

# **Genetica Medica corsi di laurea triennali**

---



**Prof. Vincenzo Nigro**  
Genetica Medica 1° anno, II semestre



Dipartimento di Patologia Generale,  
Seconda Università degli Studi di Napoli

# programma del corso di genetica medica

---

1. Organizzazione del genoma umano e dei cromosomi: geni, introni, esoni, splicing
  2. Le variazioni nella sequenza del DNA: sequenze ripetute, varianti e polimorfismi, SNP e CNV
  3. L'estrazione e la manipolazione del DNA, gli enzimi di restrizione, il Southern blot, la PCR
  4. Le tecniche per identificare mutazioni note: l'ARMS, l'MLPA, FISH
  5. Le tecniche di sequenziamento Sanger ed NGS, la NIPT
  6. L'analisi genomica generale: cariotipo, CGH array, il sequenziamento dell'esoma con NGS
  7. Gli alberi genealogici, penetranza ed espressività, anticipazione
  8. La consulenza ed i test genetici: le sindromi ed i meccanismi di trasmissione
  9. Classi di variazioni: sostituzioni, indel, delezioni, duplicazioni, inserzioni, inversioni, traslocazioni
  10. Effetti di allele: equivalente, amorfico, ipomorfico, ipermorfico, neomorfico, antimorfico
  11. Monosomie e trisomie autosomiche (16, Down, Edwards, Patau), il mosaismo
  12. Trisomie degli eterocromosomi (Klinefelter, tripla X e XYY) e monosomia X (Turner)
- 
13. Triploidia, imprinting e disomia uniparentale
  14. Traslocazioni sbilanciate e bilanciate, robertsoniane e rischio riproduttivo
  15. Eterogeneità clinica e genetica, aploinsufficienza
  16. Delezioni submicroscopiche (Williams, di George, Smith-Magenis)
  17. Imprinting (Angelman, Prader-Willi, Silver-Russel)
  18. Malattie genetiche da sostituzioni *de novo*: acrondroplasia, craniosinostosi, Waardenburg, progeria
  19. Eredità autosomica dominante: Neurofibromatosi, Marfan
  20. Malattie genetiche legate al cromosoma X: Distrofie Muscolari di Duchenne e Becker, Emofilia, sindrome di Rett
  21. Eredità autosomica recessiva: Fibrosi Cistica, LGMD, Atassia di Friedreich, SMA, Talassemie
  22. Mutazioni dinamiche: X fragile, corea di Huntington, SCA, distrofia miotonica
  23. Malattie ad eredità mitocondriale
  24. Malattie multifattoriali

# Testi consigliati

- Moncharmont  
**Patologia Generale (3 capitoli genetica)**  
Editore Idelson Gnocchi
- Da Trattato Italiano di Medicina di Laboratorio vol IX  
Diagnostica molecolare: **Genetica**  
Editore Elsevier Masson
- Strachan-Read  
**Genetica Molecolare Umana**  
Editore Zanichelli
- Sito web <http://www.vincenzonigro.it> (**glossario**)



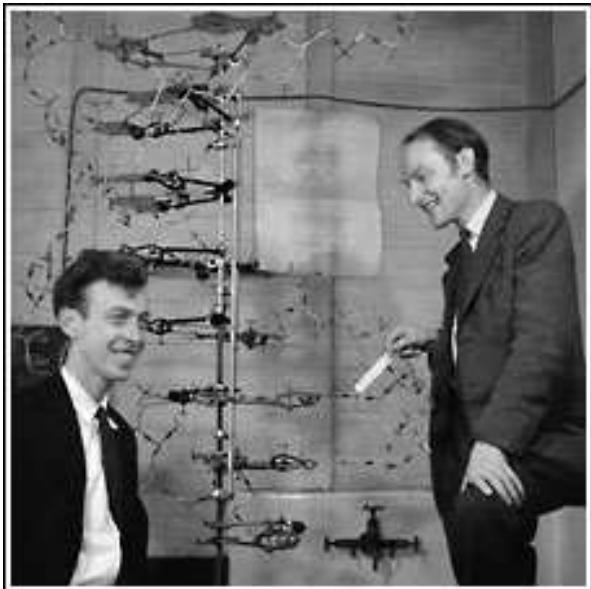
1953

# Genoma

1953



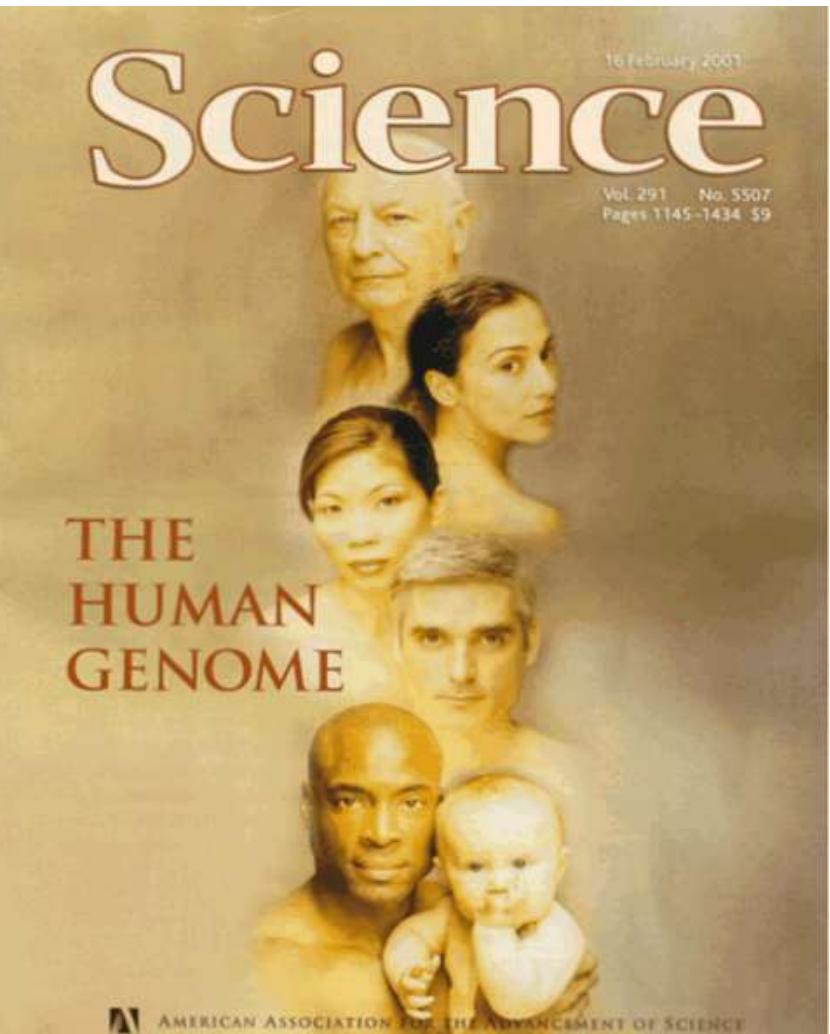
2003



2001

- Il genoma è l'intero patrimonio genetico di un organismo vivente
- Si può paragonare ad un'enorme enciclopedia in cui sono contenute le istruzioni che regolano lo sviluppo e il funzionamento dell'organismo
- La grandezza totale del genoma umano aploide è di 3.070.000.000 basi di cui 2.843.000.000 sono di eucromatina
- Il DNA è identico per tutte le cellule di un individuo ed è contenuto quasi tutto nel nucleo, con l'eccezione del DNA mitocondriale

# tutto il codice genetico è stato letto!



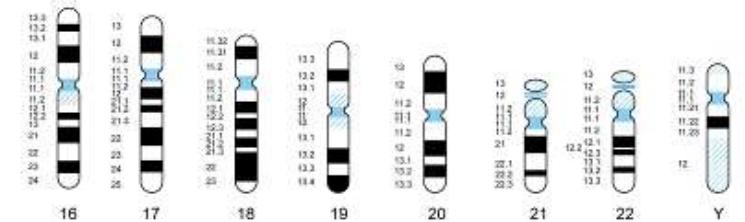
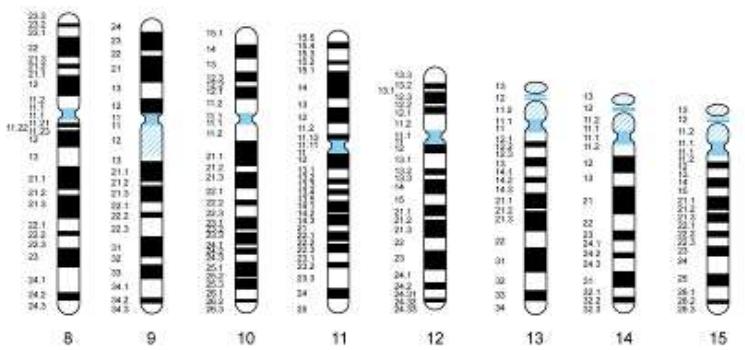
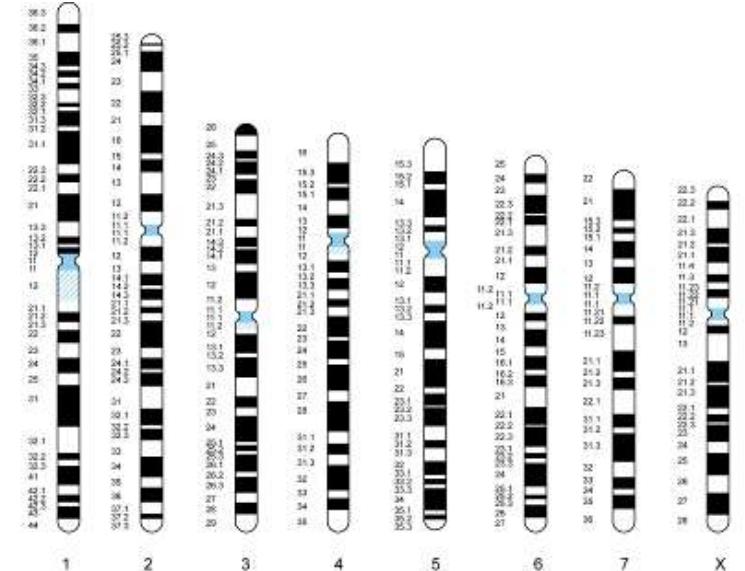
# Il genoma umano: pagina 1

**555.000 pagine**

555.000 pagina



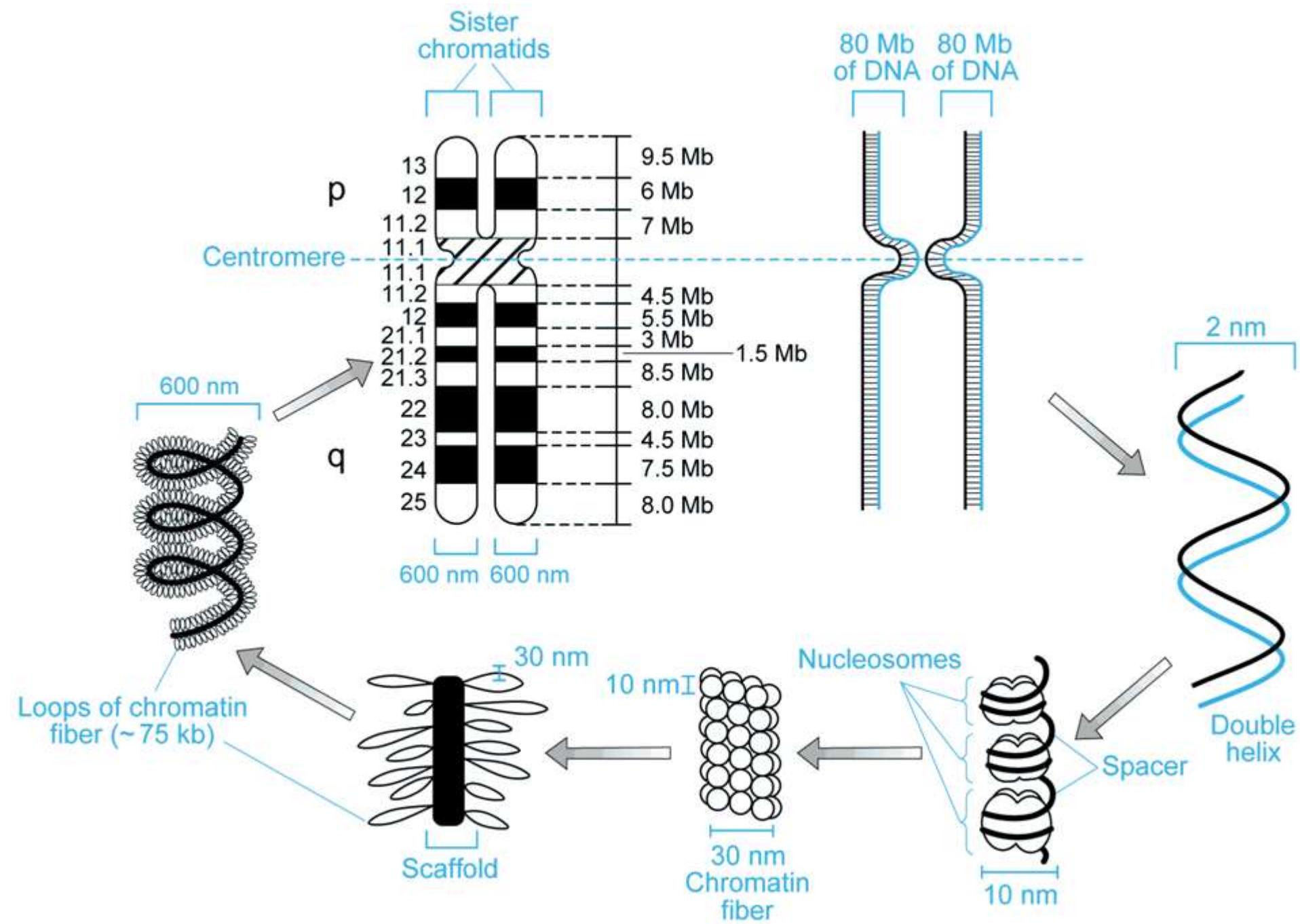
# Lunghezza dei cromosomi



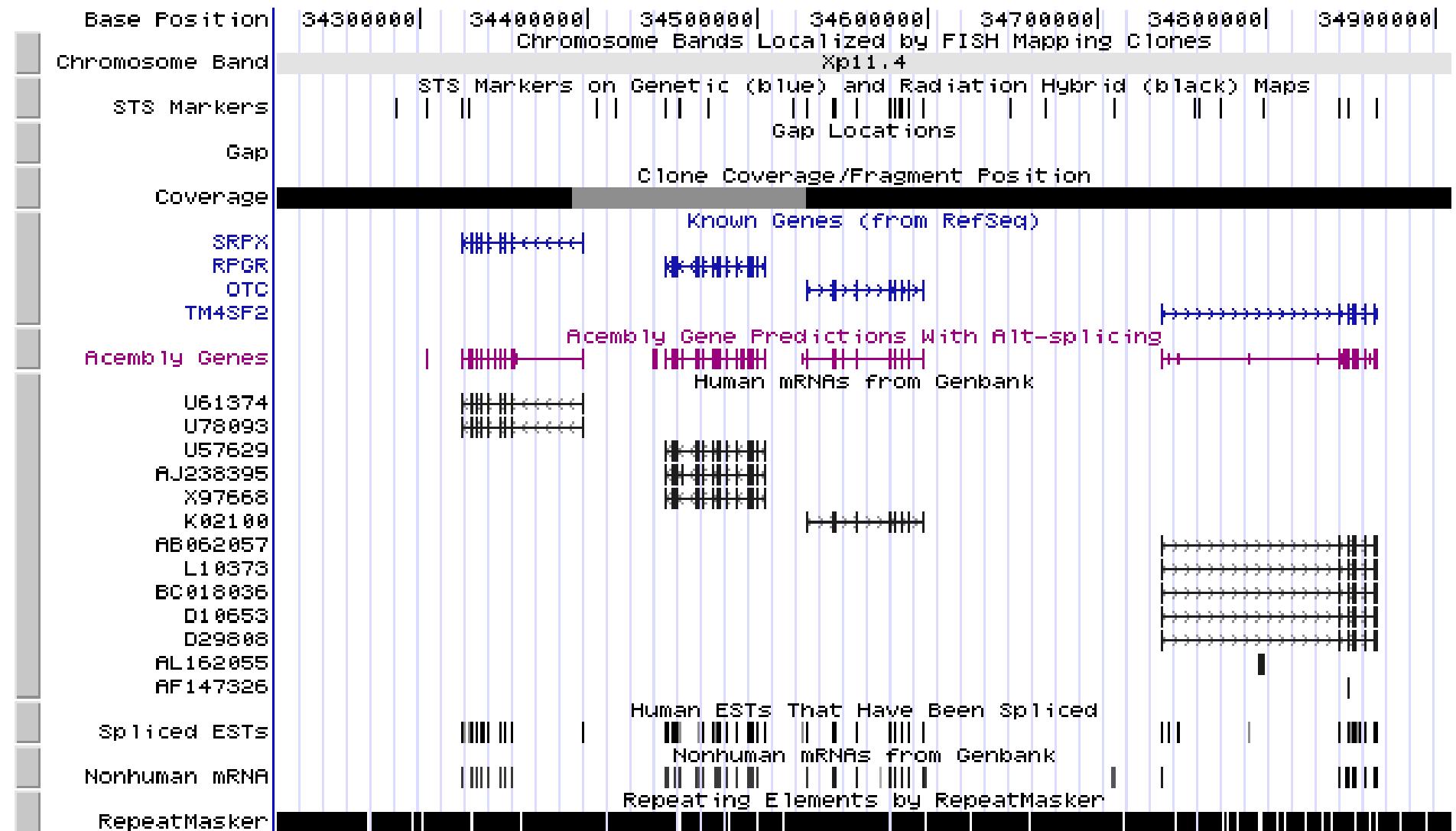
Key:

- Centromere
- rDNA
- Noncentromeric heterochromatin

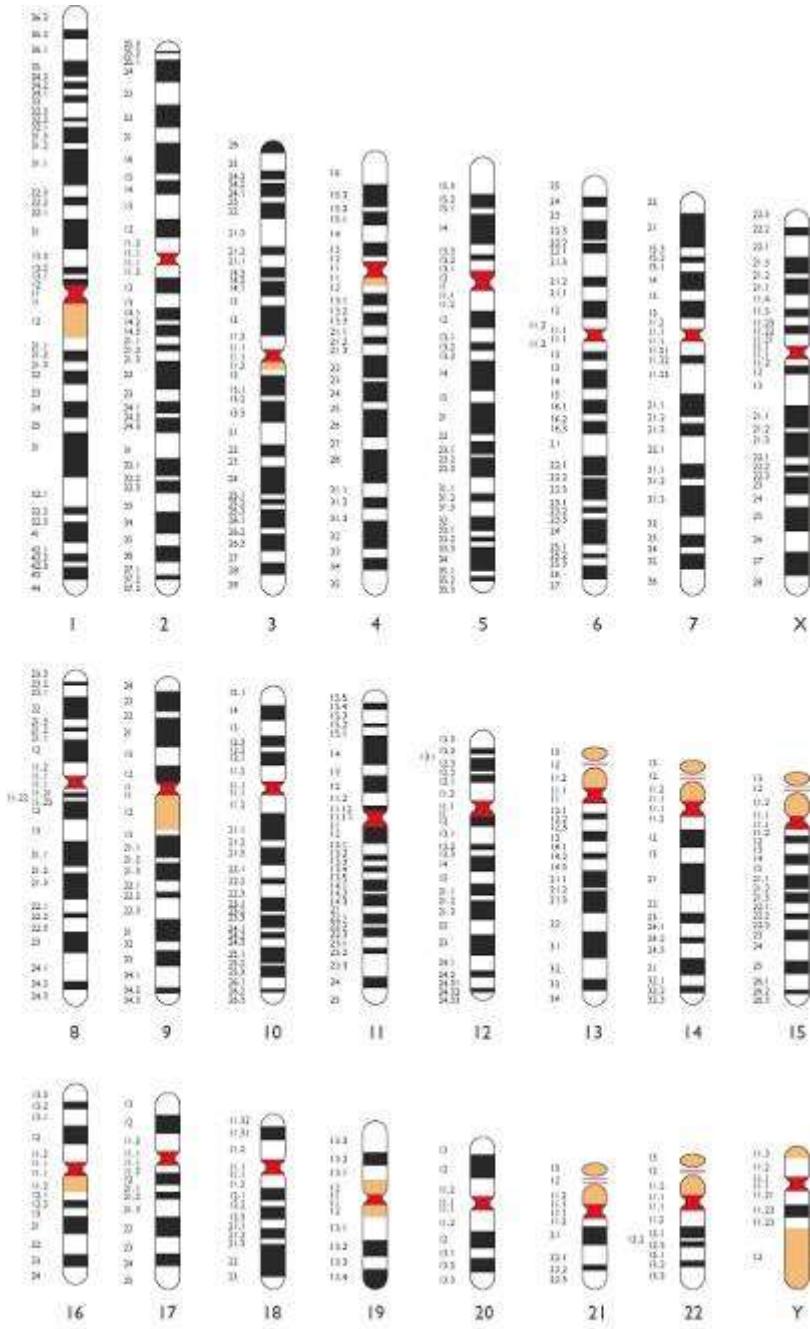
1	245,203,898	<b>218,712,898</b>
2	243,315,028	<b>237,043,673</b>
3	199,411,731	<b>193,607,218</b>
4	191,610,523	<b>186,580,523</b>
5	180,967,295	<b>177,524,972</b>
6	170,740,541	<b>166,880,540</b>
7	158,431,299	<b>154,546,299</b>
8	145,908,738	<b>141,694,337</b>
9	134,505,819	<b>115,187,714</b>
10	135,480,874	<b>130,710,865</b>
11	134,978,784	<b>130,709,420</b>
12	133,464,434	<b>129,328,332</b>
13	114,151,656	<b>95,511,656</b>
14	105,311,216	<b>87,191,216</b>
15	100,114,055	<b>81,117,055</b>
16	89,995,999	<b>79,890,791</b>
17	81,691,216	<b>77,480,855</b>
18	77,753,510	<b>74,534,531</b>
19	63,790,860	<b>55,780,860</b>
20	63,644,868	<b>59,424,990</b>
21	46,976,537	<b>33,924,742</b>
22	49,476,972	<b>34,352,051</b>
X	152,634,166	<b>147,686,664</b>
Y	50,961,097	<b>22,761,097</b>



# UCSC Genome Browser



Screenshot from University of California at Santa Cruz <http://genome.ucsc.edu>



### CCDS IDs per chromosome

Chromosome	Count
1	2,513
2	1,548
3	1,299
4	898
5	1,028
6	1,236
7	1,094
8	807
9	921
10	971
11	1,509
12	1,240
13	385
14	749
15	711
16	967
17	1,370
18	350
19	1,616
20	672
21	282
22	530
X	967
Y	53
XY	23

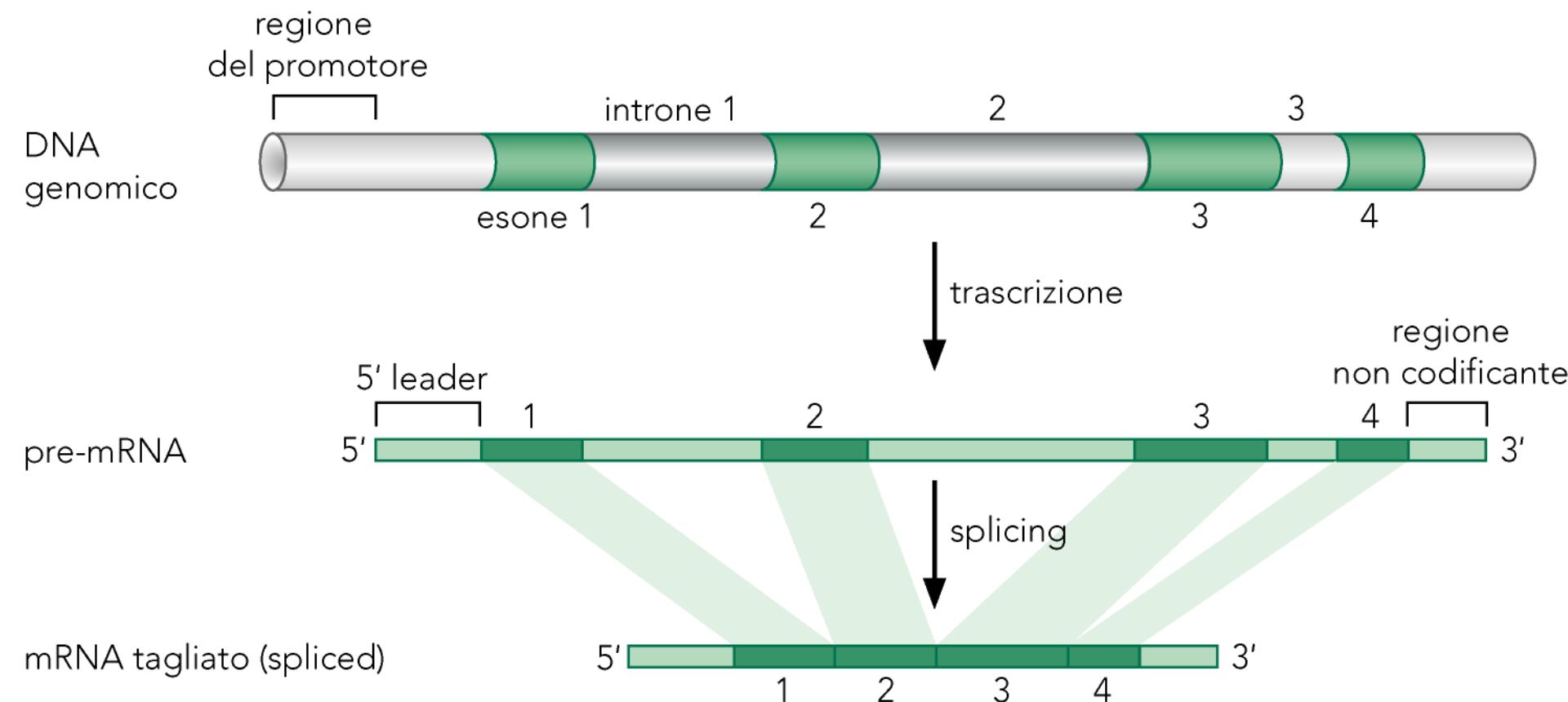
KEY

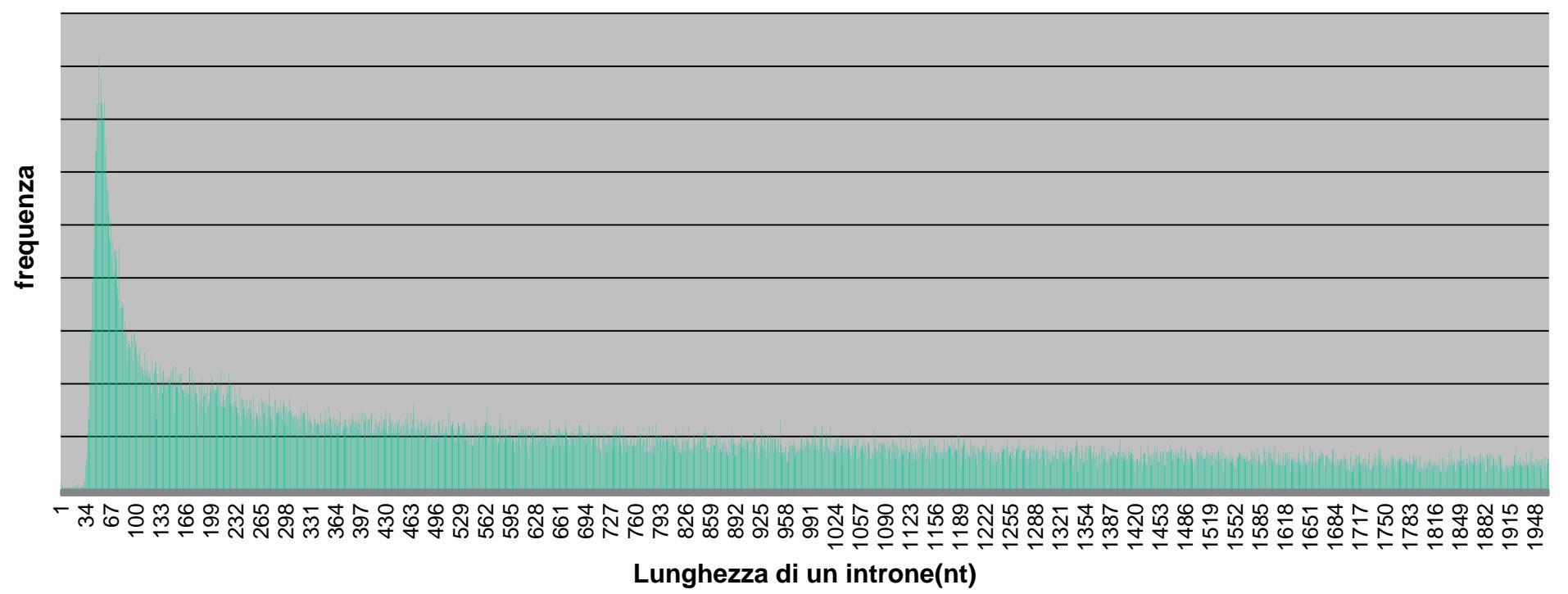
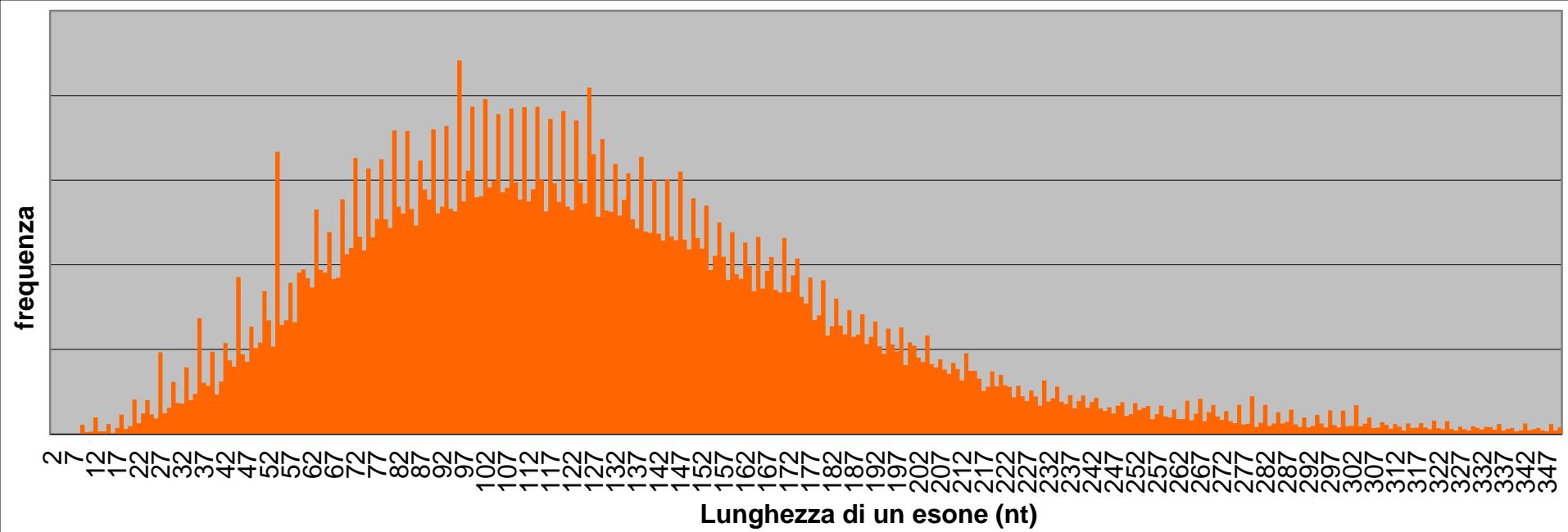
Centromere

rDNA

Constitutive heterochromatin

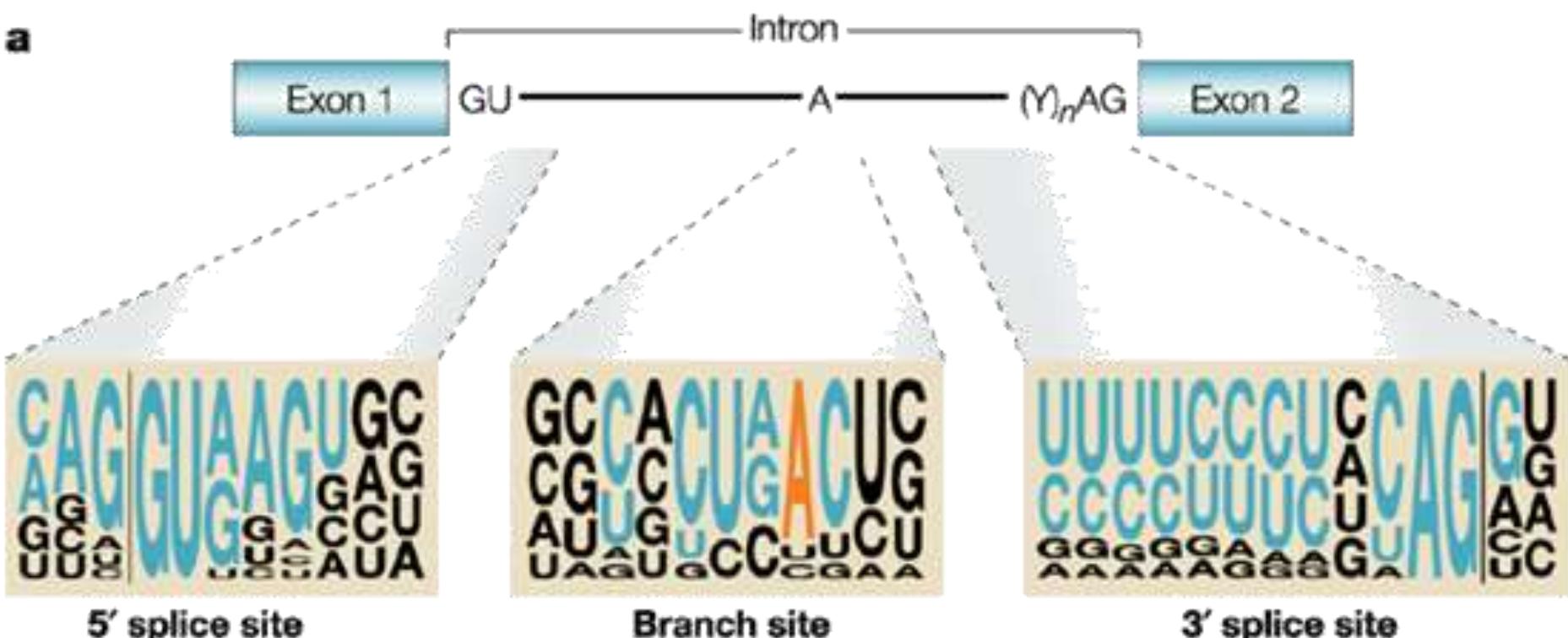
# lo splicing dell'RNA





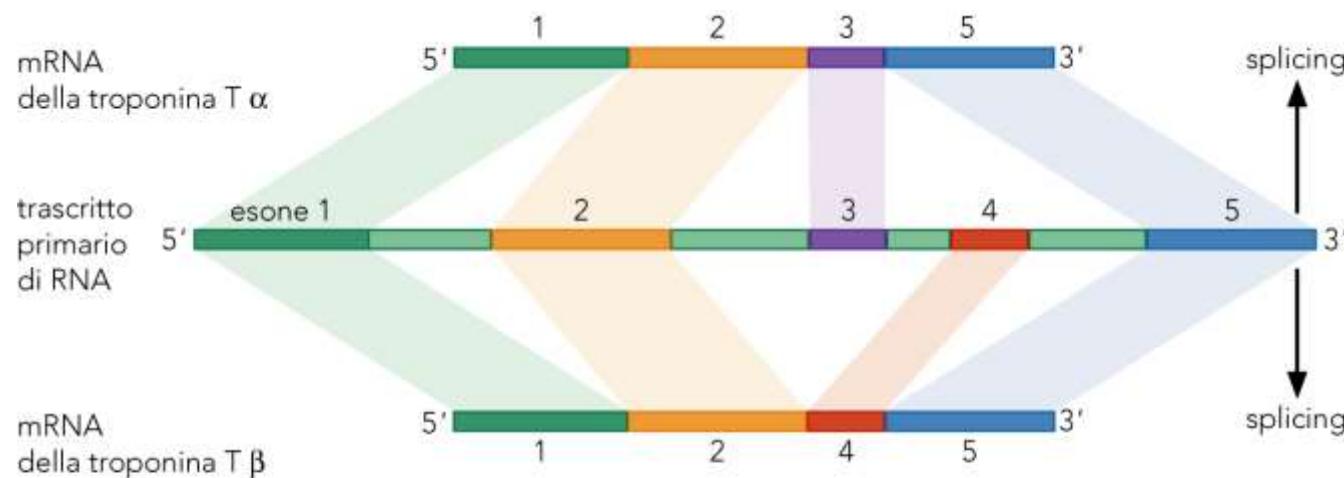
# Motivi classici di splicing

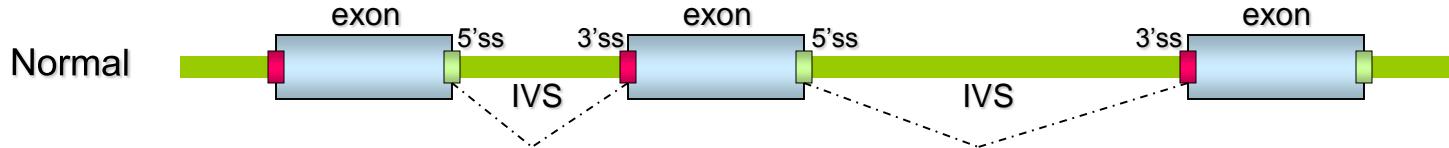
a



# Splicing alternativo

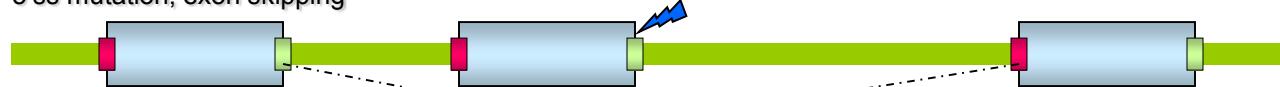
dà la possibilità di utilizzare parti diverse di un gene come esoni



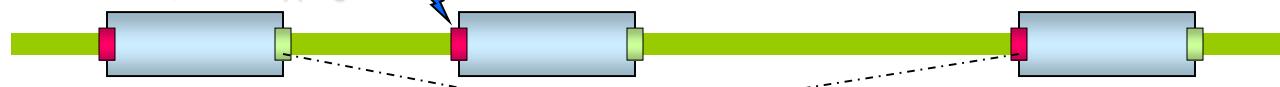


### Splicing Abnormalities

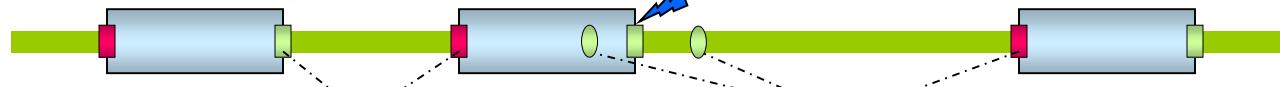
5'ss mutation; exon skipping



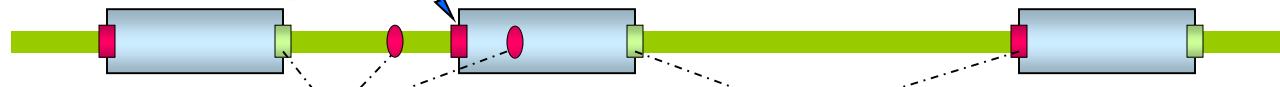
3'ss mutation; exon skipping



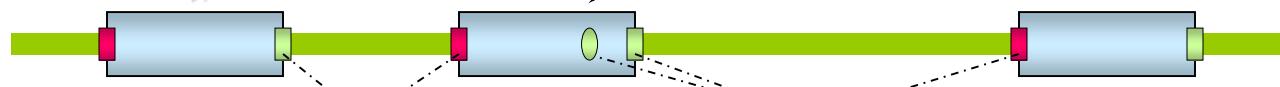
5'ss mutation; use of cryptic 5'ss



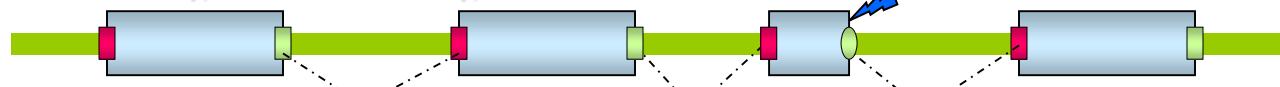
3'ss mutation; use of cryptic 3'ss



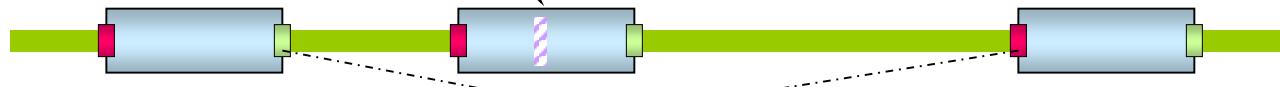
Activation of cryptic 5'ss



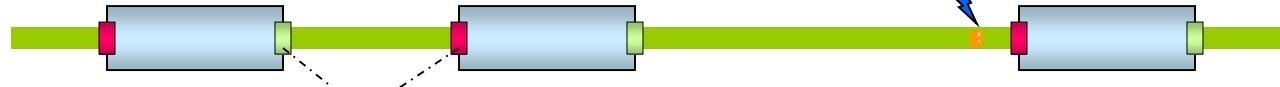
Activation of cryptic 5'ss and use of cryptic 3'ss



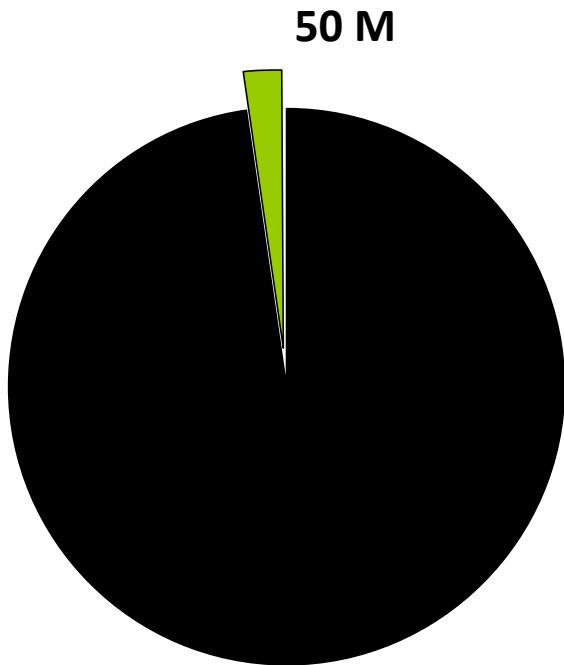
Splicing enhancer mutation



Lariat structure branchpoint mutation

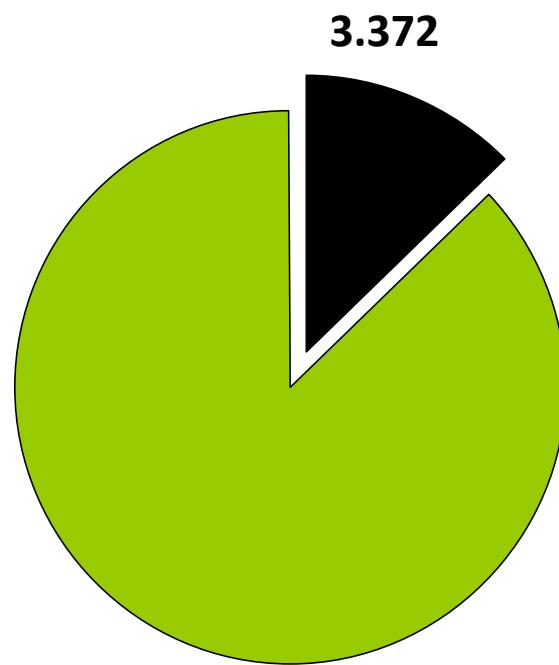


## Esoni dei geni umani (in milioni di basi)



Totale ~ 3.100 M

## Geni con mutazioni che causano malattie umane mendeliane



Totale ~ 22.000 geni

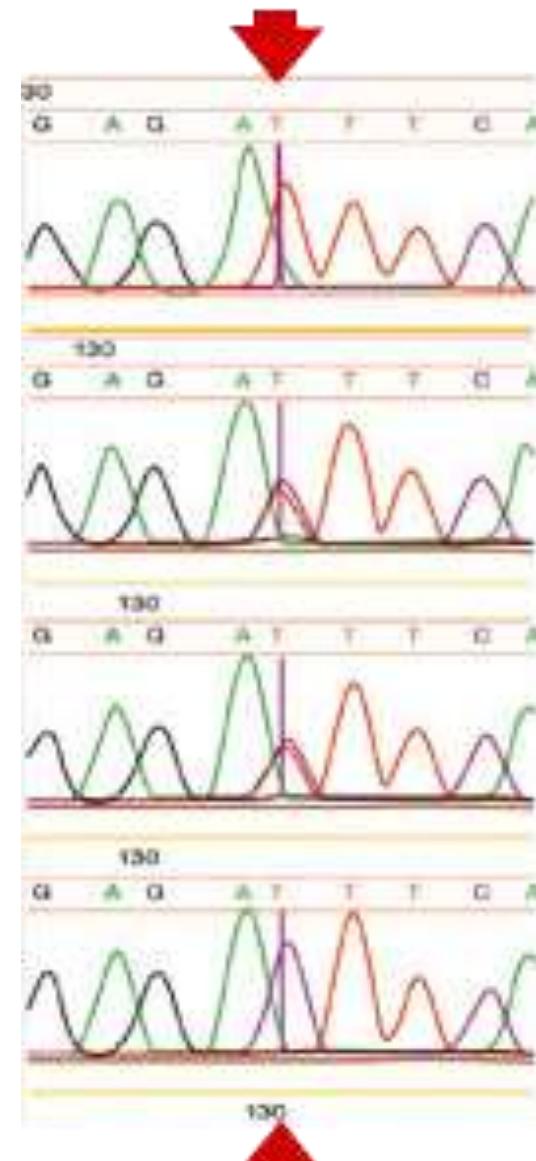
## **Variazioni di sequenza in un segmento di DNA**

**Ogni cromosoma è differente da tutti gli altri**

# SNPs

## single nucleotide polymorphisms

- Variazioni naturali che esistono tra le sequenze di qualsiasi cromosoma con un frequenza di almeno **l'1% degli individui**
- Consistono in **sostituzioni** di singoli nucleotidi, altre più rare consistono in **delezioni** o **inserzioni** di singoli nucleotidi
- Un SNP è identificato mediante **sequenziamento** del DNA di differenti cromosomi in individui diversi
- I due alleli possono essere identici (in **omozigosi**; T/T o C/C) o differenti (**eterozigosi** T/C o C/T) nel sito polimorfico





# Copy Number Variation

## CNV

1

2

# Estrazione del DNA nucleare

## Sorgente: tutte le cellule nucleate

- Nell'uomo i globuli rossi non hanno nucleo
- Da sangue, il DNA proviene solo dai leucociti
- Occorre evitare la coagulazione del sangue, mediante il sequestro dello ione calcio
- Provetta con EDTA (emocromo)



# Estrazione del DNA nucleare

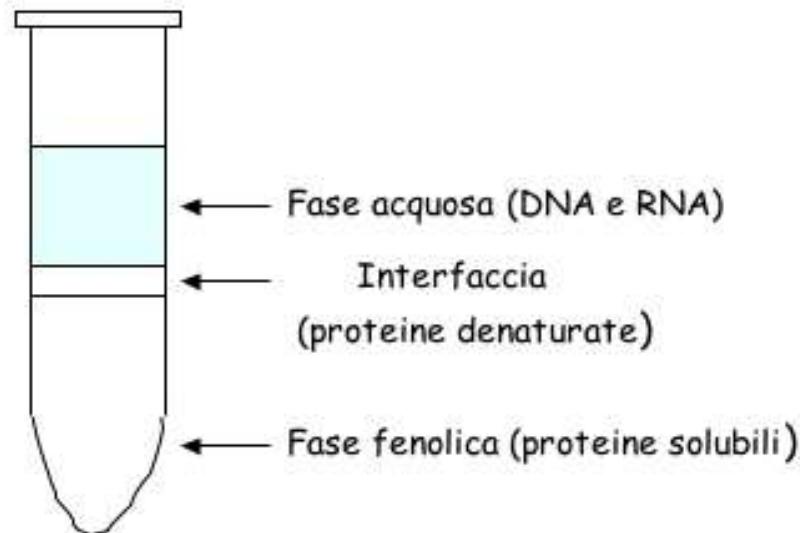
- Il numero dei leucociti è variabile da **2.800 a 10.000/mmc = 2.8 M-10 M/cc**
- Ciascun leucocita contiene circa **4,5 pg** di DNA nucleare, quindi **12,6-45 µg DNA/cc**
- Quindi con una resa estrattiva teorica del 70% da ogni cc di sangue si possono ricavare da **8,8 a 31,5 µg di DNA**



# Metodo classico

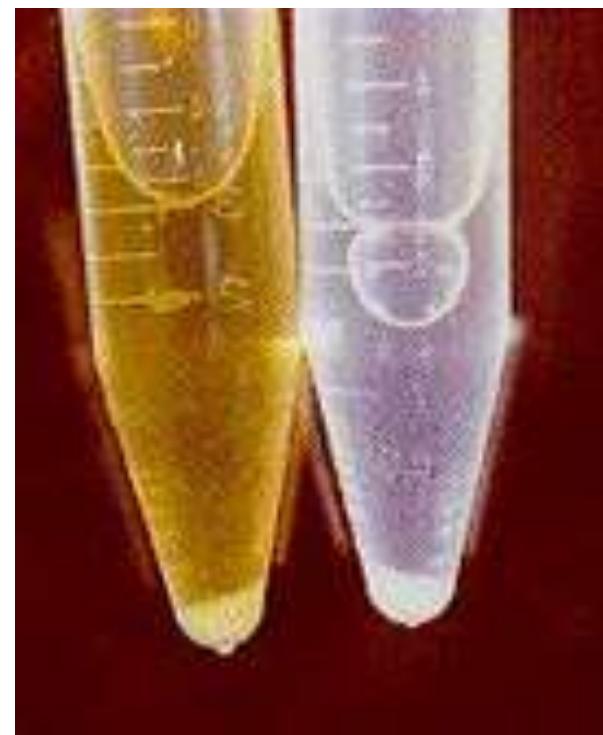
- Lisi dei globuli rossi con soluzione ipotonica
- Centrifugazione dei globuli bianchi
- Detergenti per solubilizzare la membrana nucleare
- Proteinase K per digerire istori e protammime
- **Estrazione fenolica per separare il DNA dalle proteine degradate**
- Precipitazione con alcool etilico e sodio acetato
- Lavaggio
- Risolubilizzazione in tampone di pH ed EDTA

pH neutro o alcalino



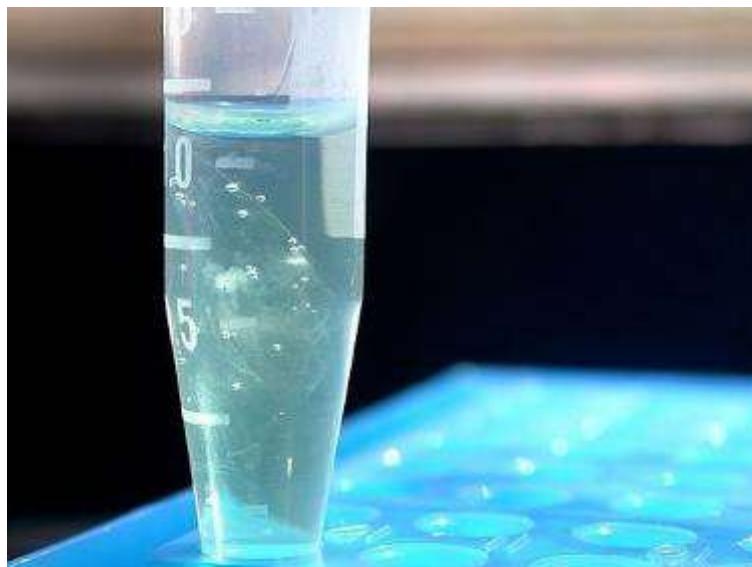
# PROTOCOLLO Estrazione DNA da sangue

1. Aggiungere al campione 10 volumi di soluzione IPOTONICA (20mM Tris:10mM EDTA pH 8) per lisare i globuli rossi.
2. Centrifugare 10' a 1500g
3. Allontanare il supernatante
4. Guardare bene come si presenta il pellet, se non è biancastro ripetere il lavaggio nella soluzione ipotonica
5. Quando il pellet è piuttosto chiaro aggiungere 500mL di 0.5% SDS, 200mM NaCl, TRIS 20 mM (pH 8)\_e 30 $\mu$ L di Proteinasi K (20 $\mu$ g/mL).
6. Incubare a 42°C e lasciare tutta la notte



# PROTOCOLLO Estrazione DNA da sangue

1. Aggiungere un uguale volume di fenolo al campione e agitare
2. Centrifugare 5'.
3. Raccogliere il supernatante
4. Aggiungere 2 volumi di etanolo 100% e agitare per inversione (si forma un flocculo bianco).
5. Prelevare il flocculo con la pipetta e risospenderlo in 500 $\mu$ L di etanolo 70%.
6. Centrifugare 3' max RT.
7. Eliminare il supernatante con accuratezza, ma non asciugare a caldo
8. Risospender *gradualmente* il pellet in circa 200 $\mu$ L di TE1X sterile



# Metodo classico

## precauzioni

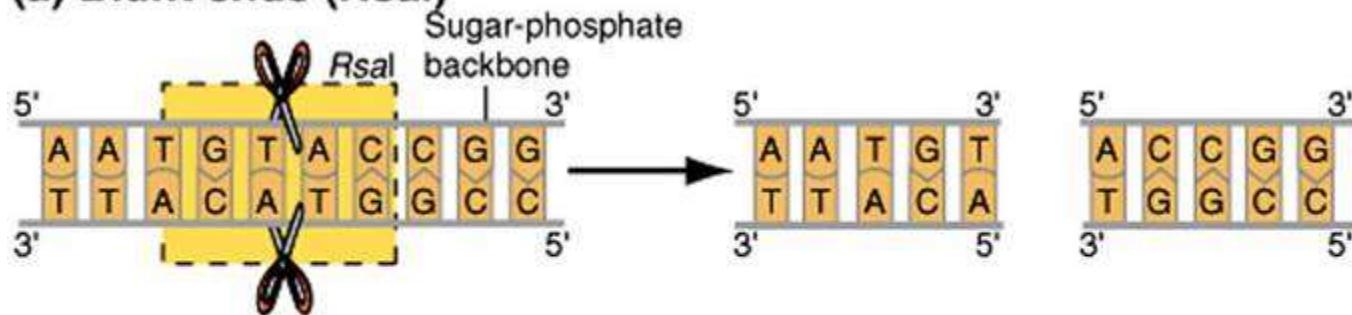
1. Prelievo fresco di sangue sempre superiore per resa e qualità
2. Lisi completa dei globuli rossi, perché l'emoglobina inibisce molti enzimi
3. EDTA ad alte concentrazioni presente in ogni fase
4. pH mai acido, TRIS presente in ogni fase
5. Fenolo non ossidato grado biologia molecolare con cloroformio, alcol isoamilico 24:1
6. Risospensione del pellet graduale: 1µl, poi 10 µl, poi il resto
7. Conservazione a 4°C se il pH rimane basico, altrimenti in etanolo per sempre

# Caratteristiche degli enzimi di restrizione

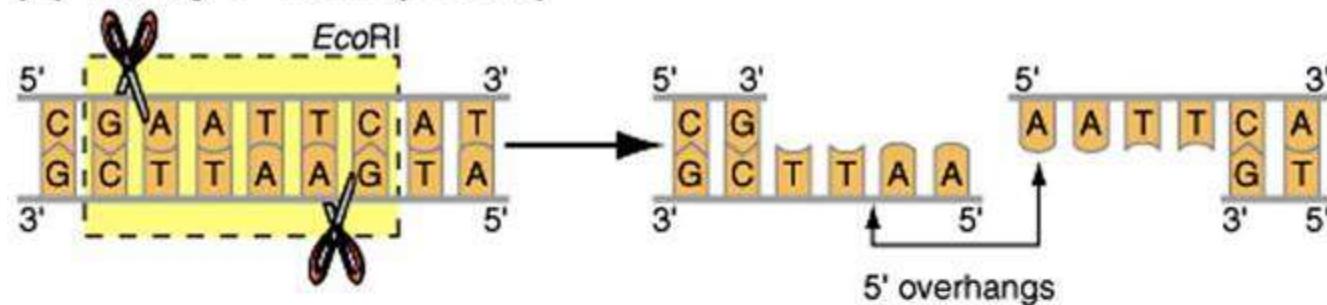
- La sequenza riconosciuta dalla maggior parte degli E.R. è **palindromica** (uguale su entrambi i filamenti quando letta in direzione 5'→3').
- In genere i punti di taglio non coincidono con l'asse di simmetria della palindrome, generando estremità coesive (*sticky ends*), sporgenti al 5' o 3' (*5' or 3' overhang*)
- I punti di taglio possono anche cadere sull'asse di simmetria della palindrome, generando estremità tronche (*blunt ends*).
- E.R. diversi che riconoscono la stessa sequenza bersaglio sono detti **isoschizomeri**.

# Gli enzimi di restrizione tagliano il DNA in modi differenti

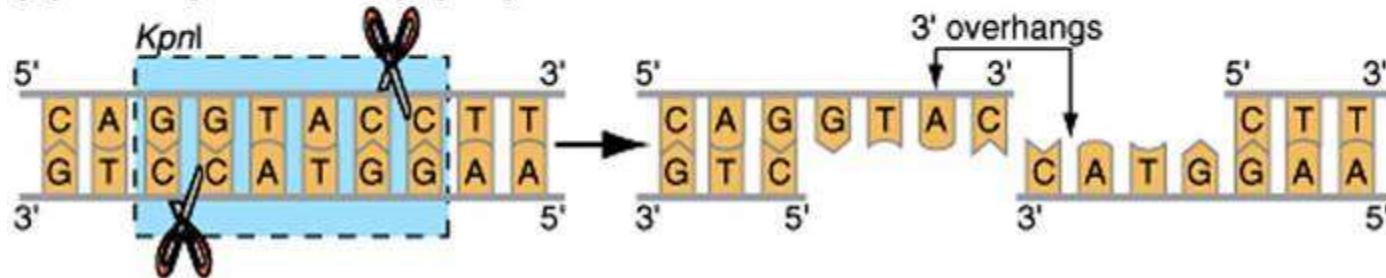
## (a) Blunt ends (*Rsa*I)



## (b) Sticky 5' ends (*Eco*RI)



## (c) Sticky 3' ends (*Kpn*I)



# Alcuni esempi di Enzimi di Restrizione

Enzyme	Source	Sequence cut	Average expected fragment size (kb) in human DNA <sup>a</sup>
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT	0.3
<i>HaeIII</i>	<i>Hemophilus aegyptius</i>	GGCC	0.6
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	<u>TCGA</u>	1.4
<i>MspI</i>	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	CCTC/GAGG	0.4
<i>HindIII</i>	<i>Hemophilus influenzae Rd</i>	AAGCTT	3.1
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> R factor	GAATTC	3.1
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	GGATCC	7.0
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	CTGCAG	7.0
<i>MspI</i>	<i>Microcoleus</i> species	CCTNAGG <sup>c</sup>	7.0
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<u>CCCGGG</u>	78
<i>BssHII</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<u>GCGCGC</u>	390 <sup>b</sup>
<i>NotI</i>	<i>Norcadia otitidis-caviarum</i>	<u>GC<sub>3</sub>GCCGC</u>	9766 <sup>b</sup>

# Southern blot

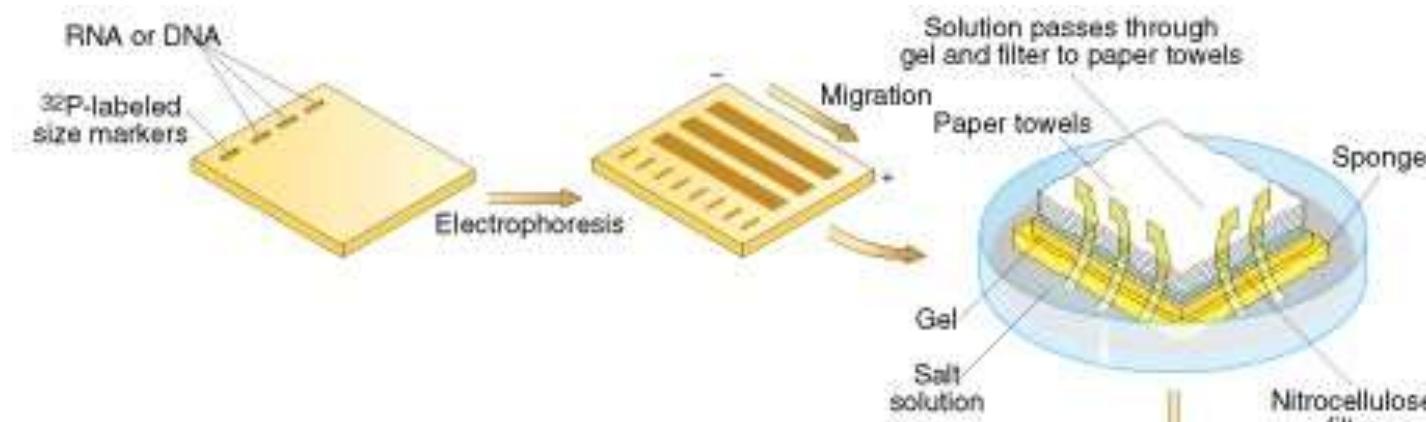
Tecnica ideata dall'inglese Edwin Mellor Southern

Il Southern blot genomico umano richiede un quantitativo minimo di 10 microgrammi di DNA

Il DNA è tagliato con uno specifico enzima di restrizione in frammenti poi separati mediante elettroforesi in gel di agarosio

Dopo la corsa il gel viene posto in una soluzione denaturante di NaOH 0..5M per separare le eliche

Dopo neutralizzazione il contenuto del gel è trasferito per capillarità al foglio di nitrocellullosa in alto sale



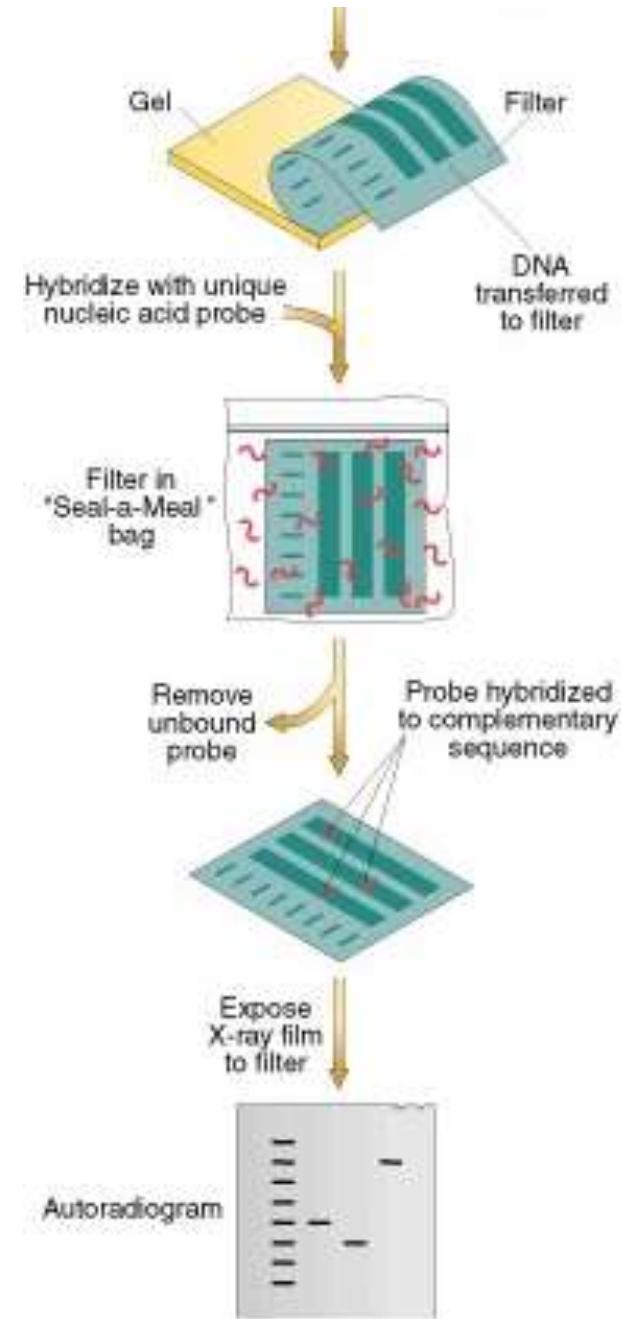
Il DNA è poi legato covalentemente ad 80C sottovuoto

A questo punto il foglio viene immerso in una soluzione contenente una sonda marcata con P32 che ibridizza con sequenze complementari presenti sul foglio

L'ibridazione è condotta ad un opportuna temperatura per almeno 18 ore in alto sale ed in presenza di una soluzione conosciuta come Denhardt e di DNA carrier

Il filtro è poi lavato in soluzione ipotonica e ad alta temperatura ed esposto per l'autoradiografia

Al termine si visualizzeranno frammenti di DNA di dimensione nota che hanno ibridato con la sonda



# L'invenzione della PCR

- Ideata da Kary Mullis nel 1983
- La prima pubblicazione è apparsa nel 1985
- Premio Nobel per la chimica nel 1995



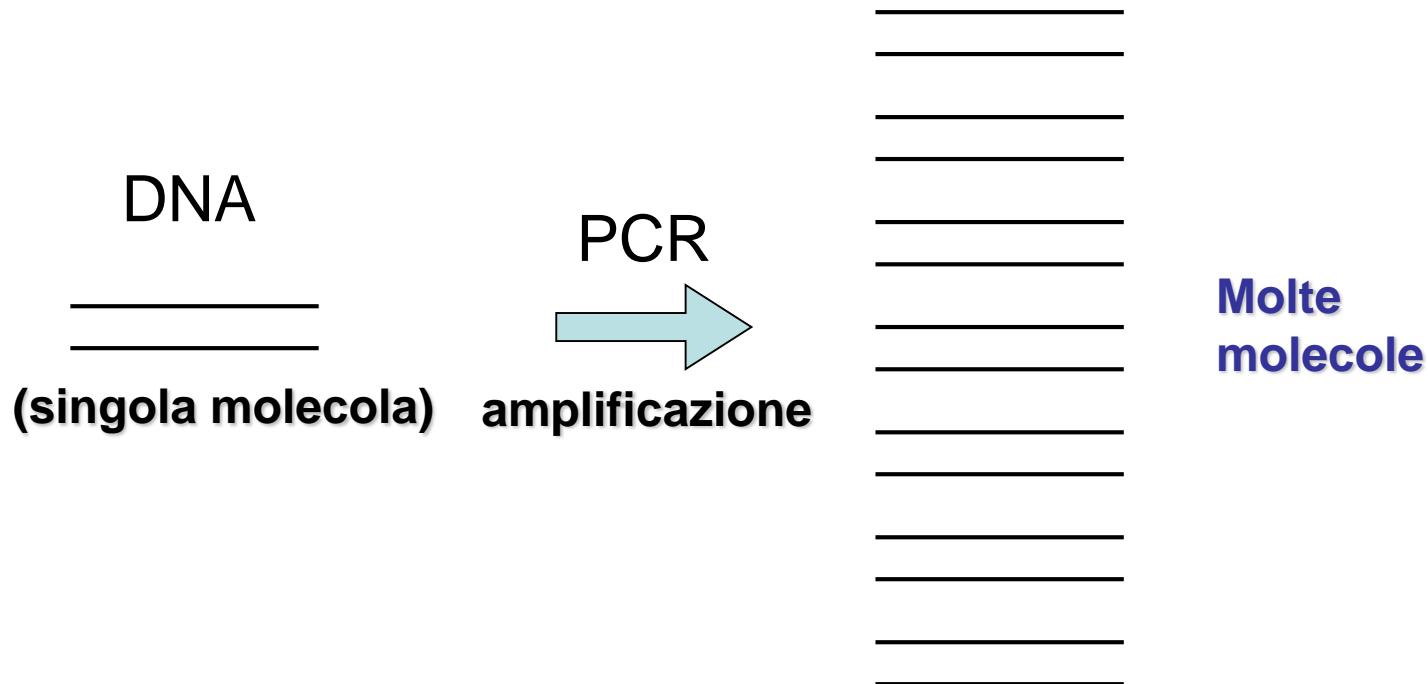
# Com'era l'analisi genetica prima della PCR?

- Il Southern blotting (1975) permetteva un'analisi approssimativa dei geni (RFLPs, inserzioni & delezioni)
- Il sequenziamento del DNA (1978) richiedeva che i geni venissero prima clonati in appositi vettori (plasmidi o fago  $\lambda$ )
- La costruzione di genoteche e lo screening potevano richiedere molti mesi e le genoteche dovevano essere preparate per ciascun individuo analizzato

# Polymerase Chain Reaction - PCR

La PCR rappresenta la seconda rivoluzione nelle tecniche di manipolazione del DNA

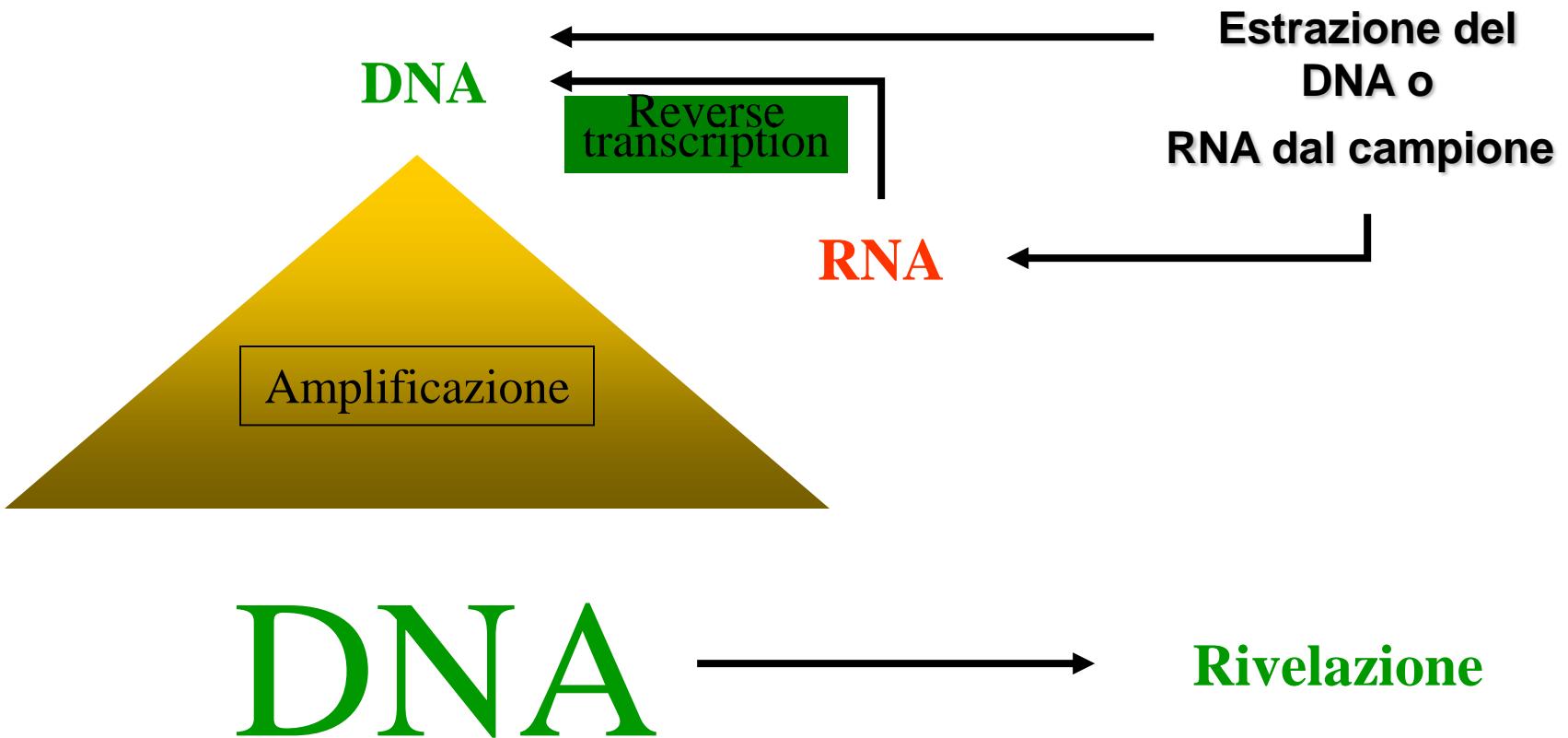
E' essenzialmente una tecnica di amplificazione del DNA



# Polymerase Chain Reaction

- Metodo per l'amplificazione esponenziale di sequenze di DNA
- Ingredienti di base
  - **Stampo** di DNA o RNA
  - 2 **primers** complementari a differenti regioni dello stampo
  - **DNA polimerasi** termostabile
  - 4 nucleotidi
  - il buffer appropriato

# Schema della PCR



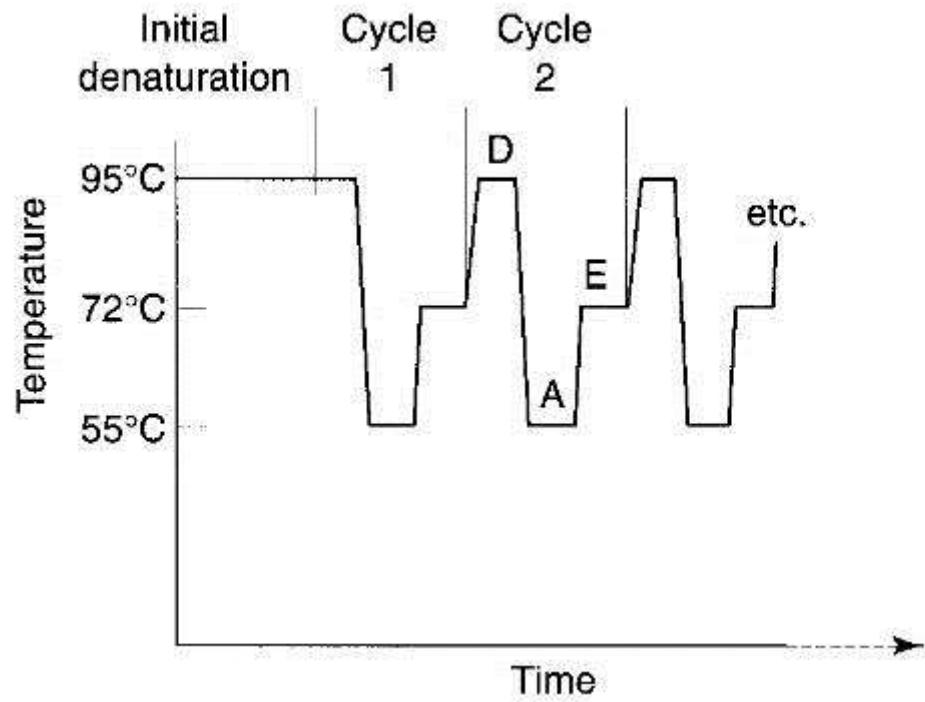
## TIPICA MISCELA DI REAZIONE

25 o 50 $\mu$ l in una provetta micro Eppendorf (0.2 o 0.5 ml)

COMPONENTE	VOLUME	Concentrazione finale
10 X PCR Buffer	5 $\mu$ l	1X
10 X dNTPs (2mM)	5 $\mu$ l	200 $\mu$ M
Forward primer (5 pmols/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
Reverse primer (5 pmols/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M (25pmols/50 $\mu$ l)
DNA genomico stampo	2 $\mu$ l	1 $\mu$ g
polimerasi termostabile (5U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l	1 unità
H <sub>2</sub> O (a 50 $\mu$ l di volume finale)	27.8 $\mu$ l	

# I cicli della PCR

- **30–35 cicli ciascuno comprendente:**
  - denaturazione (**95°C**), **10-40 sec**
  - annealing (**50–65°C**), **30-120 sec**
  - polimerizzazione (**68-72°C**),  
il tempo dipende dalla lunghezza del frammento



# Quante copie?

- Nessun prodotto fino al 3° ciclo
- L'accumulazione non è un raddoppiamento completo dopo ciascun ciclo
- Dopo 32 cicli ci dovrebbero essere max 1,073,741,764 copie di lunghezza definita ( $\sim 1 \times 10^9$ )

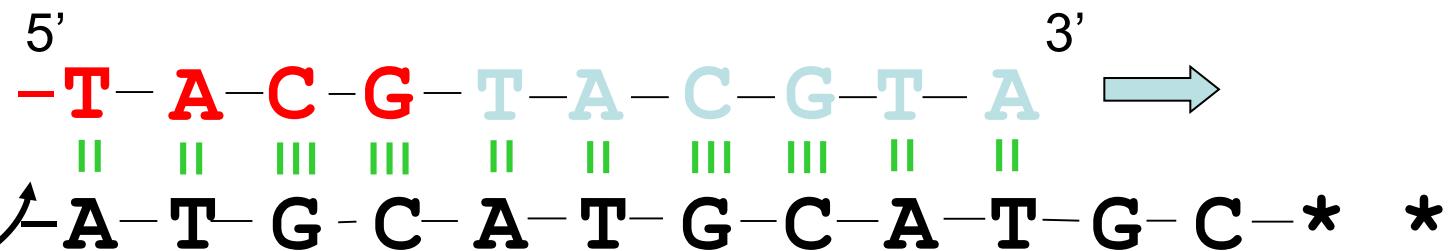
# Thermal cycler, AppliedBiosystems



# Thermal Cyclers, MJ Research



## Sintesi da parte della DNA polimerasi



Uno specifico DNA a singola elica (primer o  
innesco) ibrida con l'elica che deve essere  
copiata

# Come funziona la PCR

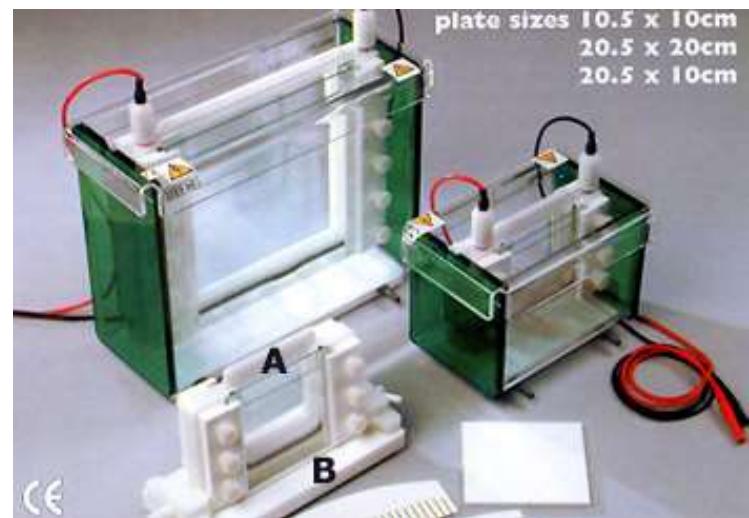
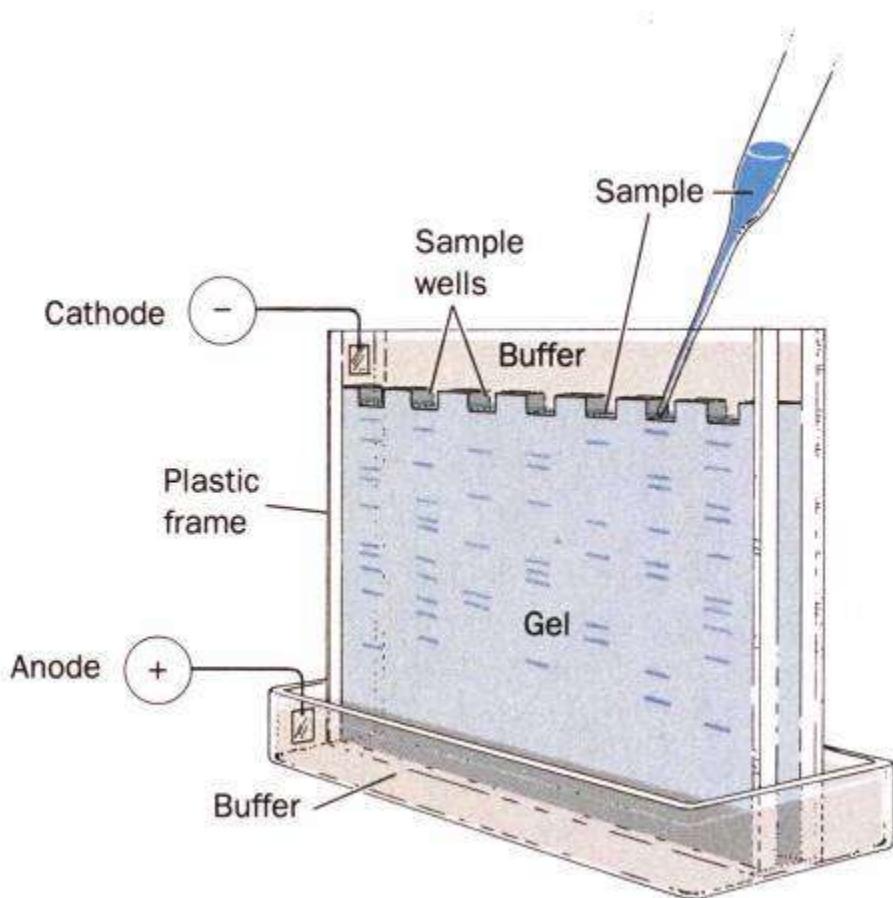
- Come fa la polimerasi a sapere quando fermarsi una volta che ha raggiunto l'altro primer?
- [PCR animation](#)  
<http://www.dnalc.org/resources/animations/pcr.html>

# Quanto è potente la PCR?

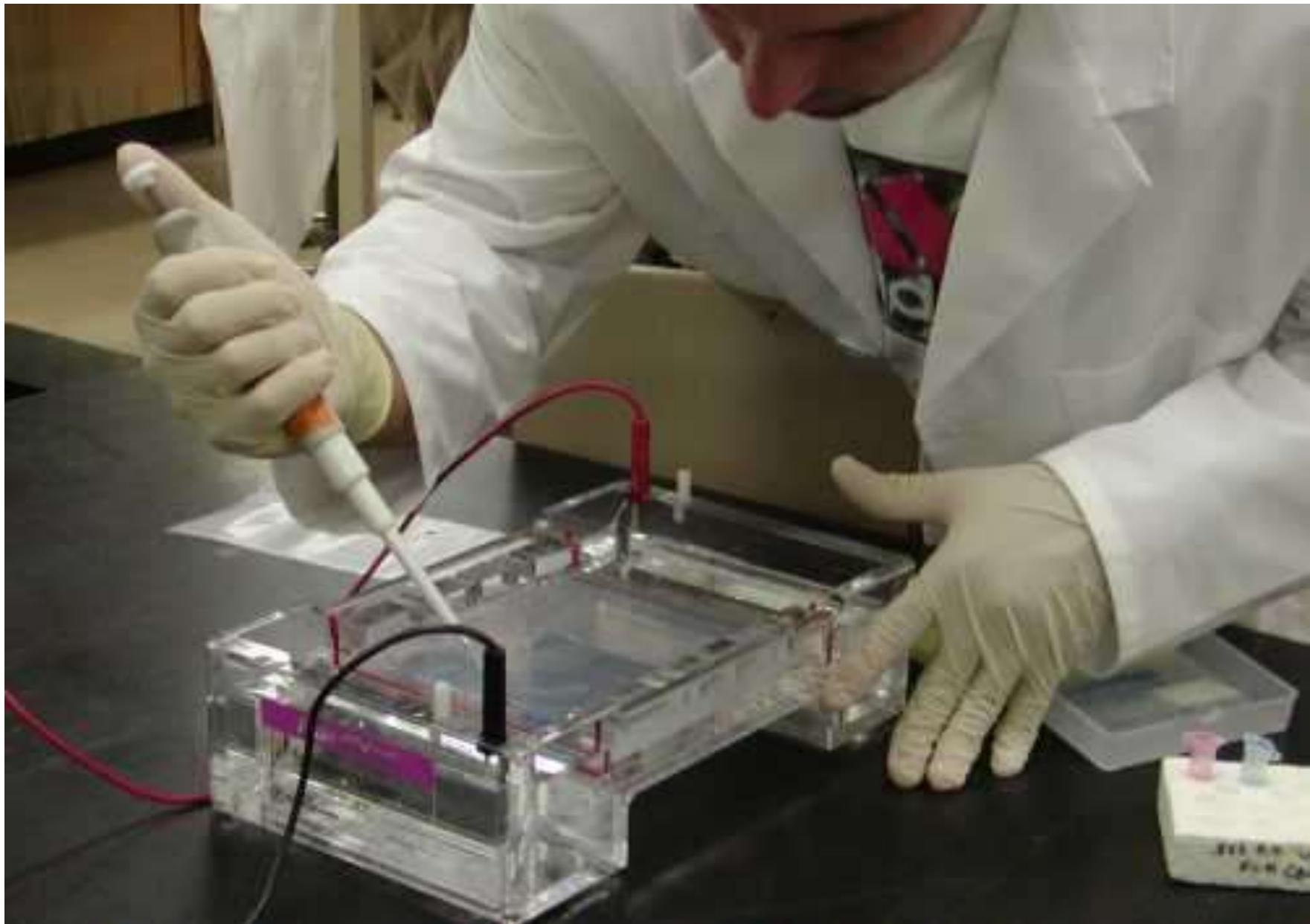
- La PCR può amplificare fino ad ottenere una quantità utilizzabile di DNA (visibile su gel) in meno di 2 ore
- Lo stampo di DNA non necessita di particolari purificazione se il frammento da amplificare è di dimensioni ridotte (fino a 1000bp)
- Il prodotto della PCR può essere digerito con enzimi di restrizione, sequenziato o clonato
- La PCR può amplificare una singola molecola di DNA (es. uno spermatozoo)

Elettroforesi su gel : Separa le molecole per dimensione  
separazione orizzontale --> Agarosio = DNA ed RNA  
separation verticale --> Acrilamide = DNA, proteine ed RNA

**le molecole più piccole migrano nel gel più velocemente**



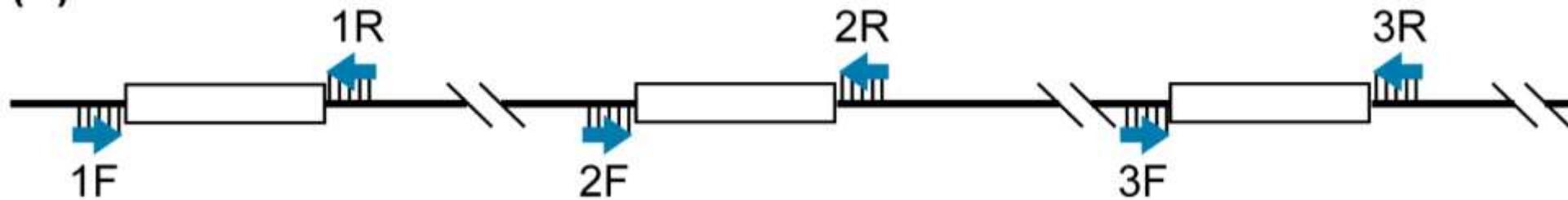
# Elettroforesi su gel: visualizzazione diretta delle molecole separazione orizzontale --> Agarosio = DNA ed RNA



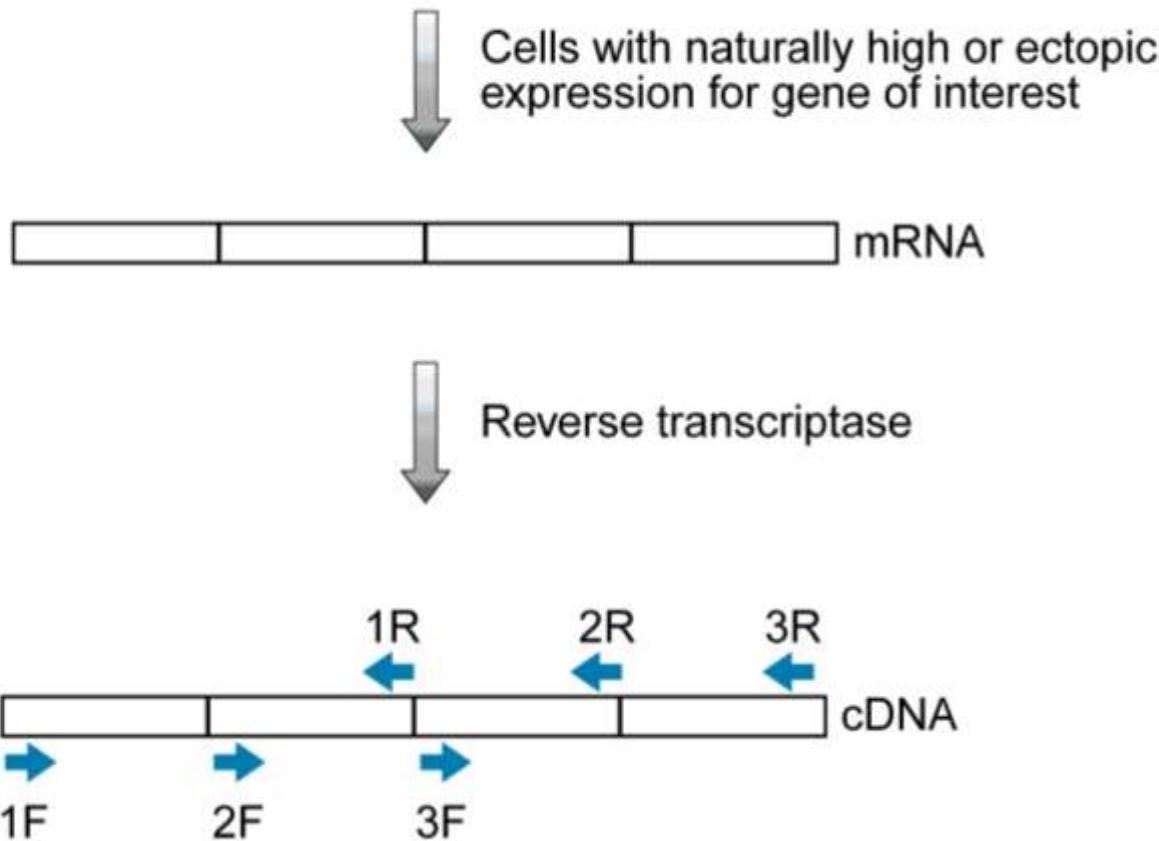


**Il DNA colorato con bromuro di etidio  
emette una fluorescenza di colore rosso-arancio se sottoposto a  
luce UV**

# screening di mutazioni dal DNA genomico



# Screening di mutazioni dall'RNA messaggero con RT-PCR



# PCR Primers

- Primers dovrebbero essere di ~20-30 nt
- Il contenuto di G/C dovrebbe essere 40–55%.
- La base al 3' dovrebbe essere una C
- I primers non dovrebbero formare strutture cruciformi, ecc
- I primers dovrebbero riconoscere una sequenza unica sul genoma, almeno al 3'

# Primers che formano dimeri

- 5' -**ACCGGTAGCCACGAATT CGT**-3'  
                  ||||| |||||  
                  3' -**TGCTTAAGCACCGATGGCCA**-5'
- I dimeri di Primers sono un eccellente substrato indesiderato per la Taq polimerasi

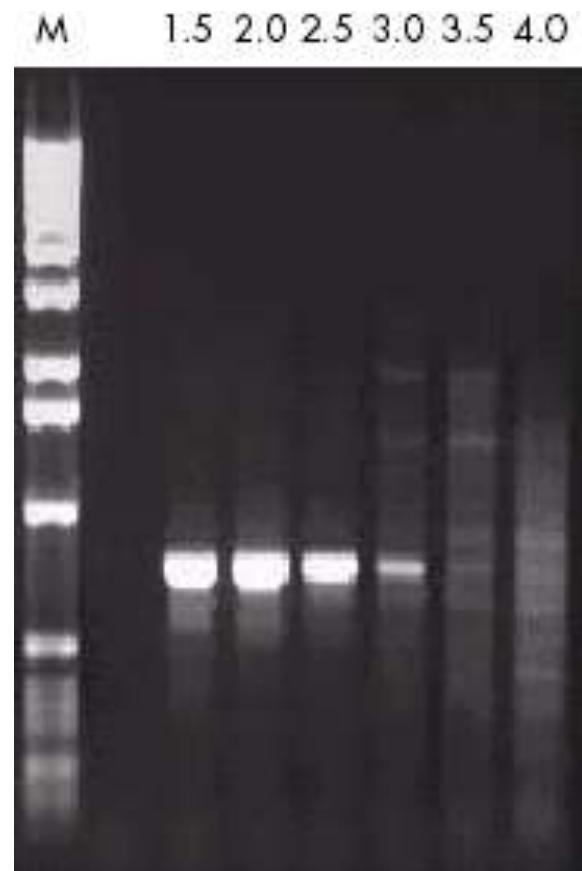
# Optimizzare la temperatura di annealing

- Primers hanno un temperatura teorica calcolata così:
  - $2^{\circ}\text{C A/T e } 4^{\circ}\text{C G/C}$  (*e.g.*  $54^{\circ}\text{C}$ ).
- La temperatura deve essere confermata empiricamente
- Usare un gradient cycler.

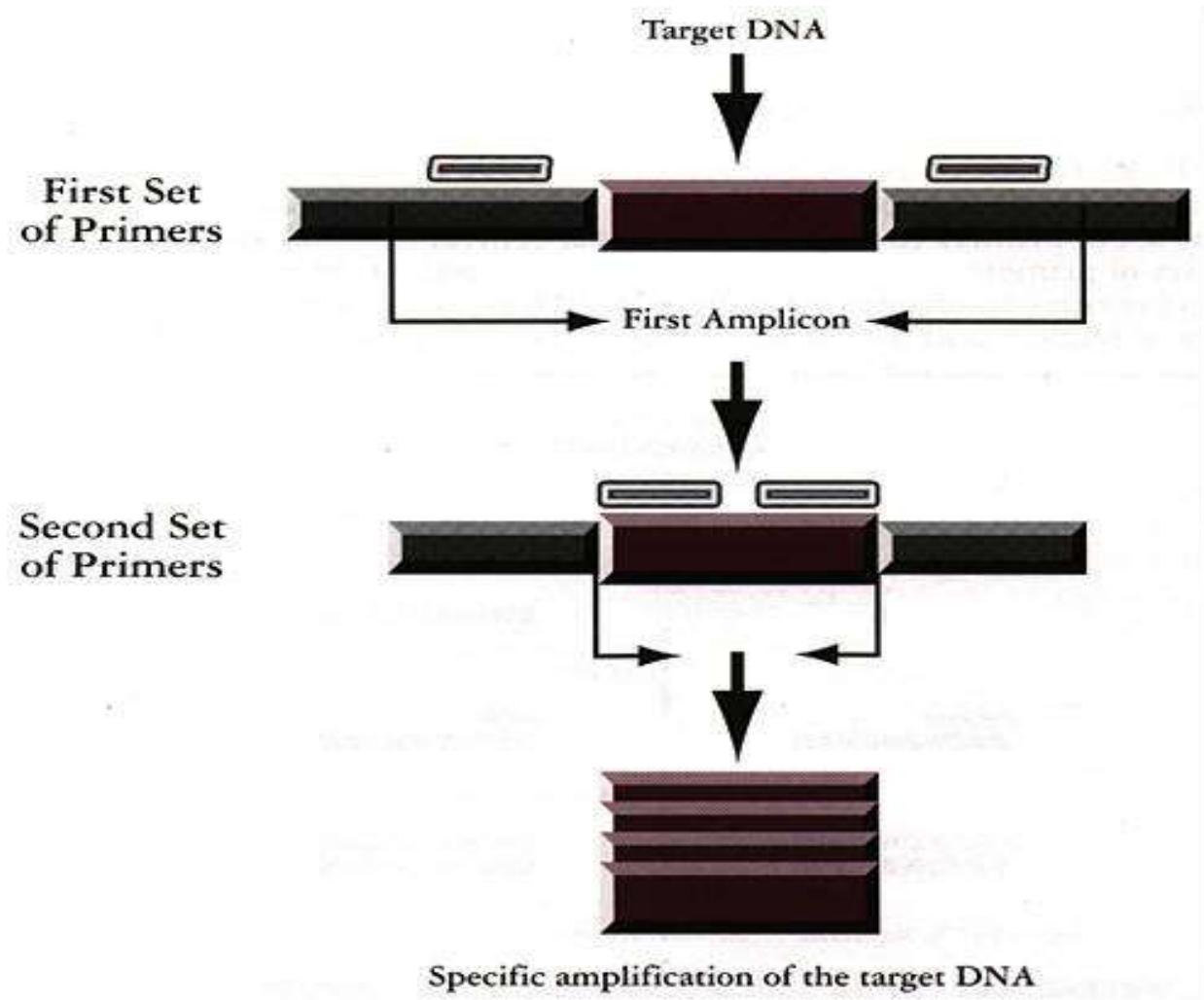


# Optimizzare la concentrazione di ione $Mg^{2+}$

- L'accuratezza della PCR dipende dalla concentrazione di  $[Mg^{2+}]$  libero
- Il  $[Mg^{2+}]$  libero è il  $[Mg^{2+}]$  totale meno le concentrazioni di dNTP, DNA, primers e le tracce di EDTA
- Variare di almeno 0.5mM tra campioni



**Nested PCR** = PCR nidificata con una seconda coppia di primers interna rispetto alla prima coppia



# Falsi positivi di PCR

## Contaminazione o errore

- nella raccolta del campione
- Durante il trasporto
- Nel laboratorio da parte di altri campioni o controlli positivi
- Nel laboratorio da precedenti PCR
  - Necessità di controlli negativi

## Primers non abbastanza specifici

- Fare tests aggiuntivi

La PCR dovrà  
essere sempre  
assemblata sotto  
cappa per evitare  
contaminazioni e  
falsi positivi

