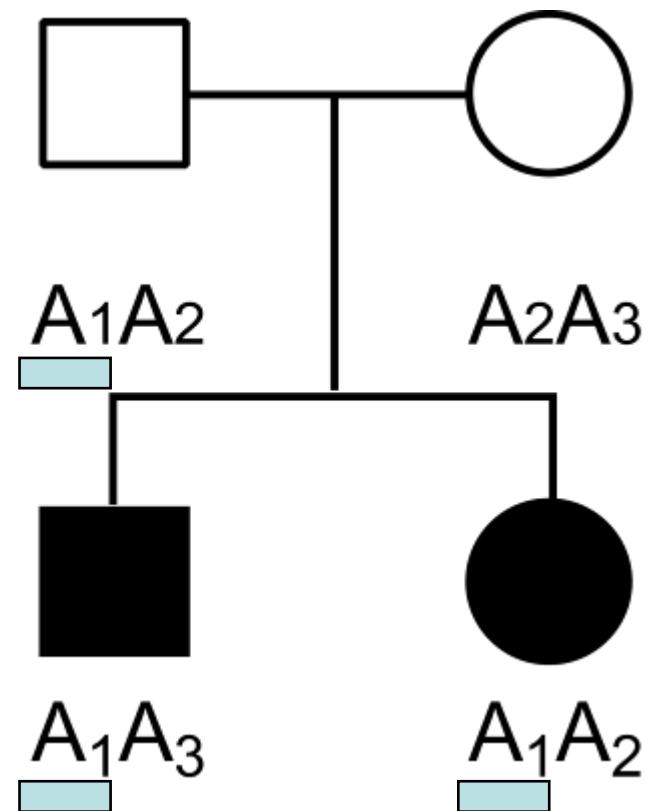
identity by state IBS

significa che gli alleli sono uguali apparentemente, ma non è conosciuta la loro origine



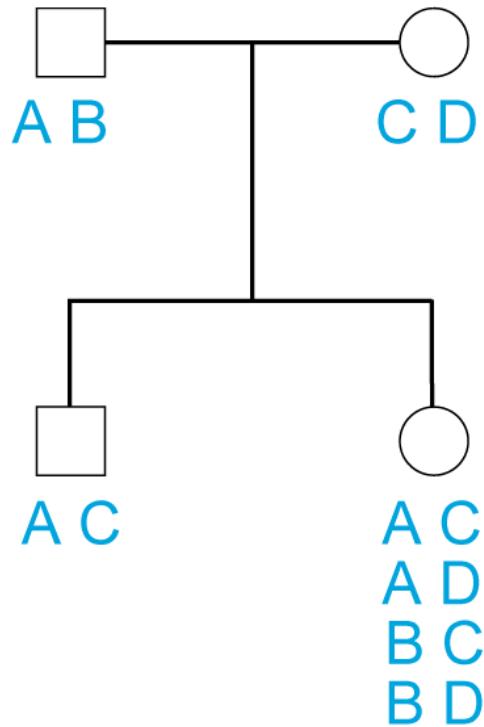
identity by descent IBD

significa che gli alleli sono uguali perché hanno una comune origine



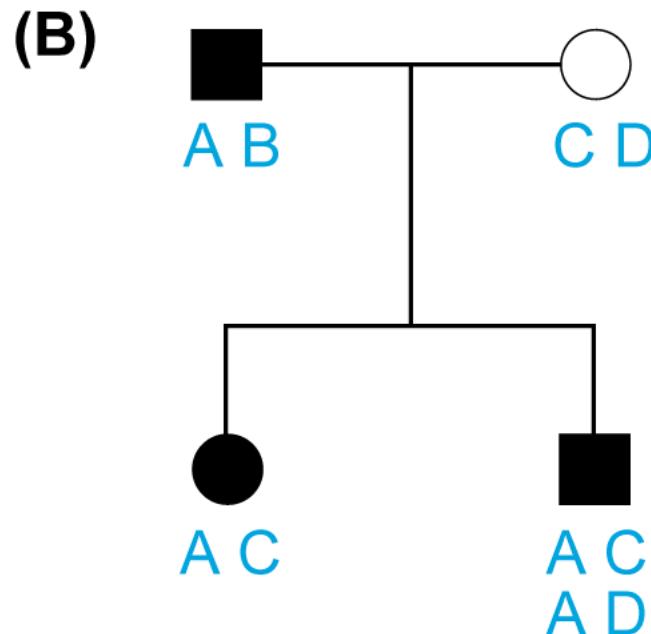
affected sib pairs ASP

(A)



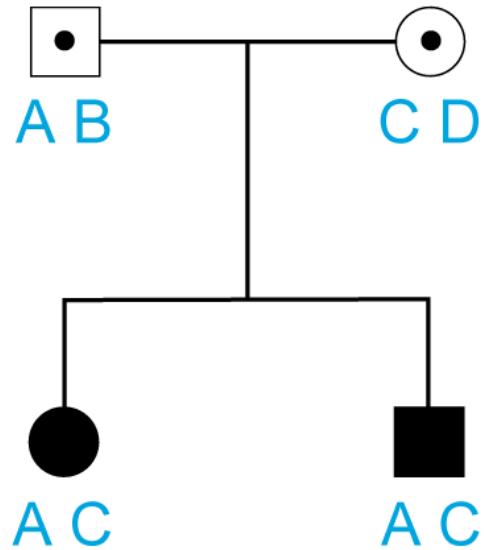
con una segregazione casuale una coppia di fratelli (sib-pair) condivide 2 alleli AC, 1 allele AD e BC, oppure o alleli BD per ogni segmento di DNA

affected sib pairs ASP



Se la ipotetica condizione è dominante, 1 allele deve essere in comune

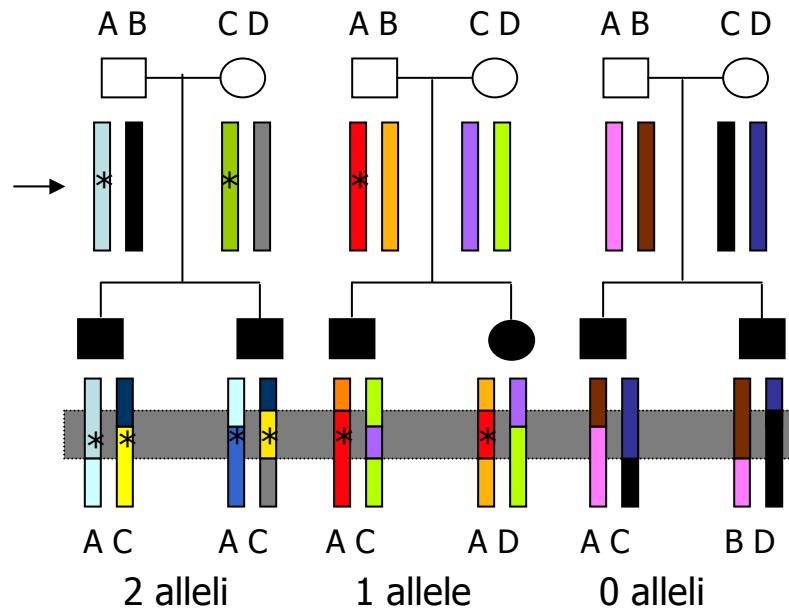
(C)



necessariamente i fratelli devono avere in comune 2 alleli

'Non-parametric' linkage

Misura se gli affetti condividono dei marcatori ereditati da un comune progenitore IBD più frequentemente rispetto al caso



Marker <u>unlinked</u> to susceptibility gene	25%	50%	25%
sib-pairs share alleles according to chance			

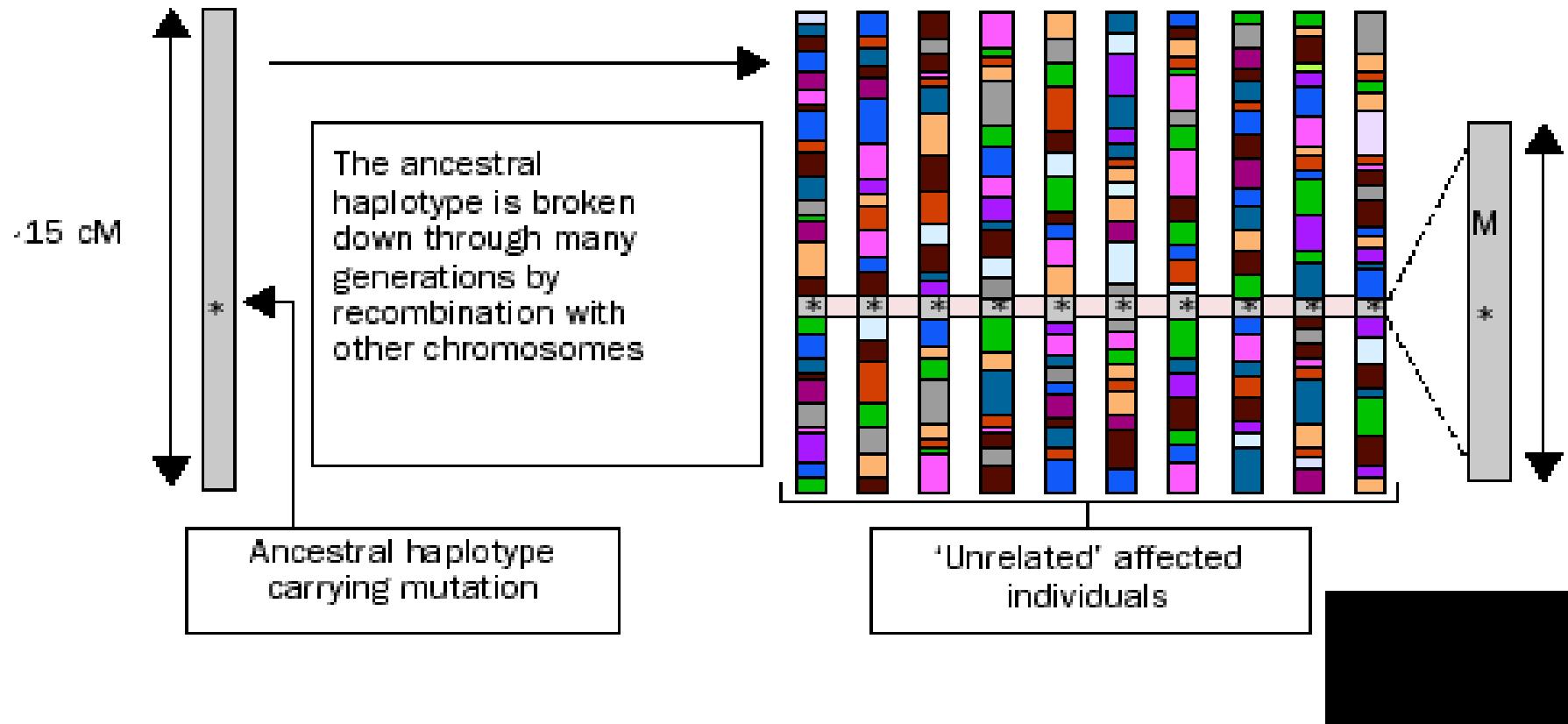
Marker <u>linked</u> to susceptibility gene	40%	55%	5%
sib-pairs share alleles more often than expected by chance			

Problemi con il linkage non parametrico

Meno sensibile e quindi sono richiesti più sib-pairs
Più impreciso
Più difficilmente si può arrivare al gene
Soglia di significatività più elevata
LOD score significativo tra 3.6 e 5.3
LOD score altamente significativo >5.3
Difficoltà a replicare gli studi in una differente popolazione

Linkage disequilibrium mapping

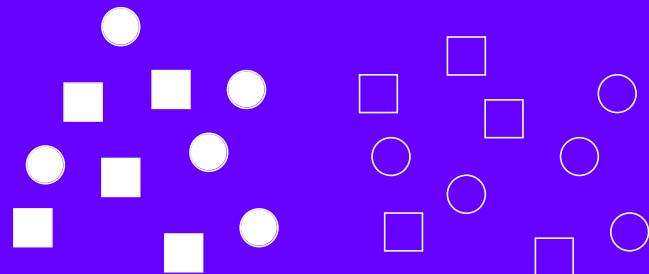
Se le variazioni nella stessa regione non sono indipendenti sono in linkage disequilibrium



Studi di associazione

- Si testa se la presenza di una specifica variante genica aumenta il rischio di ammalarsi
- Confrontano la frequenza dei markers tra casi e controlli

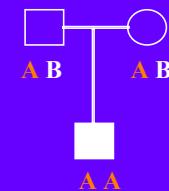
Case-control



Test for different frequency of an allele in cases vs controls

Family based association tests (TDT)

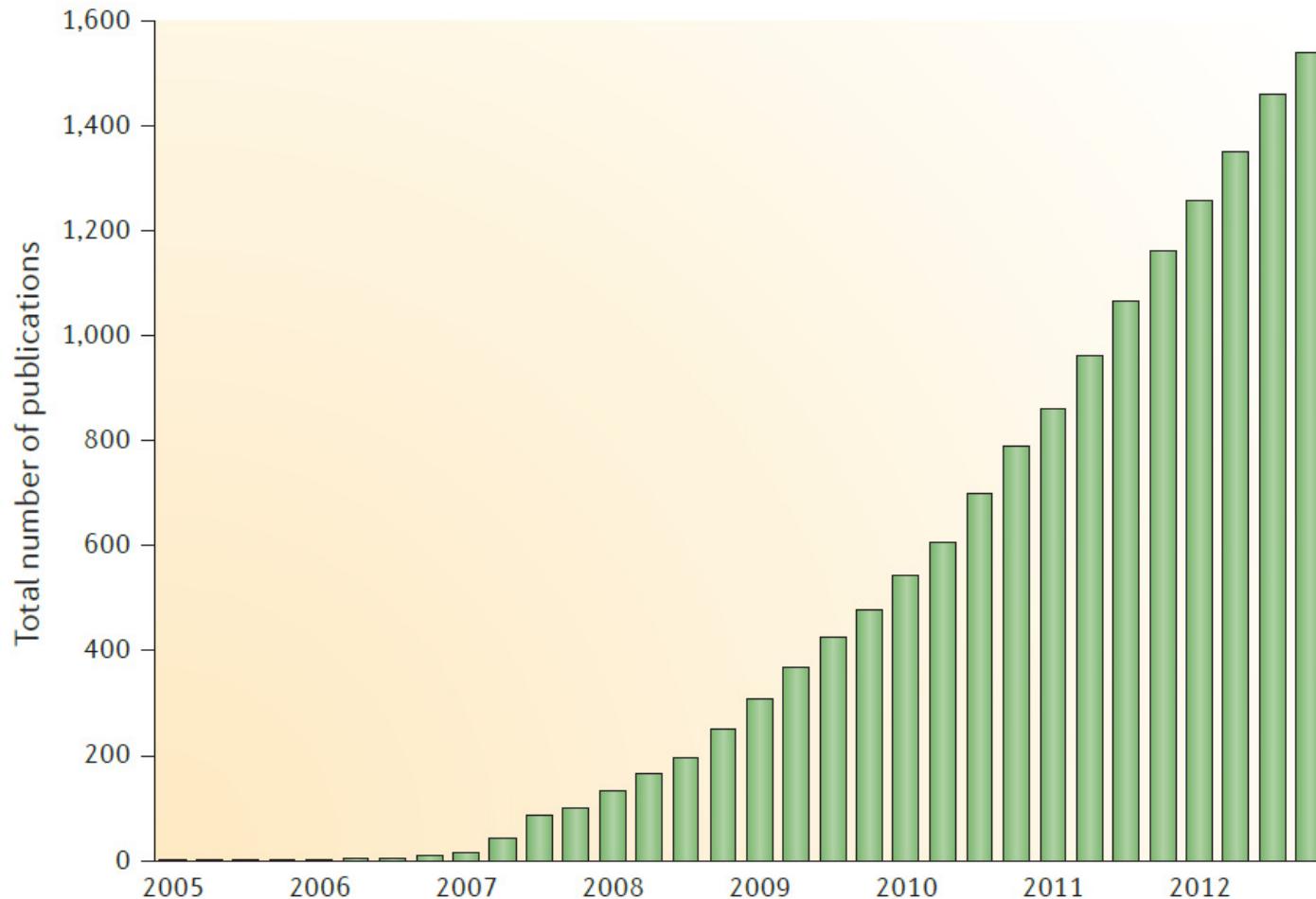
Parental alleles:
Trasmitted -> A A
Non trasmitted -> B B



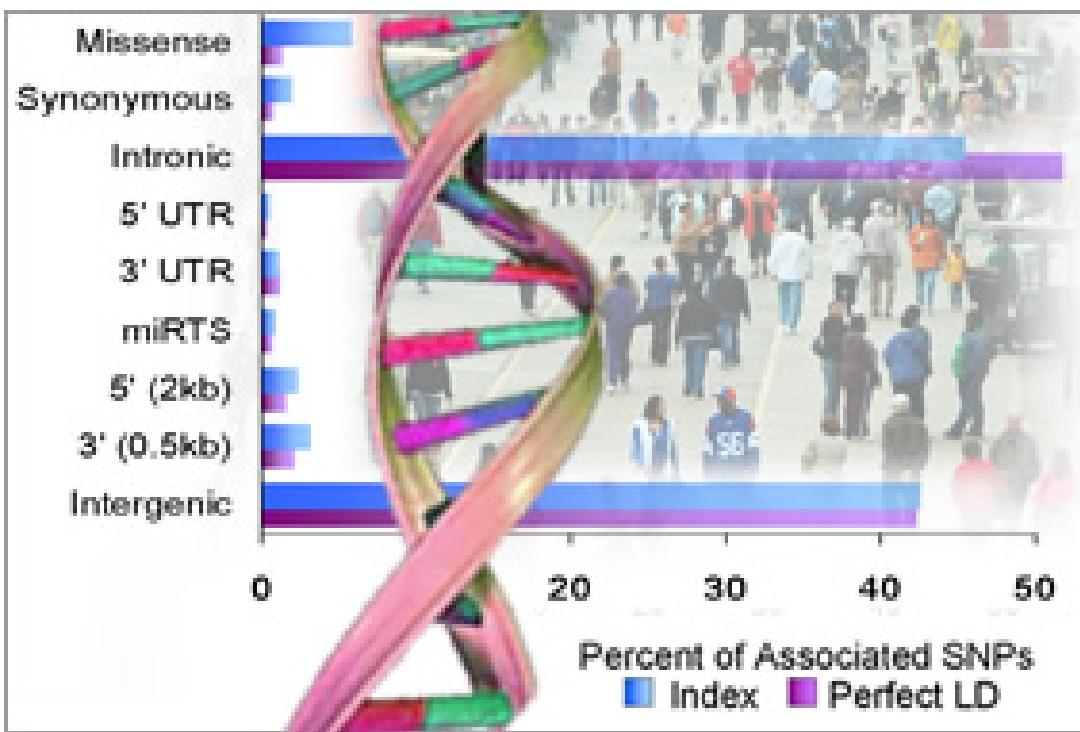
Parental alleles not trasmitted to probands are used as "internal controls"

Figure 1 | Pace of genome-wide association study publications since 2005.

The pace of genome-wide association study (GWAS) publications has increased dramatically over 7 years and shows no signs of slowing. The figure is based on data from the US [National Human Genome Research Institute Catalog of Published Genome-Wide Association Studies](#).



<http://www.genome.gov/19518660>



GWASs (genomic wide association studies)

- **GWASs servono a comprendere la base genetica dei tratti complessi**
- Per alcuni tratti ci sono molti loci: diabete, cancro della prostata e della mammella, malattia infiammatoria intestinale, ecc
- Per altri tratti i loci sono pochi: asma, malattia coronarica, fibrillazione atriale
- Sono diventati il metodo migliore per identificare fattori di rischio per malattie complesse
- Più potente del linkage se le varianti che conferiscono suscettibilità sono comuni, mentre è meno potente se le varianti sono rare
- È necessario procedere con una mappa che comprende molti marcatori a breve distanza l'uno dall'altro

GWA studies o GWASs

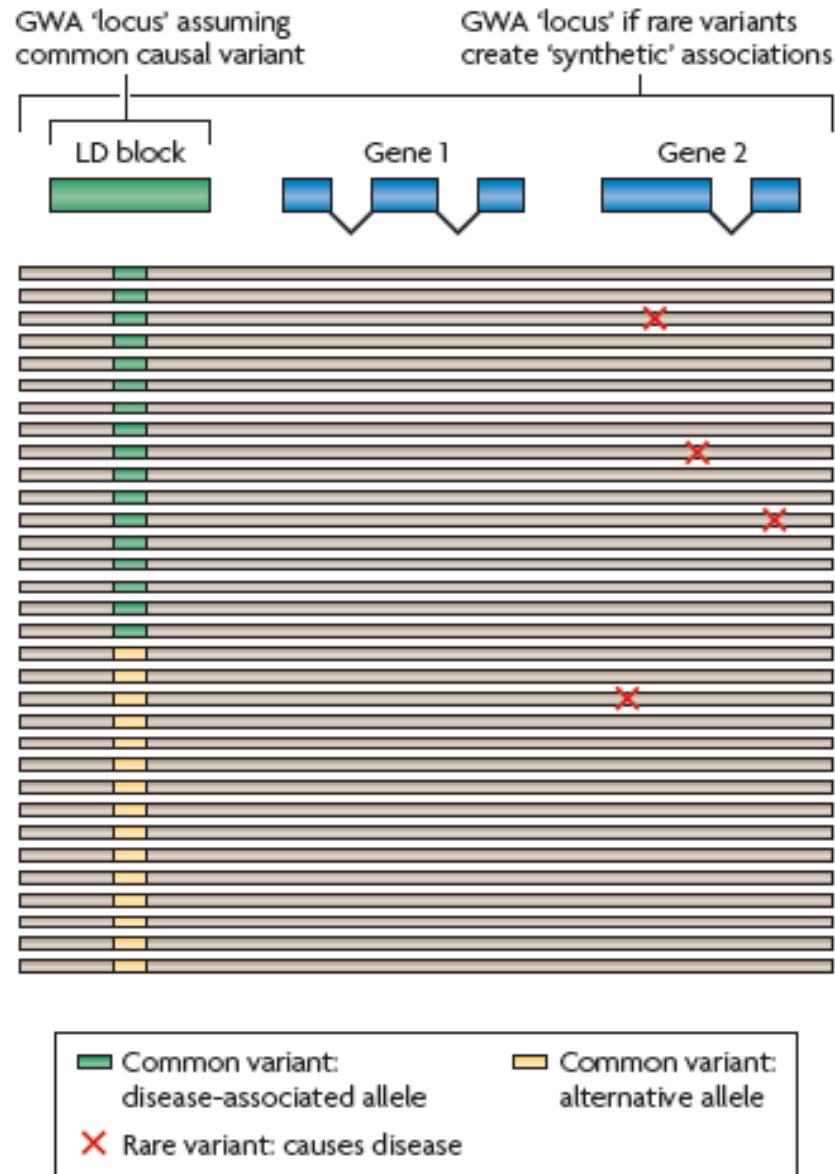
negli anni 2007-2014 sono state dimostrate circa 2.000 associazioni consistenti con oltre 300 tra malattie e tratti complessi, ma l'odd ratio è spesso <1.3

i loci identificati, da soli o in combinazione, spiegano solo una parte (circa il 10%) del contributo ereditario (*missing heritability*)

i GWASs suggeriscono solo che un *variante sconosciuta* che causa un tratto complesso è localizzata da qualche parte in un'ampia regione genomica con dozzine di geni

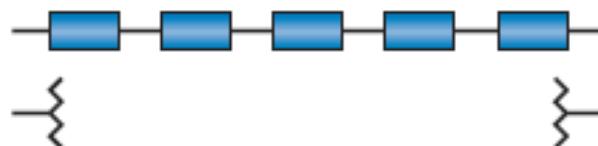
Associazione sintetica

Il blocco di LD non è abbastanza grande da includere le varianti più rare associate alla malattia e si potrebbe pensare che la variante comune abbia una funzione regolatoria



ruolo delle delezioni nella predisposizione genetica a una malattia

a Haploinsufficiency

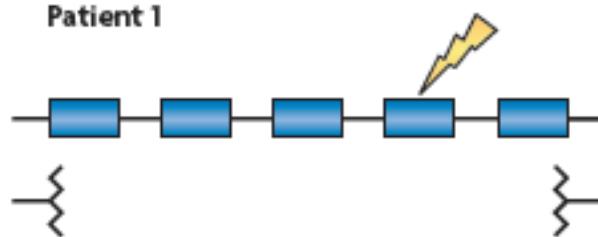


Normal copy of gene with no mutations

Deletion of gene on homologous chromosome results in disease-causing haploinsufficiency

b Revealing of recessive mutations

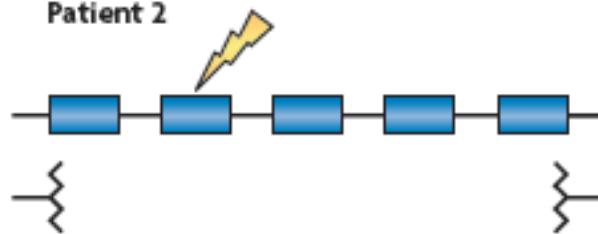
Patient 1



One copy of gene contains a recessive mutation for epilepsy

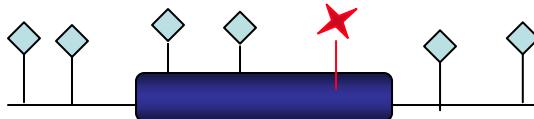
Deletion of gene on homologous chromosome reveals recessive mutation for epilepsy

Patient 2



One copy of gene contains a recessive mutation for schizophrenia

Deletion of gene on homologous chromosome reveals recessive mutation for schizophrenia



Associazione indiretta

usare SNPs comuni

Gli SNPs sono genotipizzati sulla base del linkage disequilibrium (LD)

Minor allele frequency = MAF

MAF > 0.05
alleli comuni usati sinora per i «GWA studies»

MAF >0.01 e <0.05
polimorfismi non comuni, ma inclusi nei nuovi GWASs

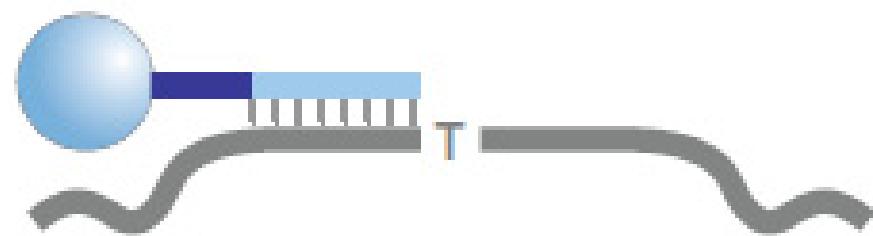
MAF<0.01
varianti rare innocue o mutazioni causative recessive

Infinium, Illumina

Infinium HD BeadChip	Markers (per sample)	Median Marker Spacing
<u>Human1M-Duo</u>	>1.1 million	1.5kb
<u>Human660W-Quad</u>	>658,000	2.5kb
<u>HumanCytoS NP-12</u>	~300,000	10kb
<u>Human510S-Duo*</u>	>510,000	3.2kb



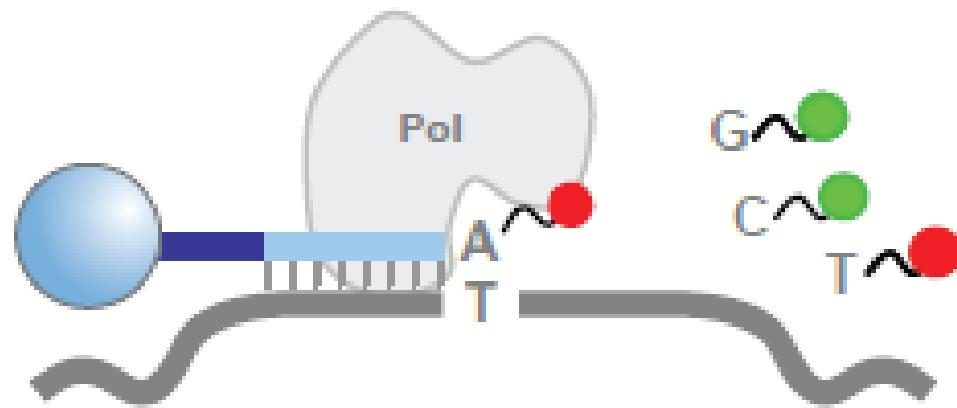
Two-Step Allele Detection



Step 1. Selectivity

Hybridization of unlabeled DNA fragment to 50mer probe on array

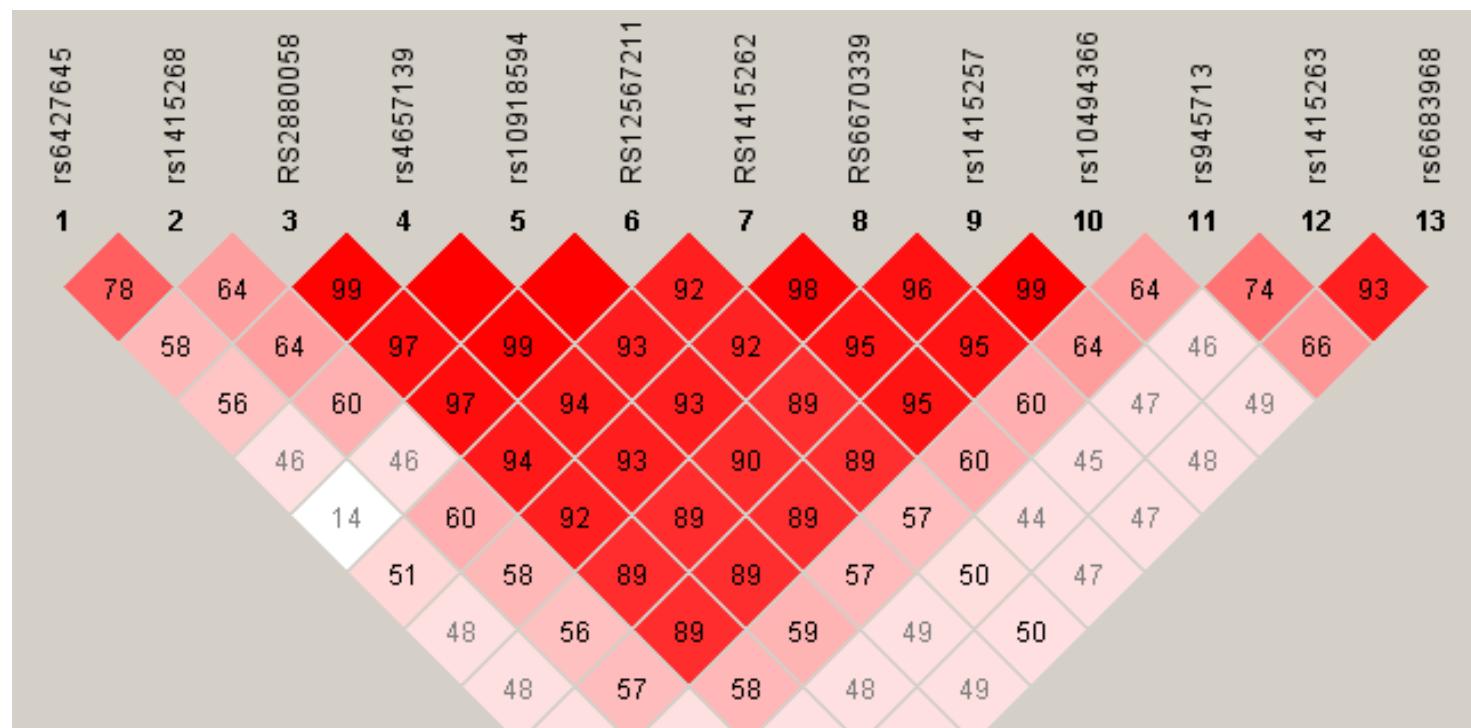
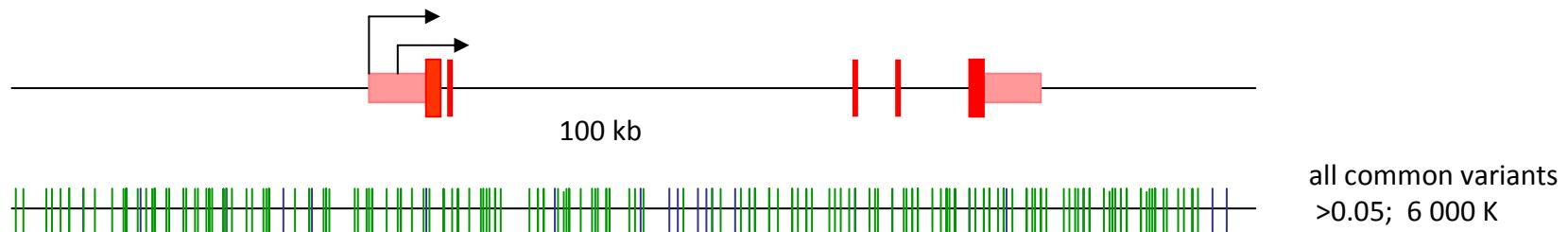
genotipizzazione di ciascun SNP



Step 2. Specificity
Enzymatic single base extension
with labeled nucleotide

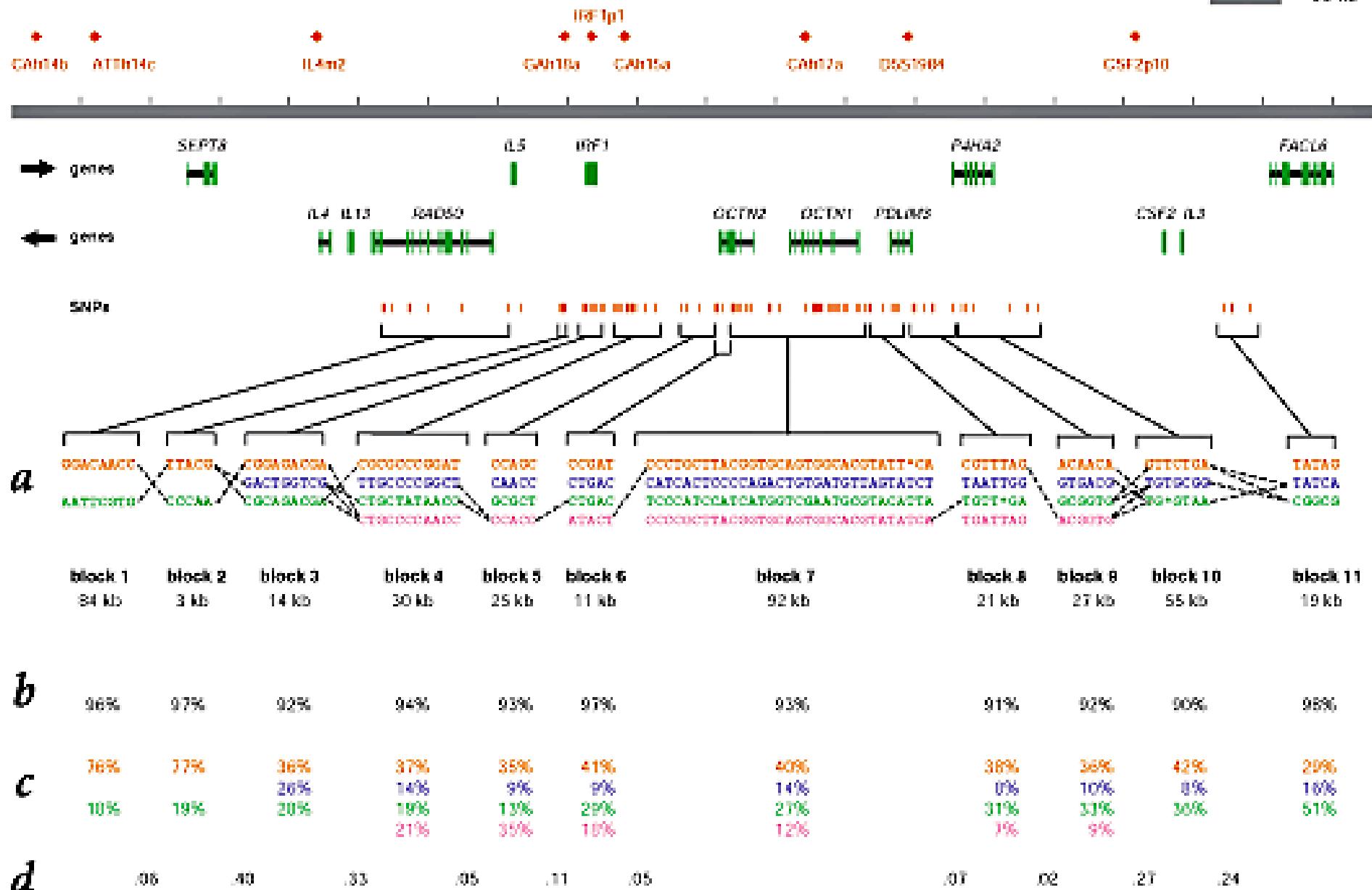
aploblocchi nel genoma

gene nr 24680



Gli aploblocki sono dovuti alla mancanza di ricombinazione

— 50 kb



punti critici dei GWAs

- Selezione dei casi
 - minimizzare l'eterogeneità fenotipica?
 - focalizzazione su casi familiari?
 - scegliere casi ad insorgenza precoce?
- Selezione dei controlli
 - Controlli comuni a differenti tratti?
 - 3000 controlli della Wellcome Trust Case Control Consortium
- Significatività statistica
 - GWS genome wide significance = $p < 5 \times 10^{-8}$
 - Replica dello studio su una differente popolazione

Hoggart CJ, Clark TG, De Iorio M, Whittaker JC, Balding DJ. Genome-wide significance for dense SNP and resequencing data. *Genet Epidemiol.* 2008;32(2):179–185.

Tremore

- 02/25/09 Stefansson
February 01, 2009 *Nat Genet*
Variant in the sequence of the LINGO1 gene confers risk of essential tremor Essential tremor
- 452 cases
- 14,378 controls
- 15q24.3
- *LINGO1*
- 1×10^{-9}
- Illumina [305,624]

obesità

- 01/15/09 Thorleifsson December 14, 2009 *Nat Genet*
Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity
- Body mass index
- Studio iniziale: 80,969 individuals
- Replica: 11,036 individuals
- 16q12.2 *FTO* 1×10^{-47}
- 2p25.3 *TMEM18* 4×10^{-17}
- 16q12.2 18q21.32 19q13.11 1p31.1 3q27.2 16p11.2 11p14.1 11p14.1 1q25.2 12q13.13 1p21.3 11p14.1
- *FTO MC4R KCTD15, CHST8 NEGR1 SFRS10, ETV5, DGKG SH2B1, ATP2A1 BDNF BDNF SEC16B, RASAL2 BCDIN3D, FAIM2 NR BDN*
- $4 \times 10^{-13} 1 \times 10^{-12} 7 \times 10^{-12} 1 \times 10^{-11} 7 \times 10^{-11} 3 \times 10^{-10} 5 \times 10^{-10} 9 \times 10^{-10} 6 \times 10^{-8} 1 \times 10^{-7} 4 \times 10^{-6} 8 \times 10^{-6} 8.04 [6.96-9.12] \% SD 6.12 [4.69-7.55] \% SD 5.25 [3.82-6.68] \% SD 4.38 [3.16-5.60] \% SD 4.18 [2.98-5.38] \% SD 3.77 [2.67-4.87] \% SD 4.42 [3.09-5.75] \% SD 3.63 [2.49-4.77] \% SD 4.58 [3.07-6.09] \% SD 3.85 [2.62-5.08] \% SD 3.36 [2.14-4.58] \% SD 3.28 [2.06-4.50] \% SD 2.6 [1.50-3.70] \% SD 3.15 [1.78-4.52] \% SD$
- Illumina [305,846]

Aneurismi intracranici

- Bilguvar November 09, 2008 *Nat Genet*
Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations
- 1,580 European cases, 6,276 European controls
- 495 Japanese cases, 676 Japanese controls
- 8q11.23 *SOX17* 1×10^{-10}
- 9q21.3 *CDKN2A* *CDKN2B* 1×10^{-10}
- Illumina [289,271]

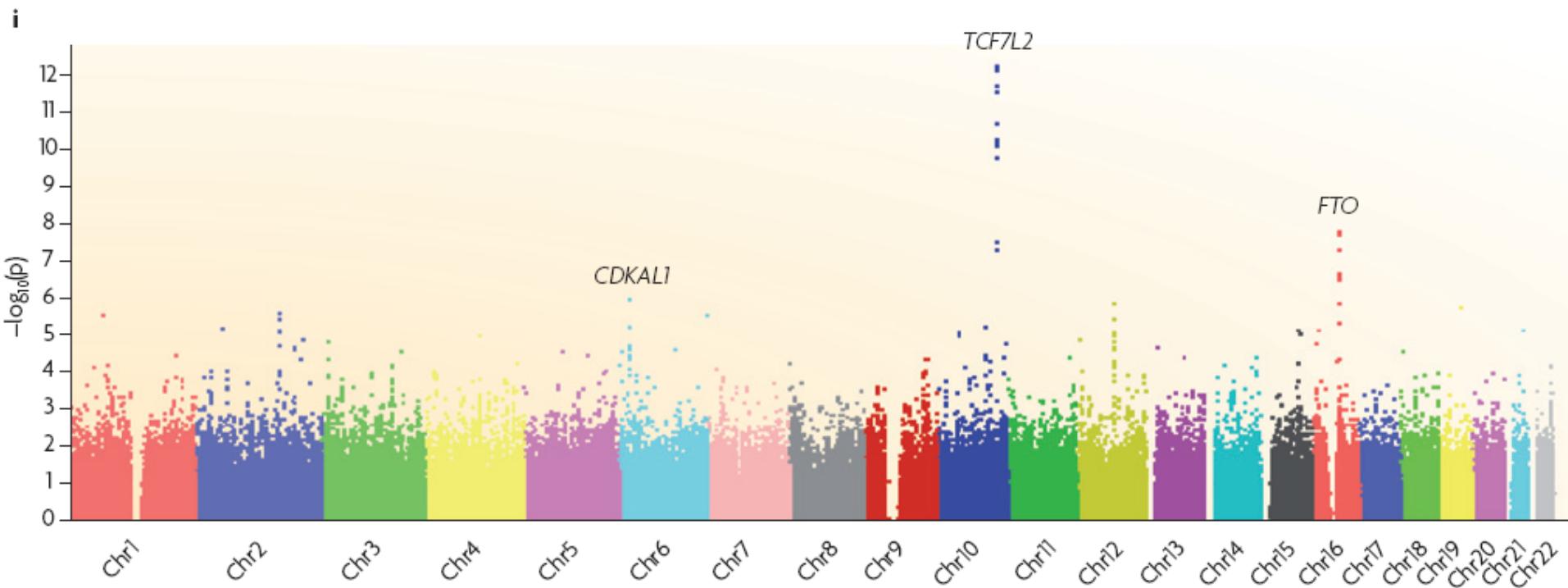
Manhattan plot

GWA Diabete di tipo 2

Crom 10 TCF7L2 transcription factor 7-like 2

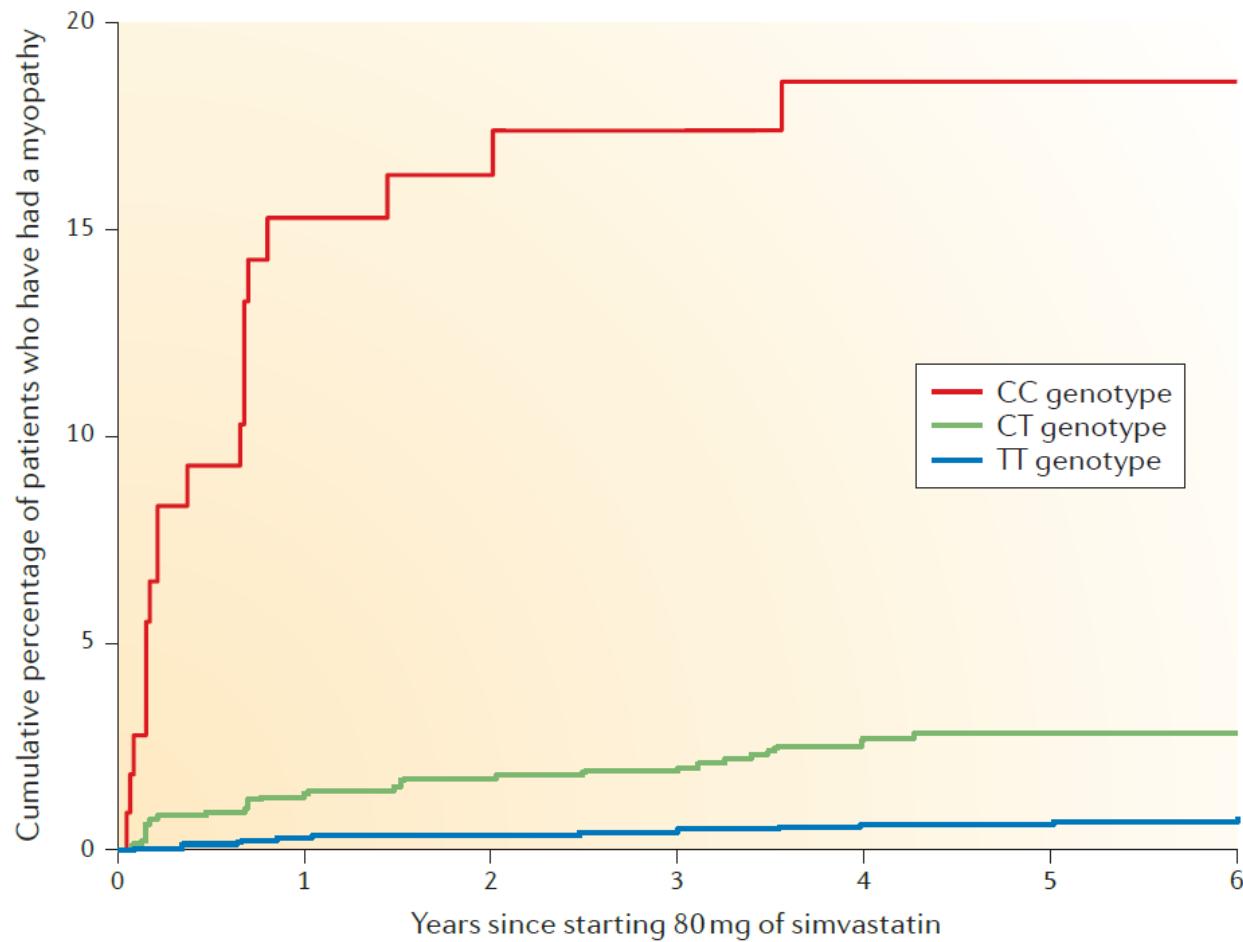
Crom 16 FTO fat mass and obesity associated

Crom 6 CDKAL1 = CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1



risk of myopathy in chronic simvastatin use

estimated cumulative risk of myopathy by high-dose by solute carrier organic anion transporter family member 1b1 (*SLCO1B1*) rs4149056 genotype



Studi GWA che hanno raggiunto una significatività per varie forme di cancro

Table 1. Eligible associations reaching genome-wide significance for cancer phenotypes

Cancer	Locus	Reported genes*	Risk allele	First publication	Risk allele information on frequency and genetic effect			
					$f_{\text{EUR}} (f_{A_1}) (\%) \dagger$	OR (95% CI)	P	PMID
Basal cell carcinoma (skin)	1q42.13	<i>RHOU</i>	rs8011114-G	October 12, 2008 (18)	33	1.28 (1.19 to 1.37)	6×10^{-12}	18849993
	1p36.13	<i>PADI4, PADI6, RCC2, ARHGEF10L</i>	rs7538876-A	October 12, 2008 (18)	35	1.28 (1.19 to 1.37)	4×10^{-12}	18849993
	12q12-13	<i>KRT5</i>	rs11170164-A	July 5, 2009 (4)	8	1.35 (1.23 to 1.50)	2×10^{-9}	19578363
	9p21	<i>CDKN2A/B</i>	rs2151280-C	July 5, 2009 (4)	53	1.19 (1.12 to 1.26)	7×10^{-9}	19578363
	7q32	Intergenic	rs157935-T	July 5, 2009 (4)	68	1.23 (1.15 to 1.31)‡	6×10^{-10}	19578363
	10q26.13	<i>FGFR2</i>	rs2981582-A	May 27, 2007 (42)	38 (30)	1.26 (1.23 to 1.30)	2×10^{-60}	17529967
	5q11.2	<i>MAP3K1</i>	rs889312-C	May 27, 2007 (42)	28 (54)	1.13 (1.10 to 1.16)	7×10^{-20}	17529967
	8q24.21 (region 3)	Intergenic	rs13281615-G§	May 27, 2007 (42)	40 (56)	1.08 (1.05 to 1.11)	5×10^{-12}	17529967
	11p15.5	<i>LSP1</i>	rs3817198-C	May 27, 2007 (42)	30 (14)	1.07 (1.04 to 1.11)	3×10^{-9}	17529967
	16q12.1	<i>TNCR9, LOC643714</i>	rs3803662-A	May 27, 2007 (42)	25 (60)	1.20 (1.16 to 1.24)	1×10^{-20}	17529967
Breast cancer	2q35	Intergenic	rs13387042-A†	May 27, 2007 (40)	50	1.20 (1.14 to 1.26)	1×10^{-12}	17529974
	6q22.33	<i>ECHDC1, RNF146</i>	rs2180341-G	March 11, 2008 (29)	21	1.41 (1.25 to 1.59)	3×10^{-8}	18326623
	6q25.1	<i>C6orf97</i>	rs2046210-At,	February 15, 2009 (13)	37	1.29 (1.21 to 1.37)	2×10^{-15}	19219042
	1p11.2	Intergenic	rs11249433-C	March 29, 2009 (12)	39	1.16 (1.10 to 1.23)	7×10^{-10}	19330030
	3p24	<i>SLC4A7, NEK10</i>	rs4973768-T	March 29, 2009 (52)	46 (21)	1.11 (1.08 to 1.13)	4×10^{-23}	19330027
	17q23	<i>COX11</i>	rs6504950-G	March 29, 2009 (52)	73 (92)	1.05 (1.01 to 1.09)	1×10^{-8}	19330027
	8q24.21 (region 4)	Intergenic	rs6983267-G§	July 8, 2007 (37)	51	1.21 (1.15 to 1.27)	1×10^{-14}	17618284
	18q21.1	<i>SMAD7</i>	rs4939827-T	October 14, 2007 (35)	52	1.18 (1.12 to 1.23)	1×10^{-12}	17934461
	15q13.3	Intergenic	rs4779584-T	December 16, 2007 (33)	19	1.26 (1.19 to 1.34)	4×10^{-14}	18084292
	11q23.1	Intergenic	rs3802842-C	March 30, 2008 (28)	29 (30)	1.11 (1.08 to 1.15)	6×10^{-10}	18372901
Colorectal cancer	8q23.3	<i>EIF3H</i>	rs16892766-A	March 30, 2008 (27)	7	1.25 (1.19 to 1.32)	3×10^{-18}	18372905
	10p14	Intergenic	rs10795668-A	March 30, 2008 (27)	67	1.12 (1.10 to 1.16)	3×10^{-13}	18372905
	8q24.21 (region 4)	<i>POU5FIP1, HsG57825, DQ515897</i>	rs7014346-A§,¶	March 30, 2008 (28)	37 (22)	1.19 (1.15 to 1.23)	9×10^{-10}	18372901

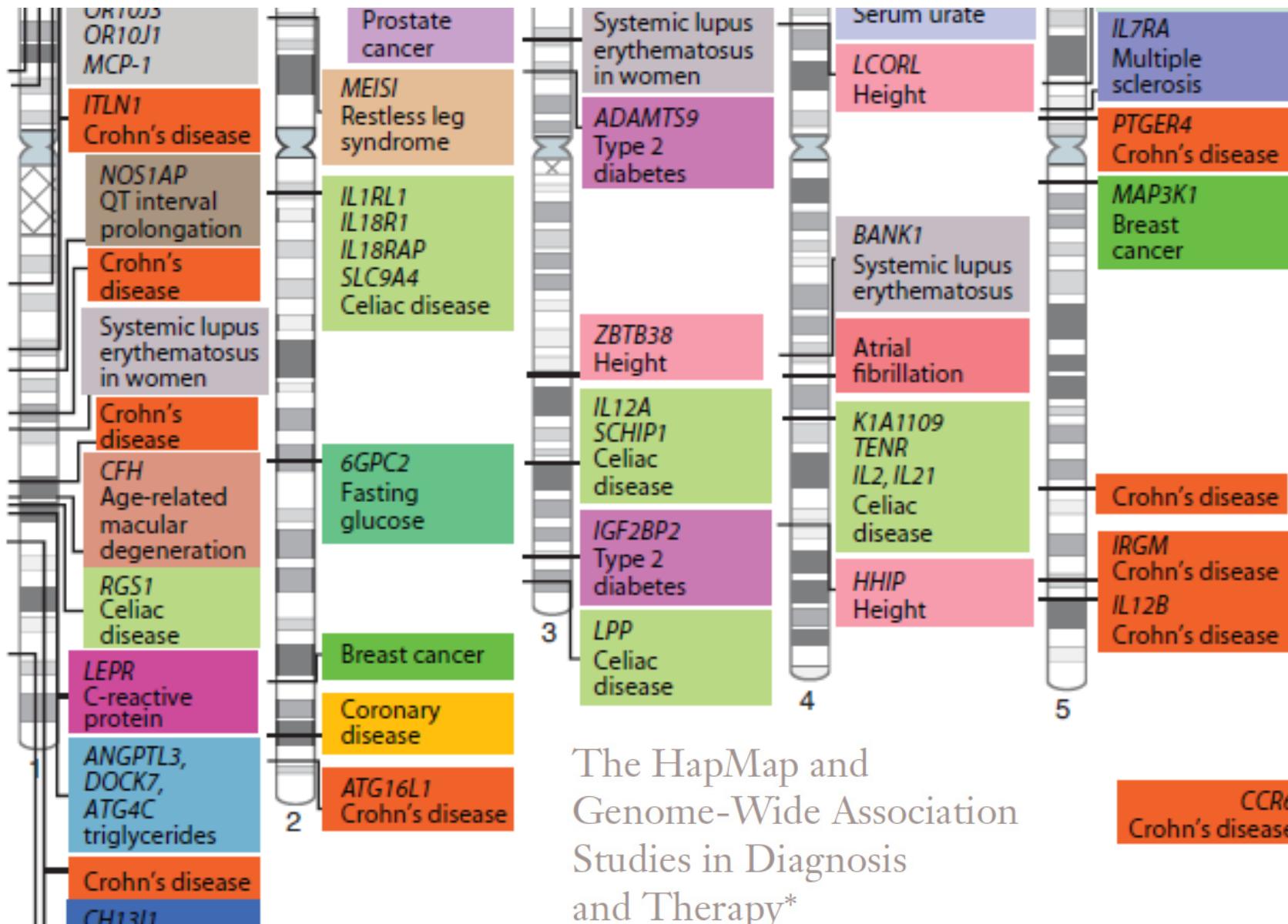
Breast Cancer FGFR2 10q26.13 Odds Ratio=1.26 p= 2×10^{-60}

Testicular Germ Tumour KITLG 12q21 OR=2.69 p= 3×10^{-30}

Effetto combinato delle varianti in quattro forme di cancro

Cancer type	Variants considered	Risk in percentile of simulated risk*				
		10th	25th	50th	75th	90th
Colorectal	10	66.4	78.3	95.6	113.3	139.6
Prostate	26	43.2	58.7	84.8	123.1	174.4
Testicular	3	39.8	54.5	101.4	138.9	152
Thyroid	2	58.9	58.9	80.8	131.8	141.4

Cancer type	Variants considered	RR in upper vs lower	RR in upper vs lower
		decile (95% CI)	quartile (95% CI)
Colorectal	10	2.75 (2.41 to 3.14)	2.10 (1.91 to 2.31)
Prostate	26	6.85 (6.02 to 7.79)	4.08 (3.67 to 4.53)
Testicular	3	7.99 (7.06 to 9.03)	4.19 (3.89 to 4.52)
Thyroid	2	4.45 (3.96 to 5.01)	4.09 (3.75 to 4.46)



The HapMap and Genome-Wide Association Studies in Diagnosis and Therapy*

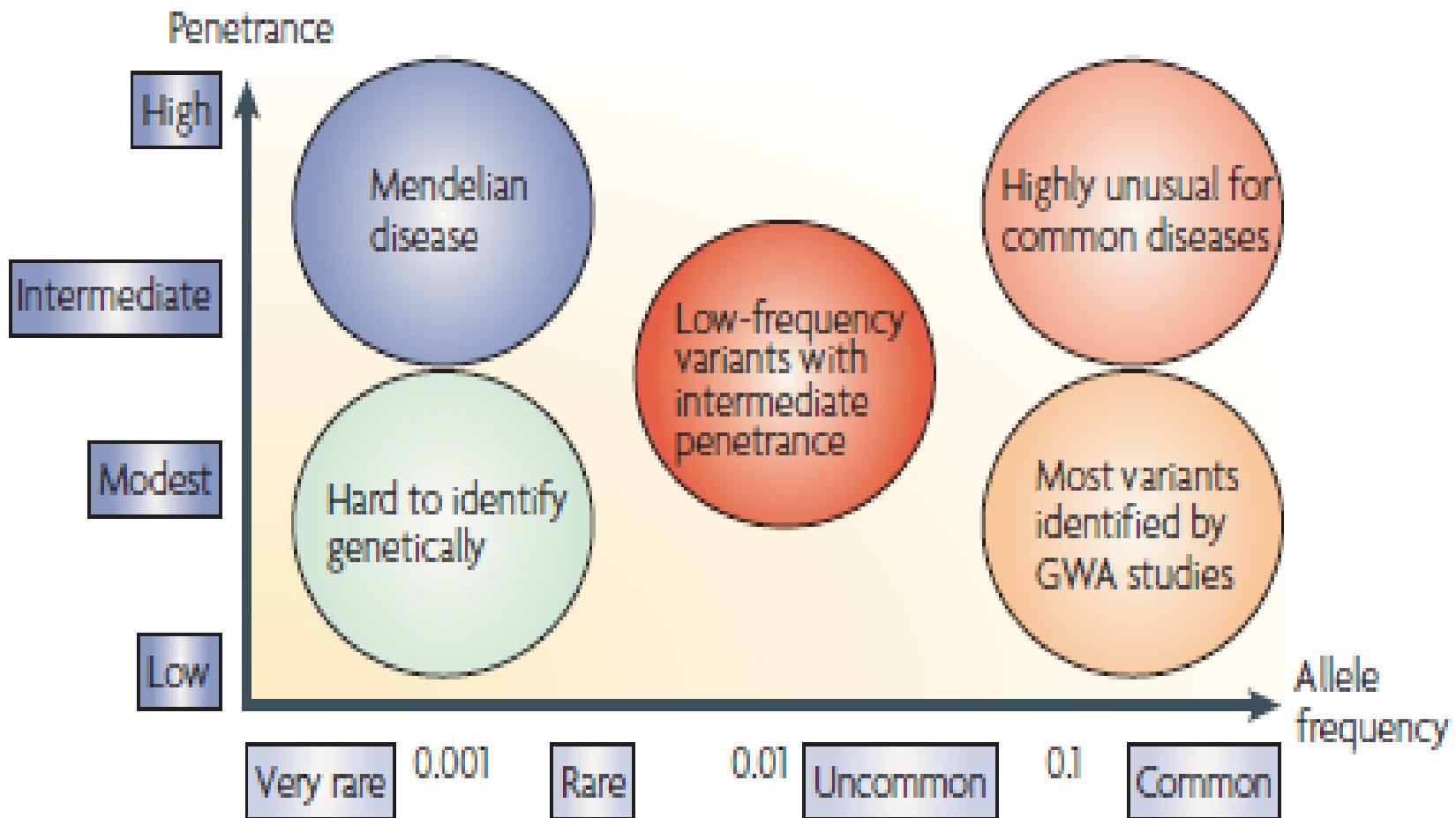
Teri A. Manolio and Francis S. Collins

National Human Genome Research Institute, Bethesda, Maryland 20892;
email: manolio@nih.gov



Dark matter

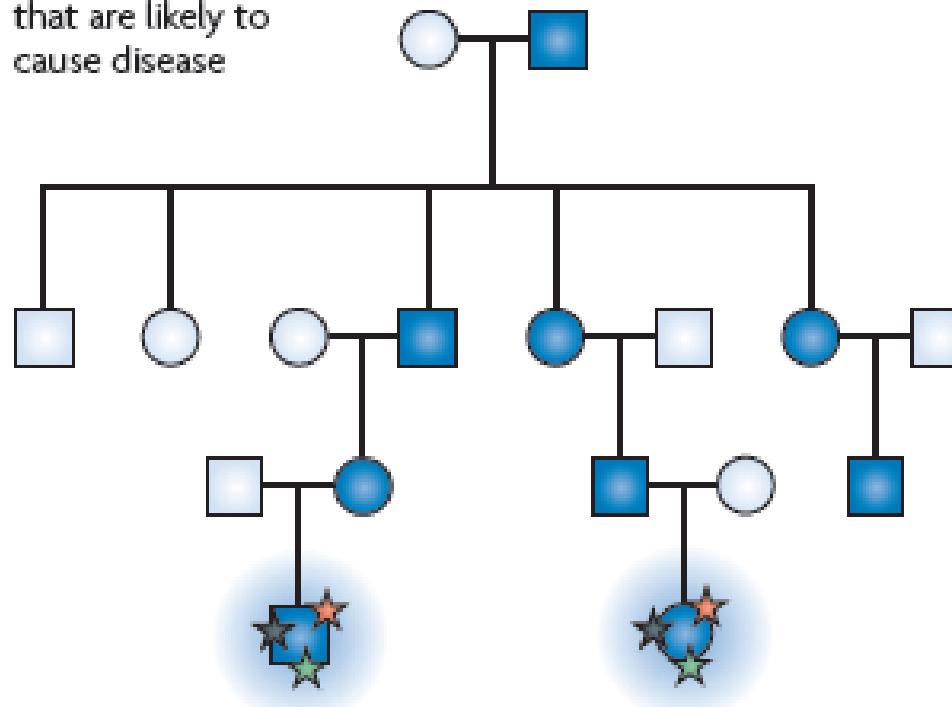




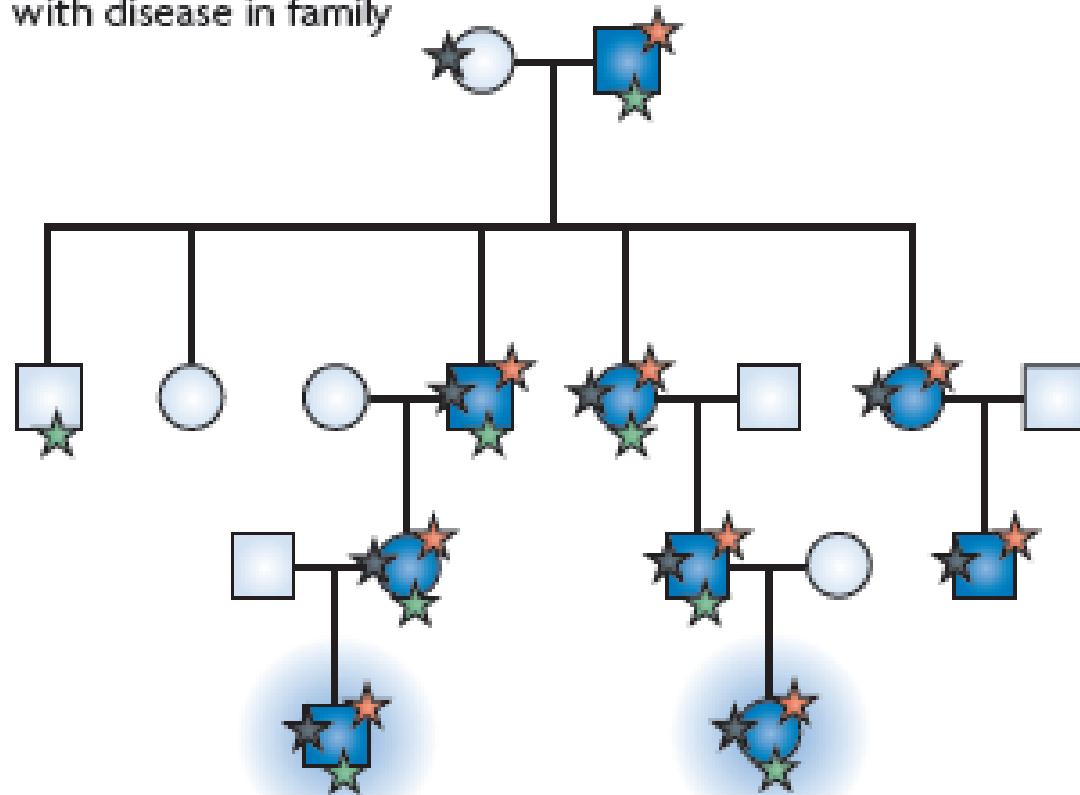
a Sequencing affected individuals in families

Sequencing affected relatives

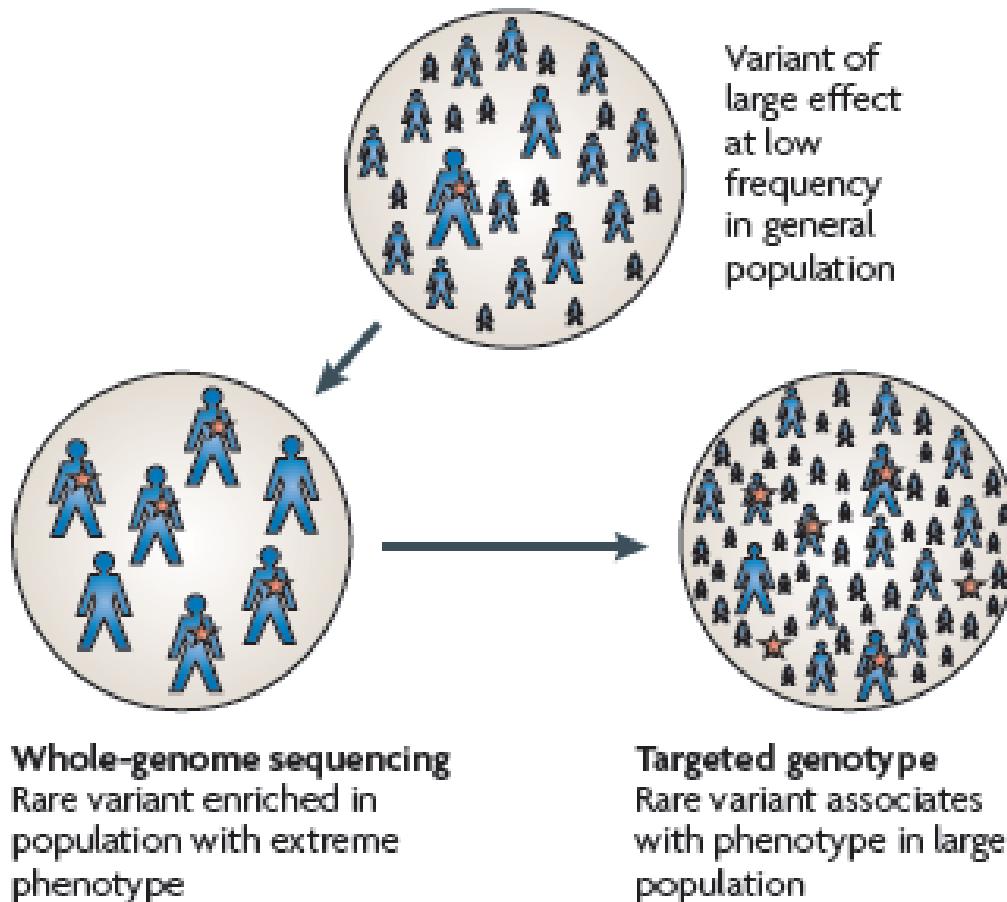
Identify shared variants
that are likely to
cause disease



Genotype candidate variants
Look for co-segregation
with disease in family



b Extreme-trait sequencing



Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk

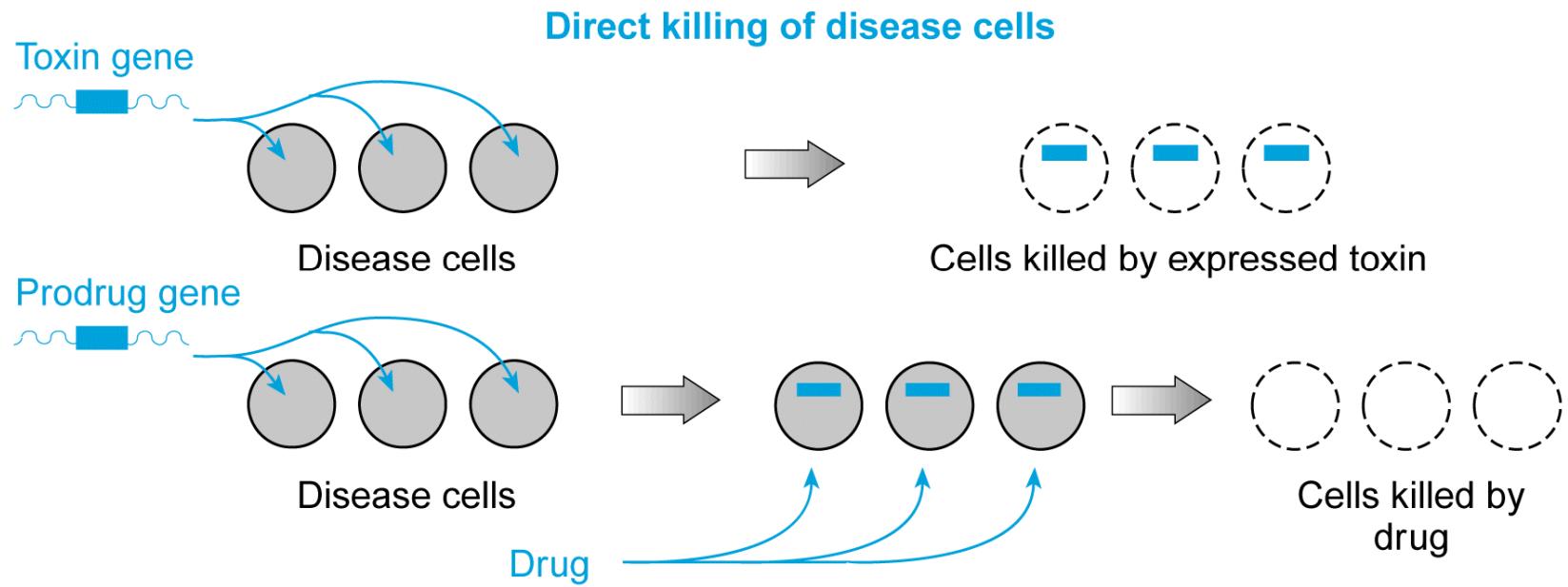
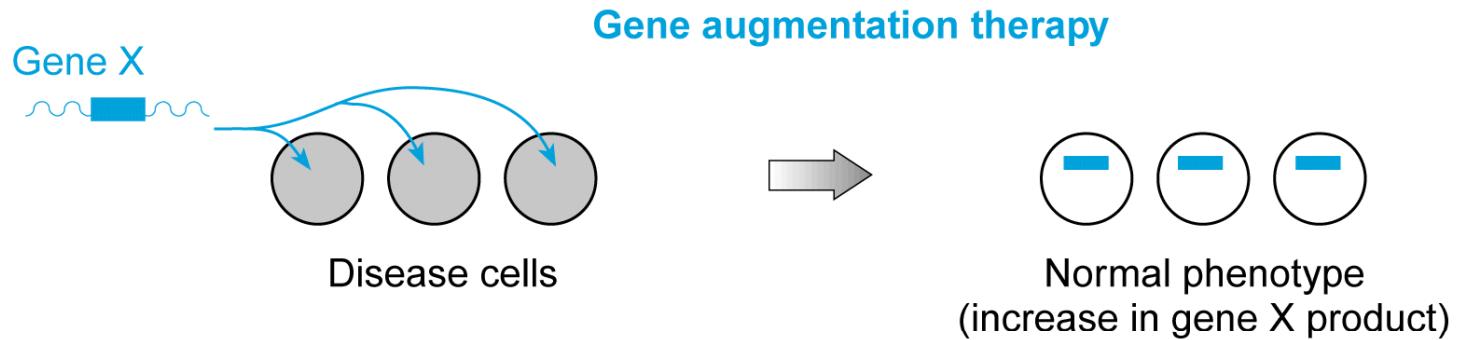
Breast cancer is the most common cancer among women. Common variants at 27 loci have been identified as associated with susceptibility to breast cancer, and these account for ~9% of the familial risk of the disease. We report here a meta-analysis of 9 genome-wide association studies, including 10,052 breast cancer cases and 12,575 controls of European ancestry, from which we selected 29,807 SNPs for further genotyping. These SNPs were genotyped in 45,290 cases and 41,880 controls of European ancestry from 41 studies in the Breast Cancer Association Consortium (BCAC). The SNPs were genotyped as part of a collaborative genotyping experiment involving four consortia (Collaborative Oncological Gene-environment Study, COGS) and used a custom Illumina iSelect genotyping array, iCOGS, comprising more than 200,000 SNPs. We identified SNPs at 41 new breast cancer susceptibility loci at genome-wide significance ($P < 5 \times 10^{-8}$). Further analyses suggest that more than 1,000 additional loci are involved in breast cancer susceptibility.

Table 2 Results for 41 SNPs for which association $P < 5 \times 10^{-8}$ in combined GWAS and iCOGS analysis

Lead SNP	Chr. ^a	Position ^b	Alleles ^c	MAF ^d	GWAS OR (95% CI) ^e	GWAS P^e	iCOGS OR (95% CI) ^f	iCOGS P^e	Combined GWAS and iCOGS P^e	Genes
rs616488	1	10488802	A/G	0.33	0.94 (0.90–0.98)	0.0017	0.94 (0.92–0.96)	3.0×10^{-8}	2.0×10^{-10}	<i>PEX14</i>
rs11552449	1	114249912	C/T	0.17	1.08 (1.02–1.14)	0.0042	1.07 (1.04–1.09)	1.1×10^{-6}	1.8×10^{-8}	<i>PTPN22-BCL2L15-AP4B1-DCLRE1B-HIPK1</i>
rs4849887	2	120961592	C/T	0.098	0.90 (0.84–0.96)	0.0017	0.91 (0.88–0.94)	5.6×10^{-9}	3.7×10^{-11}	None
rs2016394	2	172681217	G/A	0.48	0.95 (0.92–0.99)	0.014	0.95 (0.93–0.97)	2.7×10^{-7}	1.2×10^{-8}	<i>METAP1D-DLX1-DLX2</i>
rs1550623	2	173921140	A/G	0.16	0.91 (0.86–0.96)	0.00027	0.94 (0.92–0.97)	1.2×10^{-5}	3.0×10^{-8}	<i>CDCA7</i>
rs16857609	2	218004753	C/T	0.26	1.09 (1.05–1.14)	4.5×10^{-5}	1.08 (1.06–1.10)	4.4×10^{-12}	1.1×10^{-15}	<i>DIRC3</i>
rs6762644	3	4717276	A/G	0.40	1.06 (1.02–1.11)	0.0016	1.07 (1.04–1.09)	3.5×10^{-10}	2.2×10^{-12}	<i>ITPR1-EGOT</i>
rs12493607	3	30657943	G/C	0.35	1.04 (1.00–1.09)	0.049	1.06 (1.03–1.08)	1.4×10^{-7}	2.3×10^{-8}	<i>TGFBR2</i>
rs9790517	4	106304227	C/T	0.23	1.09 (1.04–1.14)	0.00027	1.05 (1.03–1.08)	1.6×10^{-5}	4.2×10^{-8}	<i>TET2</i>
rs6828523	4	176083001	C/A	0.13	0.89 (0.83–0.94)	0.00011	0.90 (0.87–0.92)	6.6×10^{-13}	3.5×10^{-16}	<i>ADAM29</i>
rs10472076	5	58219818	T/C	0.38	1.06 (1.02–1.11)	0.005	1.05 (1.03–1.07)	1.6×10^{-6}	2.9×10^{-8}	<i>RAB3C</i>
rs1353747	5	58373238	T/G	0.095	0.90 (0.84–0.96)	0.0020	0.92 (0.89–0.95)	2.7×10^{-6}	2.5×10^{-8}	<i>PDE4D</i>
rs1432679	5	158176661	T/C	0.43	1.06 (1.02–1.10)	0.0023	1.07 (1.05–1.09)	2.1×10^{-12}	2.0×10^{-14}	<i>EBF1</i>
rs11242675	6	1263878	T/C	0.39	0.97 (0.93–1.01)	0.12	0.94 (0.92–0.96)	1.2×10^{-8}	7.1×10^{-9}	<i>FOXQ1</i>
rs204247	6	13830502	A/G	0.43	1.06 (1.02–1.10)	0.0057	1.05 (1.03–1.07)	4.2×10^{-7}	8.3×10^{-9}	<i>RANBP9</i>
rs720475	7	143705862	G/A	0.25	0.93 (0.89–0.98)	0.0024	0.94 (0.92–0.96)	7.8×10^{-9}	7.0×10^{-11}	<i>ARHGEF5-NOBOX</i>
rs9693444	8	29565535	C/A	0.32	1.07 (1.03–1.12)	0.00086	1.07 (1.05–1.09)	2.6×10^{-11}	9.2×10^{-14}	None
rs6472903	8	76392856	T/G	0.18	0.88 (0.84–0.93)	2.0×10^{-6}	0.91 (0.89–0.93)	8.4×10^{-13}	1.7×10^{-17}	None
rs2943559	8	76580492	A/G	0.07	1.17 (1.09–1.26)	1.2×10^{-5}	1.13 (1.09–1.17)	6.0×10^{-11}	5.7×10^{-15}	<i>HNF4G</i>
rs11780156	8	129263823	C/T	0.16	1.13 (1.07–1.19)	2.2×10^{-6}	1.07 (1.04–1.10)	5.0×10^{-7}	3.4×10^{-11}	<i>MIR1208</i>
rs10759243	9	109345936	C/A	0.39	1.07 (1.02–1.12)	0.0084	1.06 (1.03–1.08)	4.0×10^{-7}	1.2×10^{-8}	None
rs7072776	10	22072948	G/A	0.29	1.11 (1.07–1.16)	1.3×10^{-6}	1.07 (1.05–1.09)	1.6×10^{-9}	4.3×10^{-14}	<i>MLLT10-DNAJC1</i>
rs11814448	10	22355849	A/C	0.020	1.35 (1.17–1.56)	3.7×10^{-5}	1.26 (1.18–1.35)	3.6×10^{-12}	9.3×10^{-16}	<i>DNAJC1</i>
rs7904519	10	114763917	A/G	0.46	1.06 (1.02–1.10)	0.0059	1.06 (1.04–1.08)	1.5×10^{-8}	3.1×10^{-8}	<i>TCF7L2</i>
rs11199914	10	123083891	C/T	0.32	0.94 (0.89–0.98)	0.0030	0.95 (0.93–0.97)	1.5×10^{-6}	1.9×10^{-8}	None
rs3903072	11	65339642	G/T	0.47	0.92 (0.89–0.96)	5.1×10^{-5}	0.95 (0.93–0.96)	2.0×10^{-8}	8.6×10^{-12}	<i>DKFZp761E198-OVOL1-SNX32-CFL1-MUS81</i>
rs11820646	11	128966381	C/T	0.41	0.93 (0.90–0.97)	0.00068	0.95 (0.93–0.97)	3.2×10^{-7}	1.1×10^{-9}	None
rs12422552	12	14305198	G/C	0.26	1.11 (1.05–1.16)	4.2×10^{-5}	1.05 (1.03–1.07)	2.9×10^{-5}	3.7×10^{-8}	None
rs17356907	12	94551890	A/G	0.30	0.89 (0.85–0.93)	1.7×10^{-6}	0.91 (0.89–0.93)	1.4×10^{-17}	1.8×10^{-22}	<i>NTN4</i>
rs11571833	13	31870626	A/T	0.008	1.39 (1.13–1.71)	0.0016	1.26 (1.14–1.39)	5.7×10^{-6}	4.9×10^{-8}	<i>BRCA2-N4BP2L1-N4BP2L2</i>
rs2236007	14	36202520	G/A	0.21	0.88 (0.83–0.93)	2.0×10^{-5}	0.93 (0.91–0.95)	4.4×10^{-10}	1.7×10^{-13}	<i>PAX9-SLC25A21</i>
rs2588809	14	67730181	C/T	0.16	1.07 (1.01–1.13)	0.017	1.08 (1.05–1.11)	2.3×10^{-9}	1.4×10^{-10}	<i>RAD51L1</i>
rs941764	14	90910822	A/G	0.34	1.05 (1.00–1.09)	0.043	1.06 (1.04–1.09)	2.3×10^{-9}	3.7×10^{-10}	<i>CCDC88C</i>
rs17817449	16	52370868	T/G	0.40	0.95 (0.91–0.99)	0.010	0.93 (0.91–0.95)	1.3×10^{-12}	6.4×10^{-14}	<i>MIR1972-2-FTO</i>
rs13329835	16	79208306	A/G	0.22	1.14 (1.09–1.19)	9.2×10^{-8}	1.08 (1.05–1.10)	5.8×10^{-11}	2.1×10^{-16}	<i>CDYL2</i>
rs527616	18	22591422	G/C	0.38	0.91 (0.87–0.95)	3.0×10^{-5}	0.95 (0.93–0.97)	3.1×10^{-7}	1.6×10^{-10}	None
rs1436904	18	22824665	T/G	0.4	0.93 (0.9–0.97)	0.0008	0.96 (0.94–0.98)	6.9×10^{-6}	3.2×10^{-8}	<i>CHST9</i>
rs4808801	19	18432141	A/G	0.35	0.94 (0.90–0.98)	0.0027	0.93 (0.91–0.95)	3.9×10^{-13}	4.6×10^{-15}	<i>SSBP4-ISYNA1-ELL</i>

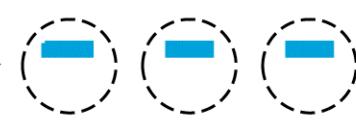
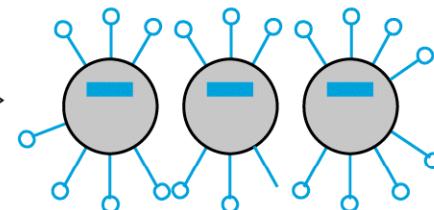
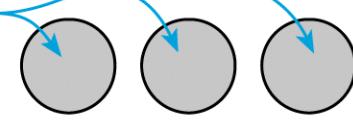
Concetti generali di terapia genica

- Inibizione mirata dell'espressione genica per bloccare un processo patologico
- Distruzione mirata geneticamente di specifiche cellule
- Supplementazione: fornire una copia funzionante del gene difettoso
- Sostituzione: sostituire il gene mutante con una copia funzionante in situ

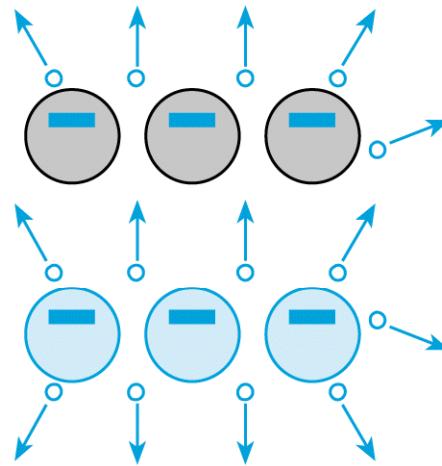


Assisted killing of disease cells by immune system cells

Foreign antigen gene



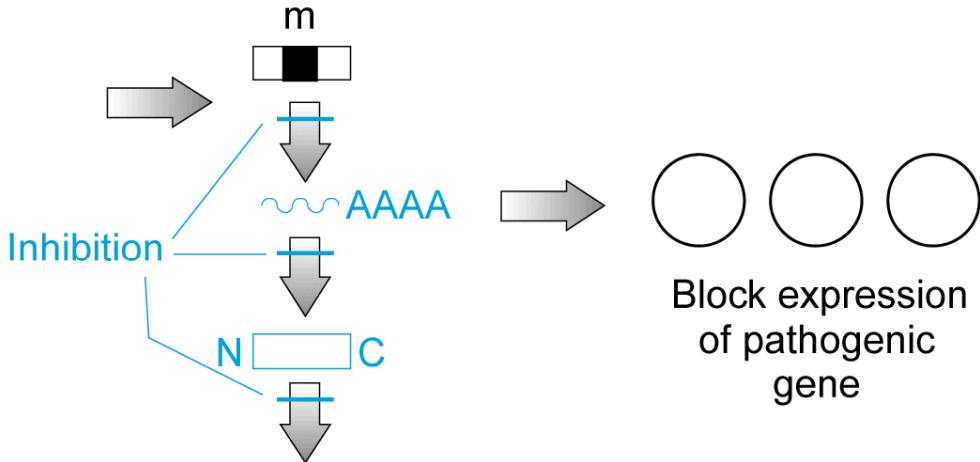
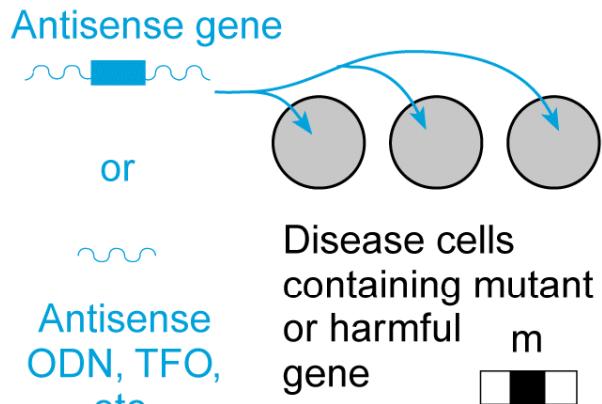
Cytokine gene



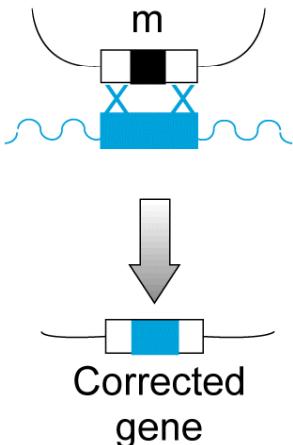
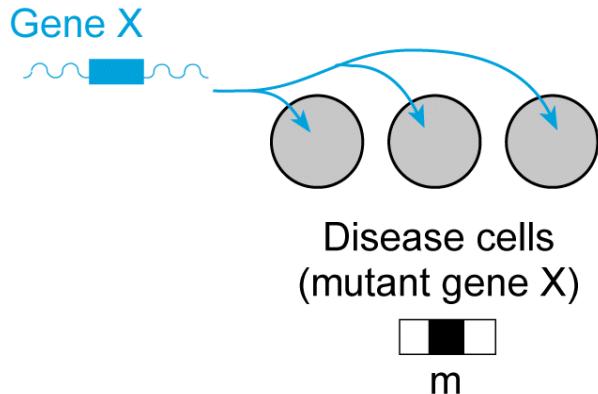
Disease cells
or
Nondisease cells, especially
immune system cells

Killing of disease cells because of enhanced immune response

Targeted inhibition of gene expression



Targeted gene mutation correction

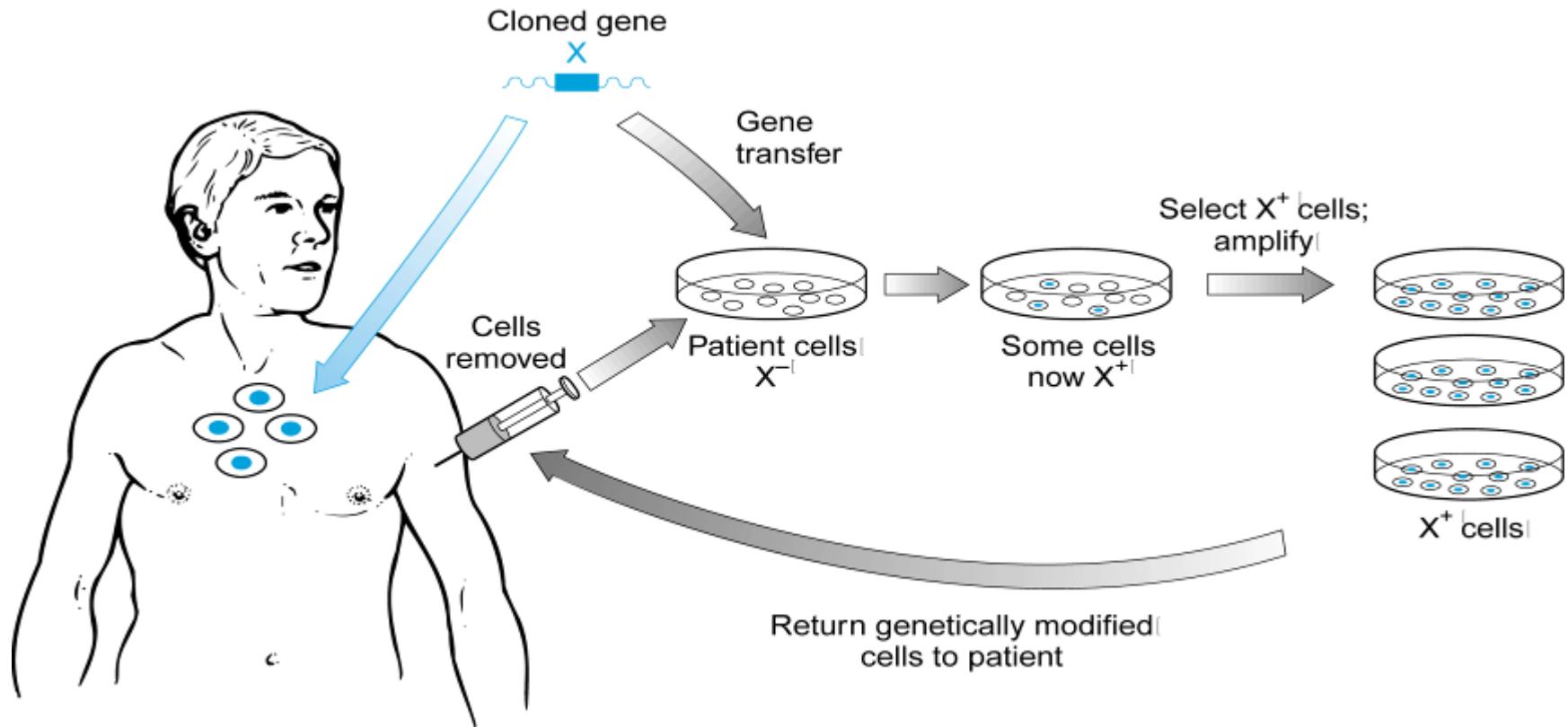


Normal phenotype
(genetic mutation
corrected to restore
functional gene)

Supplementazione: fornire una copia funzionante del gene difettoso

- **ex vivo**: trasferire i geni clonati in cellule in coltura, selezionare le cellule, espanderle in vitro e poi immetterle nel paziente
- **in vivo**: trasferire direttamente i geni nel tessuto bersaglio o in circolo, facendo in modo che poi arrivi al tessuto bersaglio

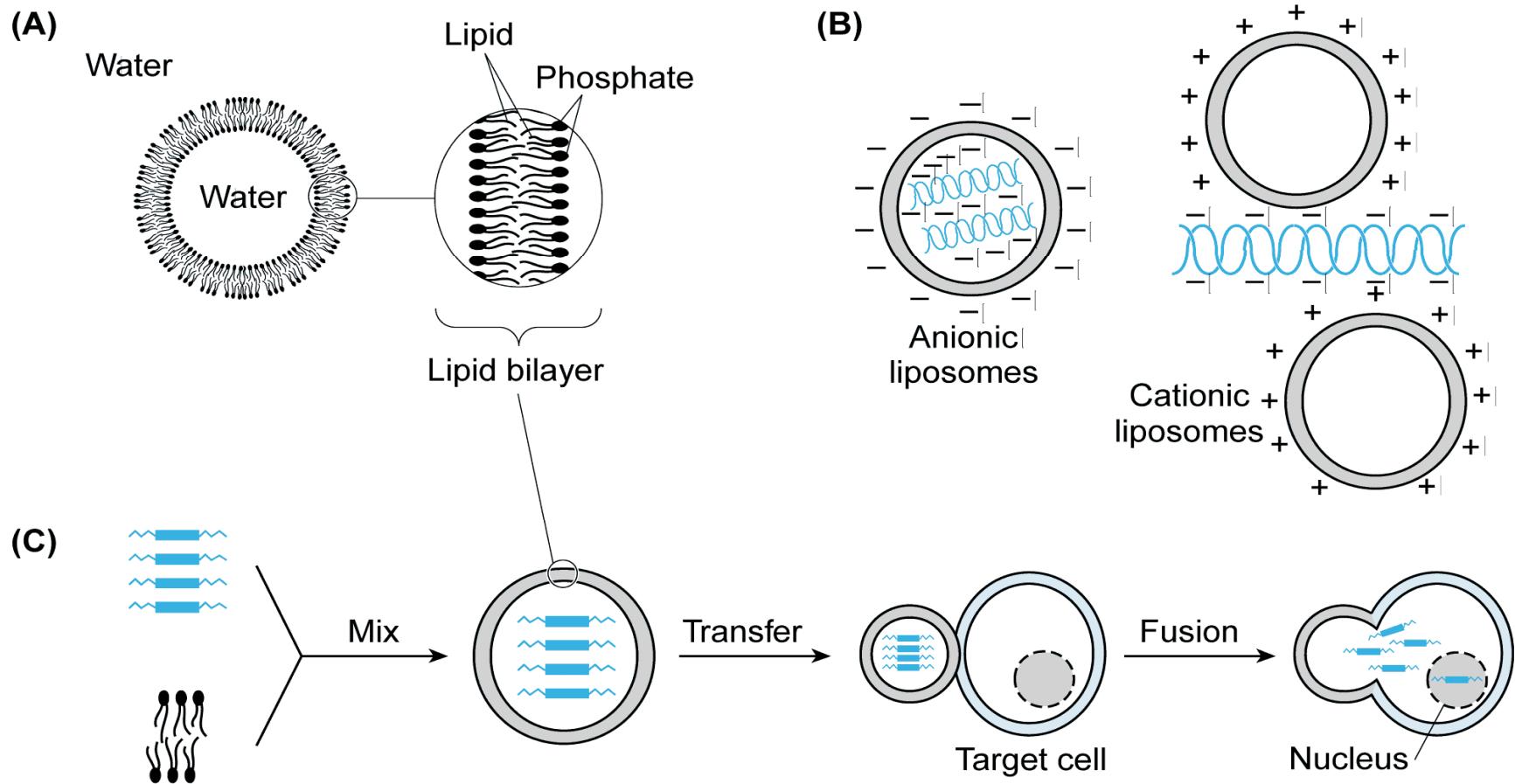
ex vivo



Vettori non virali per la terapia genica

- Liposomi: vescicole sintetiche che si formano quando alcuni lipidi sono in soluzione acquosa. Possono essere anionici e circondano il DNA o cationici e legano il DNA all'esterno
- iniezione diretta di plasmidi o bombardamento del tessuto del DNA attaccato a pellets di metallo (biolistico). Il trasferimento è molto basso e il DNA non è integrato.

Liposomi



Virus per la terapia genica

- **Retrovirus:** sono ad RNA e sintetizzano cDNA che integrano casualmente nel genoma dell'ospite quando si dissolve la membrana nucleare (divisione cellulare)
- **Adenovirus:** sono a DNA e capaci di trasdurre ad alti titoli tutte le cellule, ma in forma episomale. E' molto forte la reazione immunitaria. Morte di Jesse Gelsinger nel 1999
- **Adeno-associati (AAV)** hanno DNA a singola elica e si potrebbero integrare sul cromosoma 19q13 grazie al gene rep. Ma il 96% del genoma è deleteo. Possono ospitare fino a 4.5kb
- **Lentivirus:** sono retrovirus specializzati che infettano anche le cellule non in divisione. Sono più complessi dei retrovirus e sono capaci di un'espressione a lungo termine.

Vettori virali per la terapia genica

	Genoma	Stato	Capacità	Target
AAV	Dna	Integrato Episomal	4.7 kb	D/ND
Adeno	Dna	Episomal	< 36 kb	D/ND
Retro	Rna	Integrato	8 kb	D
Lenti	Rna	Integrato	8 kb	D/ND
HSV	Dna	Episomal	>50kb	D/ND

Virus Adeno-associato

Famiglia: Parvoviride

Genere : Dependovirus

Genoma : DNAss 4.7kb

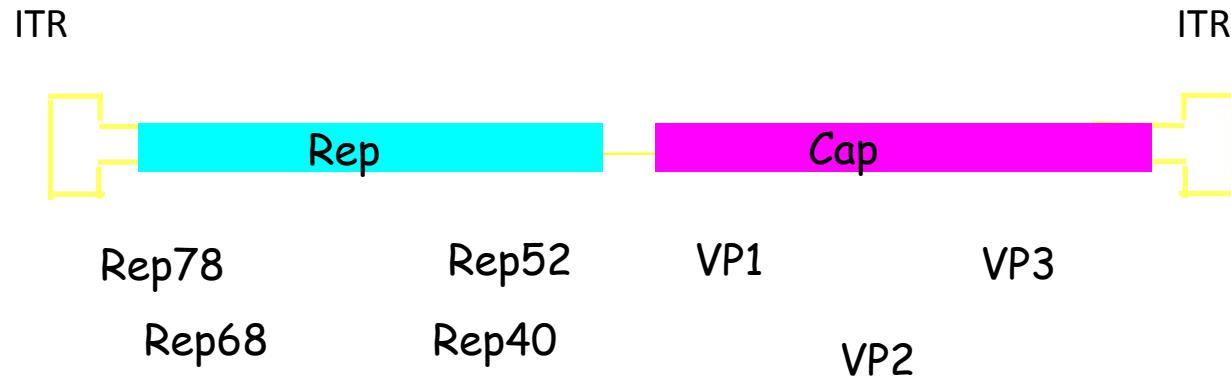
Bersaglio: Cellule in divisione e cellule non in divisione

Stato : episomale/integrazione sito specifica su 19q13.3

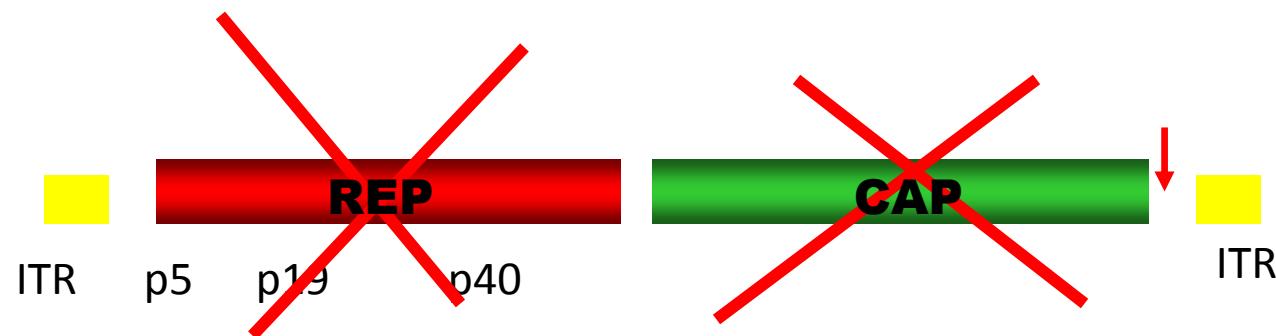
Sierotipi : 10 AAV1-10



AAV2



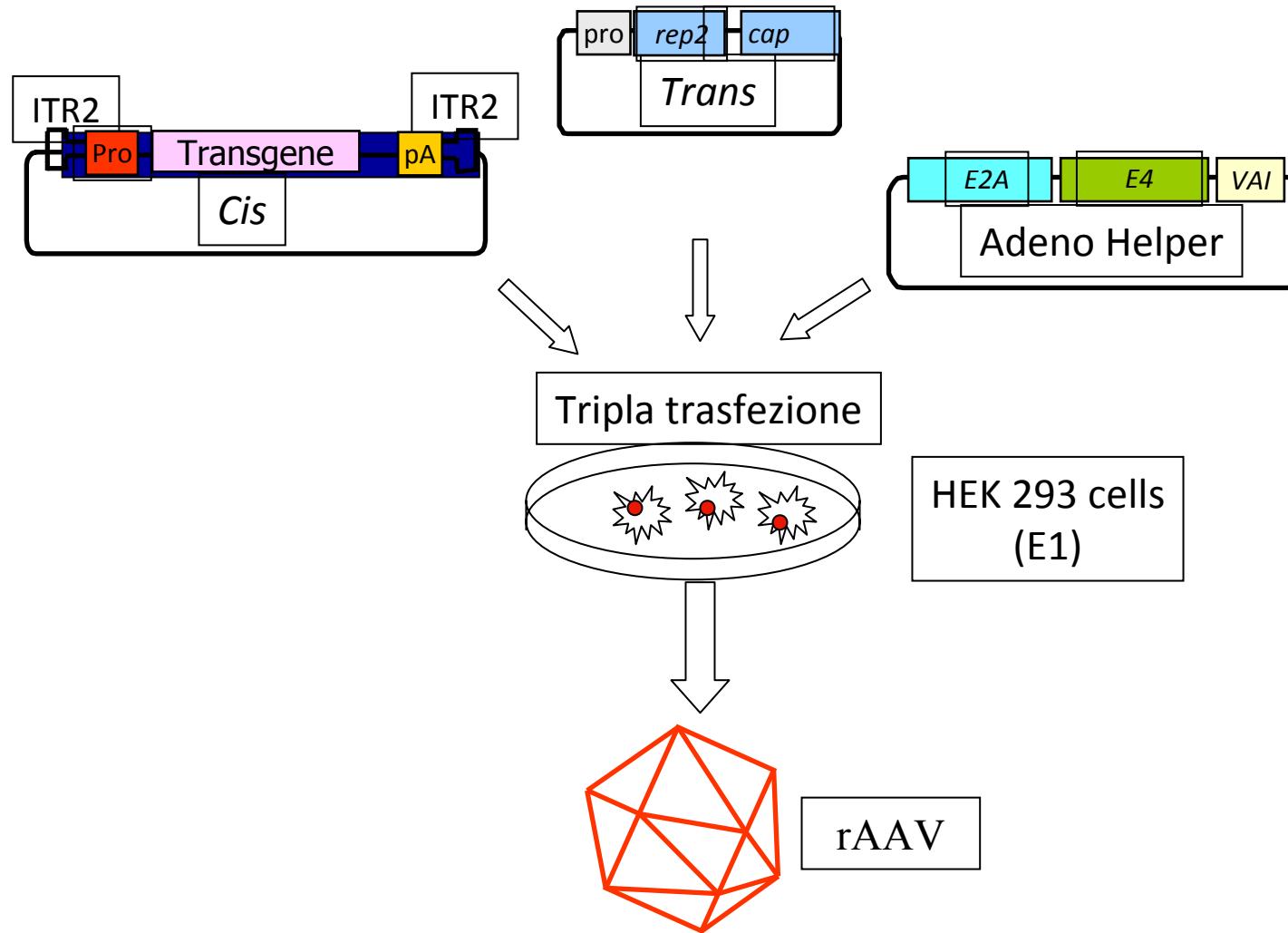
AAV RICOMBINANTI



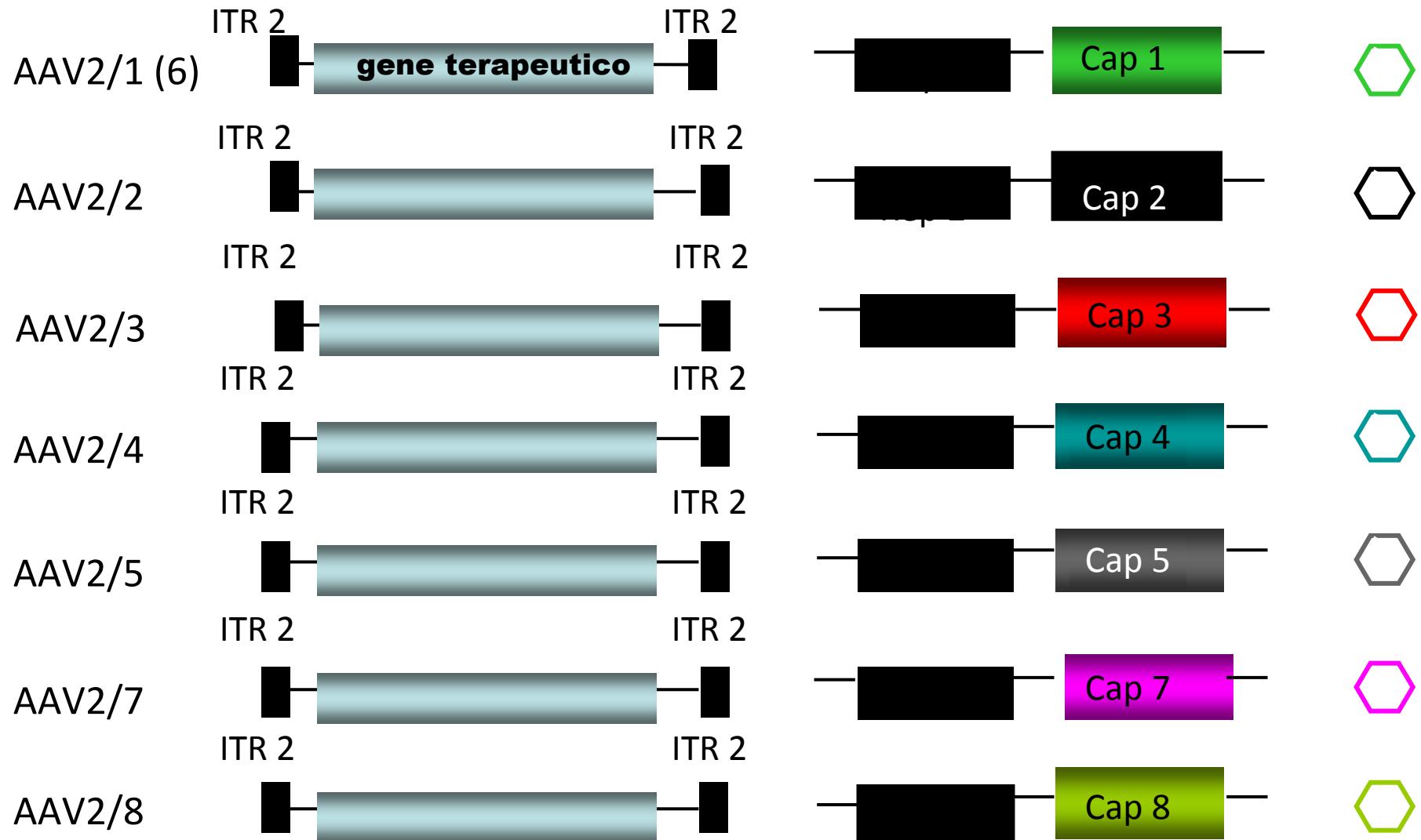
Plasmide Cis



Produzione di vettori rAAV



rAAV Pseudotipizzati

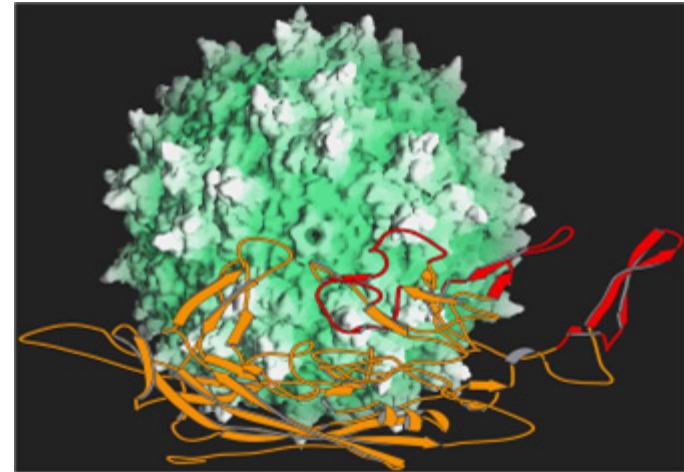




DIFFERENZE TRA SIEROTIPI AAV 1-8

PROTEINE CAPSIDE

- ANTIGENICITA'
- TROPISMO
- **AAV1** Muscolo,retina
- **AAV2** Muscolo,fegato
- **AAV4** Cervello
- **AAV5** Cervello,polm.
- **AAV6** Muscolo,retina
- **AAV7** Muscolo,fegato
- **AAV8** Fegato



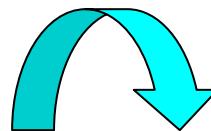
- RECETTORI
- **AAV2** FGFR1,EPARINA
- **AAV4**
- Ac.SIALICO
- **AAV5**
- PDGFR, Ac.SIALICO

Vantaggi

- Non patogeni
 - Espressione genica efficiente e a lungo termine
- Pochi effetti immunologici
 - Ampia varietà di cellule ospiti
- Infezione di cellule in divisione e non in divisione

Svantaggi

- Dimensioni dell'inserto non superiori alle 4.5kb
- Produzione di anticorpi anti-AAV



No risomministrazione del vettore virale