

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, nonsense, nonstop**
- **Inserzioni, delezioni con frame-shift e non, duplicazioni, conversione genica**
- **Significato patologico delle varie classi di variazioni del DNA: alleli equivalente, amorfo, ipomorfo, ipermorfo, neomorfo e antimorfo**
- **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 monoallelische con mutazioni *de novo* (craniosonostosi, acondroplasia)
- Malattie mendeliane monoallelische a trasmissione autosomica dominante (neurofibromatosi, s. di Marfan, rene policistico, osteogenesi imperfetta)
- Malattie mendeliane monoallelische 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)

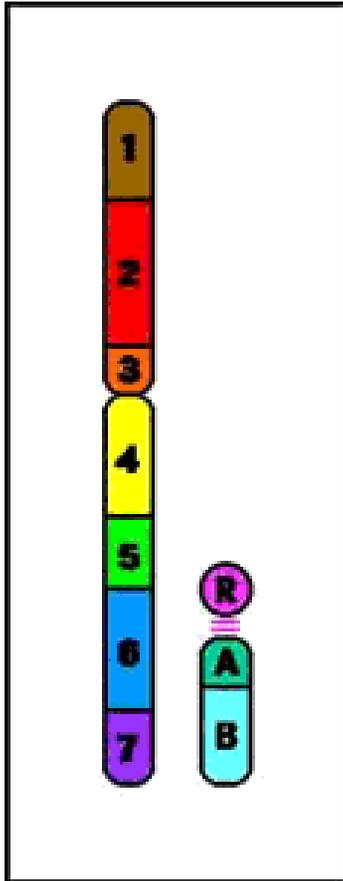
Programma, parte 4, eccezioni all'eredità mendeliana

- 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)

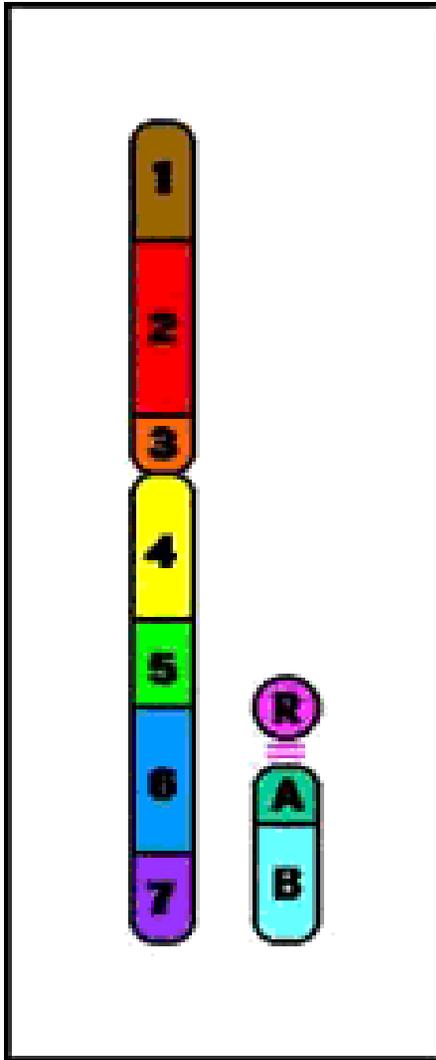
portatori di un rischio riproduttivo indipendente dal partner



traslocazione reciproca

- portatori di una traslocazione cromosomica bilanciata (reciproca)
- scambio di materiale genetico tra cromosomi non omologhi
- frequenza 1/520 nati
- in genere è fenotipicamente normale
- Nell'1% dei casi vi è un fenotipo clinico

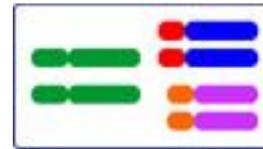
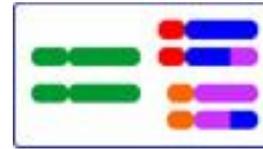
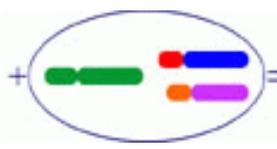
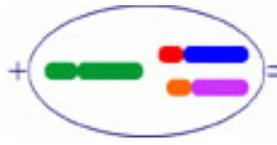
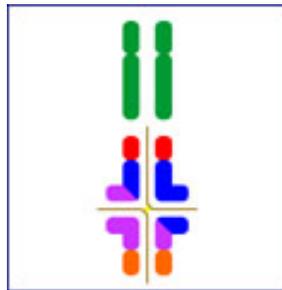
traslocazioni reciproche (t) (rcp)



- nessuna macroregione cromosomica è apparentemente assente, ma solo trasferita su un altro cromosoma
- può essere interrotta la sequenza di un gene o di due geni (in eterozigosi)
- è critico valutare i punti di rottura specie nelle traslocazioni *de novo*
- le delezioni possono essere apprezzate mediante array CGH
- si può produrre un gene di fusione tra due geni altrimenti separati, un evento che è comune nelle cellule maligne
- il problema maggiore è il rischio riproduttivo

traslocazioni bilanciate (meiosi e fertilizzazione)

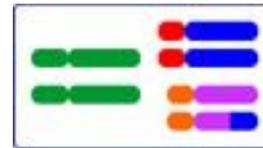
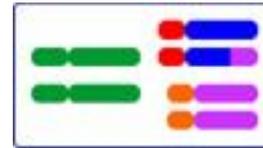
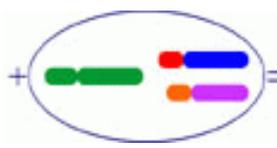
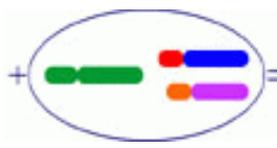
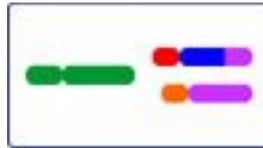
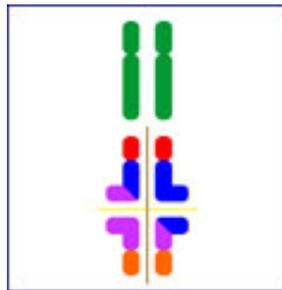
Segregazione
alternata



Traslocazione
bilanciata

Normale

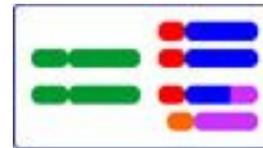
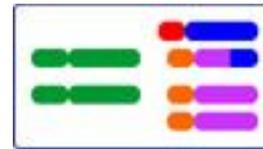
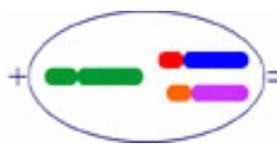
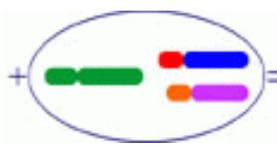
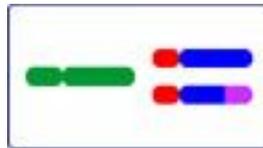
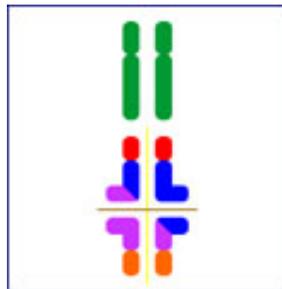
Segregazione
adiacente 1



Traslocazione

Traslocazione

Segregazione
adiacente 2



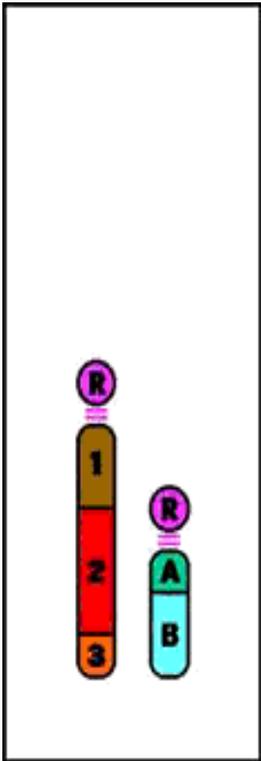
Trisomia

Trisomia

La formazione di tetravalenti aiuta a capire:

con la segregazione alternata si formano gameti normali o con traslocazione bilanciata, mentre le segr. adiacenti 1 e 2 portano alla traslocazione sbilanciata o alla trisomia

traslocazioni robertsoniane (rob)



rob

- coinvolgono i cromosomi acrocentrici 13, 14, 15, 21 e 22
- nessuna regione cromosomica è assente, perché questi contengono un braccio corto privo di geni che può risultare perduto con la fusione dei bracci q di due cromosomi acrocentrici
- La più frequente traslocazione Robertsoniana è la rob(13q14q) che rappresenta il 75% di tutte le rob
- segue poi la rob(14q21q) e la rob(21q21q)
- si formano in genere durante la meiosi femminile e comportano infertilità maschile o abortività ripetuta.

Percentuale alla nascita di figli con cariotipo sbilanciato da genitori con traslocazione robertsoniana

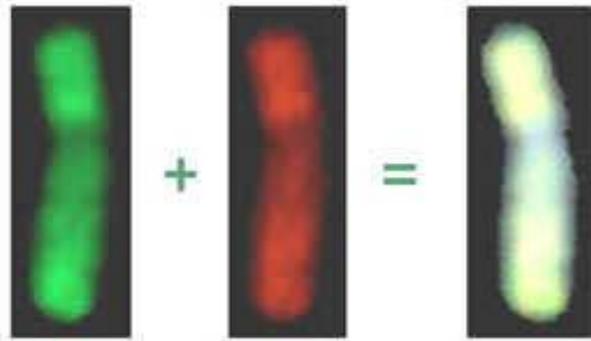
- $t(13;14)$ M=F 1%
- $t(14;21)$ F 15% M 2%
- $t(21;22)$ F 10% M 5%
- $t(21;21)$ M=F 100%

Traslocazione sbilanciata

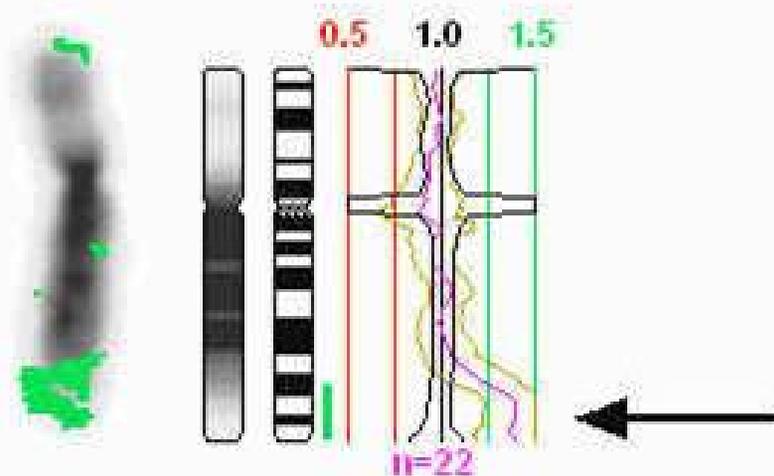
- maggiori sono le dimensioni cromosomiche, minore è la possibilità di una gravidanza a termine
- minori sono le dimensioni, maggiore è il rischio di un feto malformato
- Sesso del genitore donna > uomo (gli spermatozoi hanno il 7.5% di difetti contro l'1% degli oociti, ma sono selezionati)
- Il rischio aumenta se il difetto è stato accertato a partire da un figlio precedente con cariotipo sbilanciato

rischio di cariotipo sbilanciato

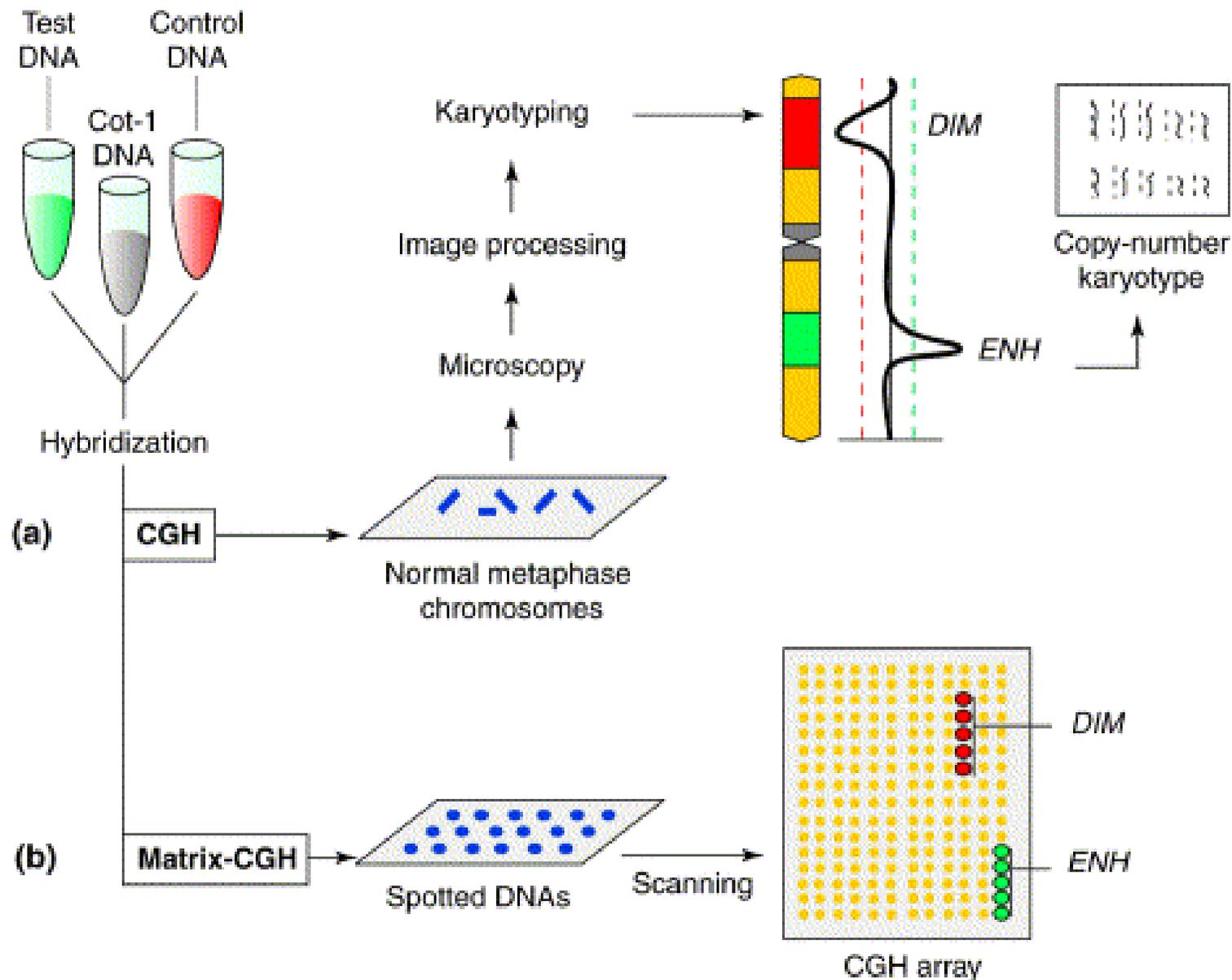
- Se non vi sono stati casi in famiglia e la madre è eterozigote per una traslocazione reciproca il rischio è il 7%
- Se non vi sono stati casi in famiglia e il padre è eterozigote per una traslocazione reciproca il rischio è il 3%
- Se vi sono stati casi di traslocazioni sbilanciate in famiglia e la madre è eterozigote il rischio è il 14%
- Se vi sono stati casi di traslocazioni sbilanciate in famiglia e il padre è eterozigote il rischio è l'8%



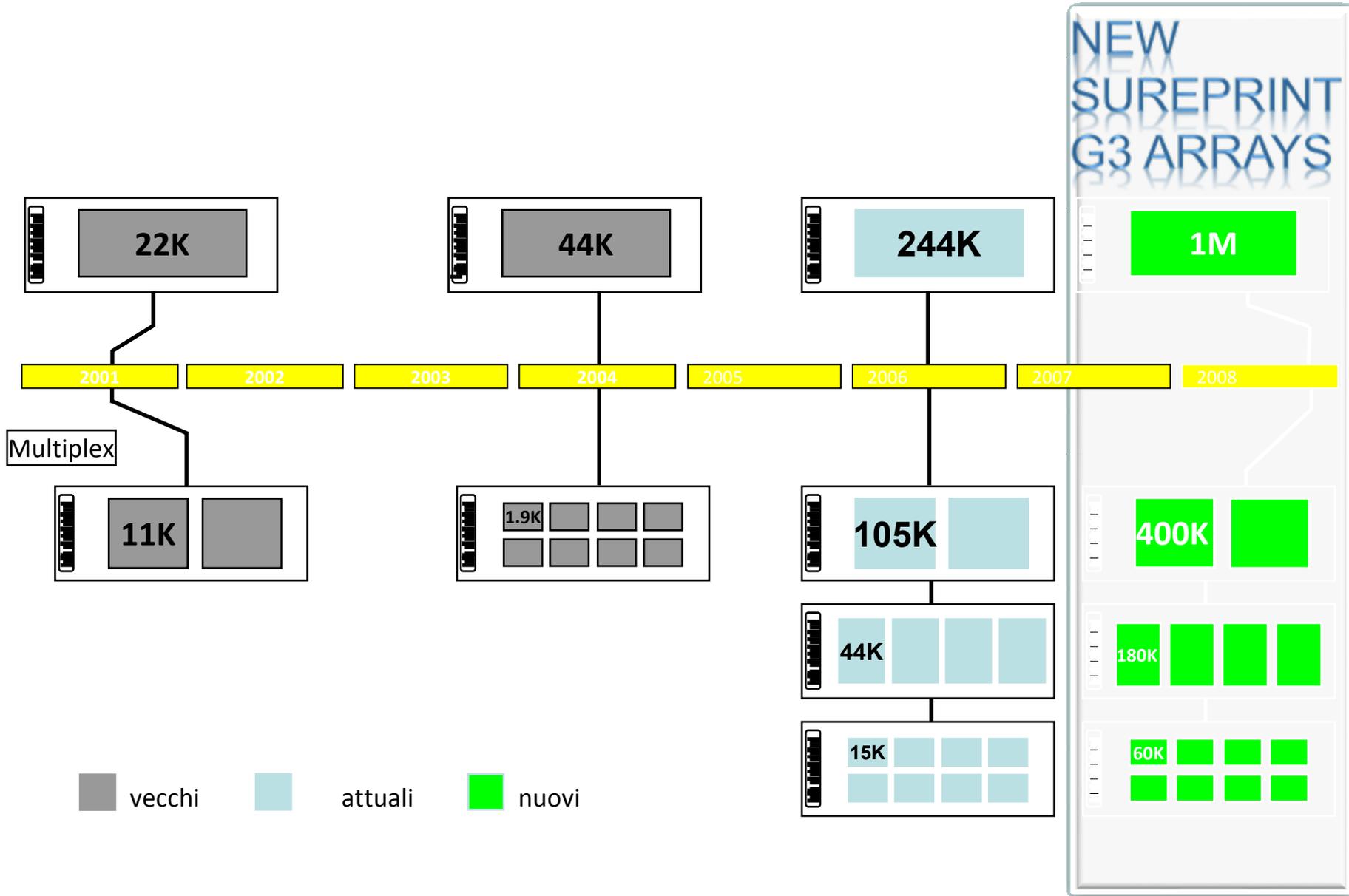
La tecnica del CGH (comparative genomic hybridization) permette l'individuazione di sequenze delete o duplicate nel genoma da testare (red) mediante il confronto con un genoma di riferimento (green).



Sono preparate due sonde fluorescenti di colore diverso che ibridano contemporaneamente sui cromosomi. Se in una regione cromosomica prevale il colore (green) relativo al genoma di controllo questo significa che il genoma da testare (red) ha una delezione in quella regione



Formati dei Microarray Agilent

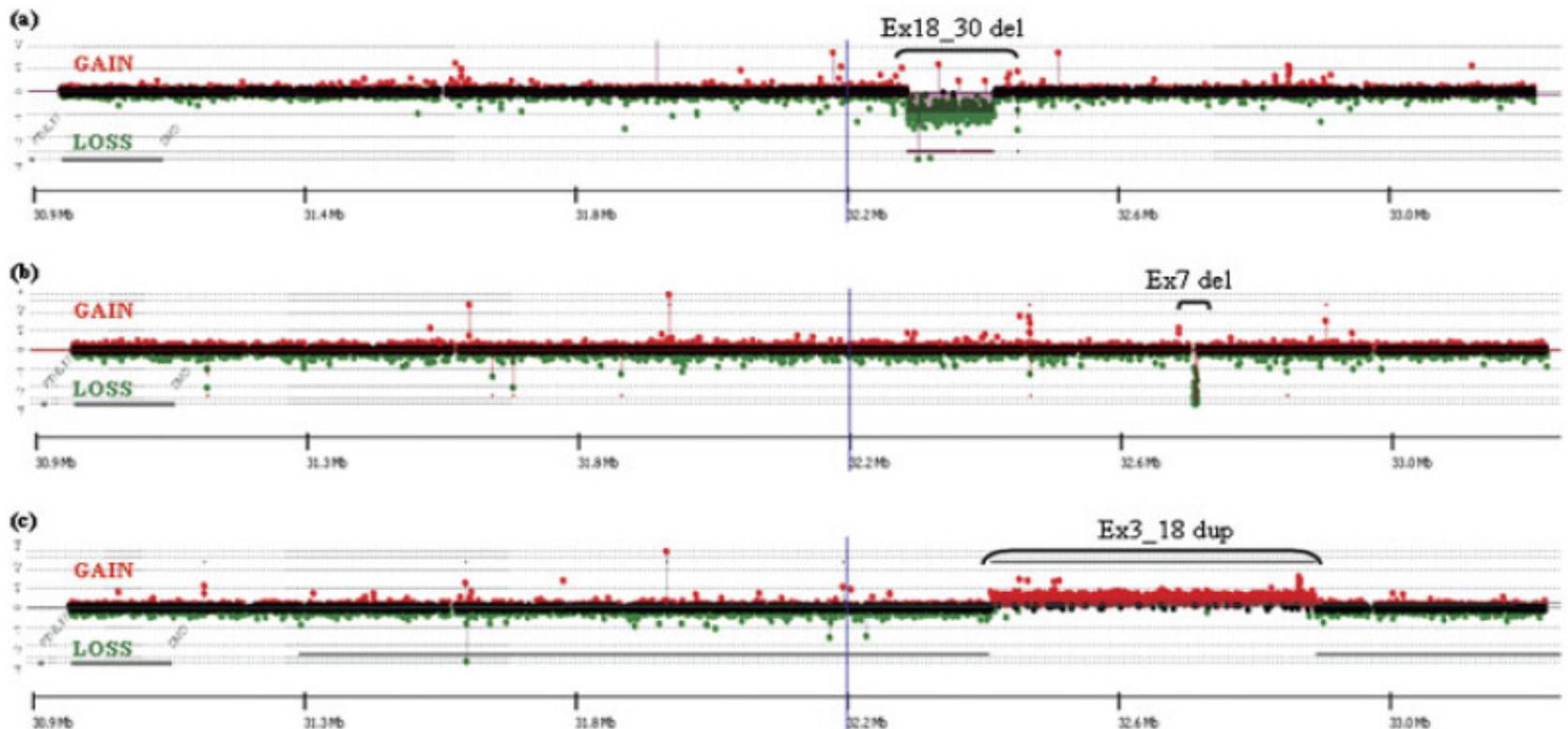


44,000-oligonucleotide with 8,769 interrogating probes (60-mer oligonucleotides) Agilent Technologies

average spacing of probes across the DMD coding region of at least one every 144 base pairs

digestion with AluI and Rsa I and labeling

Agilent CGH-Analytics V3.4s software

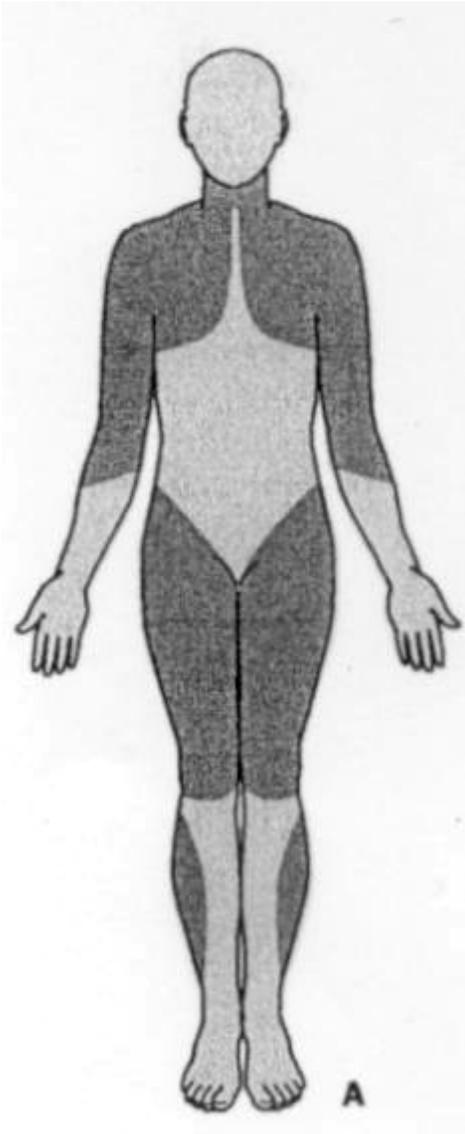
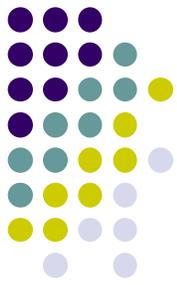


F

F

- Le inversioni sono rare (meno di 1 caso su 1000) e a volte difficili da mettere in evidenza
- Possono essere semplici quando comprendono due punti di rottura su di un singolo cromosoma
- Sono pericentriche quando il segmento invertito contiene il centromero (es: 46, XX inv(3)p25q21)
- Le inversioni pericentriche dei cromosomi 1, 9, 16 e Y sono eteromorfismi citogenetici di normale riscontro in soggetti sani
- Le inversioni sono dette paracentriche se confinate ad uno dei due bracci (es: 46,XX. Inv(11)q21q23)
- L'eterozigote per un'inversione è un soggetto normale.

X-linked disorders



- **DMD Duchenne Muscular Dystrophy**

- 1/3,500 boys

- Onset -- Early childhood - about 2 to 6 years

- **Laboratory -- CK (50x to 1.000x), LDH5, ALT, AST, aldolase increase**

- Symptoms -- Generalized weakness and muscle wasting affecting proximal limb muscles first. Calves often enlarged. Heart involvement

- Progression -- Disease progresses slowly but will affect all voluntary muscles. Survival possible beyond late twenties

- **BMD Becker Muscular Dystrophy**

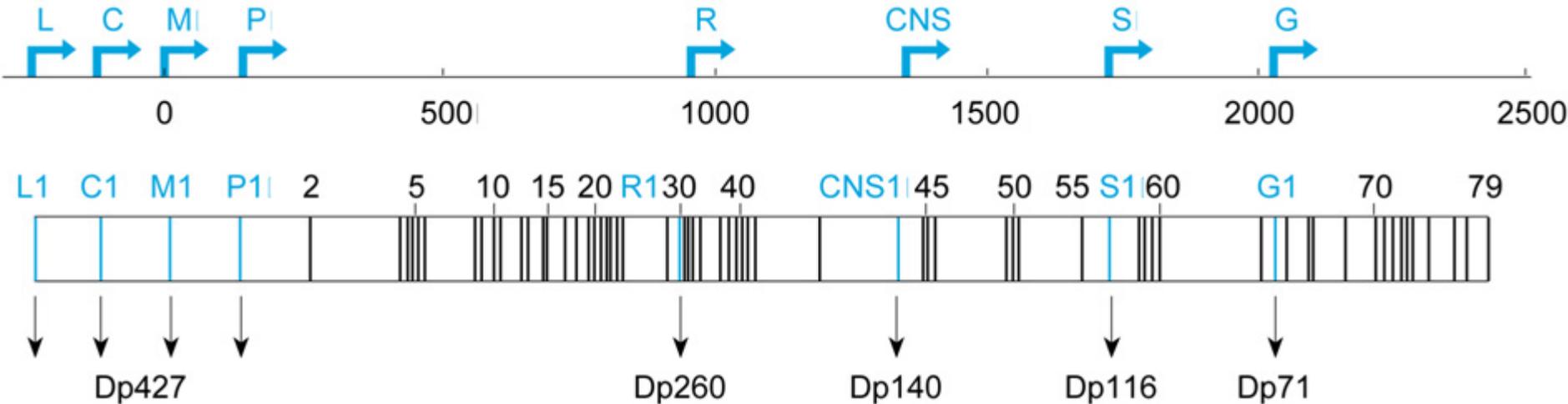
- 1/10,000 boys

- Onset -- Adolescence or adulthood

- Symptoms -- Almost identical to Duchenne but often much less severe. Heart involvement

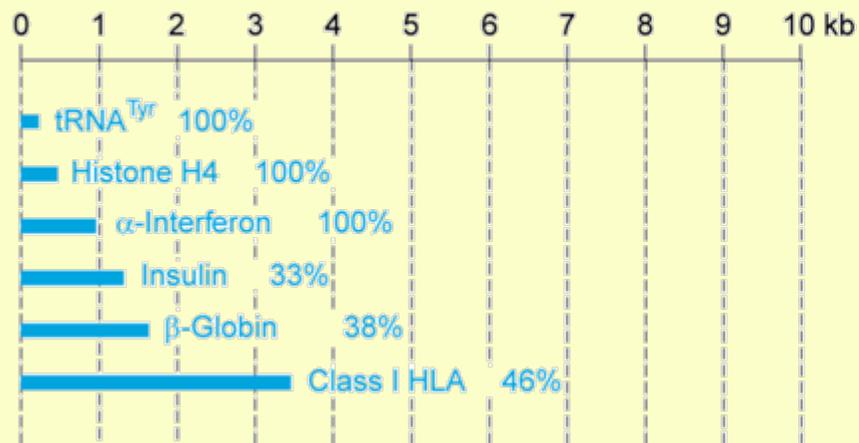
- Progression -- Slower and more variable than DMD with survival well into mid to late adulthood

At least eight promoters are used to generate cell-specific expression of the dystrophin gene

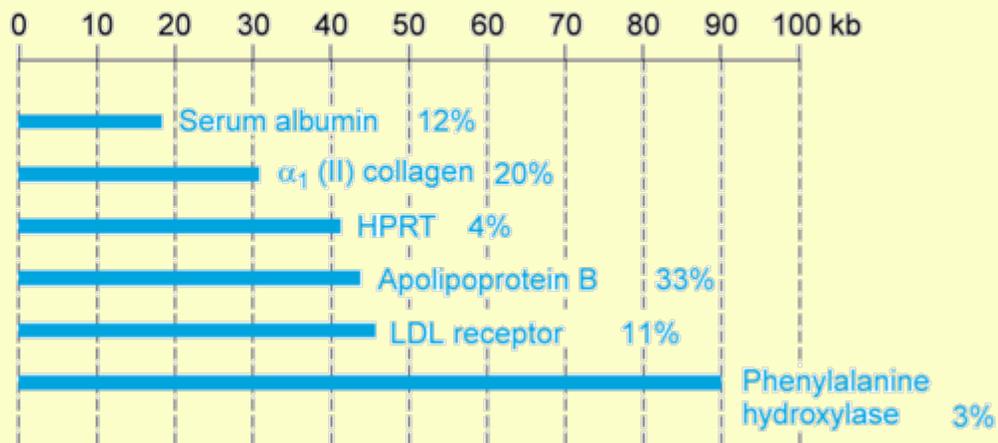


- L = lymphocyte
- C = cortical
- M = muscle
- P = Purkinje
- R = retinal
- CNS = central nervous system
- S = Schwann
- G = general

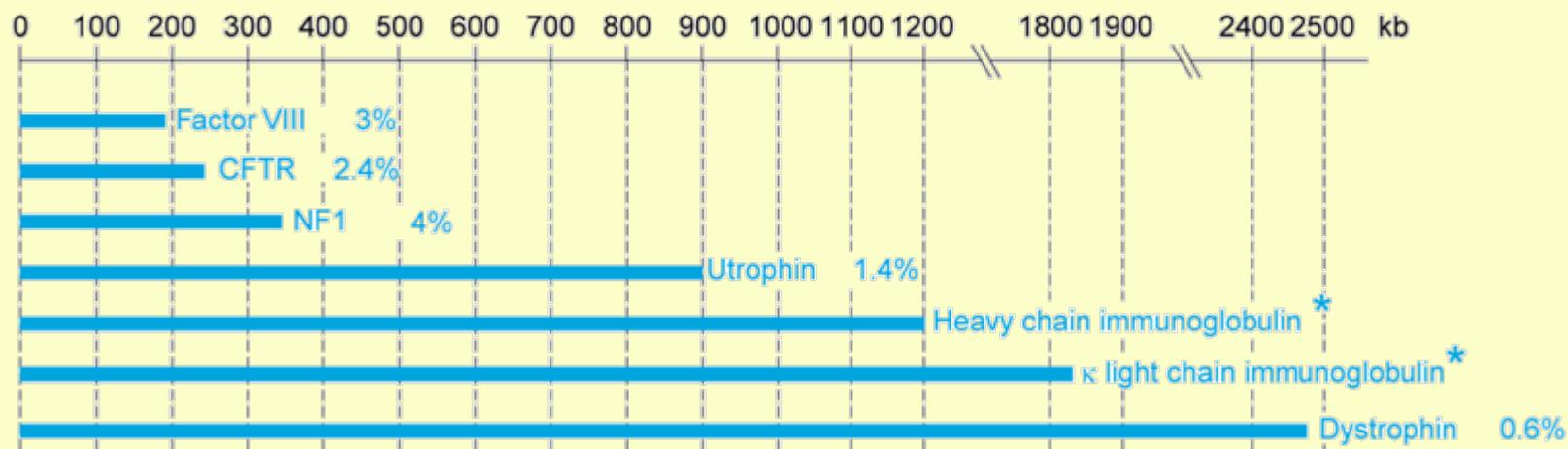
(A) Less than 10 kb



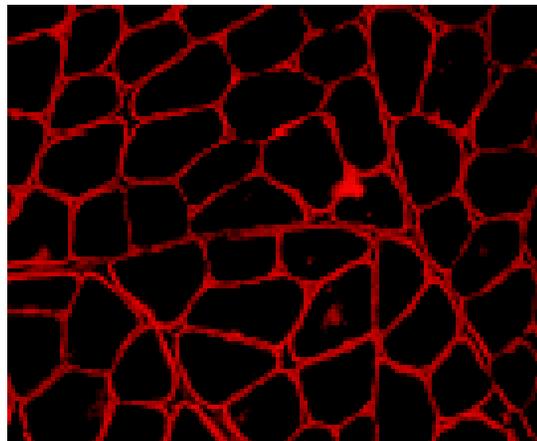
(B) Less than 100 kb



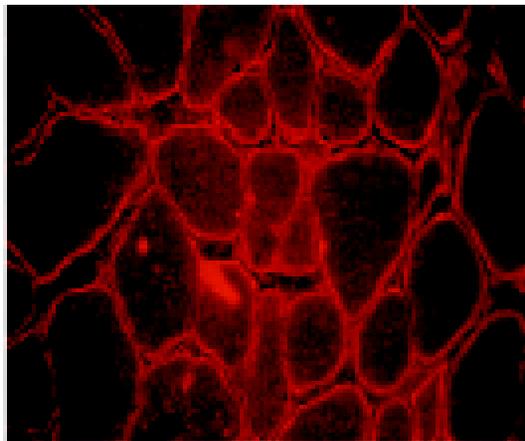
(C) More than 100 kb



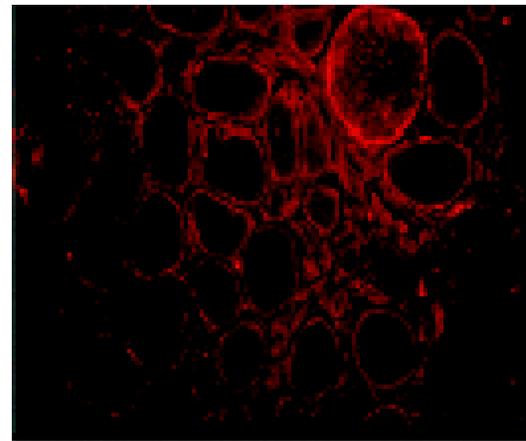
Normal



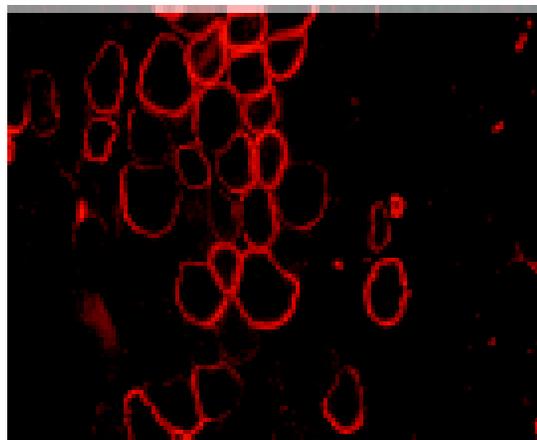
Mild BMD



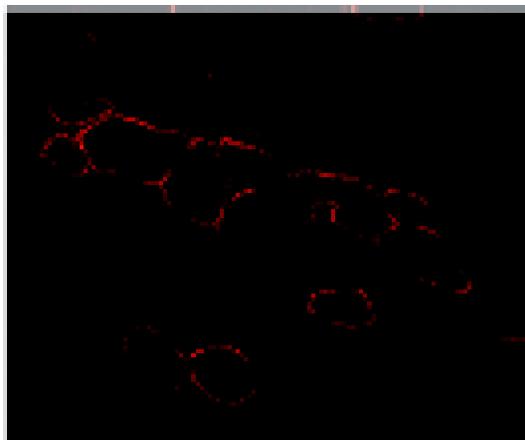
Severe BMD



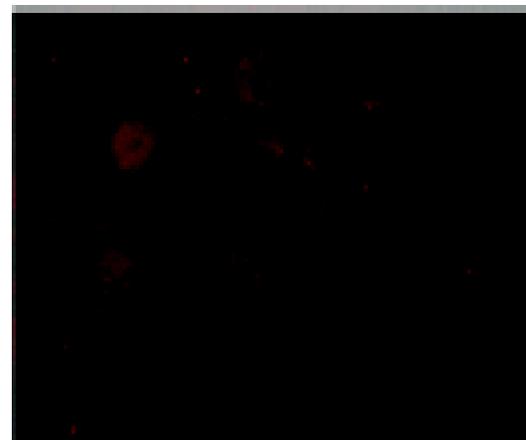
Manifesting carrier
of DMD

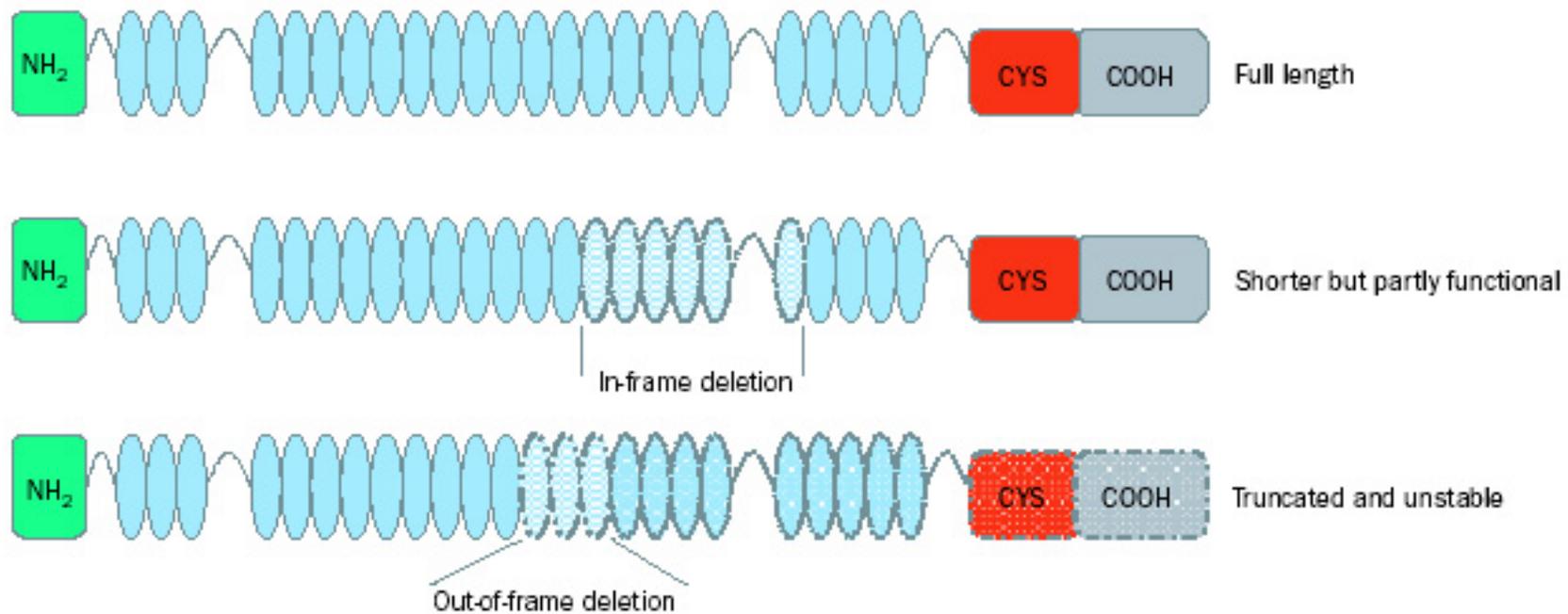


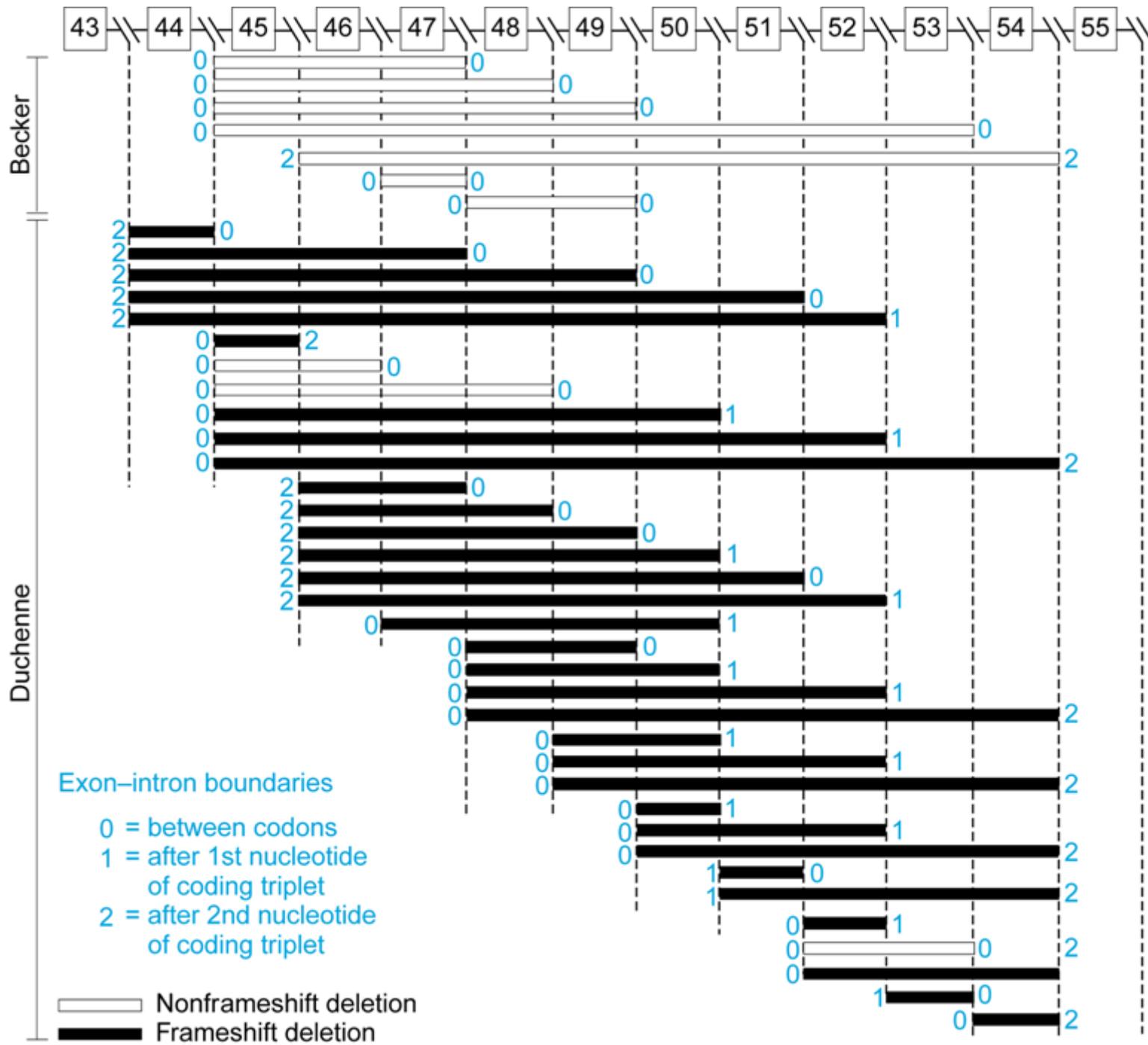
Revertant fibres in a
patient with IMD



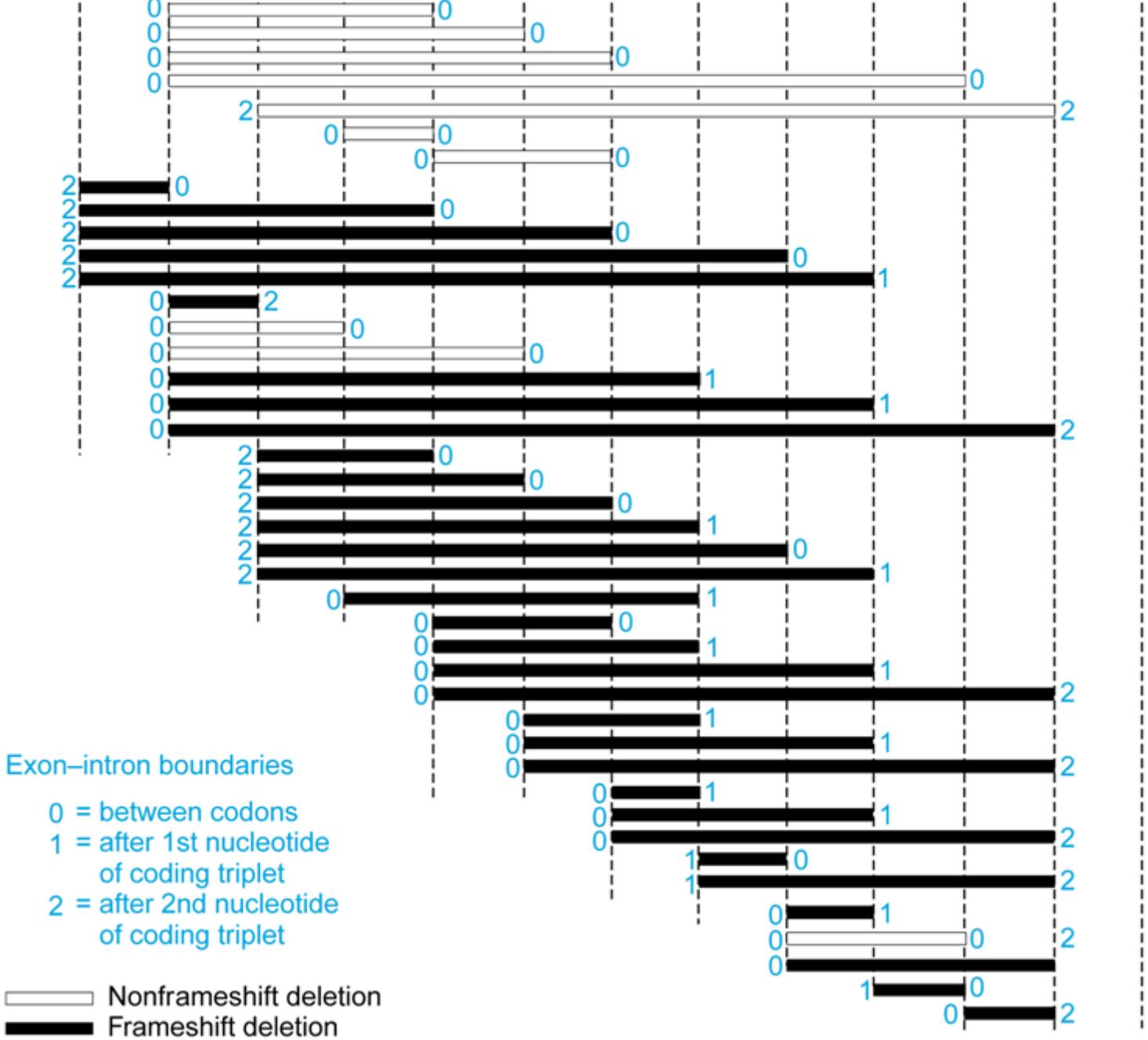
DMD

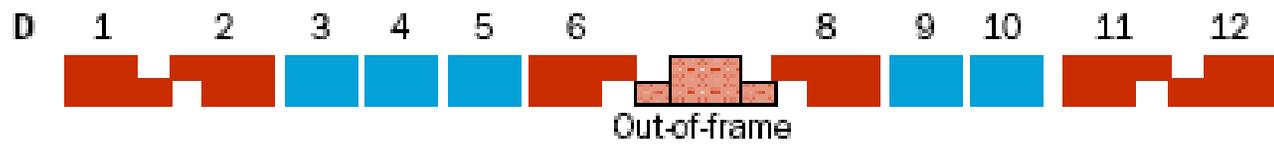
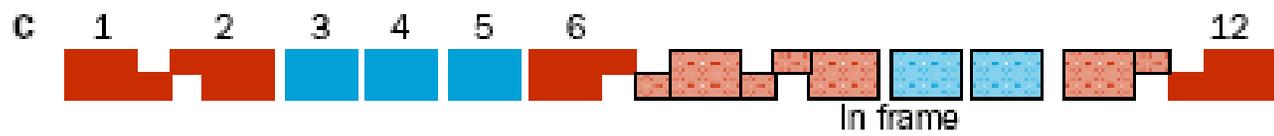
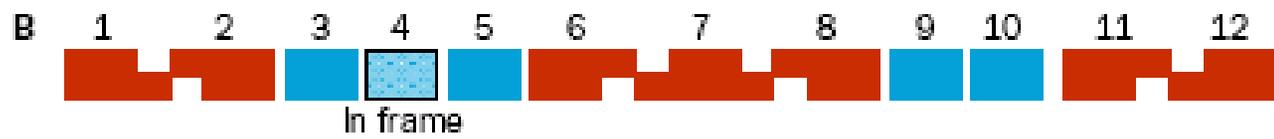




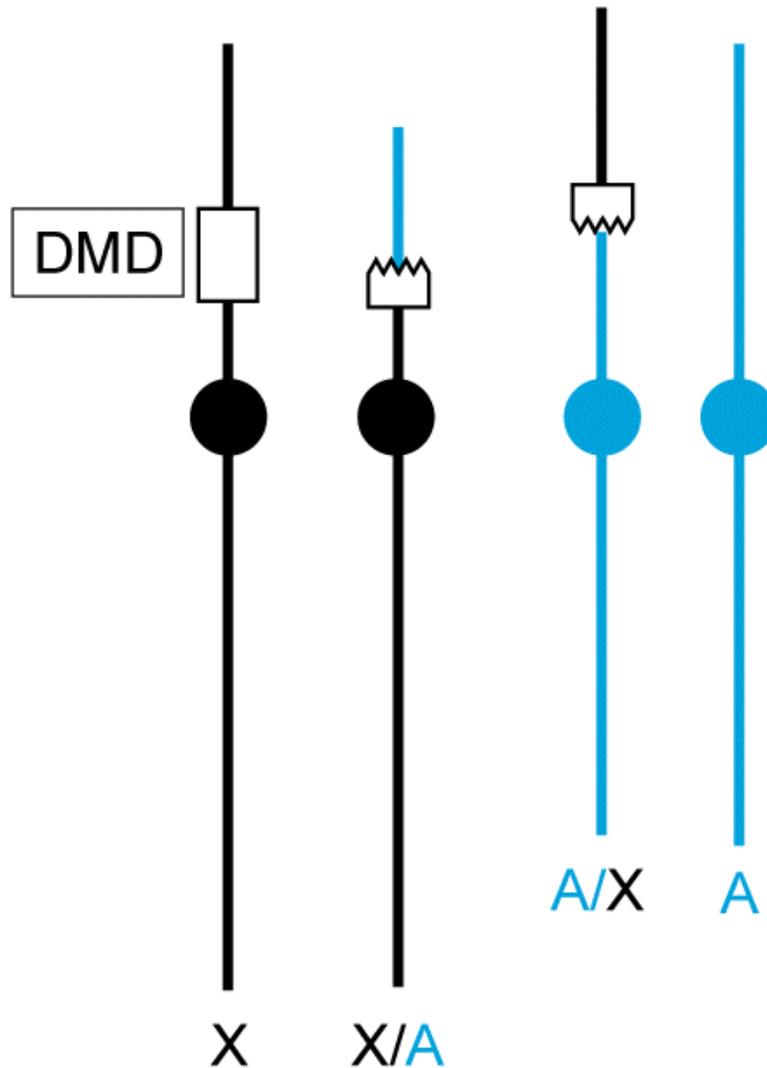


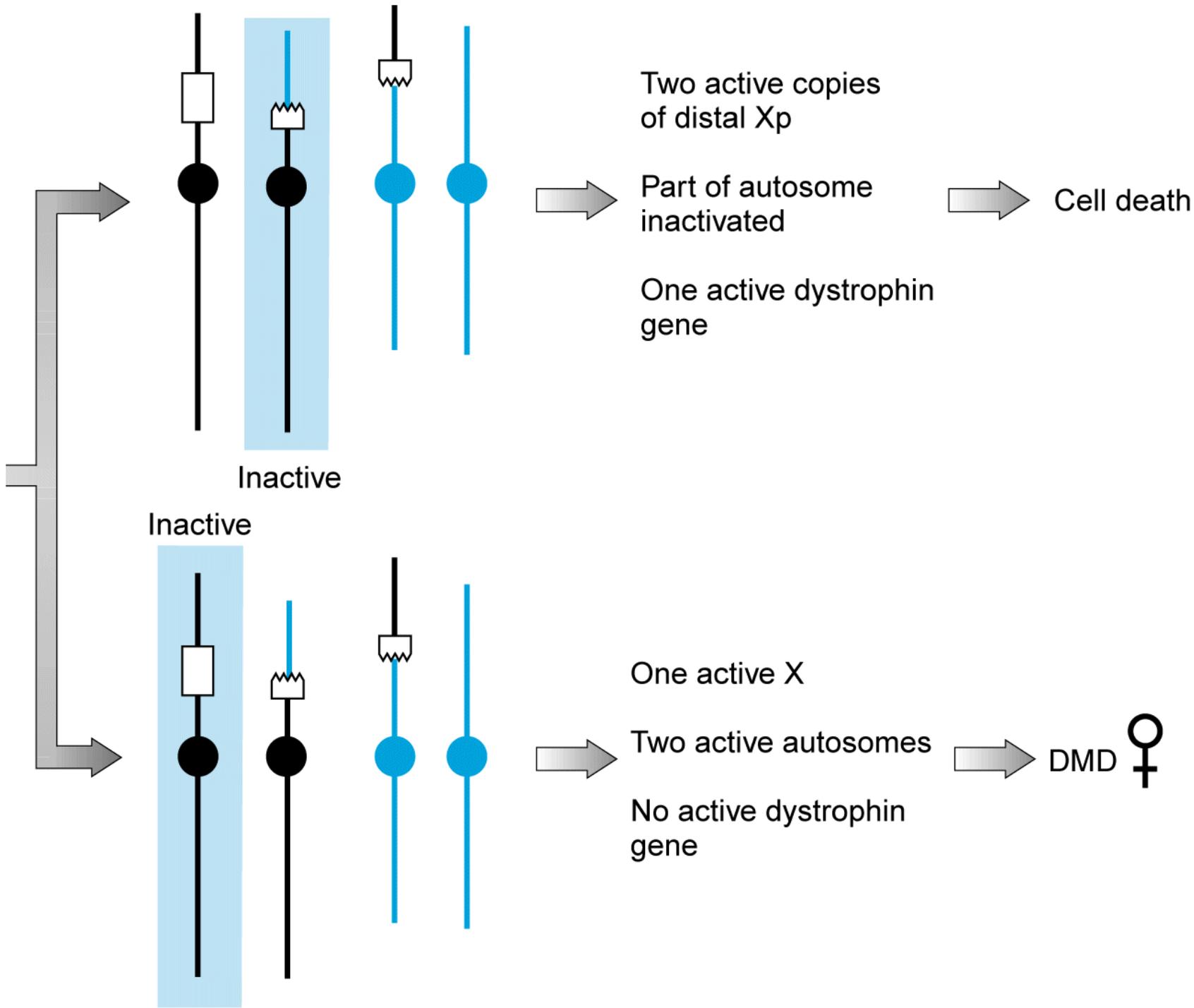
43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55





donna eterozigote per una traslocazione bilanciata X-autosoma



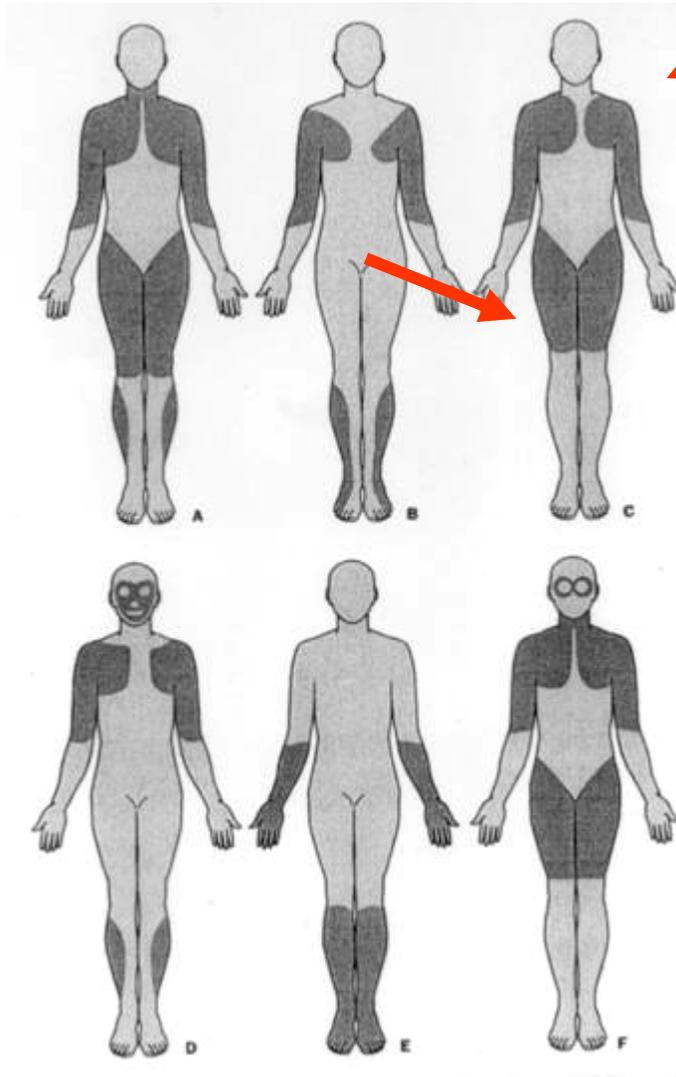


eterogeneità genetica

Fenotipo clinico indistinguibile con pattern di trasmissione ereditaria differente: autosomico dominante, autosomico recessivo, X-linked, o mitocondriale

- Esempio:
 - le **atassie cerebellari** sono un gruppo di malattie neurodegenerative, in cui l'elemento dominante è la progressiva degenerazione cerebellare, con conseguente compromissione dell'equilibrio, dell'andatura, della coordinazione dei movimenti degli arti e della parola

Proximal limb muscle involvement



- no apparent X-linked inheritance and generally milder
- severe LGMD (Duchenne-like) or mild (Becker-like)
- great variability, ranging from severe forms with onset in the first decade and rapid progression to milder forms with later onset and a slower course

autosomal dominant

- autosomal dominant forms (LGMD1) are generally milder
- represent less than 10% of all LGMD
- marked heterogeneity for LGMD1, one gene per one single family

Table 1 Autosomal dominant LGMD

disease	locus	gene		protein	animal model	clinical phenotype			
		name	exons no			typical onset ¹	progression	Cardiomyopathy ²	sCK ³
LGMD1A	5q31.2	TTID	10	Myotilin	<i>Myo</i> ^{+/+}	adulthood	slow	not observed	3-4X
LGMD1B	1q21	LMNA	12	Lamin A/C	<i>Lmna</i> ^{-/-}	variable (4-38y)	slow	often observed	1-8X
LGMD1C	3p25.3	CAV3	2	Caveolin 3	<i>Cav3</i> ^{-/-}	childhood	slow/moderate	frequent	10X
LGMD1D	6q22					adulthood	slow	not observed	1-3X
LGMD1E	7q36					adulthood	slow	often	2-4X
LGMD1F	7q31.1					variable (1-58y)	quite rapid	not observed	
LGMD1G	4p21					adulthood	slow	not observed	1-9X
LGMD1H	3p23-p25					variable (10-50y)	slow	not observed	1-10X

autosomal recessive

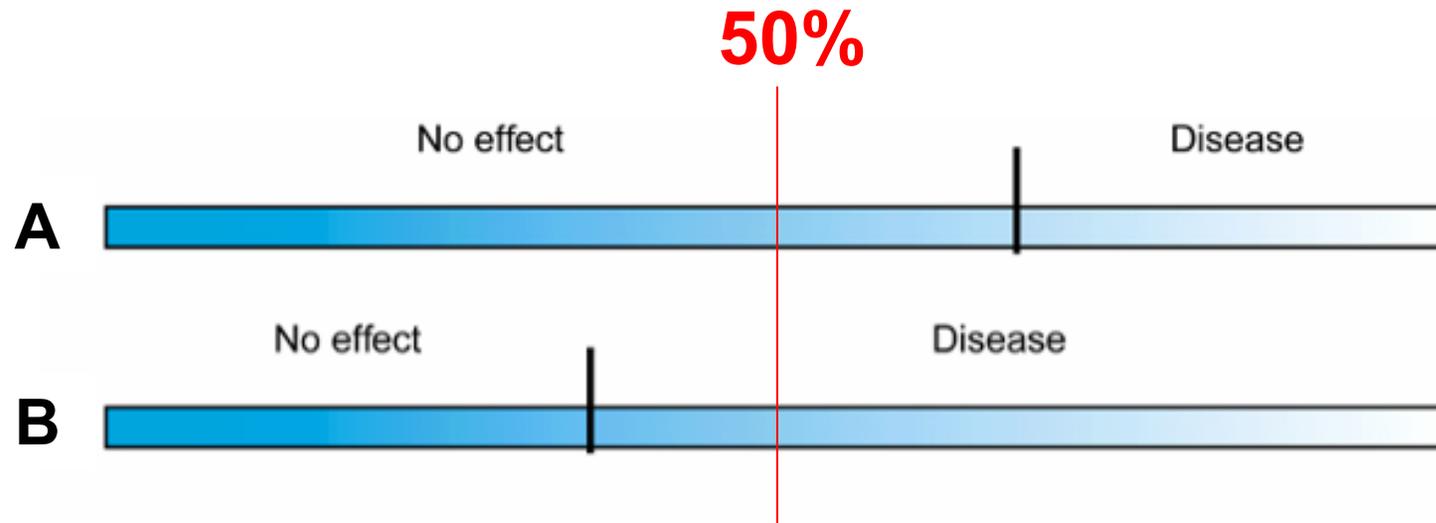
- autosomal recessive forms (LGMD2) have an average prevalence of 1:14,000-1:20,000 at birth
- frequency differences among countries
- this depends on higher carrier frequencies of single mutations, as 550delA for calpain 3 in Croatia, L276I for FKRP in Northern Europe, 521delT for gamma-sarcoglycan in Northern Africa
- At least 25% of families are excluded from any known locus and 40% of typical LGMD cases have no mutation in any known gene

Table 2 Autosomal recessive LGMD

disease	locus	gene		protein	animal model	clinical phenotype			
		name	exons no.			typical onset ¹	progression	Cardiomyopathy ²	sCK ³
LGMD2A	15q15	CAPN3	24	calpain 3	<i>Capn3</i> ^{-/-} <i>Capn3</i> ^{cs1cs}	adolescence	moderate/rapid	rarely observed	3-20X
LGMD2B	2p13.2	DYSF	56	dysferlin	<i>SJL/J; Dysf</i> ^{-/-}	young adulthood	slow	possible	5-40X
LGMD2C	13q12	SGCG	8	γ-sarcoglycan	<i>Sgcg</i> ^{-/-}	early childhood	rapid	often severe, rare in 2D	10-70X
LGMD2D	17q21.33	SGCA	10	α-sarcoglycan	<i>Sgca</i> ^{-/-}				
LGMD2E	4q12	SGCB	6	β-sarcoglycan	<i>Sgcb</i> ^{-/-}				
LGMD2F	5q33	SGCD	9	δ-sarcoglycan	BIO14.6; <i>Sgcd</i> ^{-/-}				
LGMD2G	17q12	TCAP	2	telethonin	<i>Tcap</i> KO	adolescence	slow	yes	10X
LGMD2H	9q33.1	TRIM32	2	tripartite motif containing 32	<i>Trim32</i> ^{-/-}	adulthood	slow	not observed	5-15X
LGMD2I	19q13.3	FKRP	4	fukutin related protein	<i>FKRP-neo-P448L</i> <i>E310del</i> <i>FKRP</i> ^{Tyr307Asn}	late childhood	moderate	yes	10-20X
LGMD2J	2q24.3	TTN	312	titin	<i>Mdm</i> <i>MCKcre</i> ⁺ <i>Ti</i> <i>MEx1+2</i> ^{lox/lox}	young adulthood	severe	not observed	10-40X
LGMD2K	9q34.1	POMT1	20	protein-O-mannosyltransferase 1	<i>Pomt1</i> ^{-/-}	childhood	slow	not observed	10-40X
LGMD2L	11p13-p12	ANO5	22	anoctamin 5		variable (young to late adulthood)	slow	not observed	1-15X
LGMD2M	9q31	FKTN	11	fukutin	<i>Fukutin null</i>	early childhood	moderate	sometimes	10-70X
LGMD2N	14q24	POMT2	21	protein-O-mannosyltransferase 2		early childhood	slow	rare	5-15X
LGMD2O	1p34.1	POMGnT1	22	protein O-linked mannose beta 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	<i>POMGnT1</i> ^{-/-}	late childhood	moderate	not observed	2-10X
LGMD2P	3p21	DAG1	3	dystroglycan	<i>Dag1null</i>	early childhood	moderate	not observed	20X

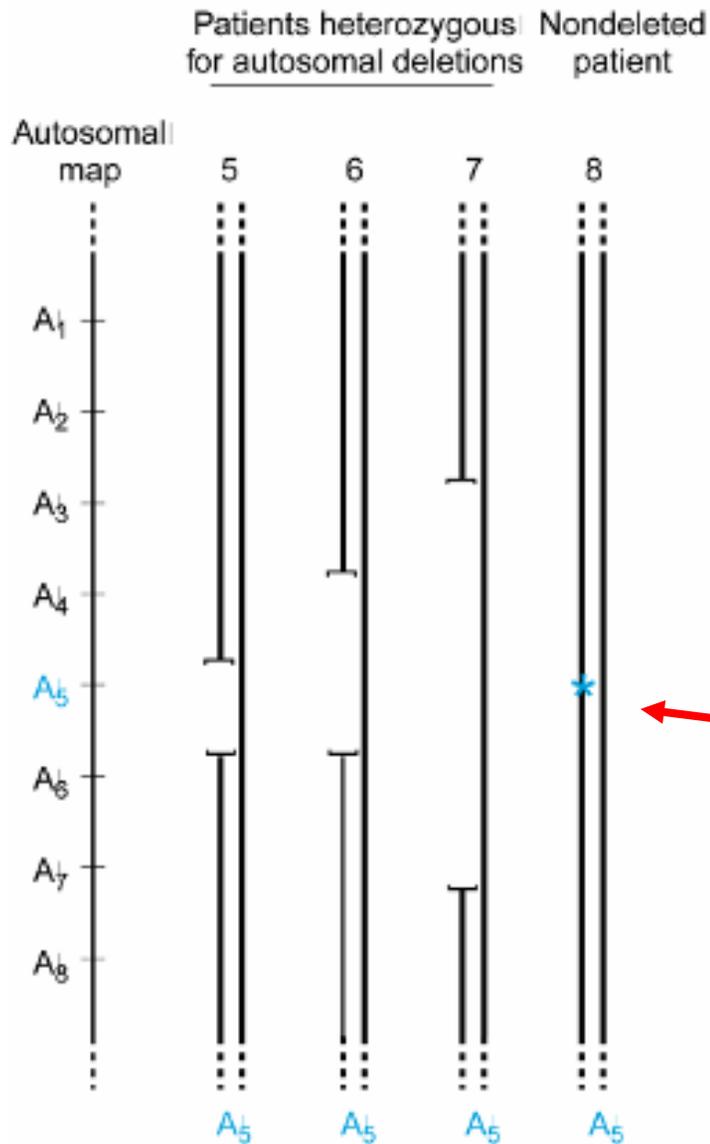
aploinsufficienza

- insufficiente quantità di prodotto genico causata da una mutazione in eterozigosi
- la mutazione è di tipo allele amorfo o ipomorfo
- colpisce geni per i quali il 50% di prodotto genico non è sufficiente a garantirne la funzione
- spesso un dosaggio preciso è richiesto ai fattori di trascrizione e alle molecole di segnale espressi nel corso dello sviluppo



La maggior parte dei geni si trova nella condizione **A**: il dosaggio genico critico è **<50%**. In tal caso, si osserva un fenotipo patologico **solo se entrambi gli alleli** sono colpiti, mentre in eterozigosi il fenotipo è normale

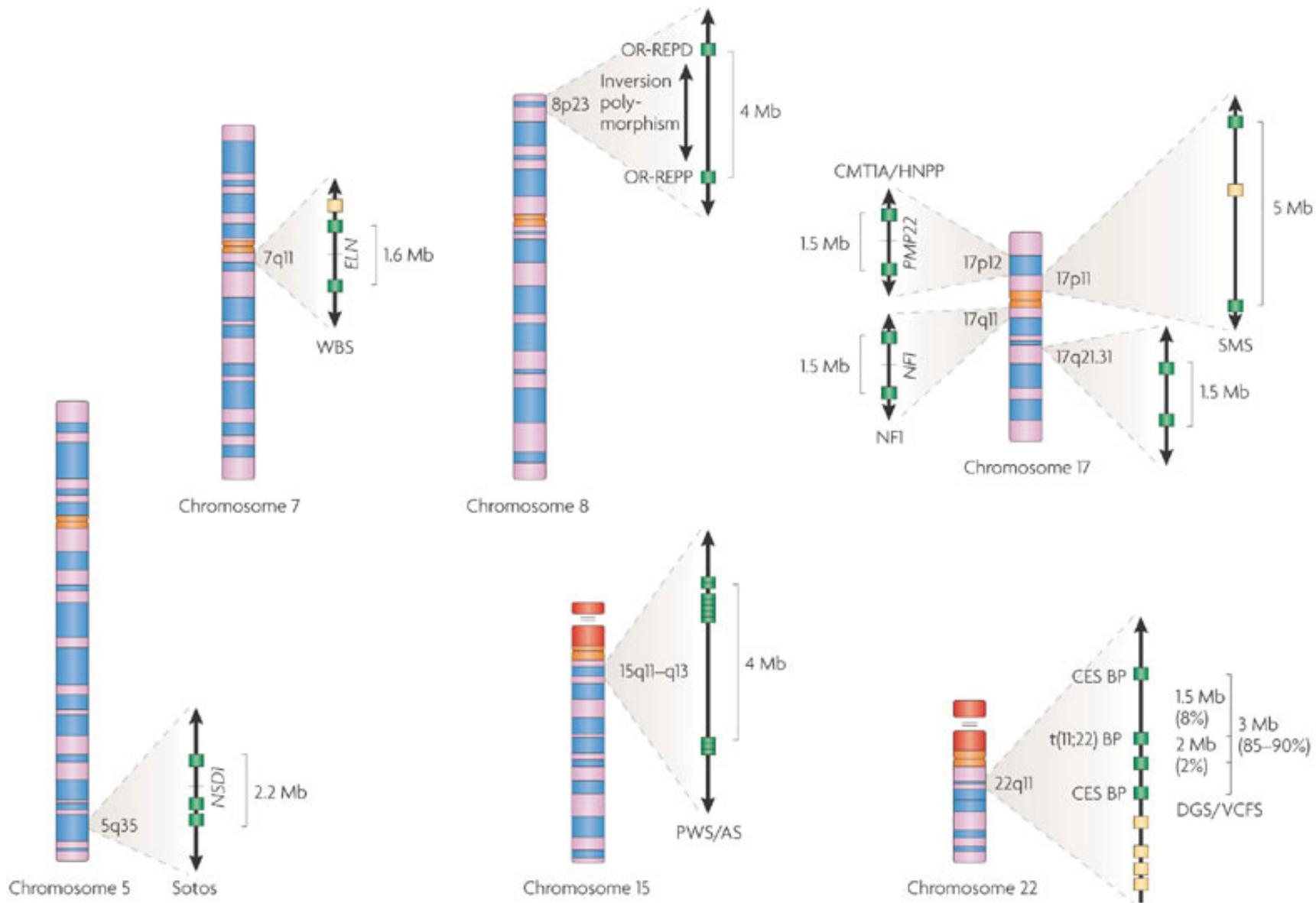
Pochi geni che si trovano nella condizione **B**: il dosaggio critico è **>50%**. Nelle **delezioni genomiche submicroscopiche** si osserva un fenotipo patologico in eterozigosi per **aploinsufficienza**



in caso di **delezioni autosomiche in eterozigosi**, molto spesso il dosaggio dimezzato non è causa di malattia

quando si osserva una sindrome da delezione, è risolutivo trovare la stessa sindrome causata da **mutazioni puntiformi** in uno solo dei geni

se questa non si trova, la sindrome esiste solo come somma di più difetti



SMS del 17p11.2

sindrome di Smith-Magenis

- sporadica 1: 15.000-25.000, ma sottodiagnosticata
- **ritardo mentale** con ricerca dell'attenzione e comportamenti autolesionistici (**onicotillomania**)
- disturbi del **sonno**
- faccia quadrata, brachicefalia, **ipoplasia** della parte centrale della faccia, brachidattilia
- **voce grossa** e profonda
- **ipotonia**, labbro superiore a tenda
- infezioni dell'orecchio, anomalie oculari, anomalie cardiache e renali





ritardo nel linguaggio **espressivo**

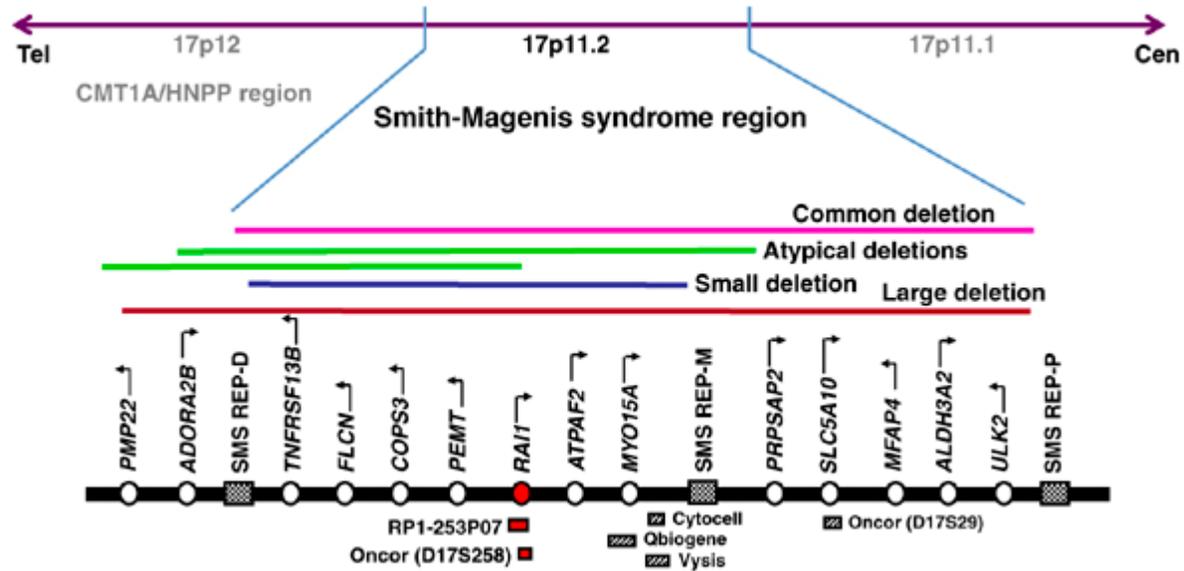
scarsa memoria a breve termine e difficoltà di **sequenzialità**

sonno eccessivo diurno e interrotto notturno, per ciclo invertito della **melatonina**

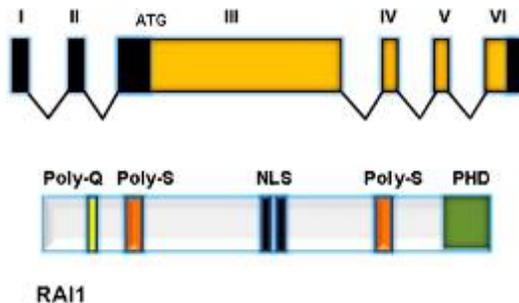
SMS del 17p11.2

sindrome di Smith-Magenis

90%

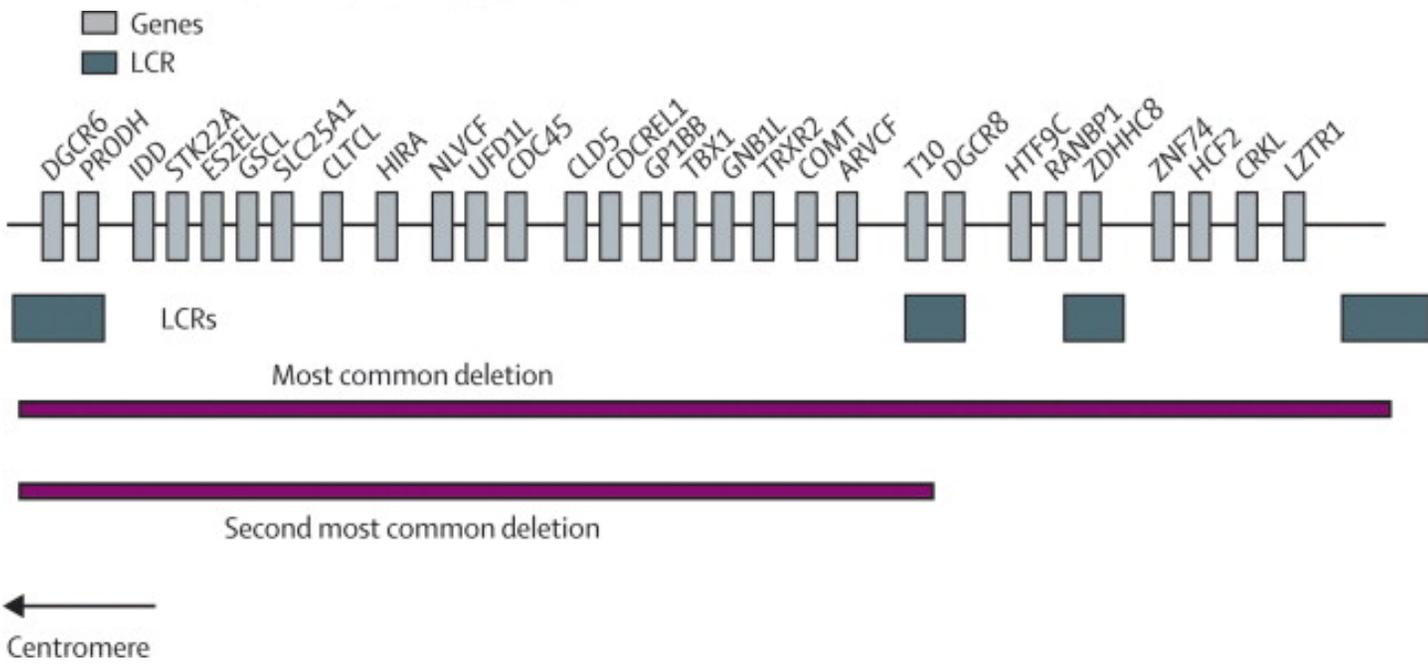
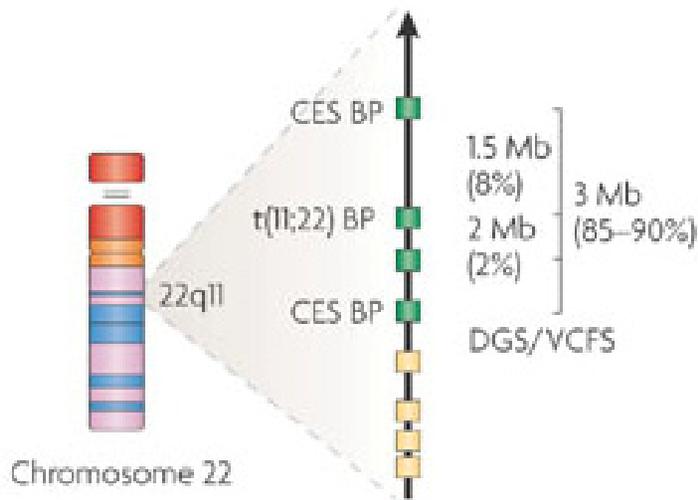


10%



- ins/del puntiformi (frame-shift) del gene **RAI1** (retinoic acid-induced 1) in eterozigosi nei casi senza delezione

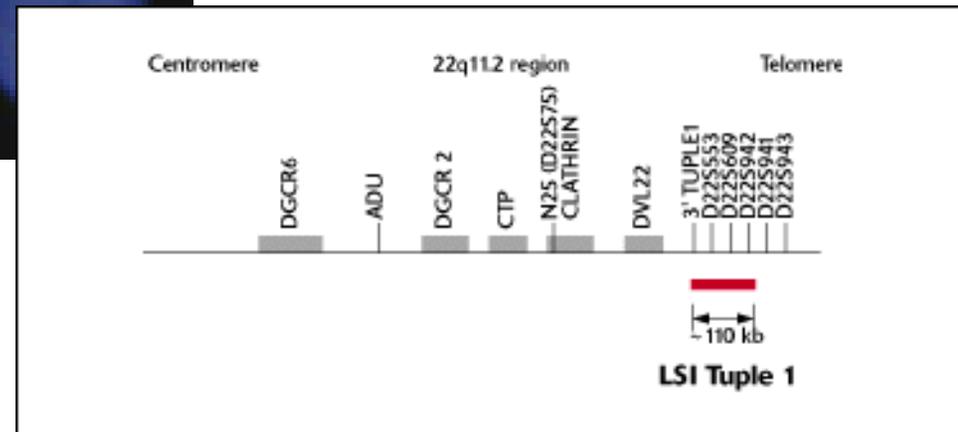
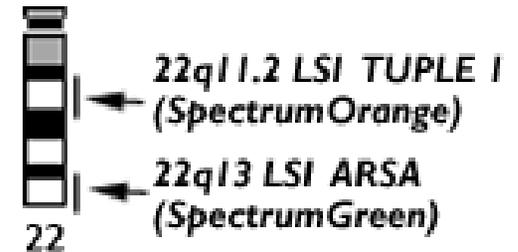
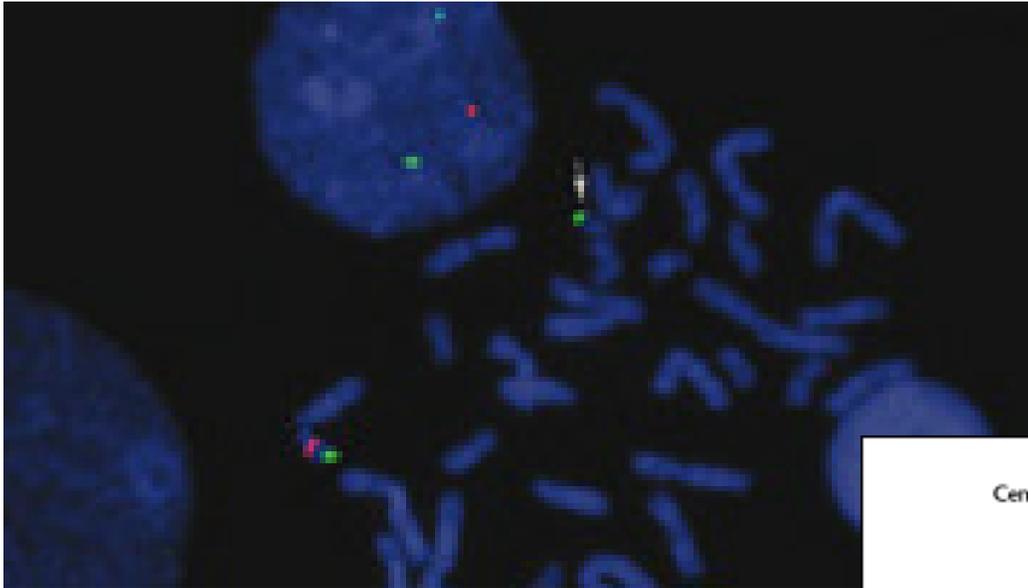
Sindrome di DiGeorge

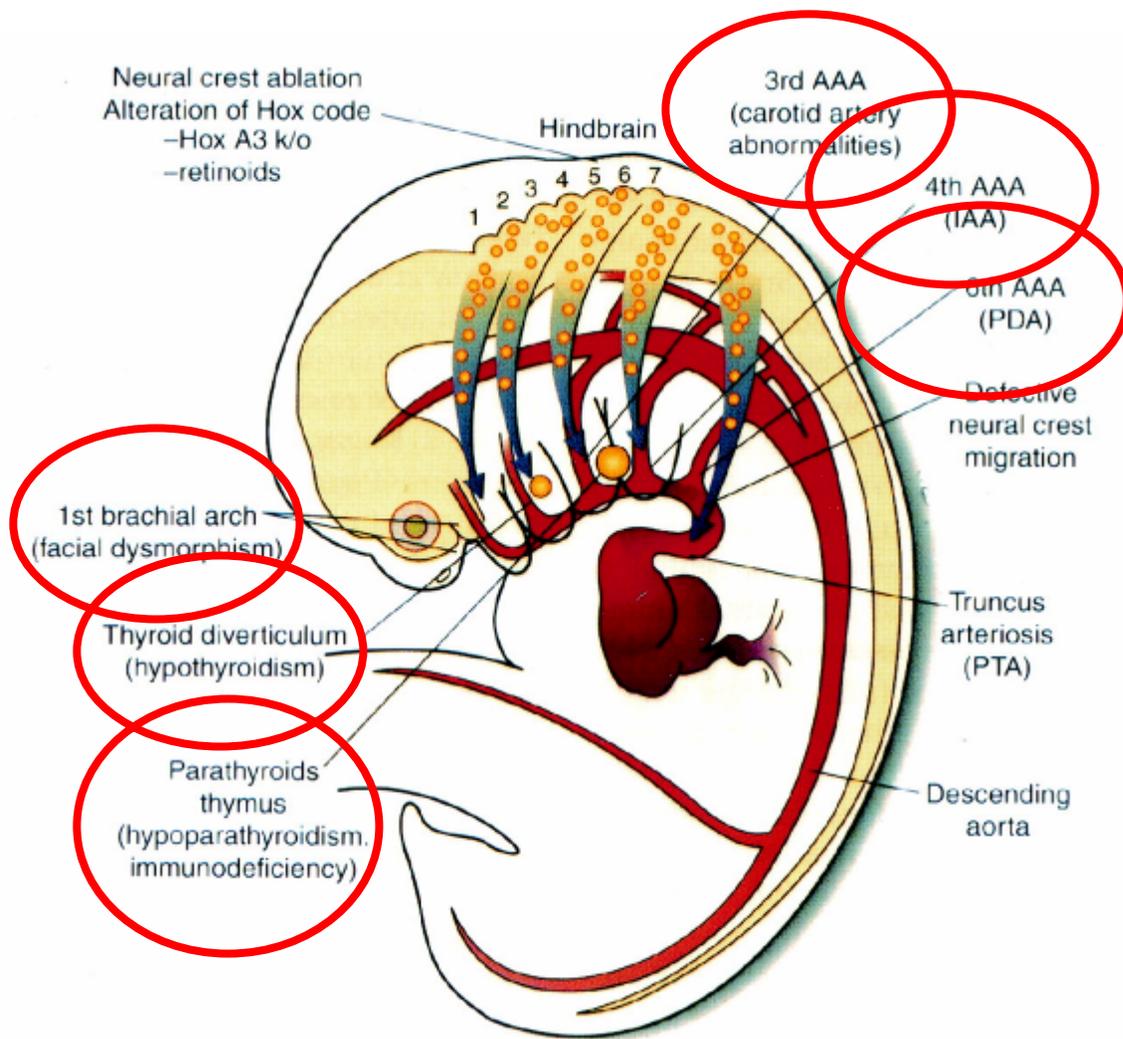


DiGeorge/velocardiofaciale

La sindrome di DiGeorge del22q11.2 è la più frequente sindrome da microdelezione, con un incidenza di 1 su 4000—5000 nati

La delezione comprende 3Mb ed almeno 30 geni





le cellule della cresta neurale in migrazione contribuiscono alle strutture embrionali colpite nella s. di DiGeorge

la figura rappresenta un embrione umano a 4-6 settimane di gestazione

La migrazione delle cellule della cresta neurale dal cervello posteriore all'arco branchiale / tasca faringea e del tratto di efflusso cardiaco è indicato dalle frecce.

Le malformazioni associate a perturbazioni di questo processo sono elencati e queste coincidono sostanzialmente con quelle osservati nelle s. di DiGeorge 22q11
persistenza del dotto di Botallo (PDA), interruzione dell'arco aortico (IAA)

DiGeorge o velo/cardio/facciale

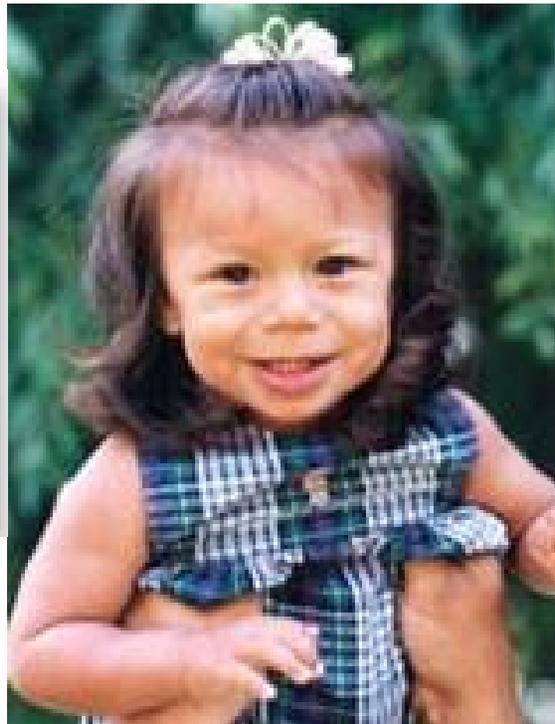
- È caratterizzata da
 - Anomalie cardiache
 - T-cell deficit
 - palatoschisi
 - anomalie facciali
 - Ipocalcemia

Mutazioni puntiformi del gene TBX1 possono portare a questi 5 tratti fenotipici, ma non alle difficoltà nell'apprendimento che è invece frequente nella sindrome da delezione

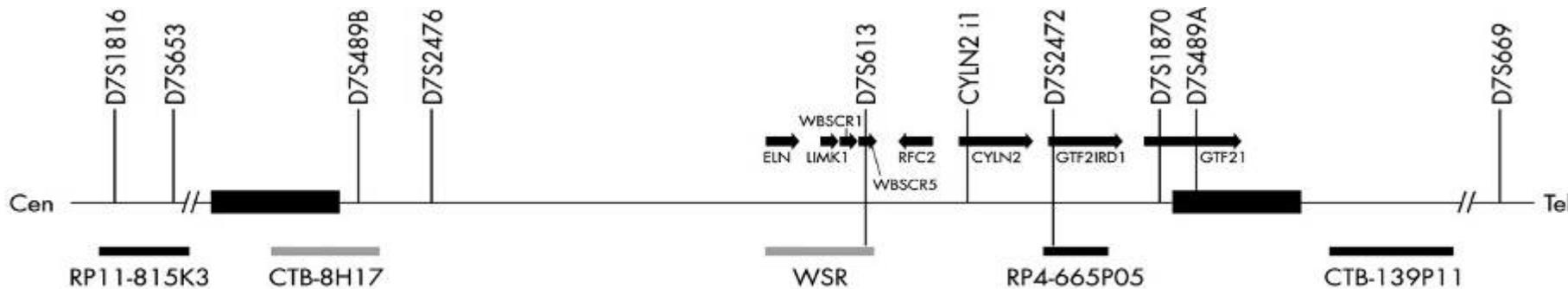


Williams-Beuren

- prevalenza alla nascita 1/7500-1/20.000, ma può non essere diagnosticata



Williams una delezione tipica



Typical deletion (~1.5 Mb)



Our patient

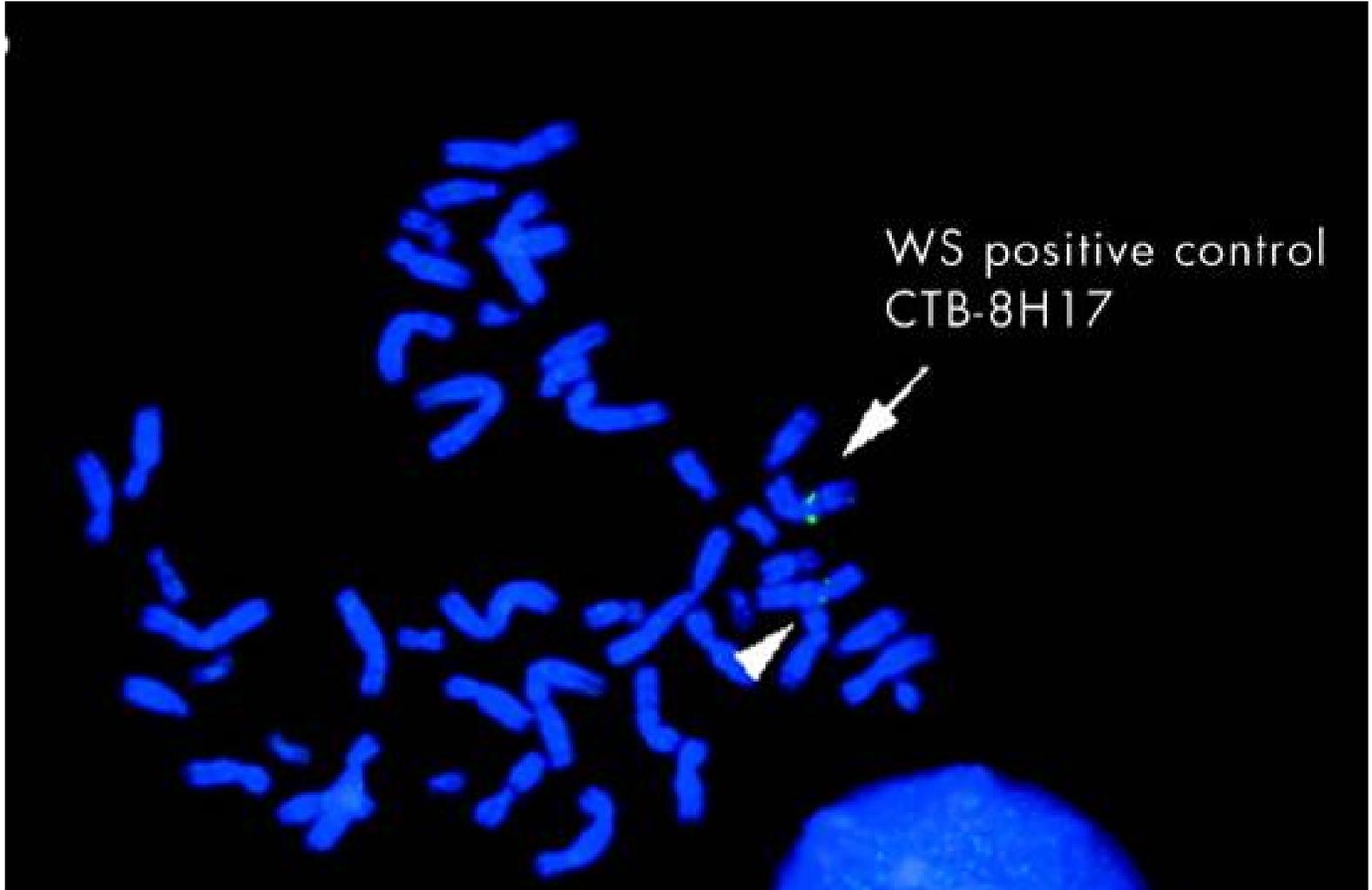


Williams genetica

- delezione “de novo”
- trasmissione autosomica dominante
- delezione di 1.6MB da 21 geni contigui in eterozigosi a 7q11.23
 - gene dell’elastina
 - LIM kinase 1 (LIMK1)
 - CLIP-115 che lega i microtubuli
 - Fattori di trascrizione GTF2I e GTF2IRD1
 - effetto posizionale su altri geni circostanti la delezione

Williams

FISH delezione 7q11.23



rilevabile mediante FISH ma non cariotipo



Williams comportamento

- lieve o medio ritardo mentale (IQ tra 41 e 80)
- scarsa capacità di concentrazione
- ritardo nell'apprendimento del linguaggio e poi esagerata loquacità
- personalità amichevole e affettuosa
- danno facilmente confidenza anche a sconosciuti
- ansietà, spesso preoccupati per il benessere altrui
- ipersensibilità ai suoni
- memoria visiva e uditiva spesso fuori dal comune
- ricordano persone, luoghi e motivi musicali
- predisposizione ad imparare le lingue e la musica



Williams aspetto e segni

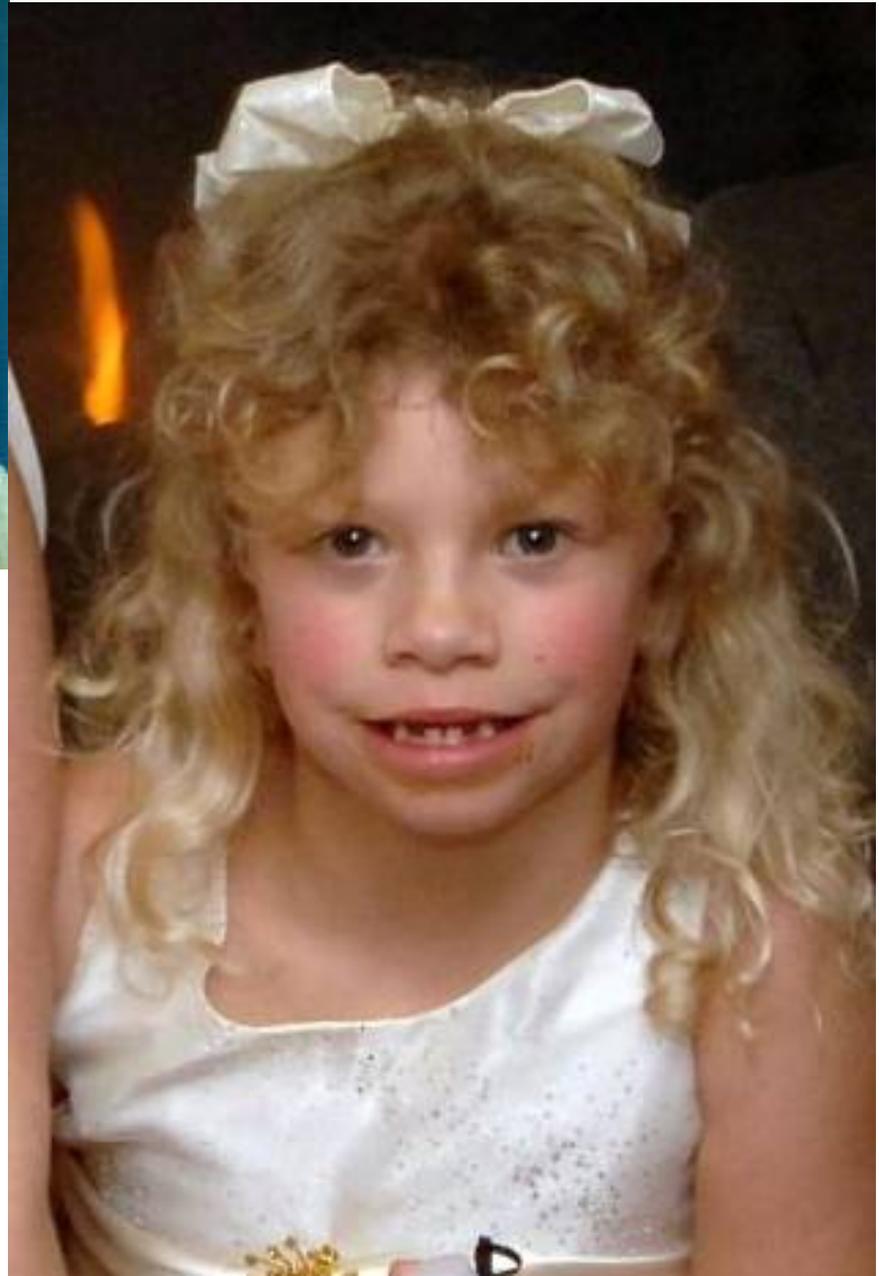
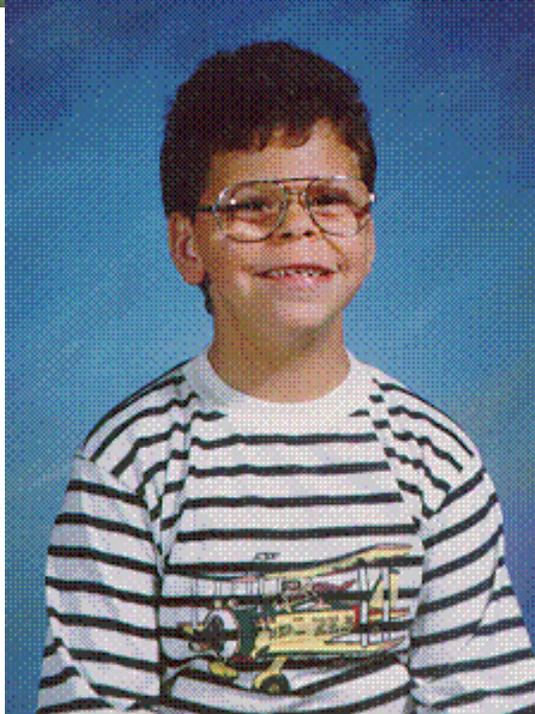
- Faccia da elfo
- Occhi blu (77%) con pattern stellato dell'iride (74%) ma questo vale per i nordeuropei, strabismo (40%)
- Naso con la punta bulbosa
- bocca larga e guance piene
- microdontia e micrognazia
- Statura 10 cm in meno del normale
- ipercalcemia
- stenosi periferica delle arterie polmonari
- stenosi aortica sopravvalvolare

<http://www.wsf.org/family/photoalbum/wsfphoto.htm>

Williams foto



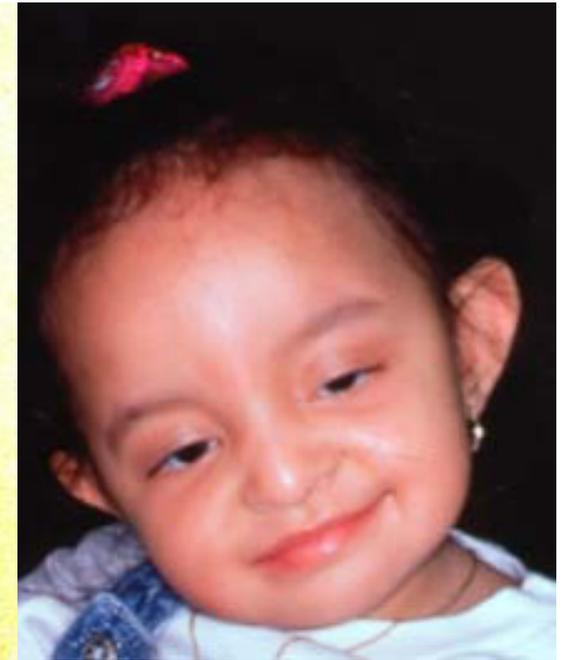
Williams foto



Wolf-Hirschhorn genetica

- delezione “de novo” di circa 4MB
- le delezioni sono più frequenti nella linea germinale maschile
- trasmissione autosomica dominante
- Regione critica di 165 kb di molti geni contigui in eterozigosi a 4p16.3

Wolf-Hirschhorn delezione a 4p16.3





Wolf-Hirschhorn



- Scarso accrescimento
- Ritardo mentale, ipotonia
- Labbro leporino
- Conformazione ad elmo di guerriero greco

Sindrome 5p- (cri du chat)

1:50.000 nati

- Pianto acuto e flebile
- Caratteristiche principali:
 - Ritardo di crescita
 - Microcefalia ed ipertelorismo
 - Ipotonia, diastasi dei retti
 - Deficit intellettivo e del linguaggio

MWS del 2q22

sindrome di Mowat-Wilson

- sporadica 1: 15.000-25.000, ma sottodiagnosticata
- **ritardo mentale**
- gene ZEB2
- lobo slargato e tipico



classificazione strutturale delle mutazioni

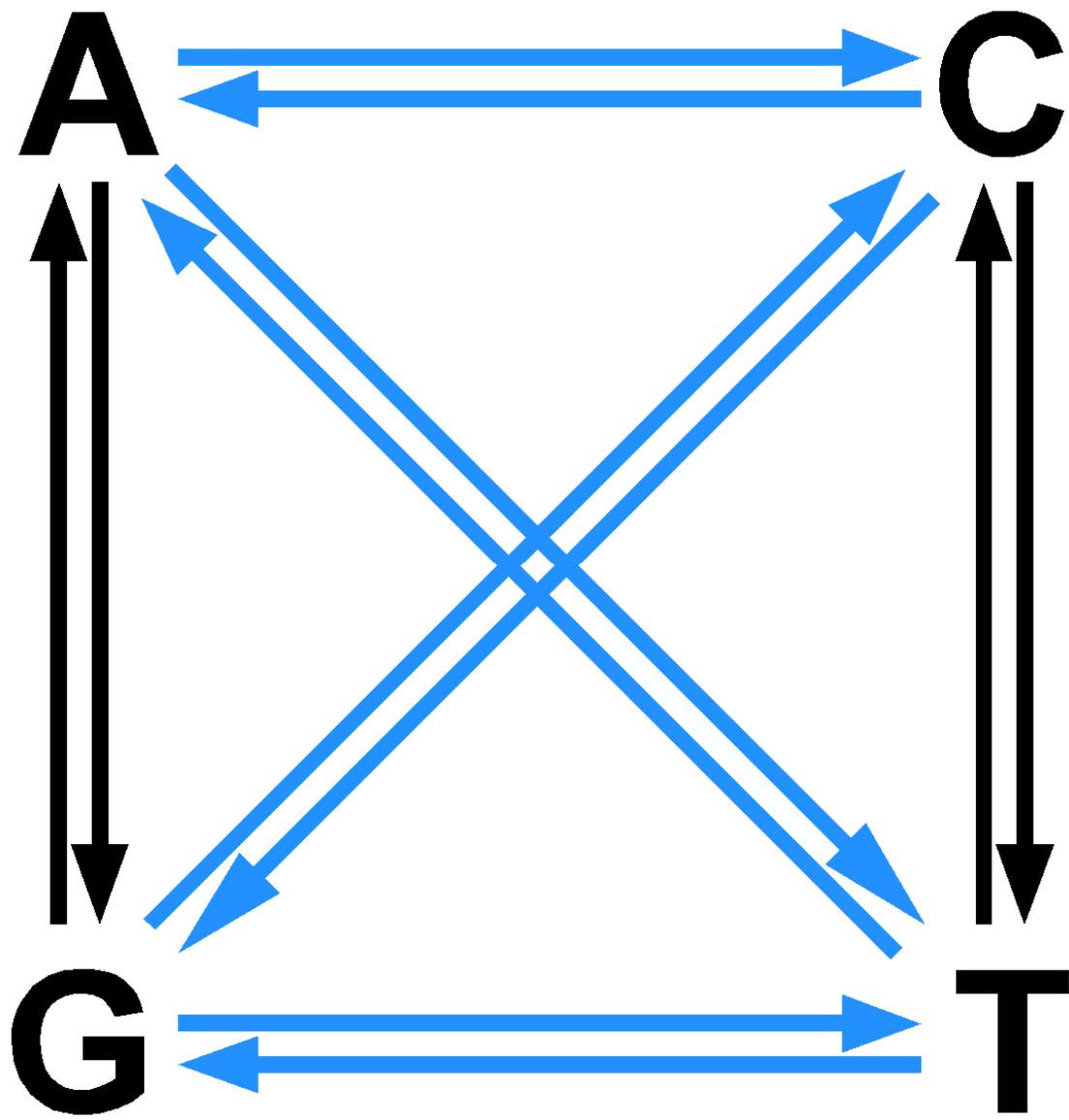
1. sostituzioni
2. piccole inserzioni, delezioni o inserzioni + delezioni contemporaneamente (indels)
3. riarrangiamenti genomici a due (delezioni, duplicazioni) o più punti di rottura (traslocazioni, inversioni ecc.)
4. copy number variations (CNV)

a queste quattro classi appartengono in modo indistinguibile tanto le variazioni innocue quanto le mutazioni causative di malattia

numerazione dei nucleotidi

- Il nucleotide +1 è la A dell' ATG-codone di inizio della traduzione
- Il nucleotide che precede al 5' l'ATG-codone di inizio della traduzione è denominato -1; non esiste una base 0
- Il nucleotide che segue al 3' il codone di terminazione è denominato *1

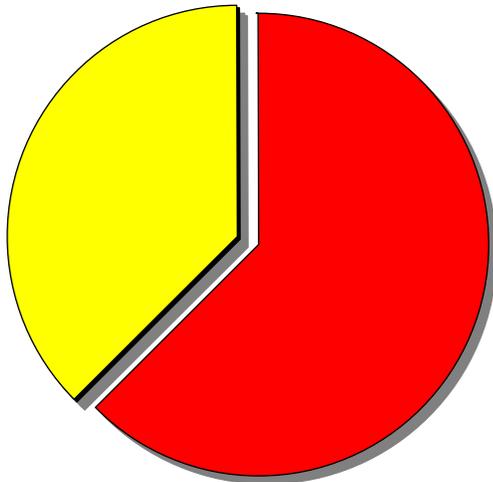
- le sostituzioni sono indicate dal carattere “>”. Ad esempio, 76A>C indica che in posizione 76 un’adenina è sostituita da una citosina
- 88+1G>T (oppure IVS2+1G>T) indica che una guanina è sostituita da una timina in posizione +1 dell’introne 2, posizionato tra i nucleotidi 88 e 89 del cDNA
- 89-2A>C (oppure IVS2-2A>C) indica che un’adenina è sostituita da una citosina in posizione -2 dell’introne 2, posizionato tra i nucleotidi 88 e 89 del cDNA



Mutazioni osservate

T>A or G , C>G or A
G>T or C , A>T or G

trasversioni



transizioni

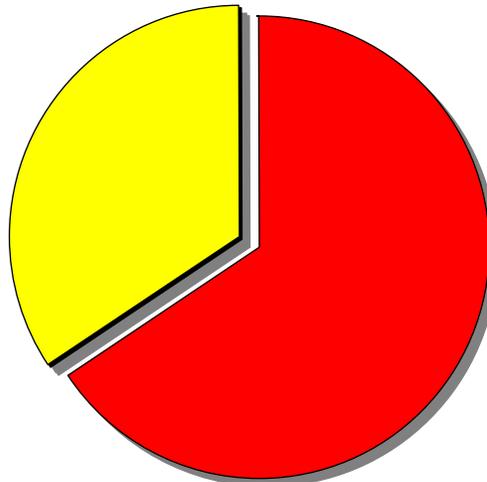
T>C, C>T, G>A, A>G

46,000

SNPs (polimorfismi)

T/A, C/G
T/G, C/A

trasversioni



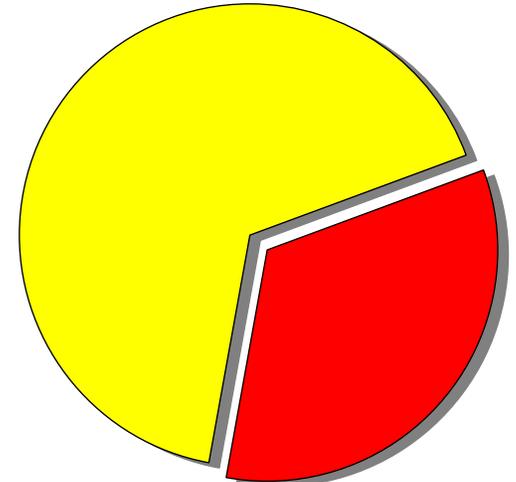
transizioni

T/C, A/G

12,000,000

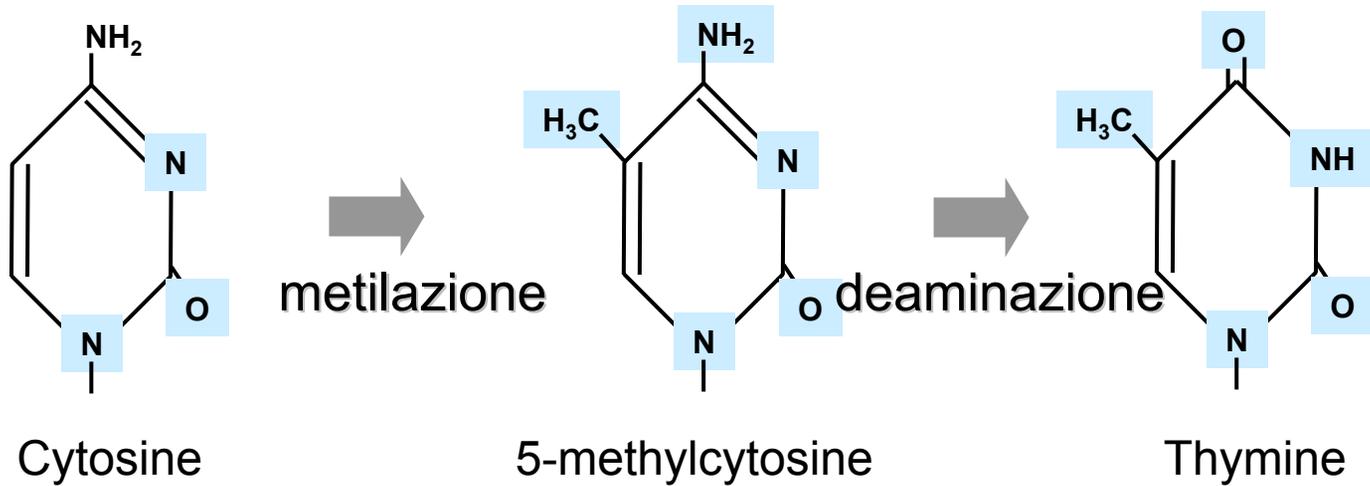
Teoricamente attese

trasversioni



transizioni

Il meccanismo più comune di mutazione



CG → **TG**
CG → **CA**

AAA	22.2] Lys	CCA	14.6] Pro	AGA	9.9] Arg	CUC	19.9] Leu
AAG	34.9		CC C	20.0		AGG	11.1		CU U	10.7	
AAC	22.6] Asn	CC G	6.6		CG A	5.4		CU A	6.2	
AAU	16.6		CC U	15.5		CG G	10.4		CU G	42.5	
CAA	11.1] Gln	GCA	14.0	CG C	11.3	UUA	5.3			
CAG	33.6		GC C	29.1	CG U	4.7	UUG	11.0			
CAC	14.2] His	GC G	7.2	GG A	17.1	UUC	22.6			
CAU	9.3		GC U	19.6	GG C	25.4	UUU	15.8			
GAA	26.8] Glu	UCA	9.3	GG G	17.3] Phe				
GAG	41.4		UC C	17.7	GG U	11.2		GU A	5.9		
GAC	29.0] Asp	UC G	4.2	UGC	14.5		GU C	16.3		
GAU	21.7		UC U	13.2	UGU	9.9		GU G	30.9		
UAC	18.8] Tyr	AGC	18.7	UGG	13.8	GU U	10.4			
UAU	12.5		AGU	9.4	AUA	5.8] Val				
ACA	14.4] Thr		AUC	24.3	Ile					
ACC	23.0			AUU	14.9	Met					
ACG	6.7			AUG	22.3						
ACU	12.7										

Key:

- N Nondegenerate site
- N Twofold degenerate site
- N Fourfold degenerate site

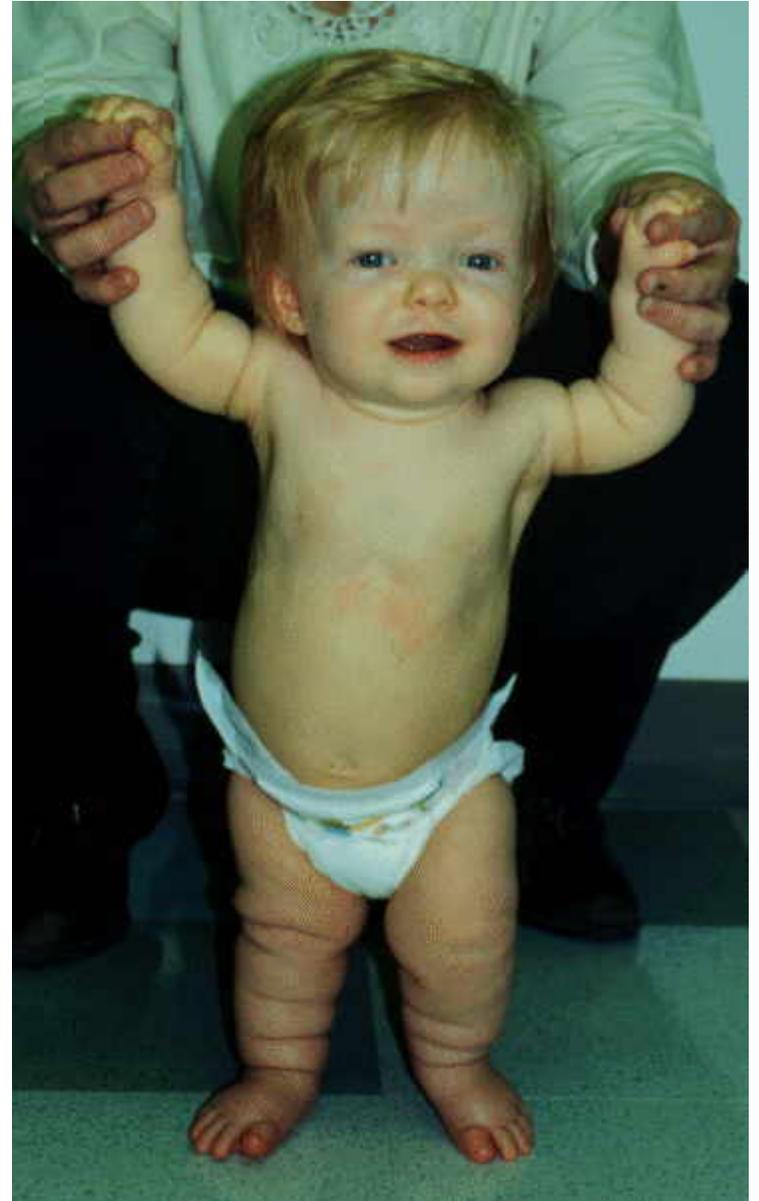
mutazioni puntiformi missenso

- Le mutazioni **missenso** sono quelle in cui il cambiamento determina nel prodotto proteico la sostituzione di un aminoacido con un aminoacido differente
- Sebbene queste alterazioni generalmente non provochino conseguenze nella funzionalità della proteina (polimorfismi o varianti) , ci sono casi in cui anche una minima alterazione può avere conseguenze gravi



achondroplasia

- nanismo dismorfico (1:35.000)
- arti corti e testa sproporzionatamente più grossa
- fronte prominente e naso appiattito
- altezza media 130 cm nei maschi 125 cm nelle femmine
- La mutazione è in eterozigosi
- Gly380Arg nel recettore 3 del "fibroblast growth factor" (FGFR3) a 4p16.3
- autosomico dominante a penetranza completa



acondroplasia

- La mutazione conferisce una funzione aumentata al recettore dell'FGF (allele ipermorfo) che è una tirosin-chinasi di membrana
- In risposta all'FGF il recettore dimerizza e si fosforila trasducendo un segnale con la funzione di rallentare la proliferazione dei condrociti e quindi la crescita ossea
- Topi senza il gene FGF3R hanno ossa lunghe e vertebre allungate

ipocondroplasia



- L'ipocondroplasia ha caratteristiche simili all'acondroplasia, ma di gravità minore con un coinvolgimento craniofacciale inferiore. L'altezza può risultare ai limiti della norma e la malattia viene spesso non diagnosticata.
- L'ipocondroplasia è meno omogenea: circa il 70% dei casi è dovuto alla sostituzione N540K del gene FGFR3, mentre non si conosce la mutazione nel restante 30%.



acrocefalosindattilia sindrome di Apert

- 1:65.000 alla nascita
- craniosinostosi, volta cranica a forma conica
- ipertensione endocranica
- ritardo mentale
- ipoplasia della parte centrale della faccia
- sindattilia delle dita delle mani e dei piedi
- sordità e atrofia ottica

acrocefalosindattilia sindrome di Apert

- tutti i pazienti hanno la stessa mutazione Apert (Cys755Gly) del gene human fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)
- la mutazione è in eterozigosi
- *de novo*
- cromosoma 10q26
- la sindrome è allelica con Crouzon e Pfeiffer



sindrome di Pfeiffer

- alcuni pazienti hanno la mutazione Pfeiffer (Cys342Arg) del gene human fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)
- altri la mutazione Pro252Arg in FGFR1
- la mutazione è in eterozigosi
- *de novo*
- cromosoma 10q26
- la sindrome è allelica con Crouzon e Apert



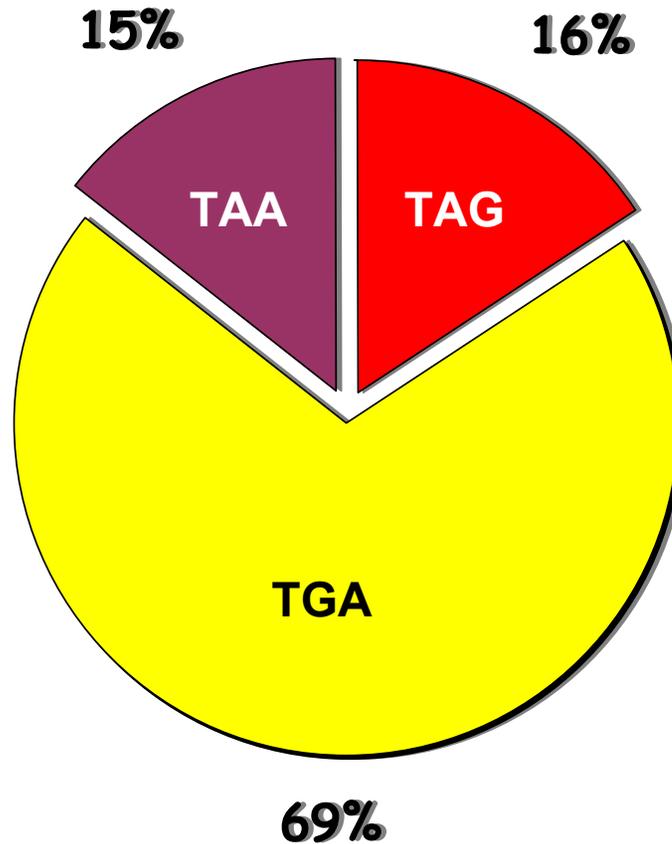
disostosi cranio facciale sindrome di Crouzon

- alcuni pazienti hanno la mutazione (Cys342Tyr) del gene human fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)
- la mutazione è in eterozigosi
- *de novo*
- cromosoma 10q26
- la sindrome è allelica con Pfeiffer e Apert con alcune mutazioni in comune

mutazioni puntiformi nonsense

- La mutazione **nonsense** è quella in cui la modificazione nucleotidica provoca la creazione di un tripletta di stop, che blocca la sintesi della proteina prematuramente.
- In questo caso, la funzionalità della proteina dipenderà dalla posizione dello stop.

Tipi diversi di mutazioni nonsense nei geni umani



mutazioni in eterozigosi di

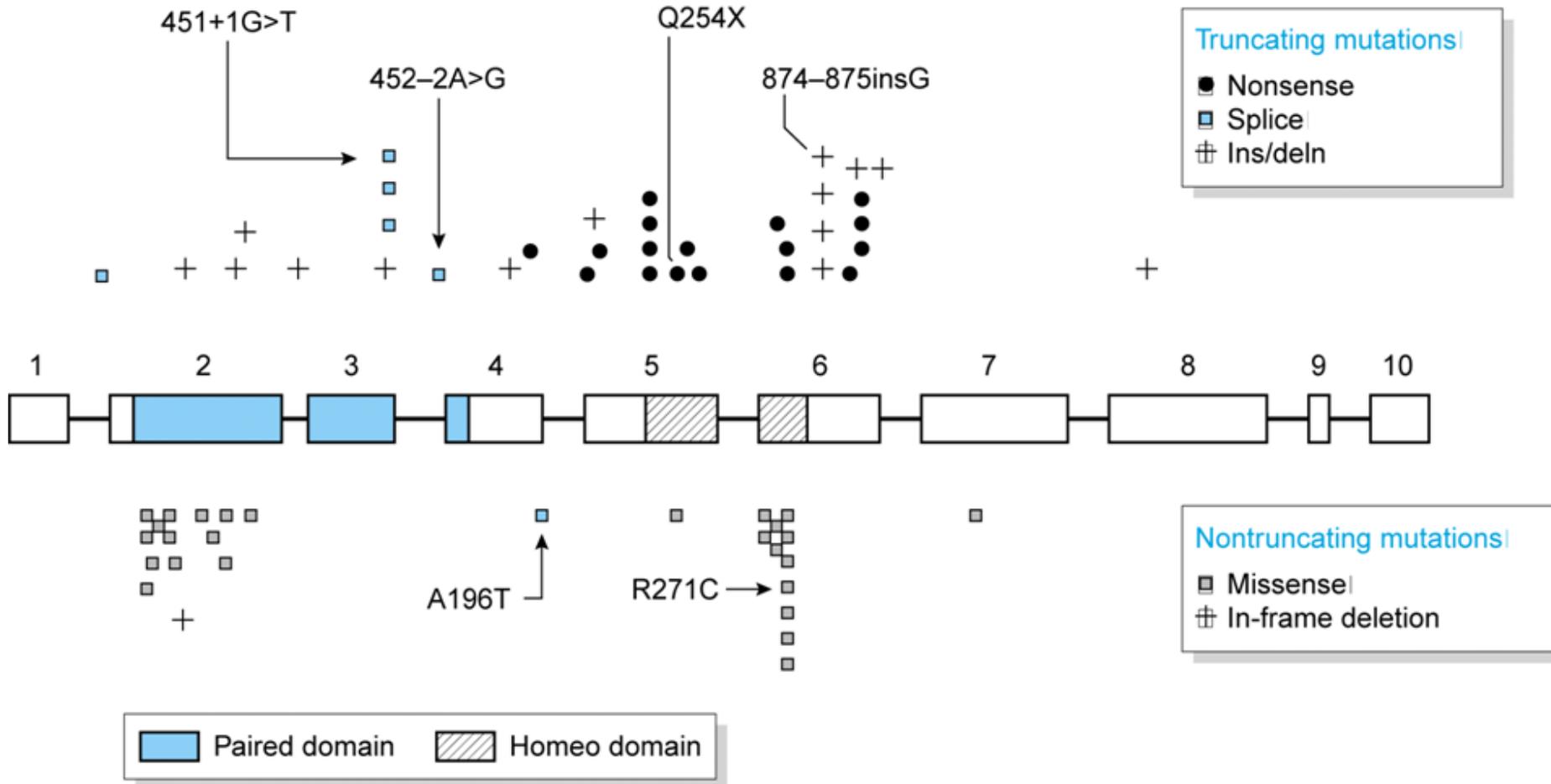
PAX3

Waardenburg



- **sordità bilaterale** (o deficit uditivo di vario livello)
- modifiche nella pigmentazione, sia dei capelli (albinismo parziale, in genere **piebaldismo**) sia della cute
- anomalie nello sviluppo dei tessuti derivati dalla cresta neurale
- lateralizzazione del canto mediale
- **eterocromia**, diverso colore degli occhi di solito uno marrone e l'altro blu

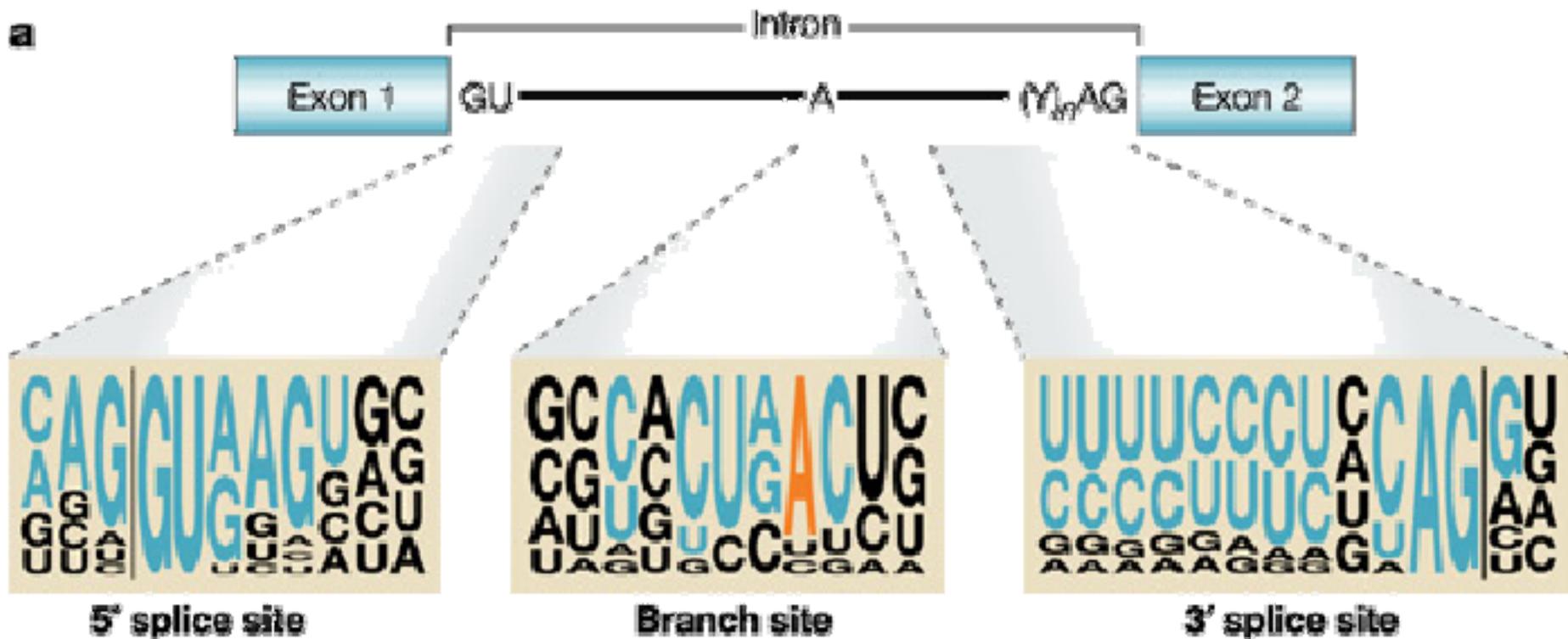
mutazioni eterozigoti di PAX3 Waardenburg



mutazioni frame-shift

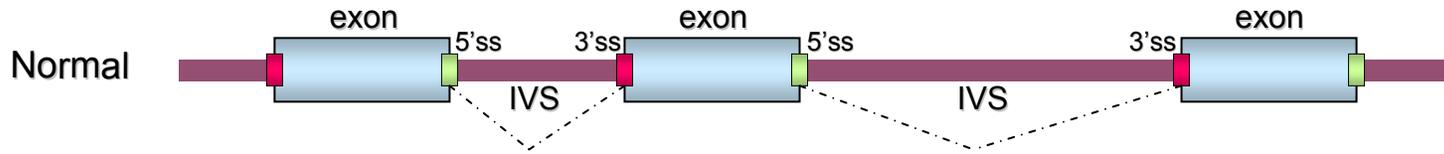
- Le mutazioni **frame-shift** o di slittamento del modulo di lettura consistono nell'inserzione o delezione di un numero di nucleotidi non divisibile per 3 (1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, ecc.) con conseguente sfasamento della cornice di lettura delle triplette dell'RNA messaggero.
- Questa mutazione determina la traduzione non corretta della proteina a valle della mutazione.

Motivi classici di splicing



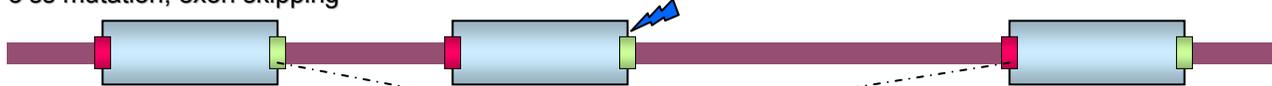
Nucleotidi intronici fiancheggianti

- inizio dell'introne: il numero dell'ultimo nucleotide dell'esone che precede, il segno + e la posizione nell'introne, ad esempio 77+1G, 77+2T, oppure quando il numero dell'esone è noto ed univoco IVS1+1G, IVS1+2T
- fine dell'introne: il numero del primo nucleotide del esone seguente, il segno – e la posizione a monte dell'esone, ad esempio 78-2A, 78-1G, oppure quando il numero dell'esone è noto ed univoco, IVS1-2A, IVS1-2G

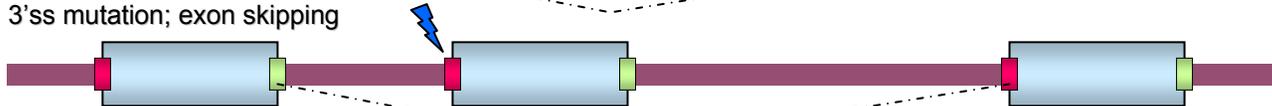


Splicing Abnormalities

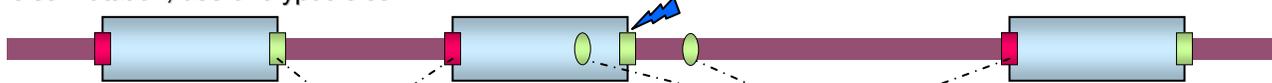
5'ss mutation; exon skipping



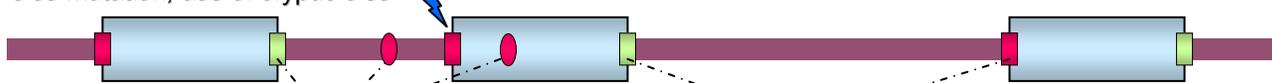
3'ss mutation; exon skipping



5'ss mutation; use of cryptic 5'ss



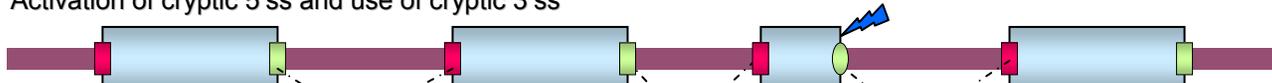
3'ss mutation; use of cryptic 3'ss



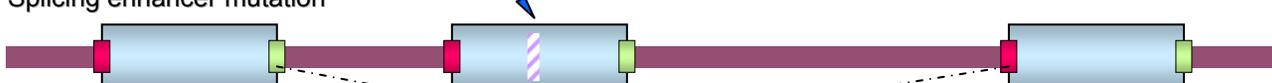
Activation of cryptic 5'ss



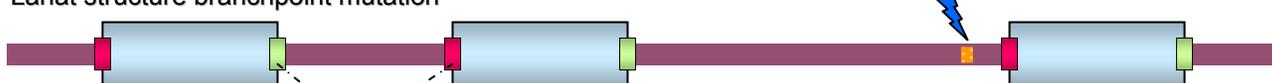
Activation of cryptic 5'ss and use of cryptic 3'ss



Splicing enhancer mutation

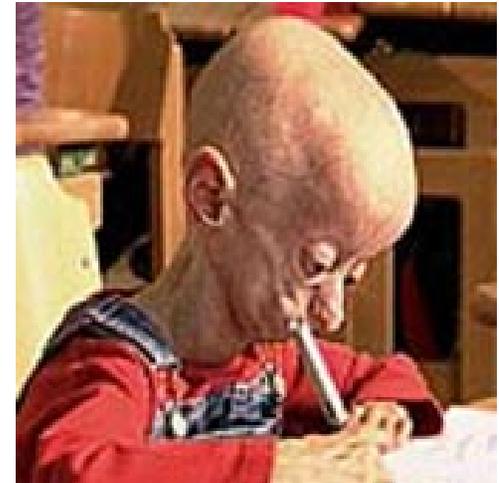


Lariat structure branchpoint mutation



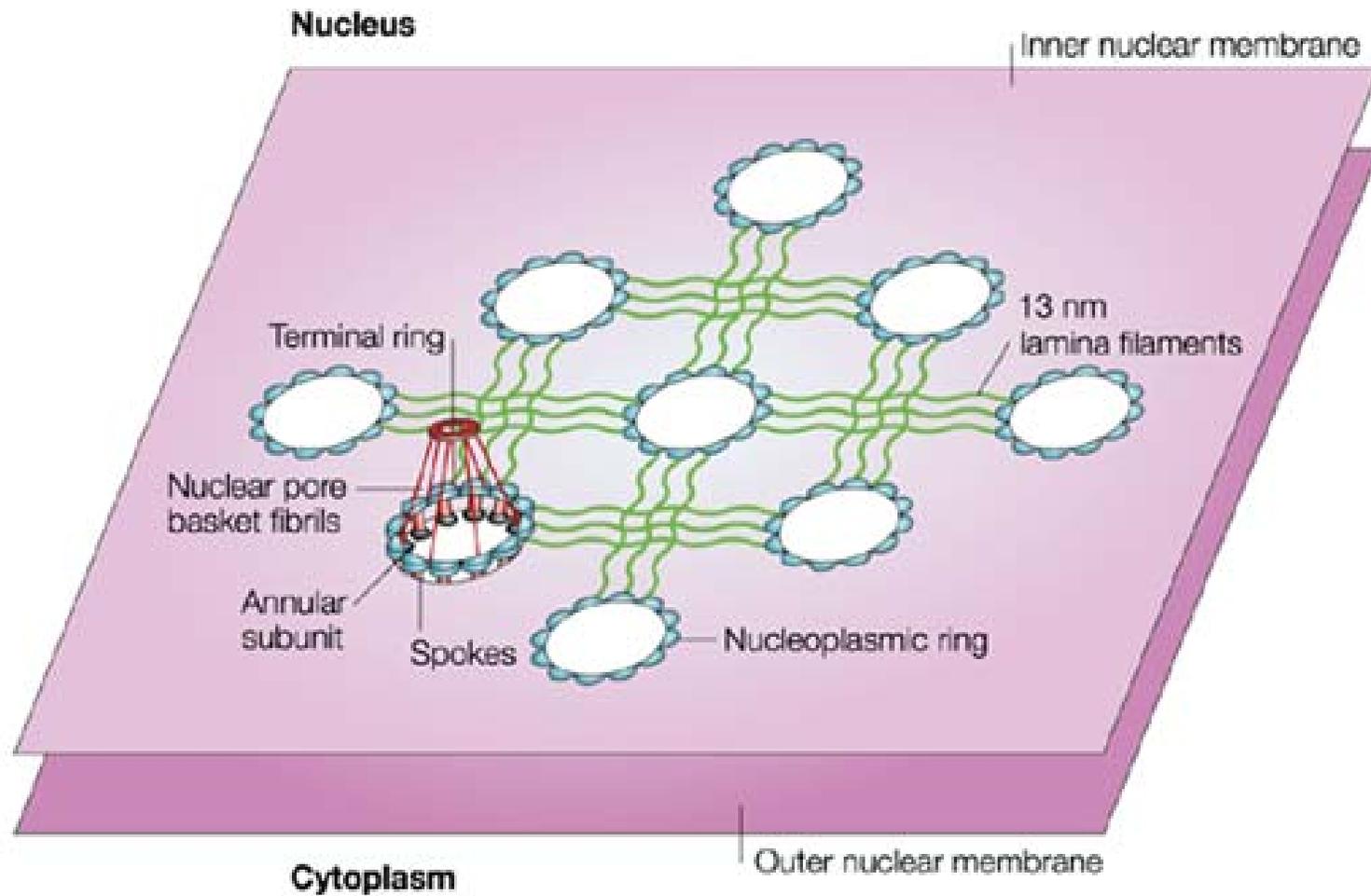
Progeria Hutchinson-Gilford

- invecchiamento precoce
- bassa statura, pelle rugosa
- calvizie, assenza di tessuto adiposo
- aterosclerosi ed infarto

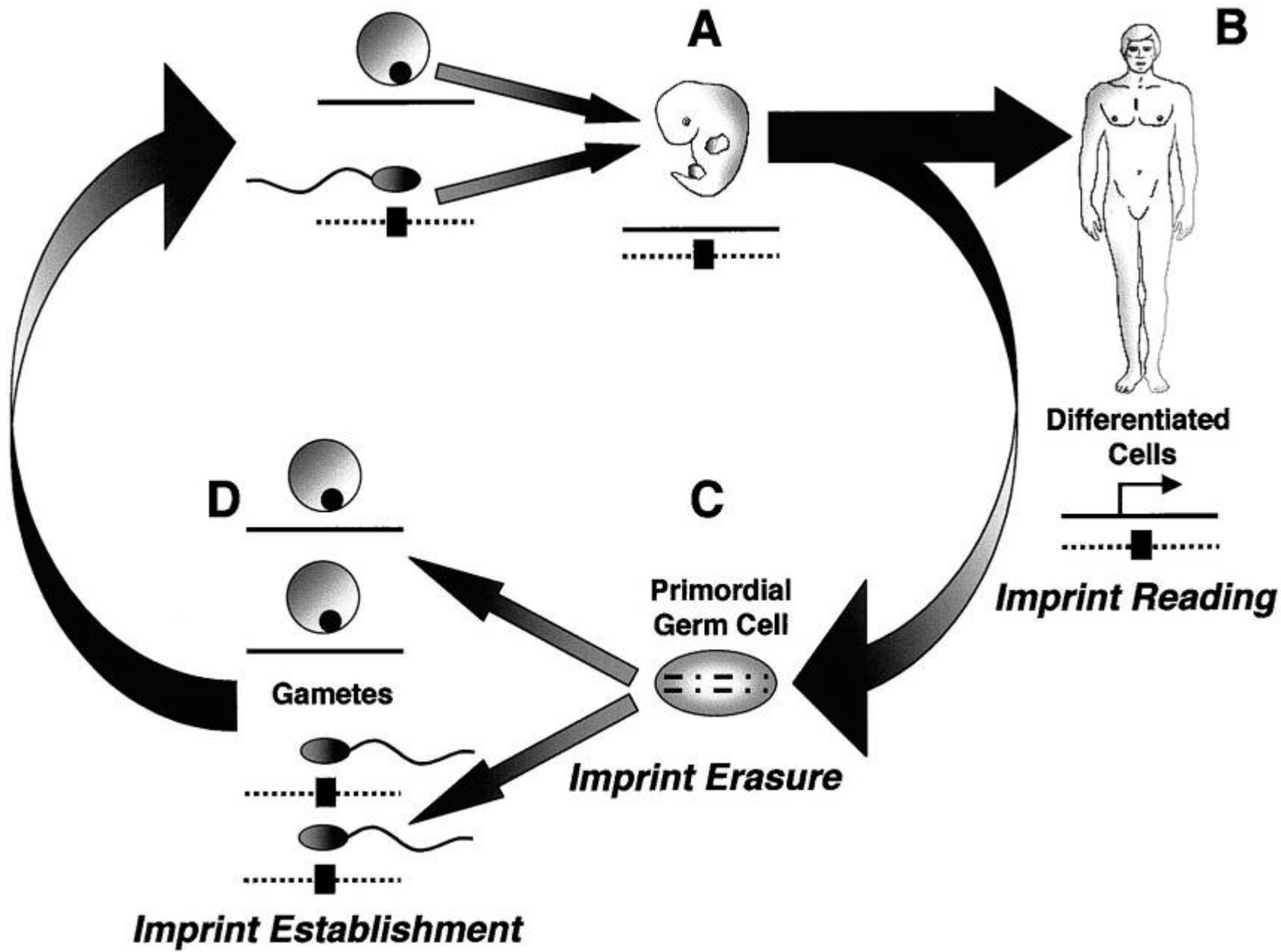


Progeria Hutchinson-Gilford

- nuova mutazione in eterozigosi del gene lamina A
- la mutazione è in eterozigosi
- *de novo*
- cromosoma 1q23
- La mutazione non cambia l'aminoacido glicina G608G, ma introduce un sito donore di splicing GGT che fa perdere 50 aminoacidi alla proteina
- sperimentazione con inibitori di farnesil-trasferasi



Imprinting



- Nelle cellule germinali primordiali l'imprinting viene cancellato del tutto e il DNA è demetilato
- Successivamente nella linea germinale maschile si determina un pattern di imprinting che in alcuni loci è complementare a quello della linea germinale femminile
- I cromosomi su cui avviene l'imprinting (7, 11, 15) manterranno questo pattern e lo riprodurranno ad ogni mitosi
- Si potranno sempre distinguere l'espressione genica del cromosoma materno e paterno

Disomia uniparentale

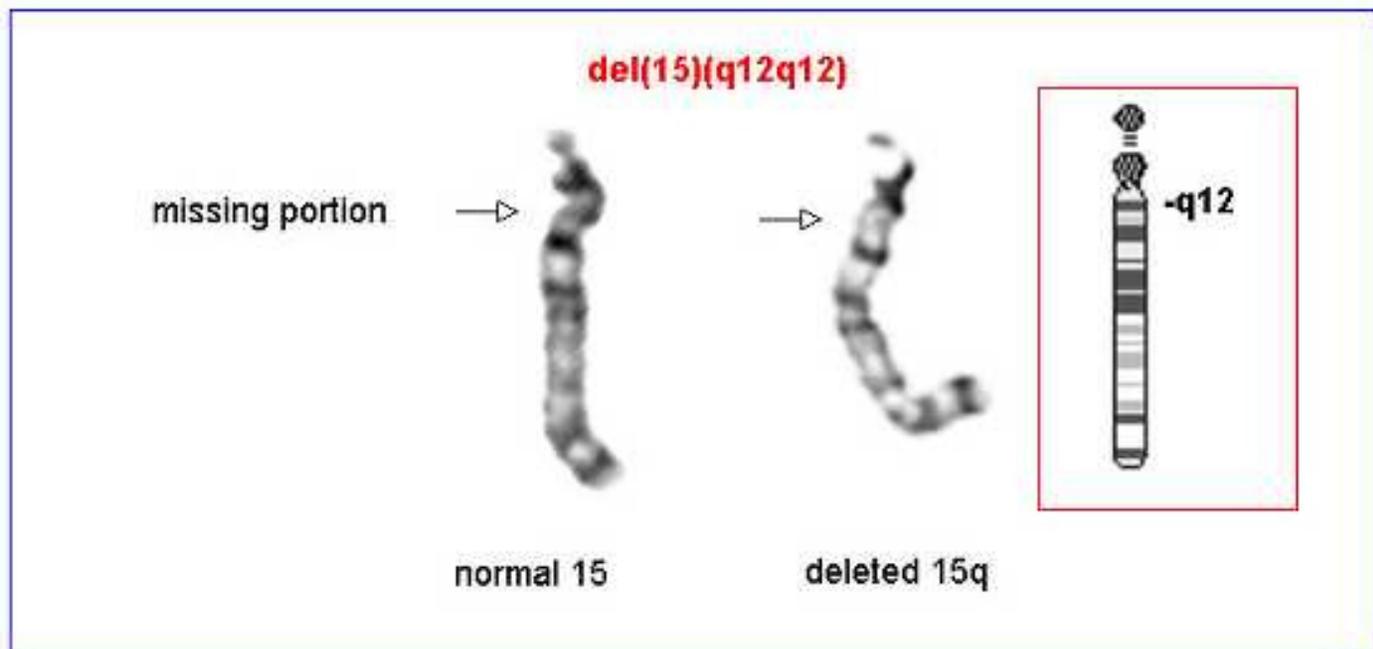
- Due copie dello stesso cromosoma sono ereditate dallo stesso genitore
- Spesso questo avviene attraverso un fenomeno transitorio di trisomia, seguito dalla perdita del cromosoma singolo e mantenimento del cromosoma doppio

Angelman

- 70% dei casi delezione della regione cromosomica 15q11-q13, che è soggetta al fenomeno dell'imprinting del cromosoma paterno
- Il gene materno (l'unico espresso) può essere alterato con 4 meccanismi noti:
 - delezione
 - disomia uniparentale paterna
 - difetti nell'imprinting
 - mutazioni a carico del gene UBE3A (ubiquitin ligasi)
- La diagnosi è clinica e il difetto genetico non si identifica nel 20% dei casi

PRADER WILLI OR ANGELMAN SYNDROME

del(15q12)



Angelman

- "happy puppet syndrome" si può identificare in Cucciolo (Dopey) "addormentato", il più giovane dei nani che non ha mai imparato a parlare
- ritardo mentale con assenza del linguaggio, difficoltà nell'equilibrio, eccessivo buon umore





Angelman

- L'incidenza è 1/20.000 nati
- crisi epilettiche e comunque alterazioni dell'EEG e microcefalia relativa



Prader-Willi

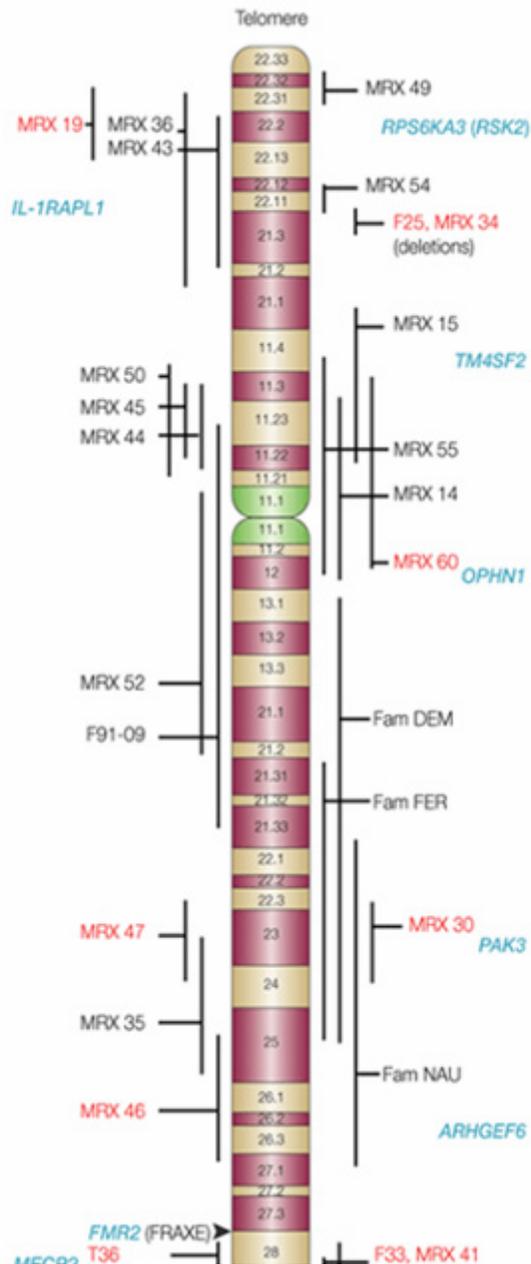
- iperfagia>obesità
- eccessiva assunzione di liquidi
- reazioni abnormi ai sedativi
- acromicria, criptorchidismo
- insensibilità al dolore, lesioni cutanee
- sbalzi di umore

Prader-Willi

1/15.000



Mutazioni dinamiche



Circa il 2% della popolazione ha un IQ<70 (ritardo mentale)

il 15-20% di tutti I ritardi mentali sono attribuibili a geni del cromosoma X

Il ritardo mentale legato al cromosoma X (XLMR) è geneticamente eterogeneo con 202 loci responsabili di forme che si sovrappongono clinicamente

46 geni sono stati a tutt'oggi identificati

il locus che contribuisce alla frazione maggiore causa la sindrome di Martin-Bell, oggi nota come

sindrome dell'X fragile

X fragile



ritardo mentale: IQ tra 20 e 70

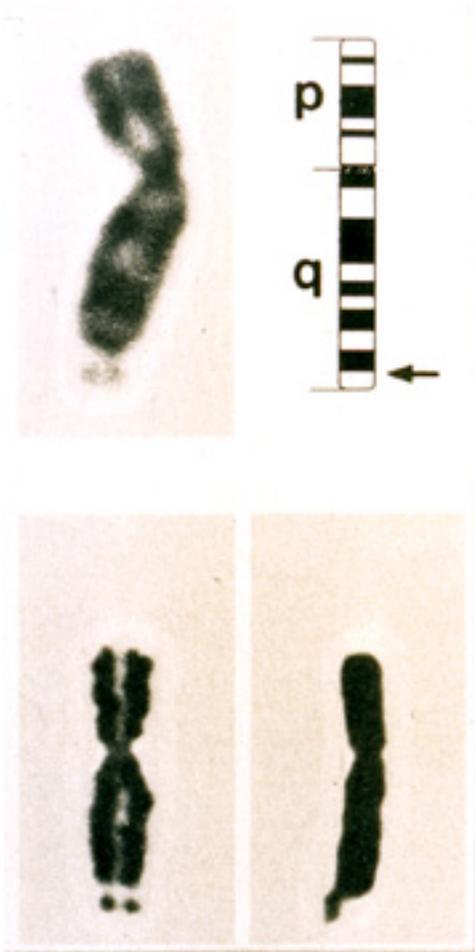
- deficit di memoria a breve termine di informazioni complesse
 - ritardo nel linguaggio
 - ridotte abilità visuo-spaziali
 - ipersensibilità agli stimoli
 - iperattività con deficit di attenzione
 - comportamento autistico
-
- **Macrocefalia con fronte, mento e orecchie sporgenti**
 - **Macroorchidismo (<30ml) dopo la pubertà**
 - **Anomalie connettivali: prollasso della mitrale, lassità articolare, piede piatto**
 - **Disfunzioni ipotalamiche?**



Nel 1969 Lubs osservò una costrizione (marker X) sul braccio lungo del cromosoma X in quattro maschi affetti e tre carriers obbligate della stessa famiglia



Il sito fragile a Xq27.3



rottura o costrizione dei cromosomi in metafase che insorge quando le cellule sono esposte ad una perturbazione della replicazione del DNA

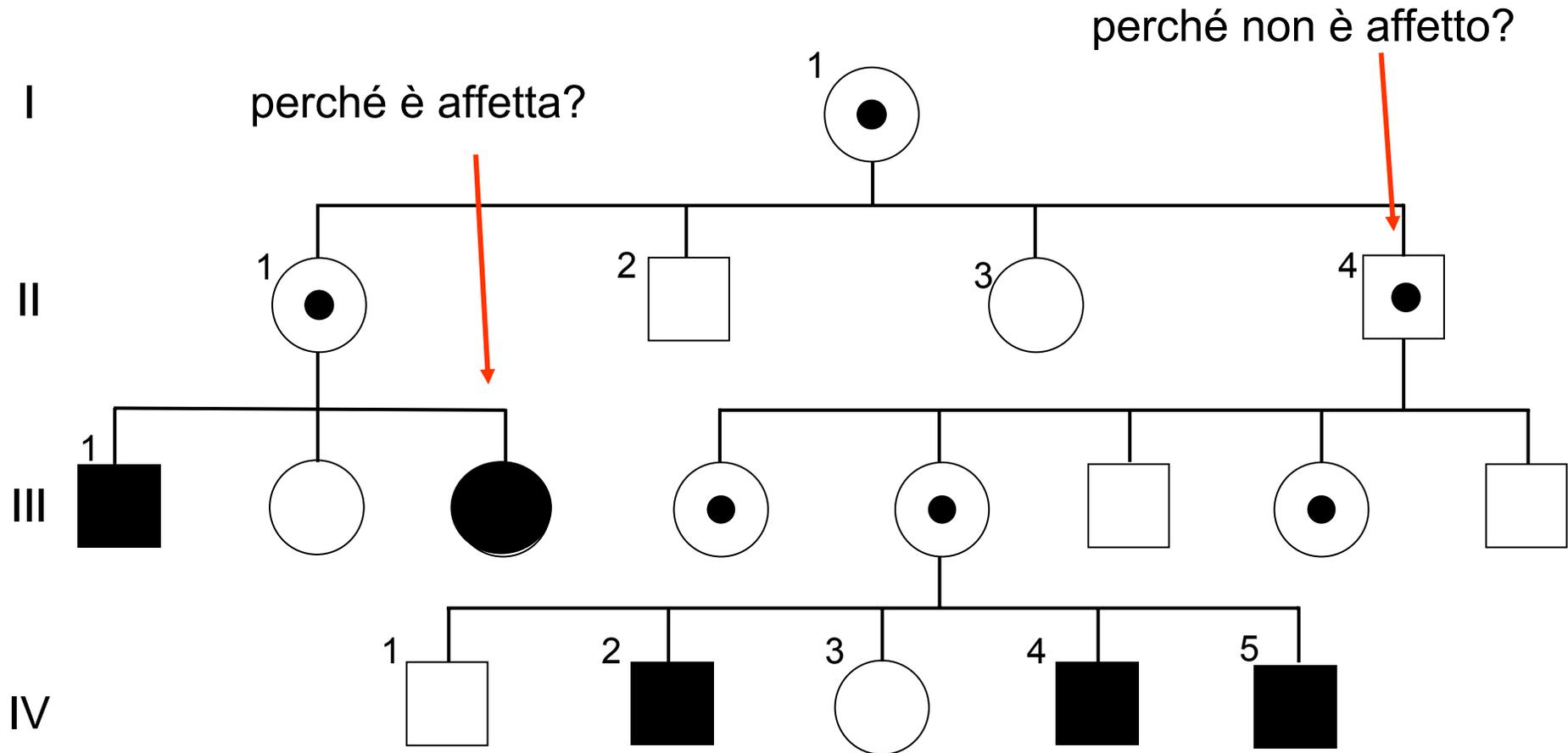
siti fragili sono su tutti i cromosomi e prendono il nome della banda cromosomica, es fra(X)(q27.3)

la nomenclatura HUGO chiama questo sito FRAXA, cioè il primo sito fragile identificato sul cromosoma X

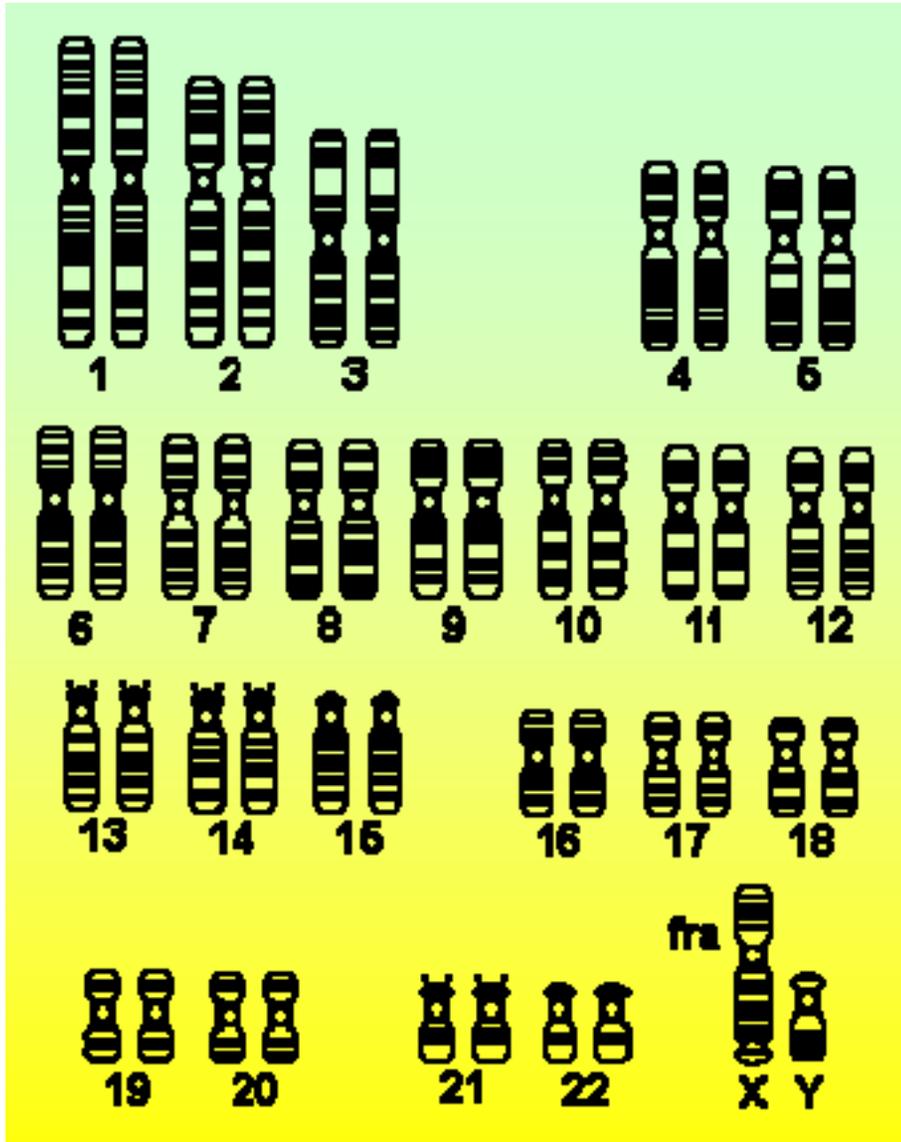
Segregazione, paradosso di Sherman

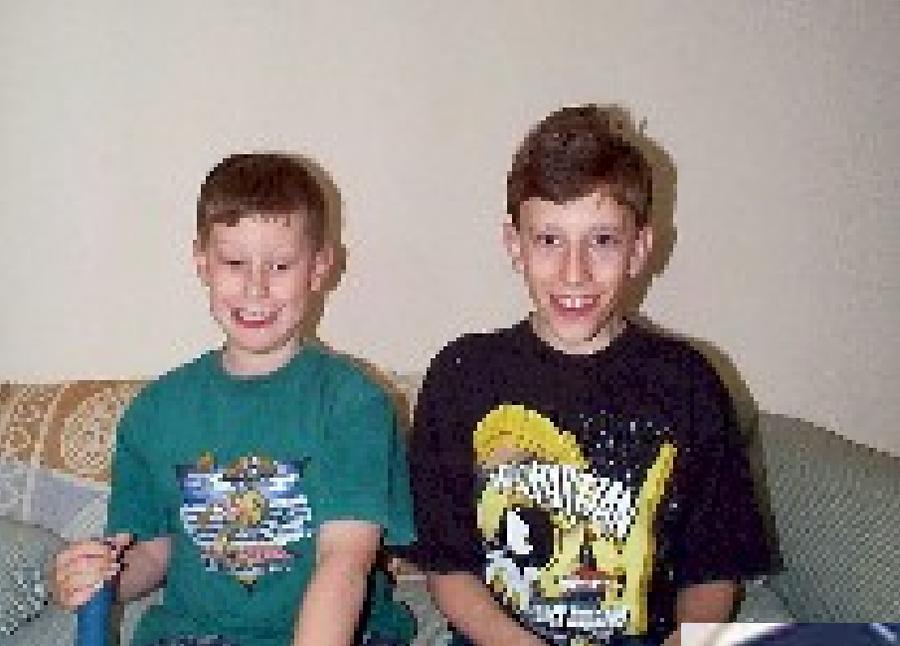
Il 20% dei maschi che portano l'allele mutato sono normali (NTM)

Il 30% delle carrier presenta ritardo mentale

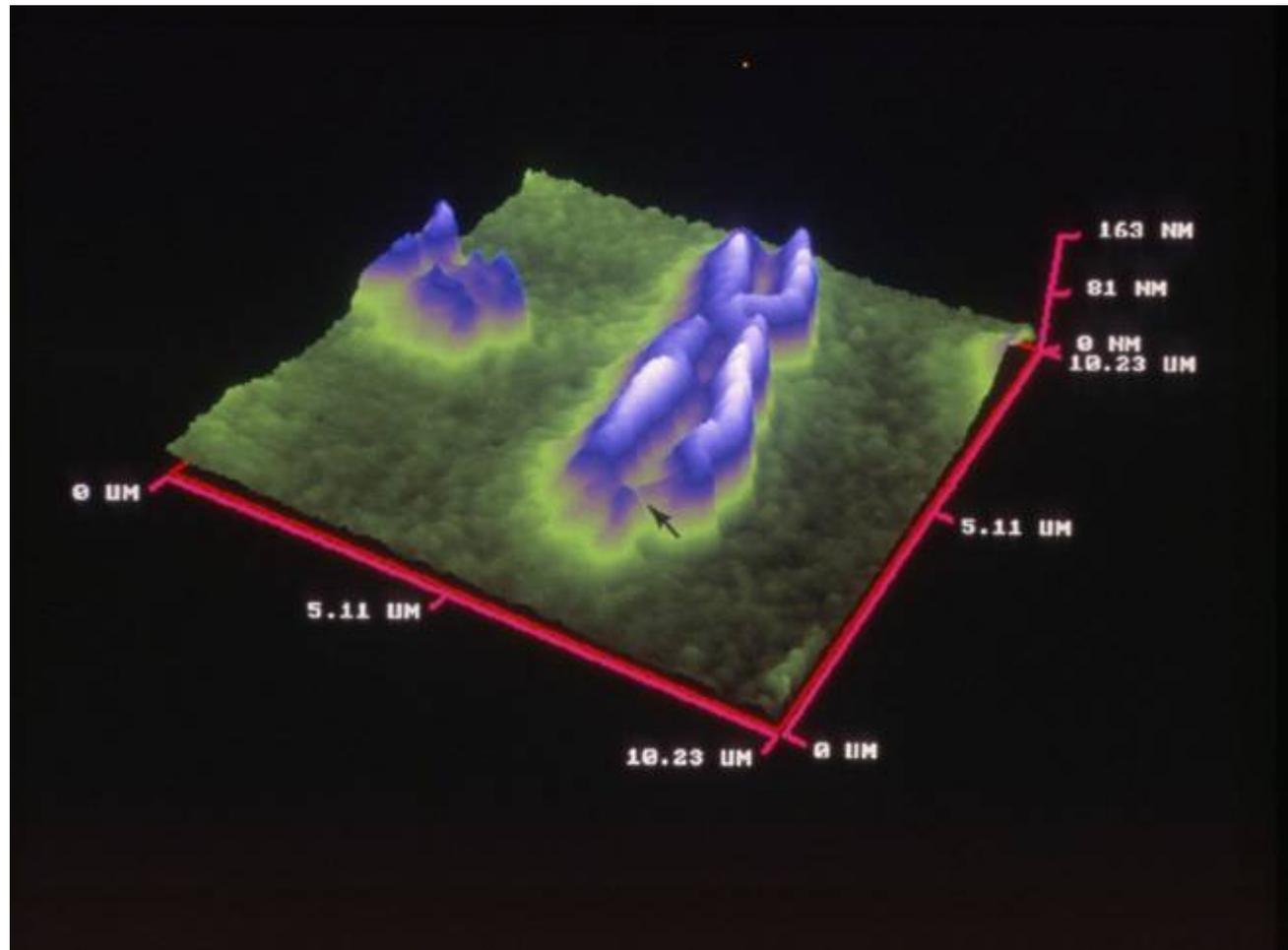


Fragile X syndrome

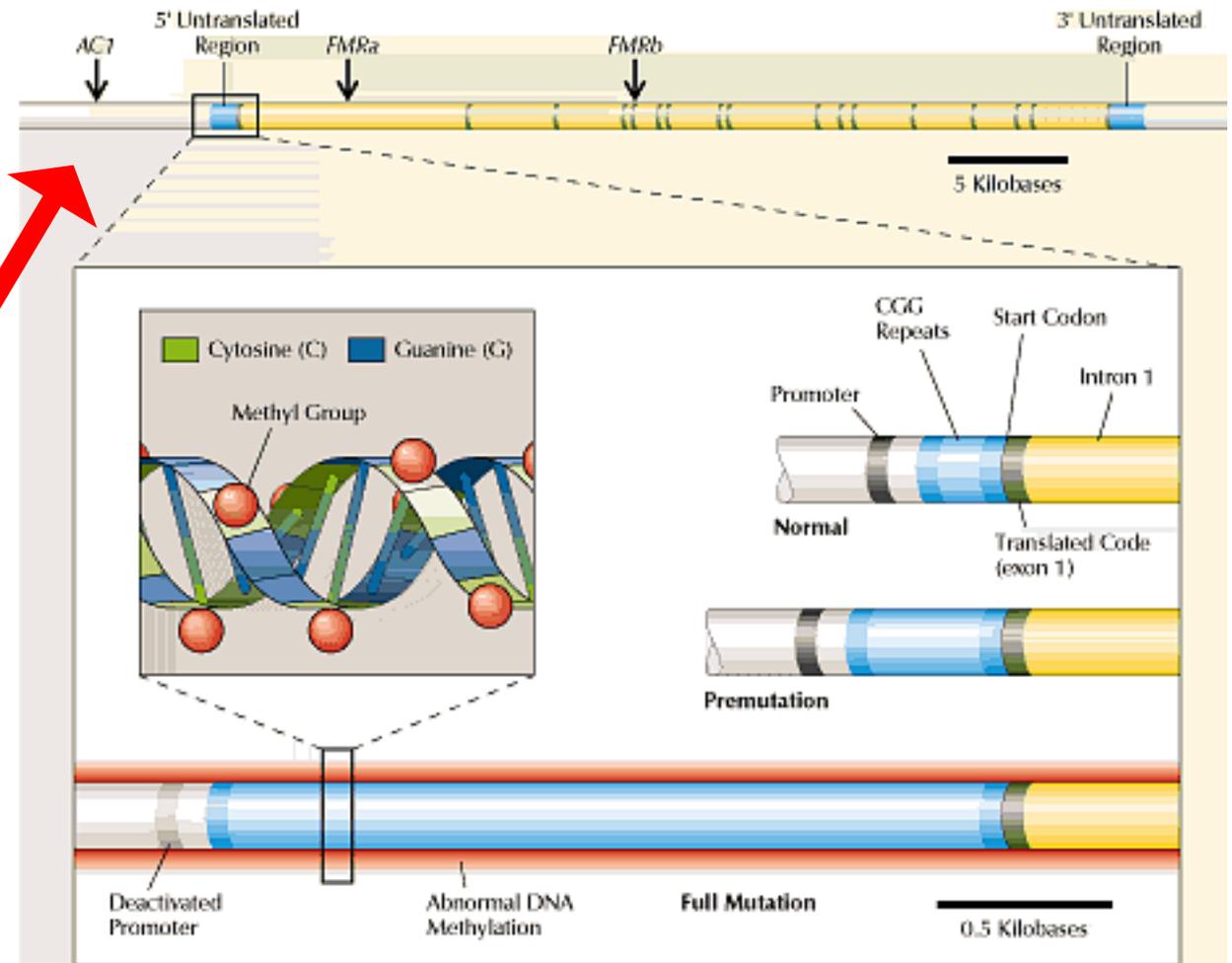
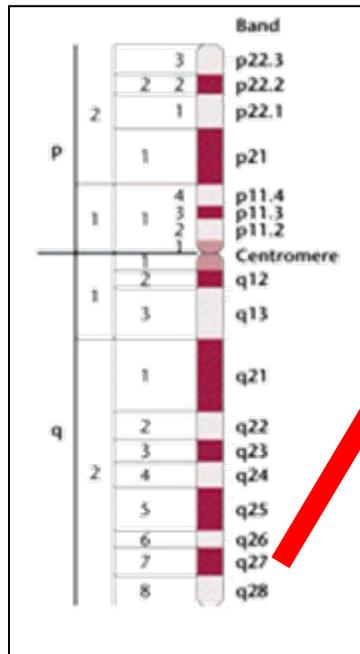


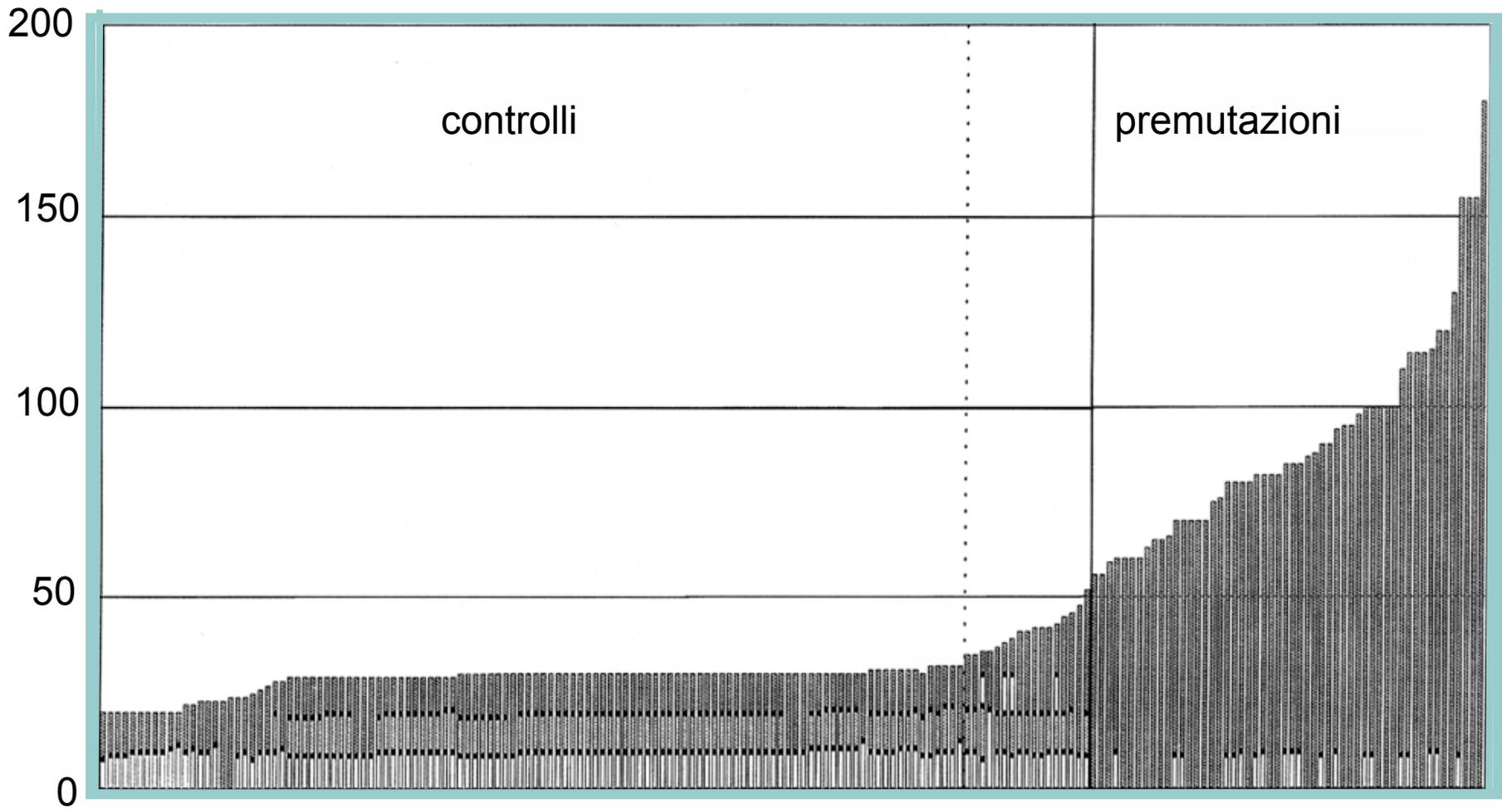


X fragile al microscopio a forza atomica

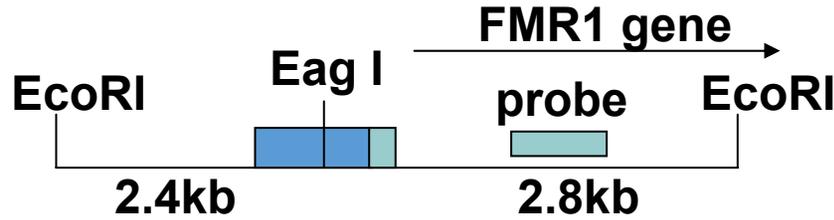


II gene FMR

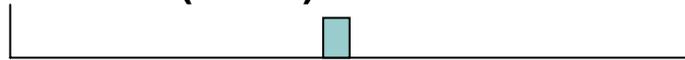




CpG island/5' UTR

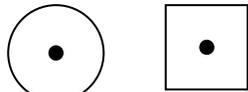


(CGG) ~ 6 to 50

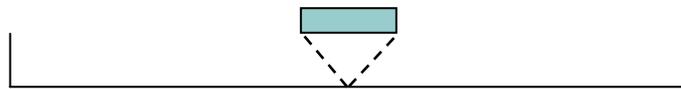


allele normale:

stabile nella famiglia e nell'individuo, instabile nella popolazione (polimorfismo)

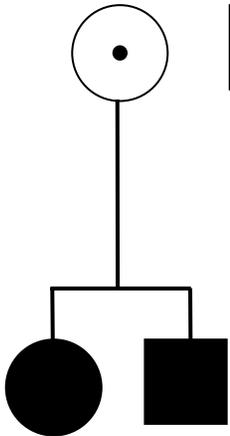


(CGG) 59 to ~ 200

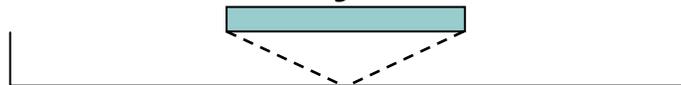


premutazione:

instabile nella famiglia, stabile nell'individuo



(CGG) > 250
Methylation

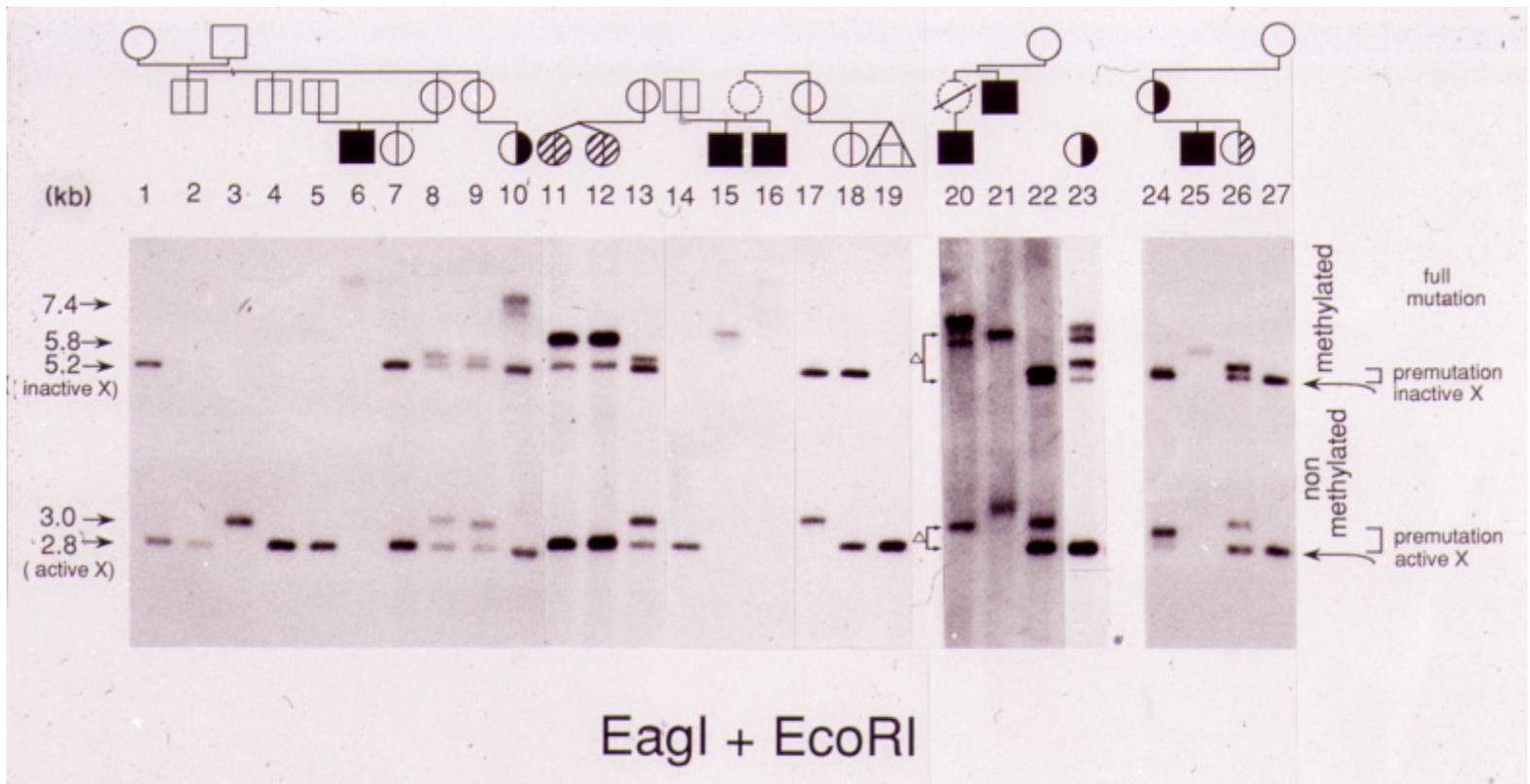


mutazione piena:

instabile nell'individuo (mutazioni somatiche)

reprime la trascrizione di FMR1

diagnosi di X Fragile : analisi mediante Southern blot di espansione e metilazione



Rousseau et al. NEJM 1991

Premutazioni e mutazioni

- Le premutazioni si espandono quando sono trasmesse dalla madre
- La donna con premutazioni ha un maggiore rischio di menopausa precoce POF (premature ovarian failure)
- Il più corto allele descritto che in una sola generazione è diventato mutazione piena è di 59 triplette

Espansione stabile (CGG)9-AGG-(CGG)9-AGG-(CGG)9

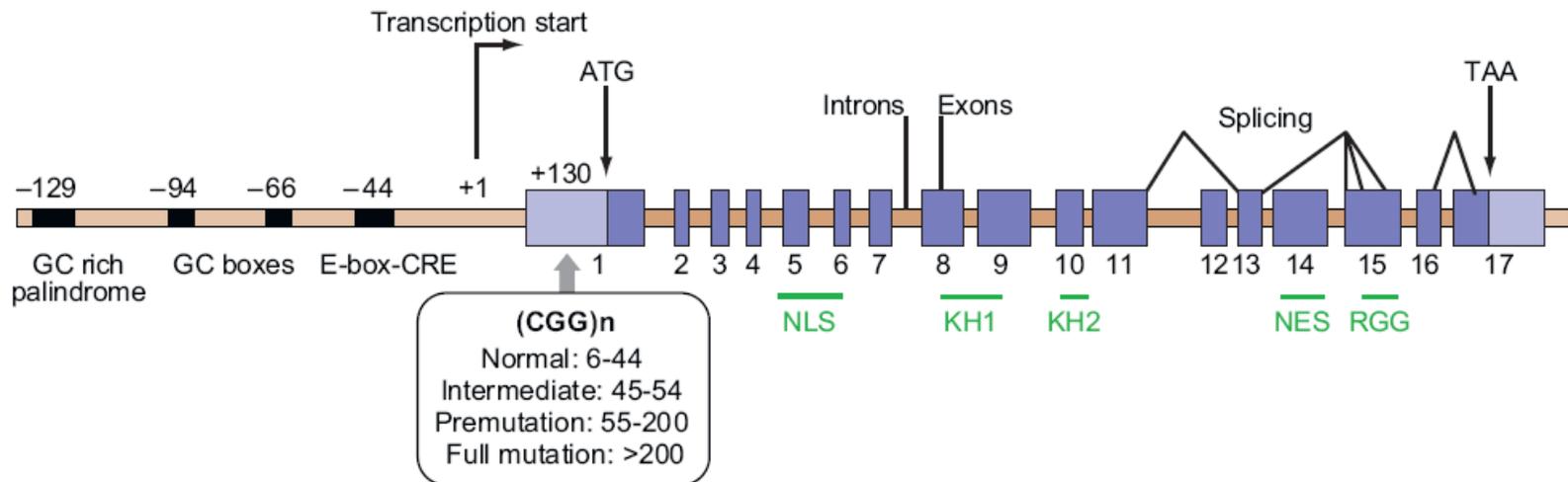
Ha almeno 2 A che interrompono la serie di 9 triplette

Espansione instabile (CGG)9-(CGG)9-(CGG)9- (CGG)9.....

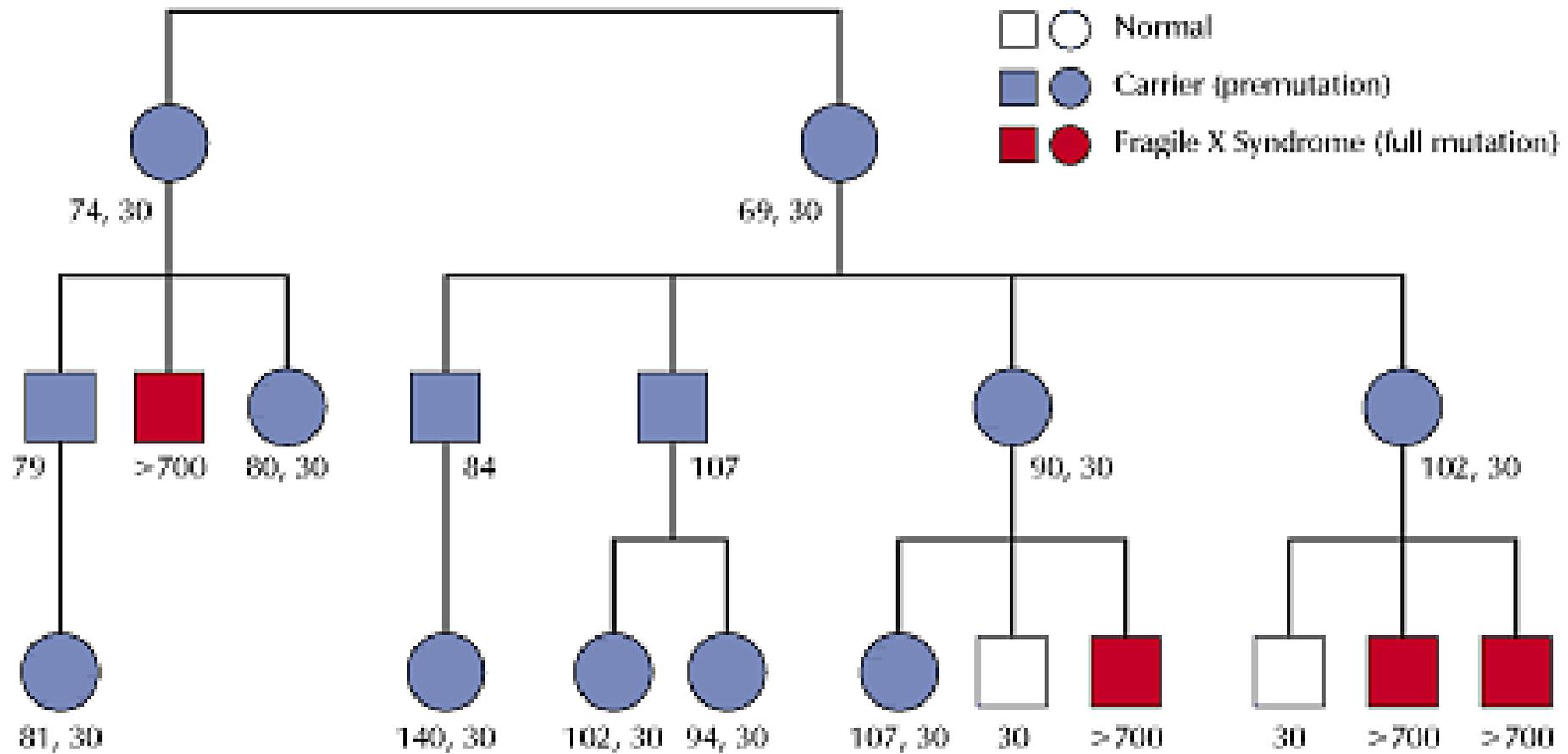
NON ha A che interrompono la serie

Il gene FMR1 (fragile X mental retardation 1) è all'interno di deserto genico: quindi il fenotipo NON è da geni contigui

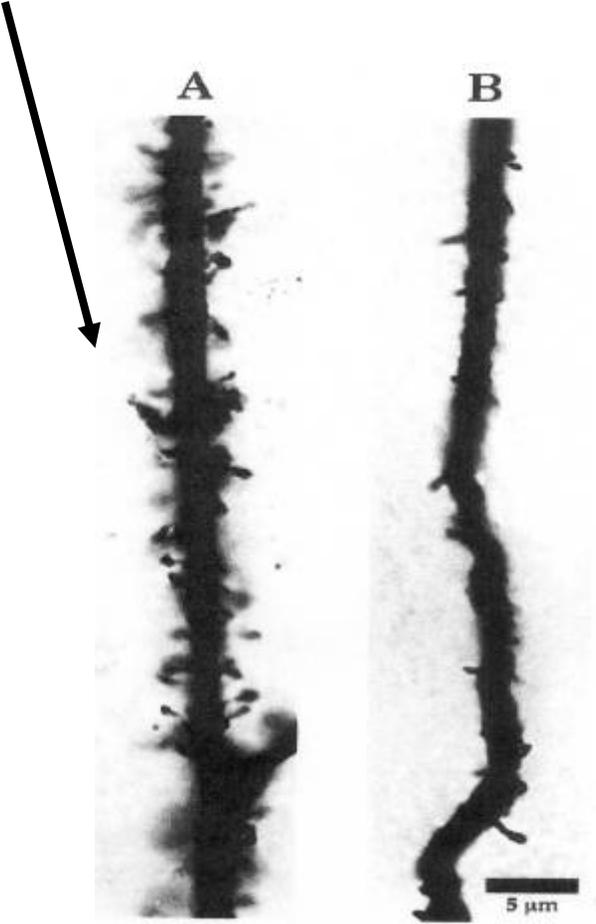
Mutazioni puntiformi o delezioni di FMR1 causano un fenotipo identico alle espansioni e questo dimostra che il ruolo del gene non è importante nelle prime fasi dello sviluppo, quando le triplette non sono ancora metilate



Trasmissione X fragile



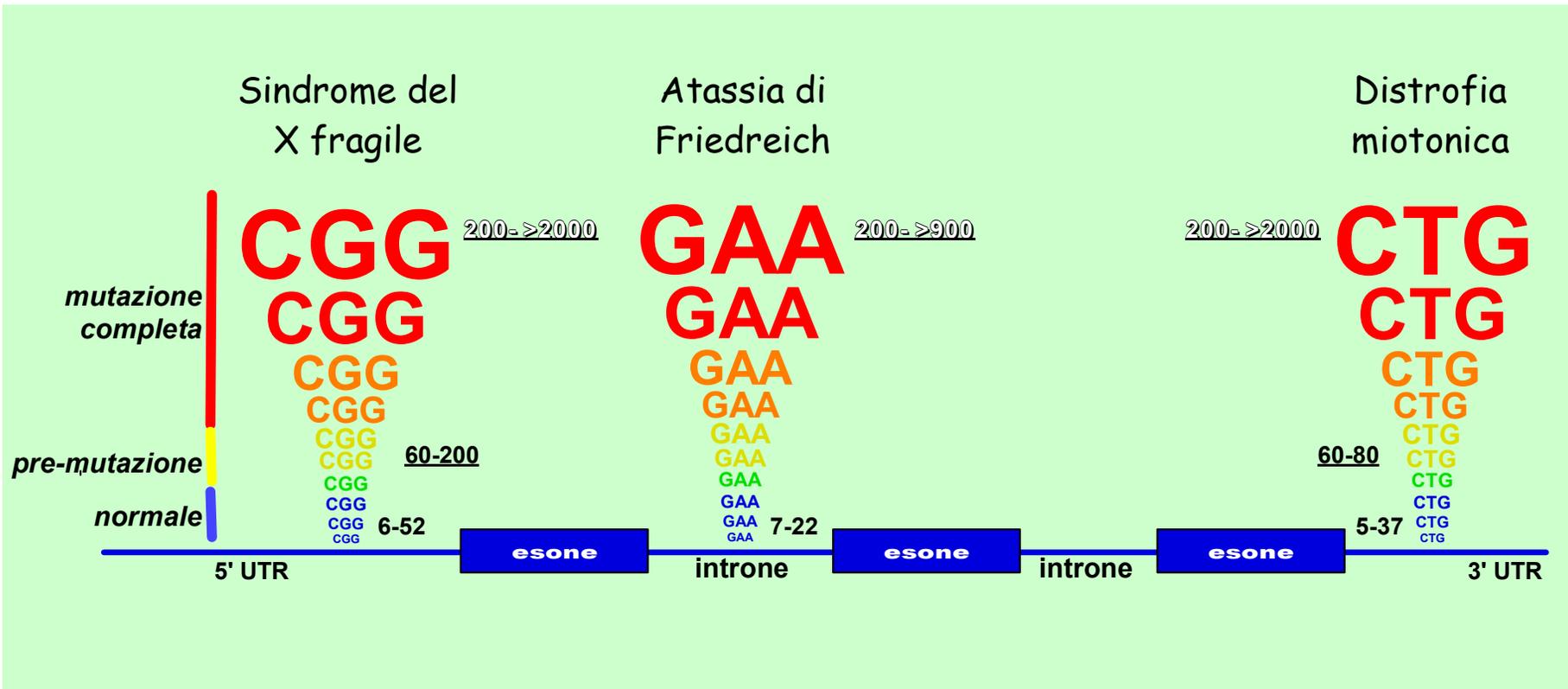
Spine dendritiche nel neocortex lunghe ed immature anche nel topo KO



Malattie da triplette ripetute

Disease	Gene Locus/Protein	Repeat	Location
Fragile X syndrome	Xq27.3/FMR-1 protein	CGG	Noncoding
Fragile XE syndrome	Xq28/FMR-2 protein	GCC	Noncoding
Friedreich ataxia	9q13-9q21.1/frataxin	GAA	Noncoding
Myotonic dystrophy 1	19q13/myotonic dystrophy protein kinase	CTG	Noncoding
Myotonic dystrophy 2	3q21	CCTG	Noncoding
Spinobulbar muscular atrophy	Xq13-Xq21/androgen receptor	CAG	Coding
Huntington disease	4p16.3/huntington	CAG	Coding
Dentatorubralpallidoluysian atrophy	12p13.31/atrophin-1	CAG	Coding
SCA type 1	6p23/ataxin-1	CAG	Coding
SCA type 2	12q24/ataxin-2	CAG	Coding
SCA type 3 (Machado-Joseph disease)	14q32.1/ataxin-3	CAG	Coding
SCA type 6	19p13/ α -1A (voltage-dependent calcium channel subunit)	CAG	Coding
SCA type 7	3p12-3p13/ataxin-7	CAG	Coding
SCA type 8	13q12/none identified	CTG	?
SCA type 12	5q31-5q33	CAG	Noncoding

Malattie da triplette ripetute non codificanti



anticipazione nella distrofia miotonica



distrofia miotonica DM1

- fenomeno “miotnico”, difficoltà al rilasciamento muscolare dopo una contrazione
- ipotonia al volto, non debolezza importante
- cataratta precoce
- alterazioni ritmo cardiaco
- disfunzione tiroidea
- trasmissione autosomica dominante (1/8000)
- forma congenita con grave ipotonia neonatale

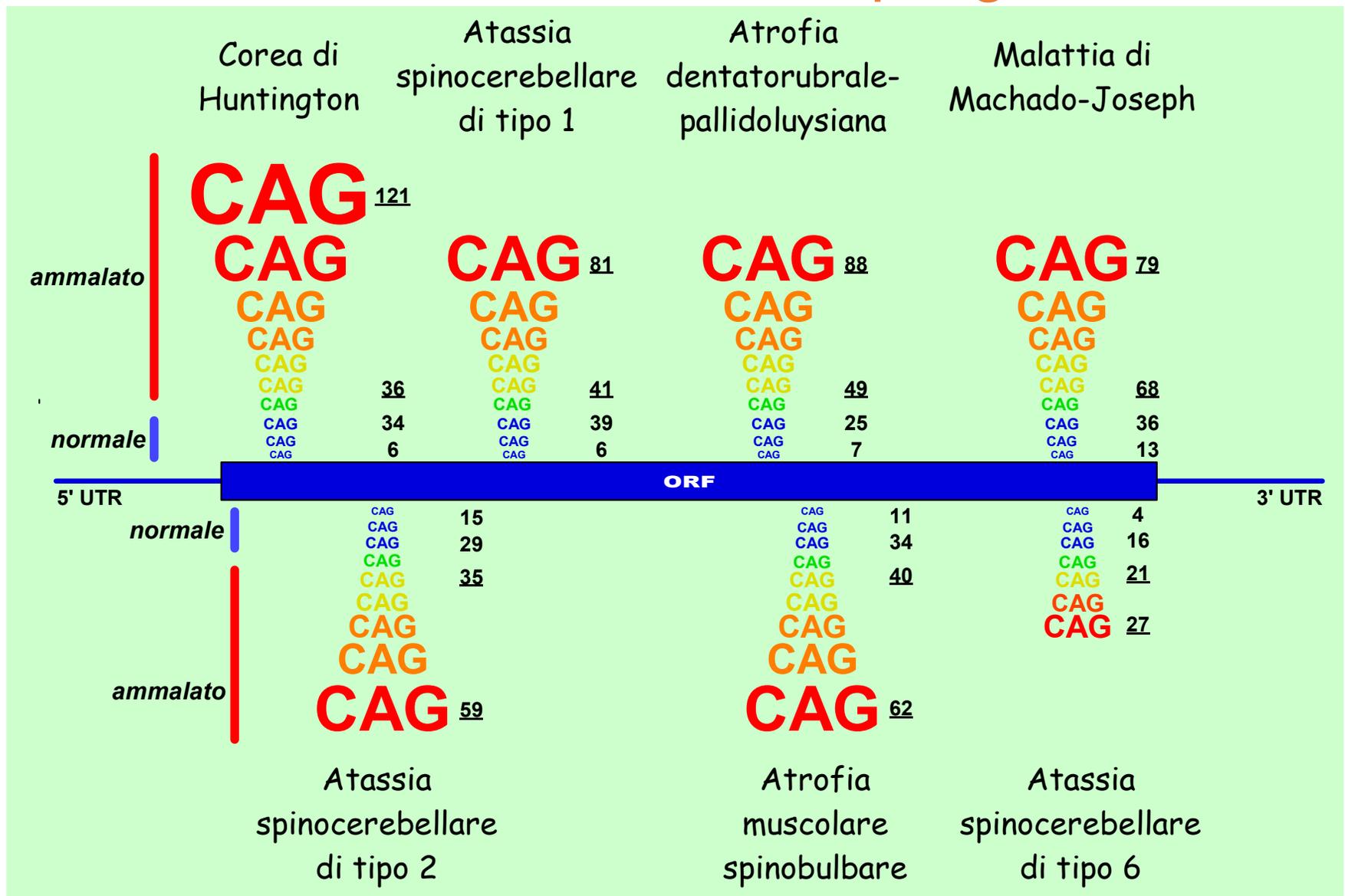
distrofia miotonica DM1

- La distrofia miotonica di Steinert è la più comune distrofia muscolare dell'adulto
- è causata da un'espansione CTG nel 3'UTR del gene DMPK (nell'RNA CUG) a 19q13.3
- presenta eredità autosomica dominante con anticipazione
- sono state identificate RNA binding proteins che interagiscono con l'espansione CUG

distrofia miotonica DM2

- cromosoma 3p21
- un'espansione simile nell' introne 1 di un repeat CCUG nel gene ZNF9 (zinc finger protein 9) causa la distrofia miotonica 2
- la DM2 è detta anche distrofia miotonica prossimale

Malattie da triplette ripetute di poliglutammina



Còrea di Huntington

- descritta da George Huntington nel 1872, è detta anche còrea che in greco indica la danza
- alla base vi è una degenerazione programmata geneticamente dei neuroni dei gangli basali (nuclei caudato e pallido) e della corteccia
- prevalenza di 1/10,000 e presenta il fenomeno dell'anticipazione
- si trasmette nel 97% dei casi come carattere autosomico dominante associato al gene huntingtina sul cromosoma 4p16.3
- solo il 3% dei casi è dovuto a nuove mutazioni
- un'espansione dinamica della tripletta CAG che codifica per la glutammina

quante glutammine?

- fino a 28 = numero max di CAG per un soggetto non a rischio
- 29 - 39 CAG la malattia si potrebbe presentare alla generazione successiva (premutazione)
- oltre 39 CAG il soggetto è considerato affetto anche se la patologia non si è ancora manifestata
- il test è in grado di prevedere che la patologia si manifesterà in futuro
- l'esecuzione in soggetti sani solleva problemi di natura etica