

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

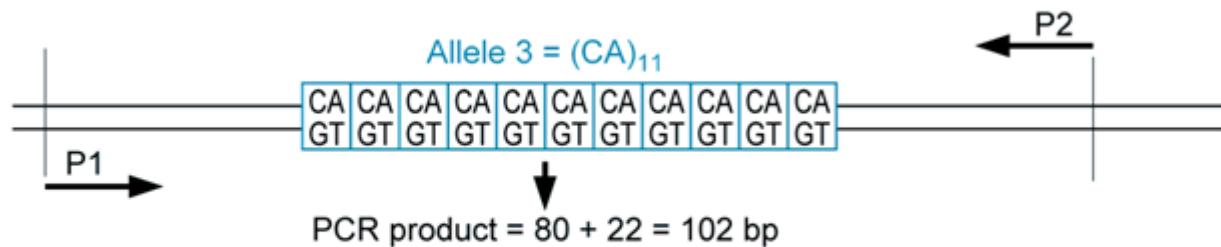
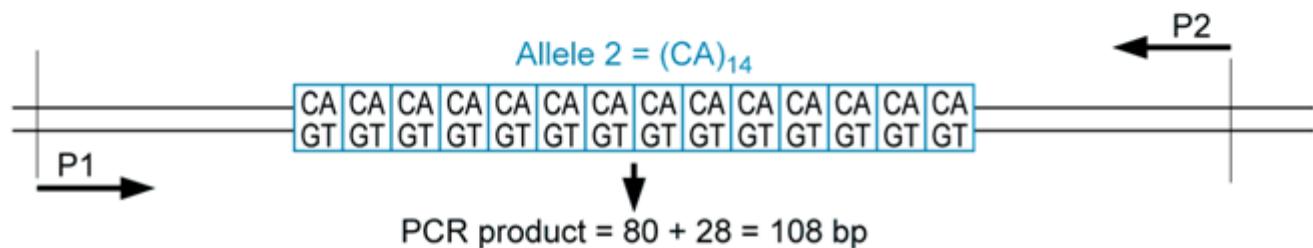
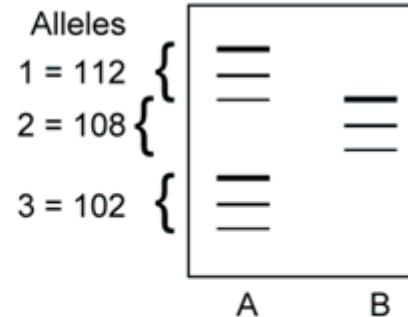
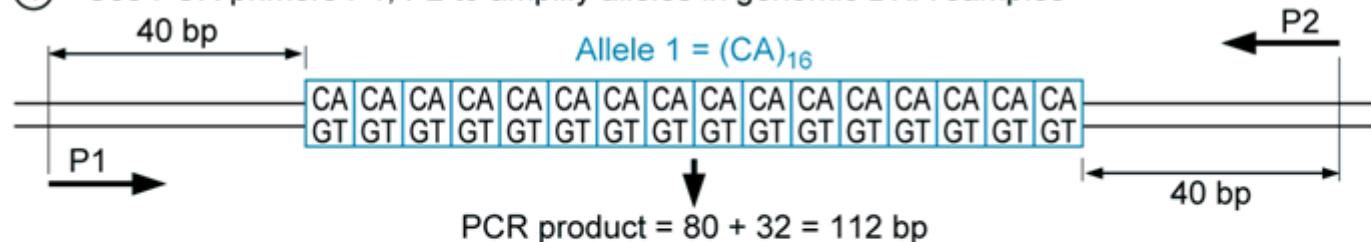
- Moncharmont
Patologia Generale (3 capitoli genetica)
Editore Idelson Gnocchi
- Da Trattato Italiano di Medicina di Laboratorio vol IX
Diagnostica molecolare: **Genetica**
Editore Elsevier Masson
- Strachan-Read
Genetica Molecolare Umana
Editore Zanichelli
- Sito web <http://www.vincenzonigro.it> (glossario)

DNA Ligasi

- I frammenti di DNA ottenuti per digestione con un E.R. possono essere riuniti insieme per azione di una **DNA Ligasi** che catalizza la formazione di ponti fosfodiesterici tra i nucleotidi di due frammenti di DNA.
- La reazione richiede ATP come fonte di energia.
- La più comune DNA Ligasi utilizzata è la **T4 DNA Ligasi**.

Genotipizzazione

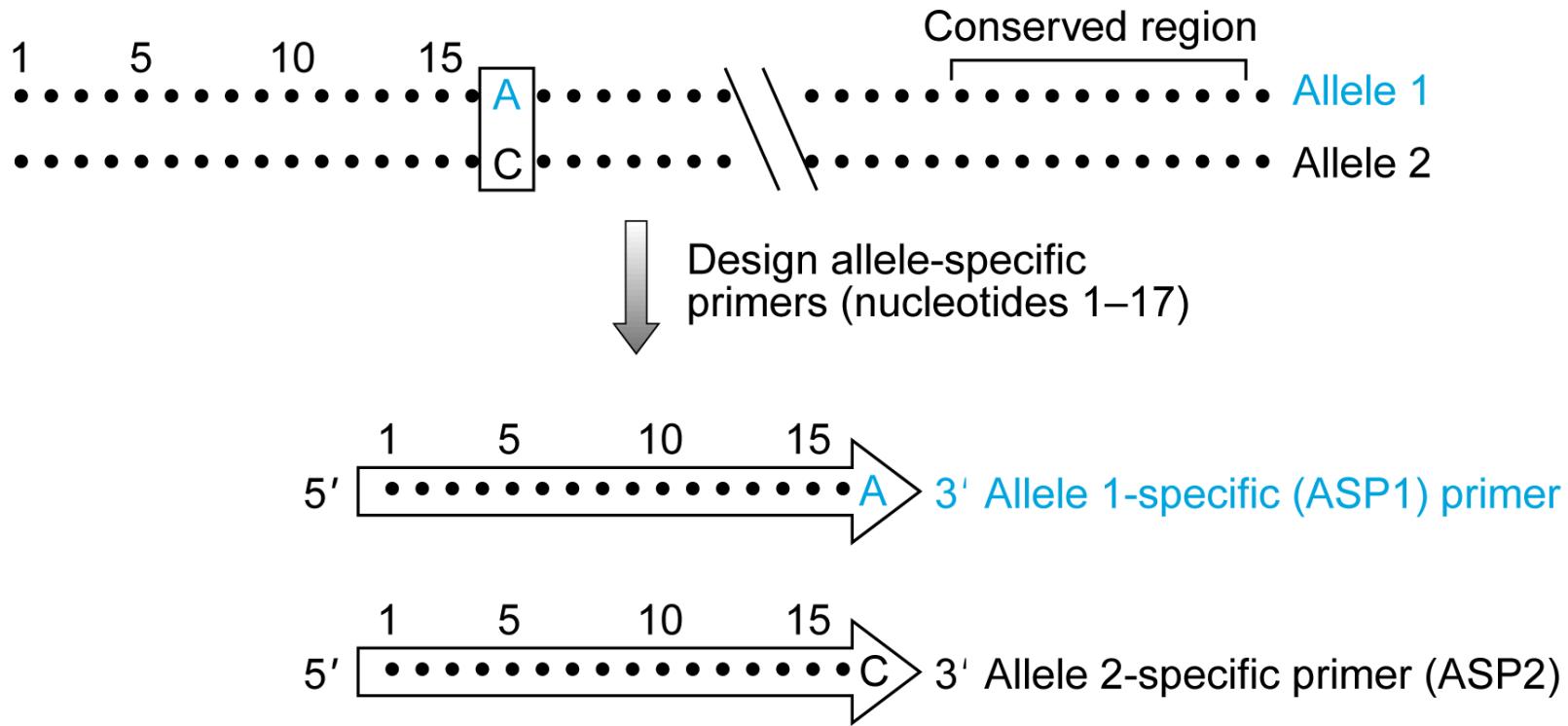
- ① Use PCR primers P1, P2 to amplify alleles in genomic DNA samples



- ② Denature PCR products and size-fractionate by polyacrylamide gel electrophoresis

- ③ Autoradiography

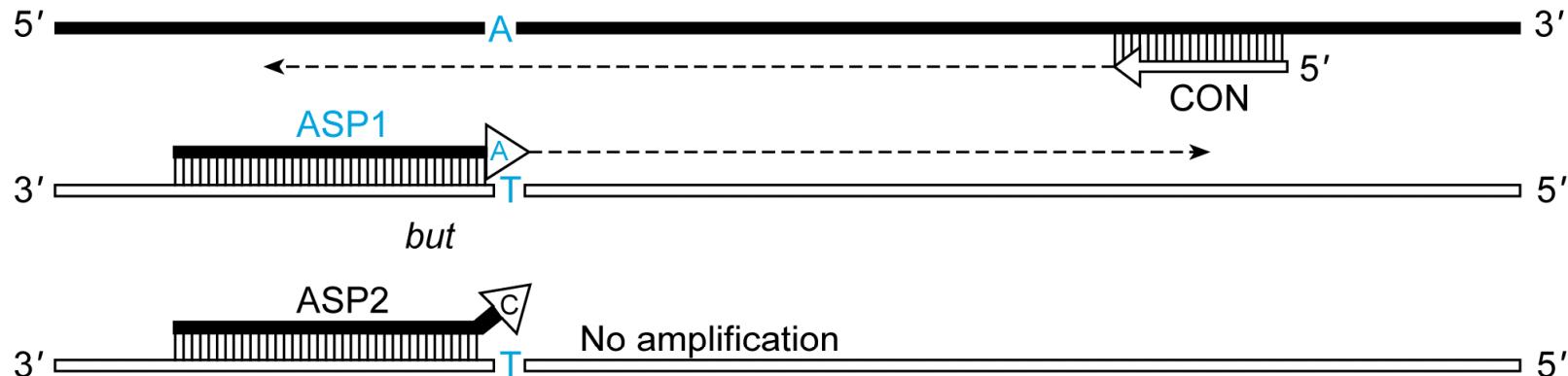
PCR allele-specifica



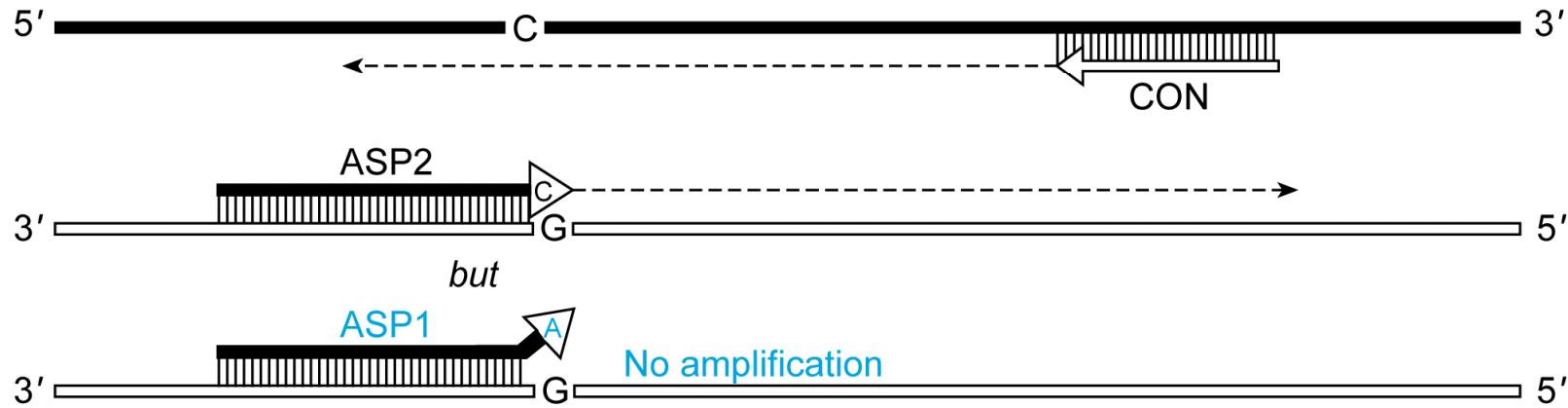


PCR with **ASP1** or **ASP2**
+ conserved primer (CON)

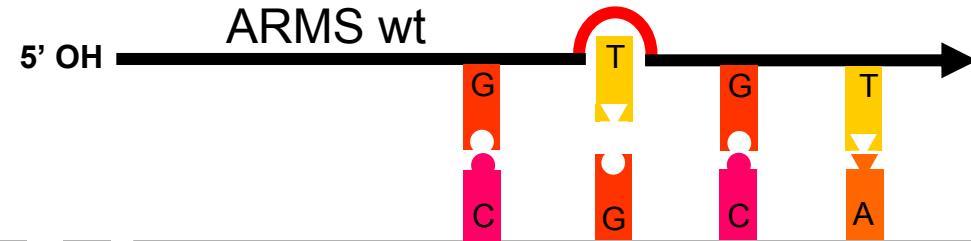
Allele 1 DNA



Allele 2 DNA

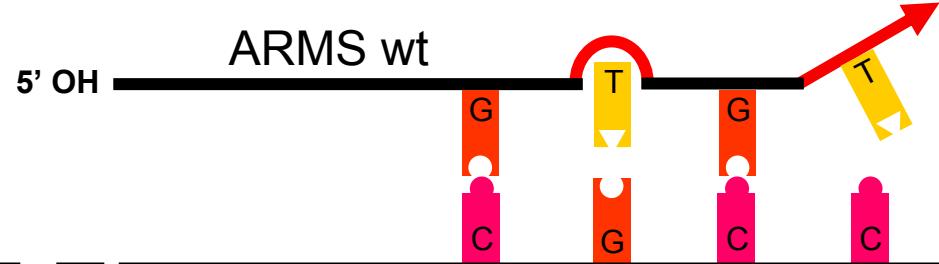


ARMS



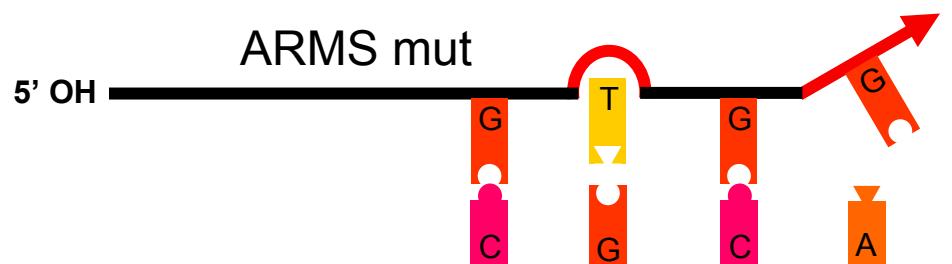
Amplificazione

allele wild type



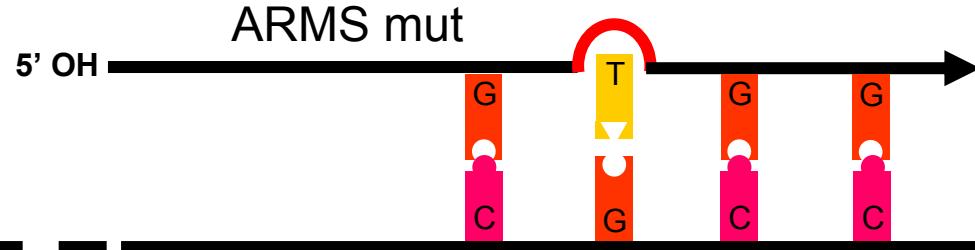
No Amplificazione

allele mutato



No Amplificazione

allele wild type



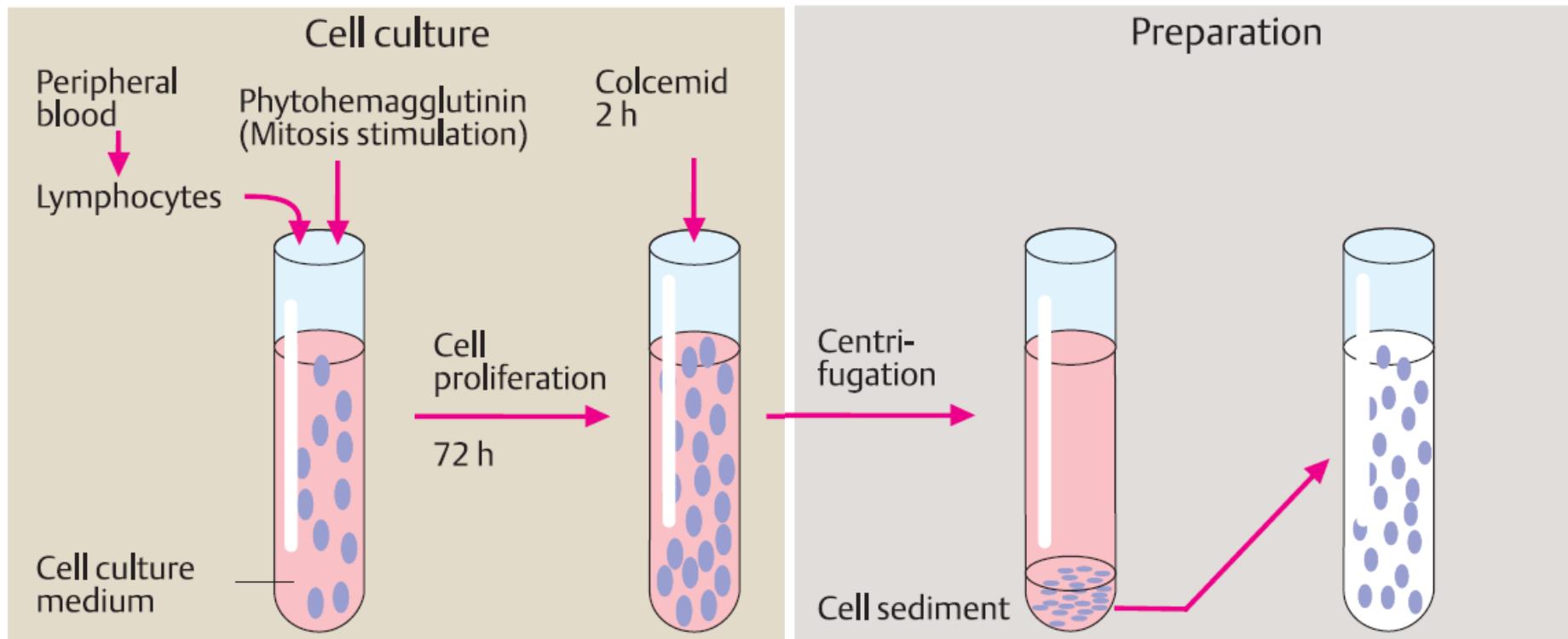
Amplificazione

allele mutato

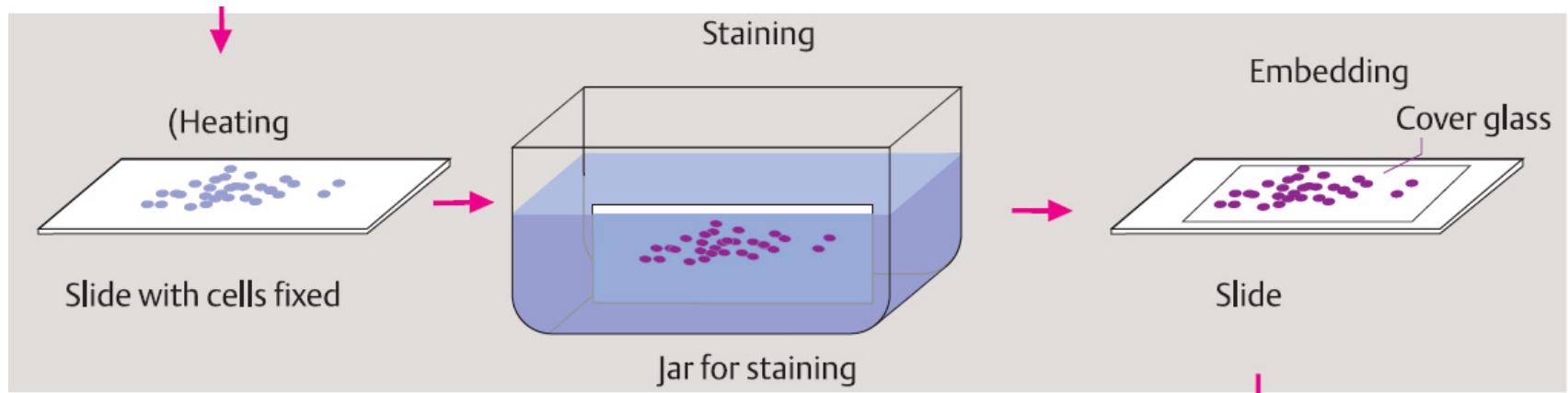
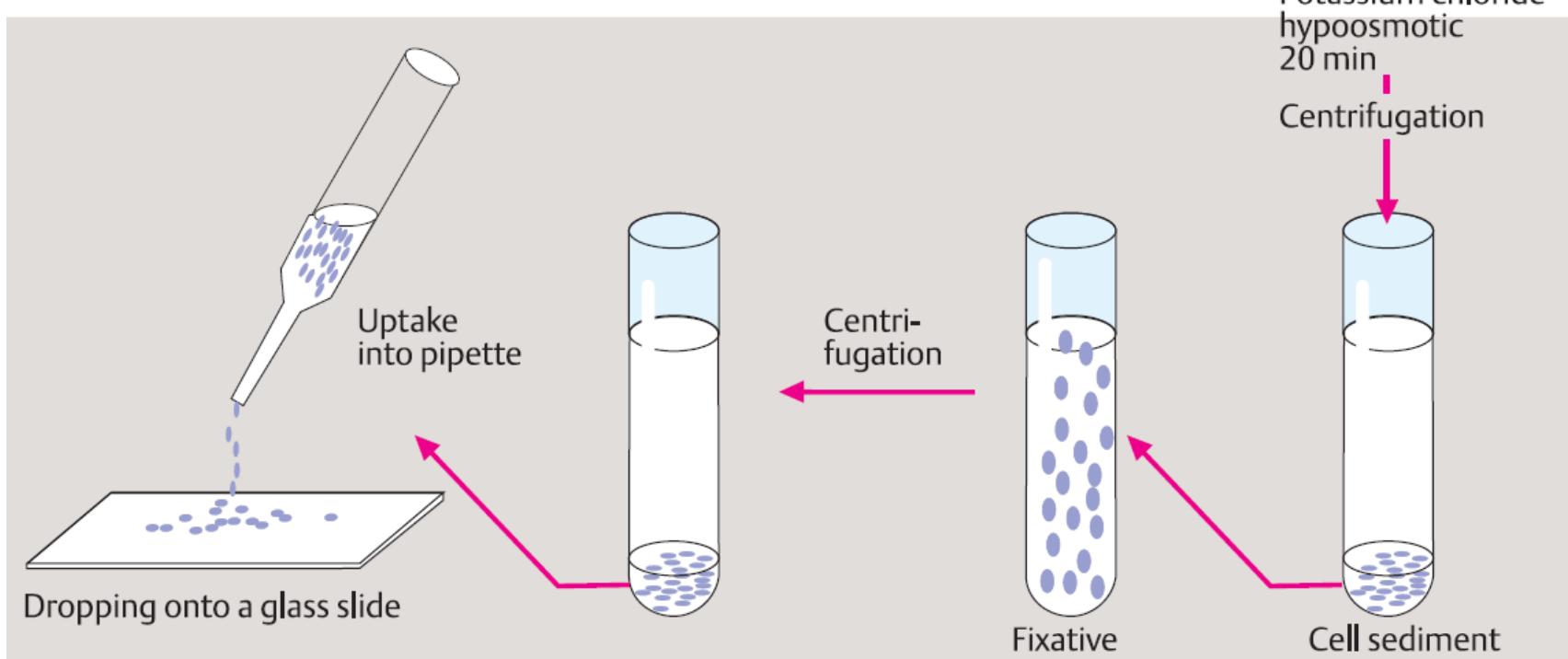
ARMS = amplification refractory mutation sensitive

- La PCR determina la produzione di un amplificato solo se i prodotti contengono una specifica sequenza di DNA riconosciuta dall'estremità 3' d
- Si preferisce introdurre un altro errore di appaiamento del primer in terzultima base
- Questo fa aumentare la specificità

citogenetica di routine

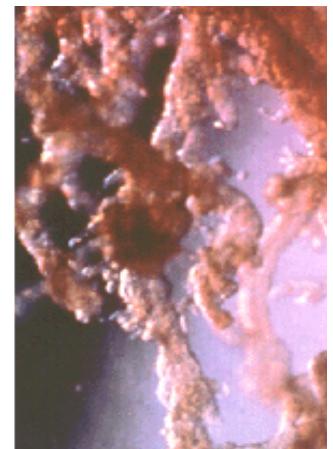
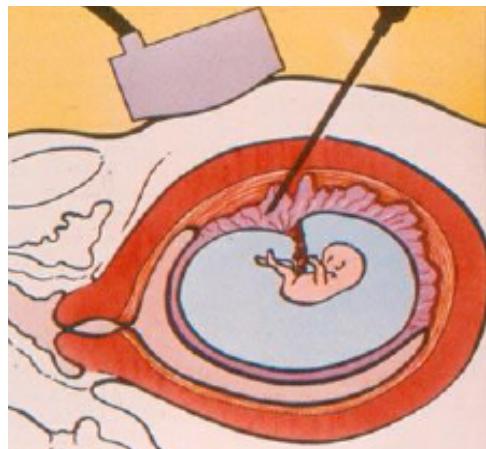


Si parte dai linfociti perché sono facili da ottenere e vanno in mitosi sono rappresentativi di ciascun altra cellula del corpo, ma in caso di mosaico potrebbero non esserlo



citogenetica prenatale

- da amniociti (più difficili da ottenere)
- da villi coriali (sono presenti cellule in attiva riproduzione)
- dovrebbero essere rappresentativi delle cellule del feto

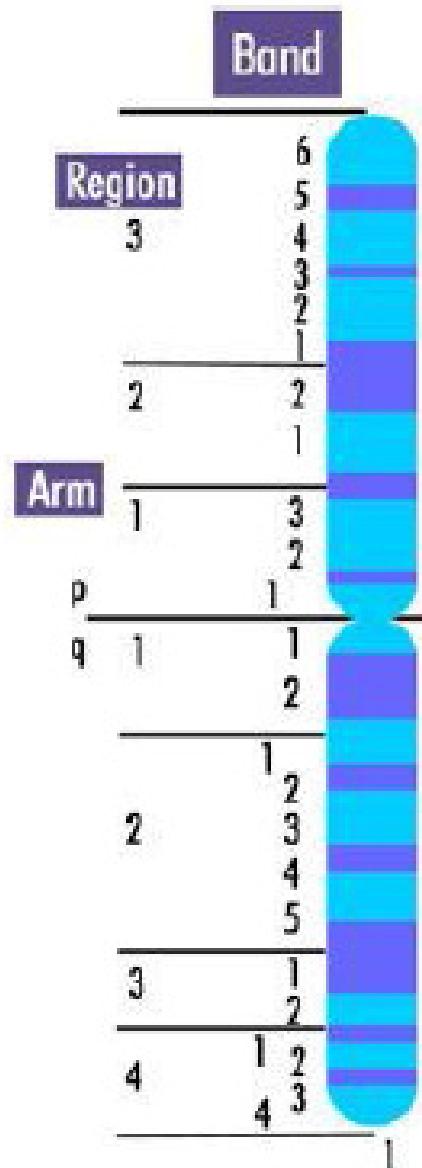


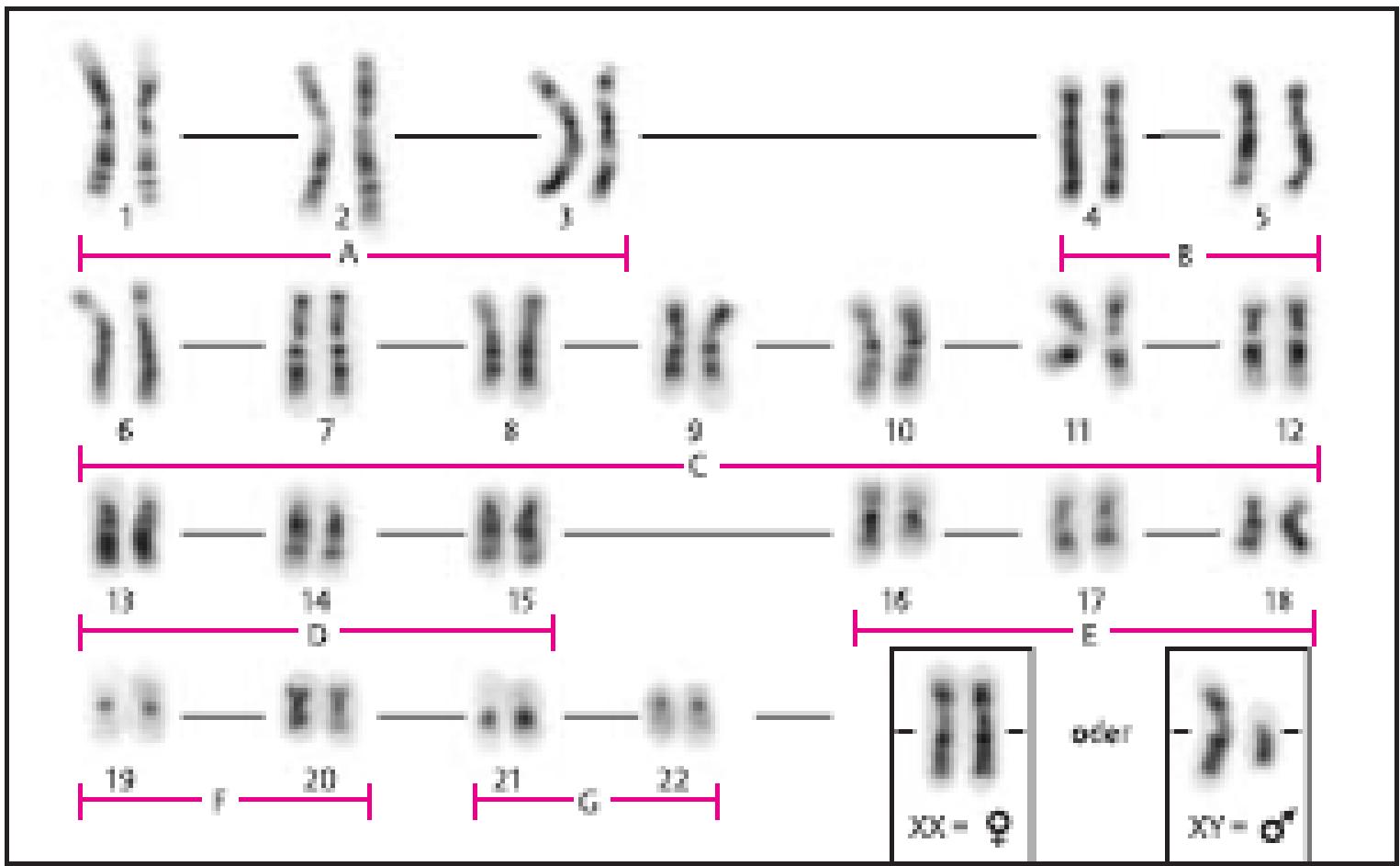
Tecnica	Procedura	Banding pattern
bandeggio G	proteolisi limitata seguita dalla colorazione Giemsa	Le bande scure sono ricche in AT Le bande chiare sono ricche in GC
bandeggio R	denaturazione al calore seguita dalla colorazione con Giemsa	Le bande scure sono ricche in GC Le bande chiare sono ricche in AT
bandeggio Q	digestione enzimatica e colorazione con un colorante fluorescente, la Quinacrina	Le bande scure sono ricche in AT Le bande chiare sono ricche in GC
bandeggio C	denaturazione con idrossido di bario e poi colorazione con Giemsa	Le bande scure sono ricche in eterocromatina costitutiva

Nomenclatura

ISCN

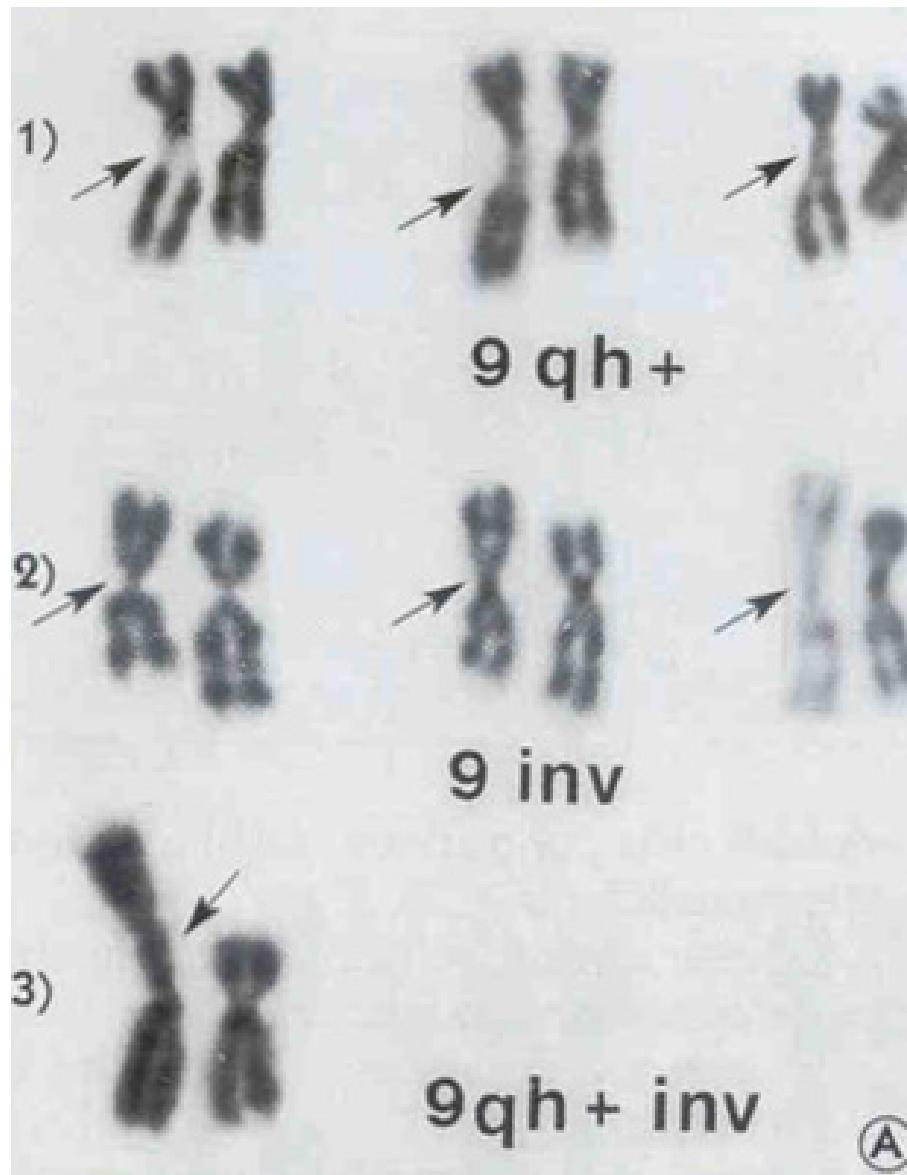
International
System for human
Cytogenetics
Nomenclature





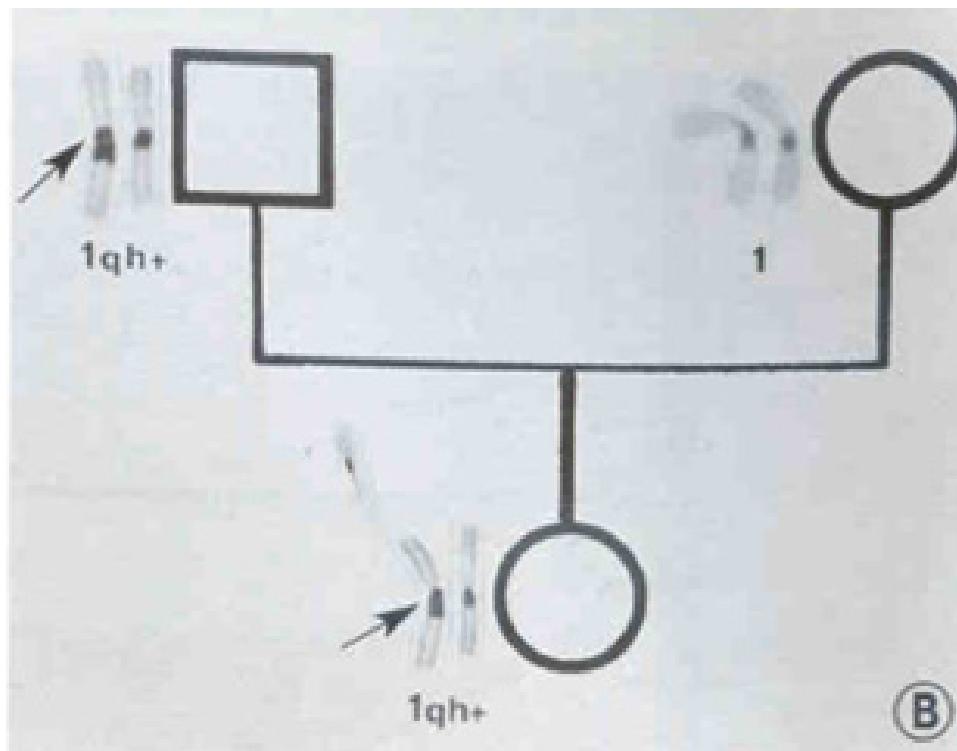
- **metacentrici**, se il centromero è centrale **1, 3, 16, 19, 20**
- **submetacentrici**, se il centromero non è centrale e non è ad un'estremità **2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 18, X, Y** (**in rosso i molto submetacentrici con anche il 9, 17 e 18**)
- **acrocentrici**, se il centromero è ad un'estremità **13, 14, 15, 21, 22**

Eteromorfismi citogenetici

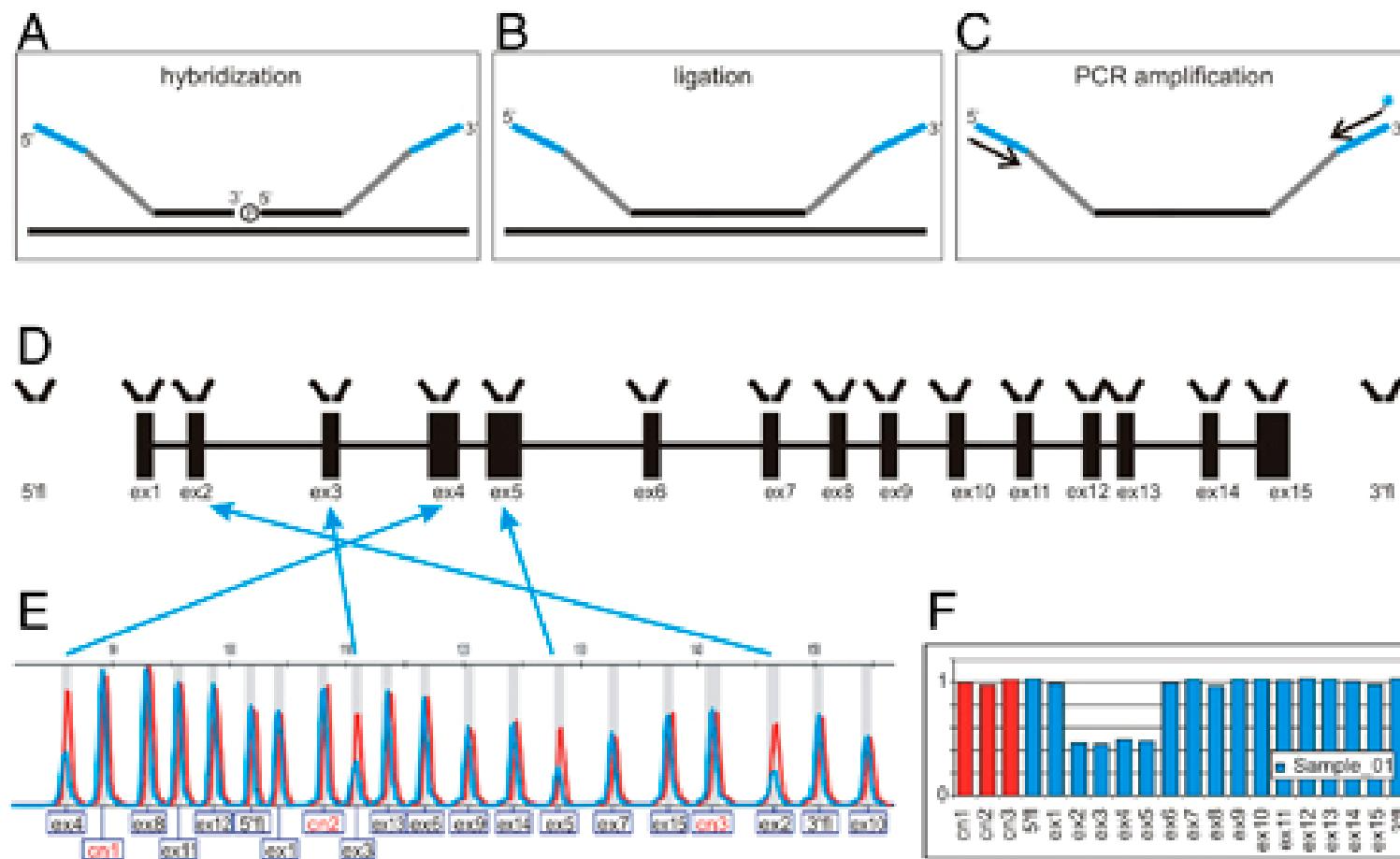


- Variazione pericentromerica del crom. 9 9qh+
- Inversione 9 inv
- Variazione + inversione

Ereditarietà della variazione pericentromerica del cromosoma 1



Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

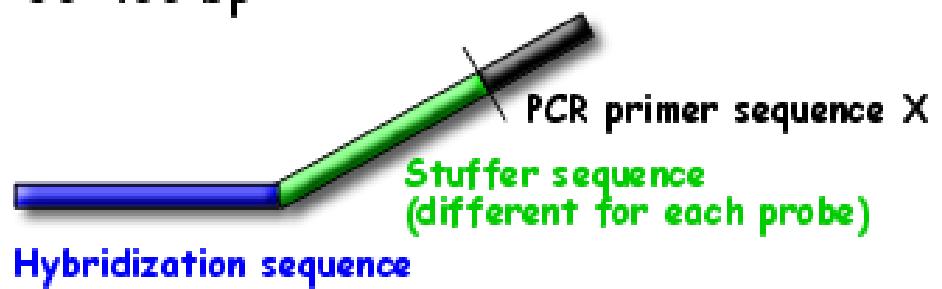


Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Synthetic oligonucleotide
50-60 bp

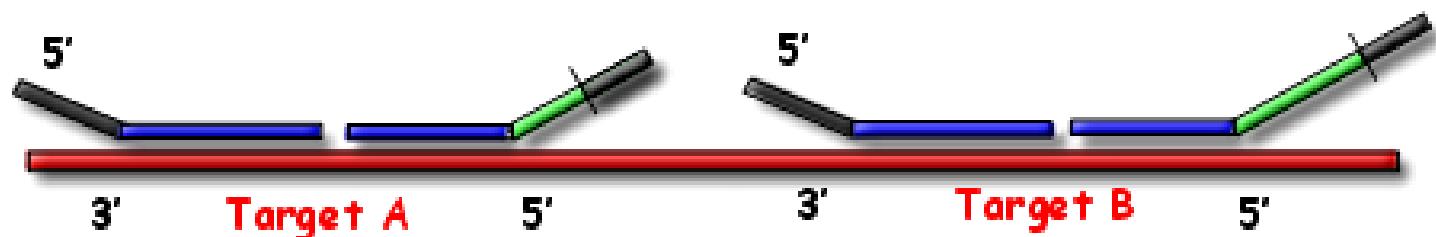


M13-derived oligonucleotide
60-450 bp



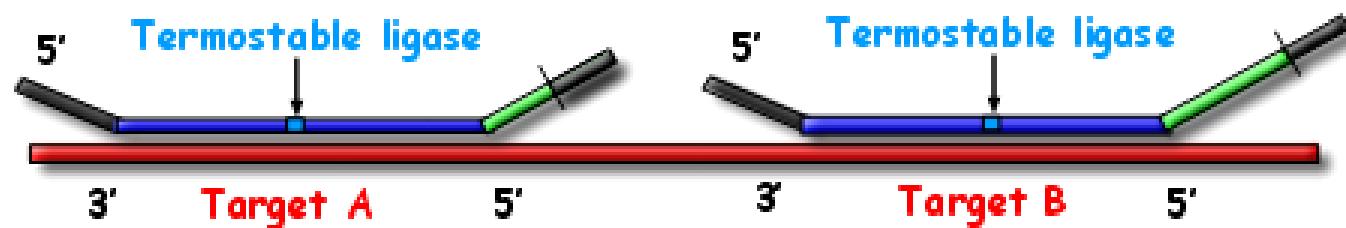
Ibridazione

1. La MLPA probemix è aggiunta al DNA genomico denaturato
2. Le due parti di ciascuna probe si posizionano sul genoma in posizioni adiacenti



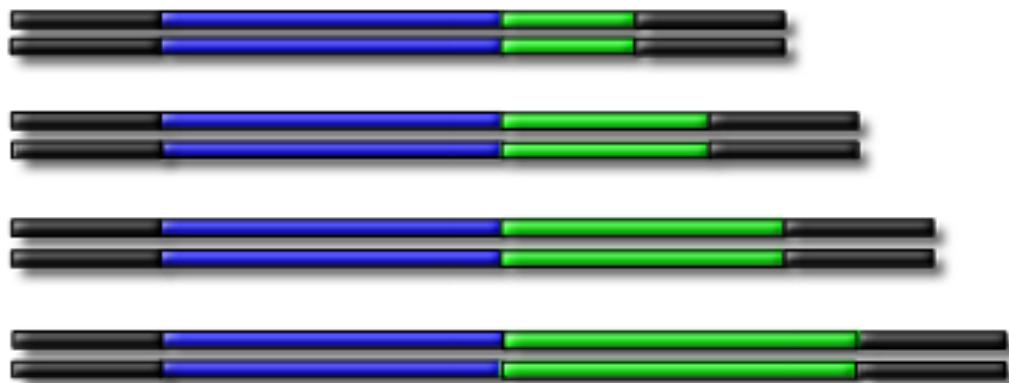
ligasi

3. Le Probes sono ligate da una DNA ligase termostabile



PCR amplification

4. Un primer universale è usato per amplificare tutte le probes ligate
5. I prodotti di PCR hanno ciascuno una lunghezza univoca (130 480 bp)

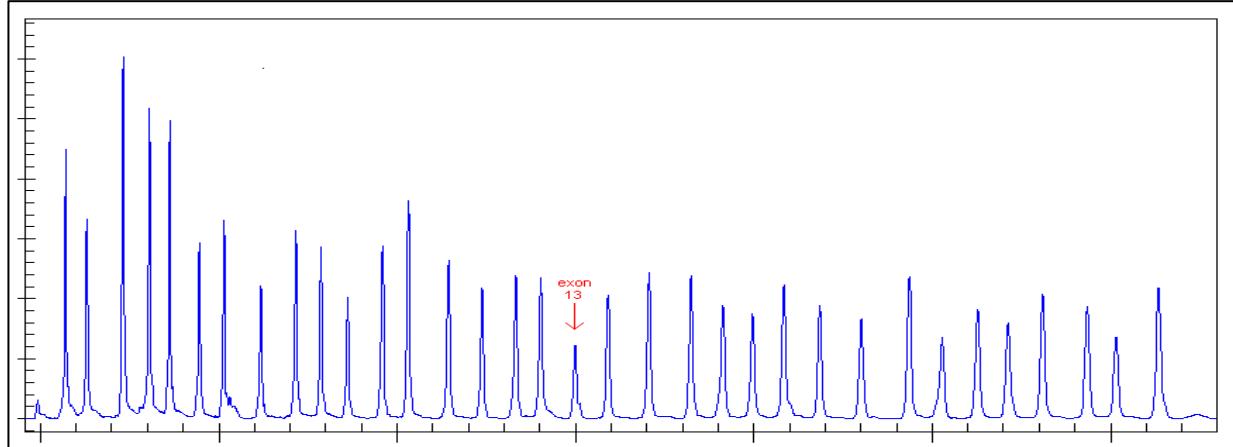
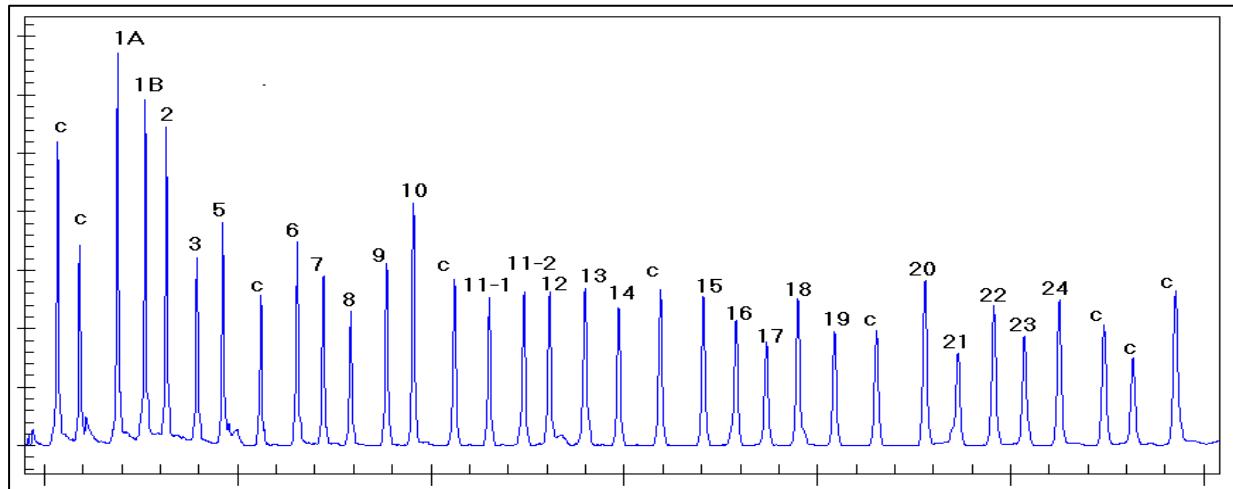


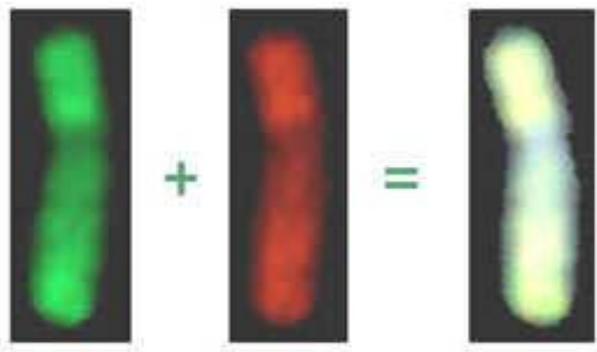
separazione e quantificazione mediante elettroforesi capillare

Ciascun picco è l'amplificato di una sonda specifica

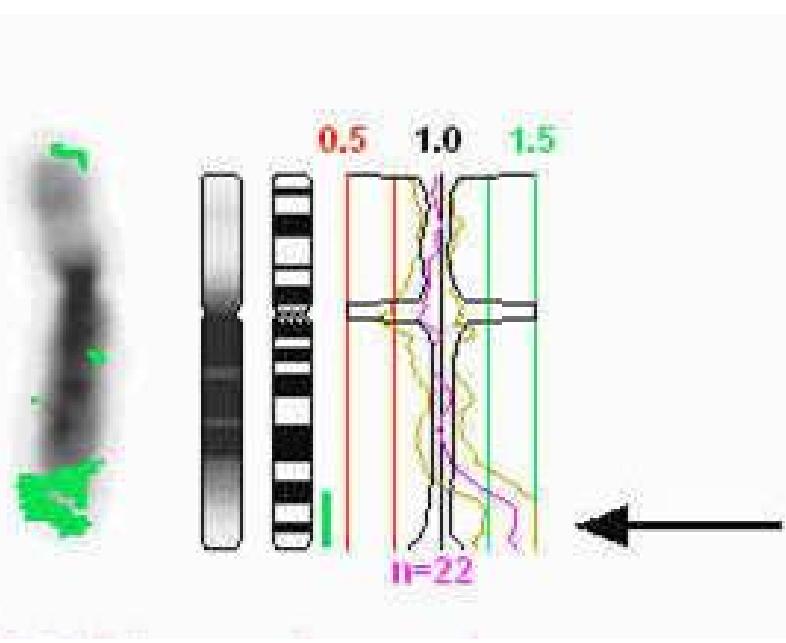
I campioni sono confrontati con più controlli

Una differenza di altezza del picco è calcolata rispetto a quella attesa e alla lunghezza

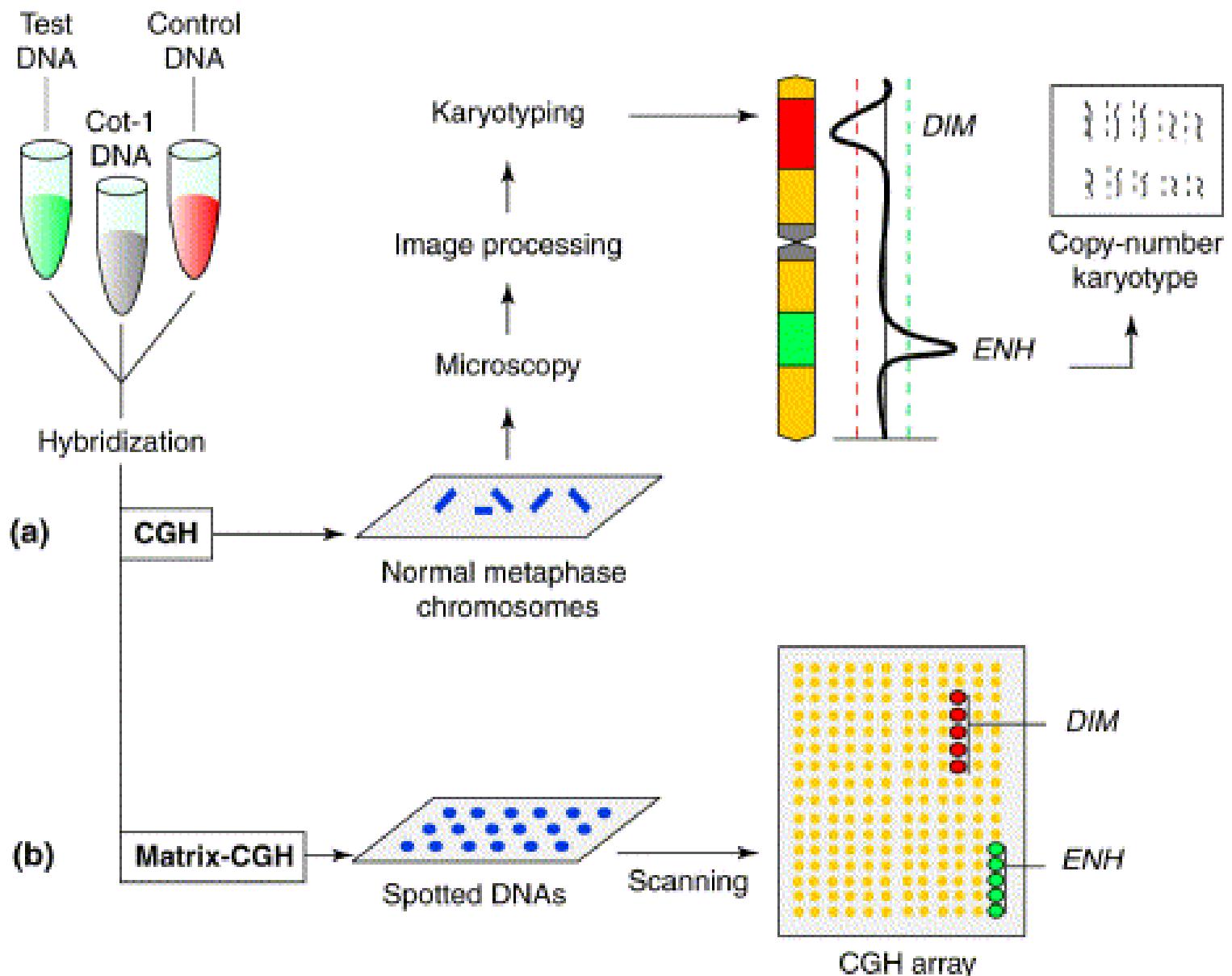


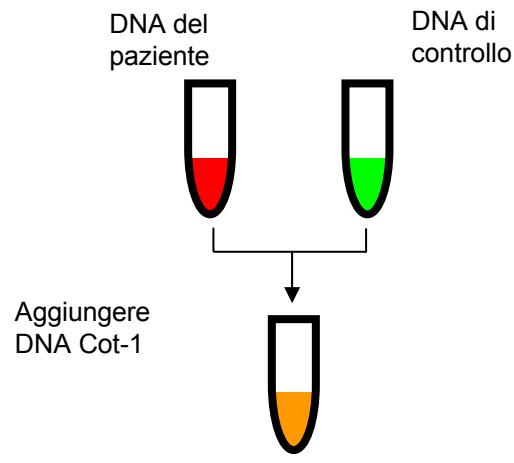


La tecnica del CGH (comparative genomic hybridization) permette l'individuazione di sequenze delete o duplicate nel genoma da testare (red) mediante il confronto con un genoma di riferimento (green).



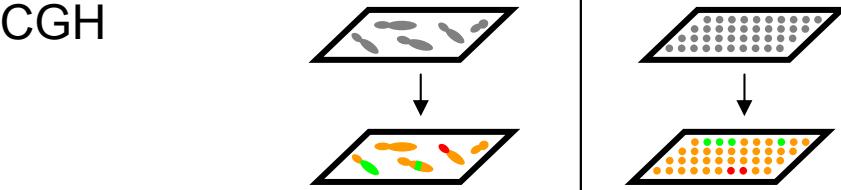
Sono preparate due sonde fluorescenti di colore diverso che ibridano contemporaneamente sui cromosomi. Se in una regione cromosomica prevale il colore (green) relativo al genoma di controllo questo significa che il genoma da testare (red) ha una delezione in quella regione





Ibridazione

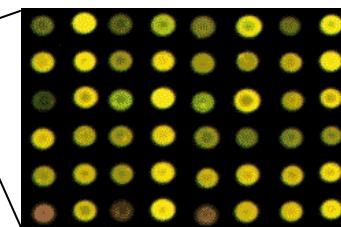
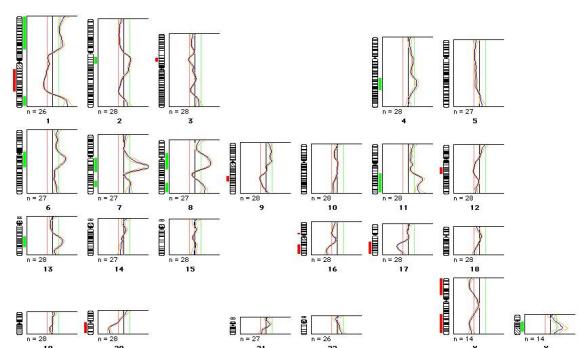
CGH



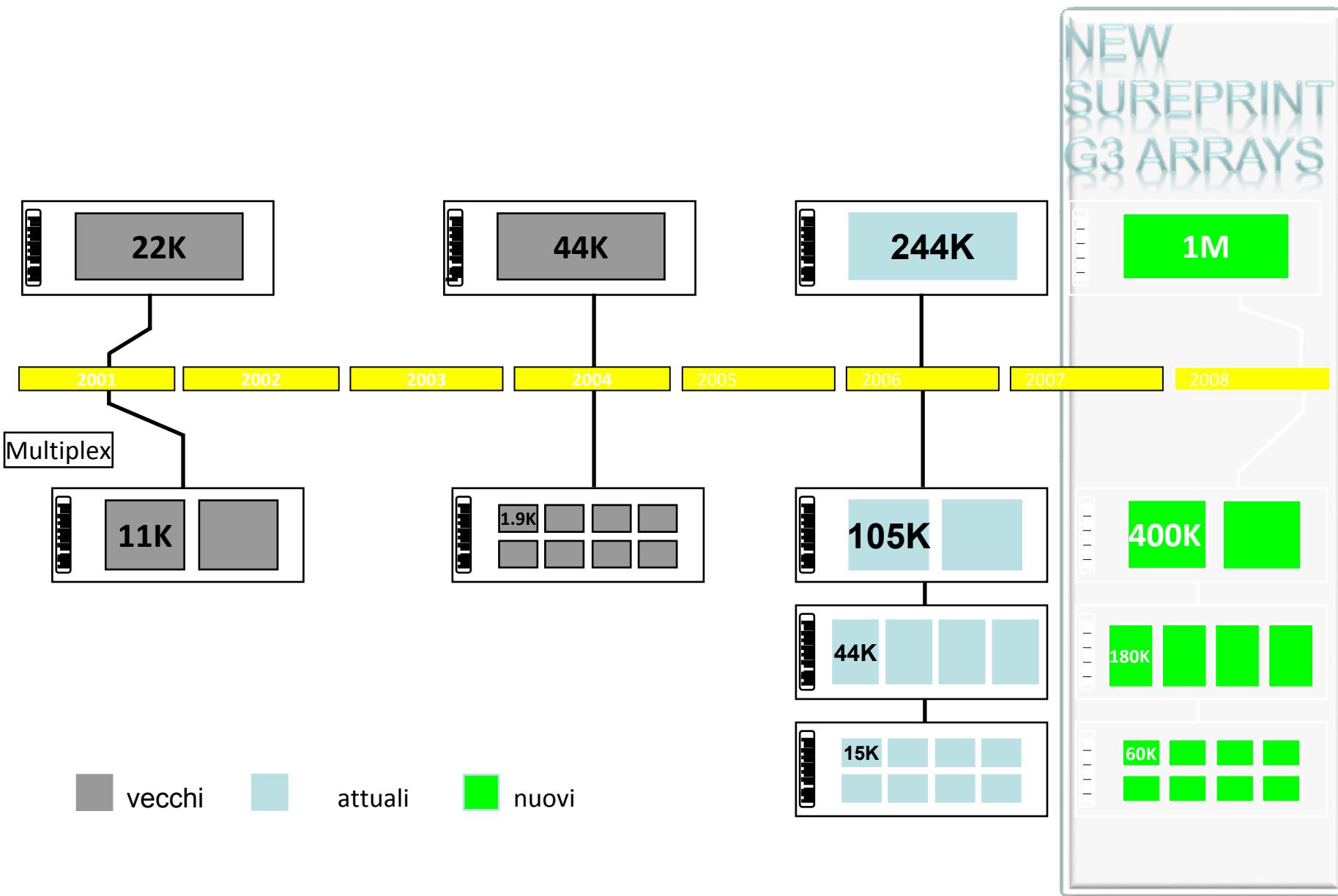
CGH array



Analisi delle immagini con software dedicati



Formati dei Microarray Agilent

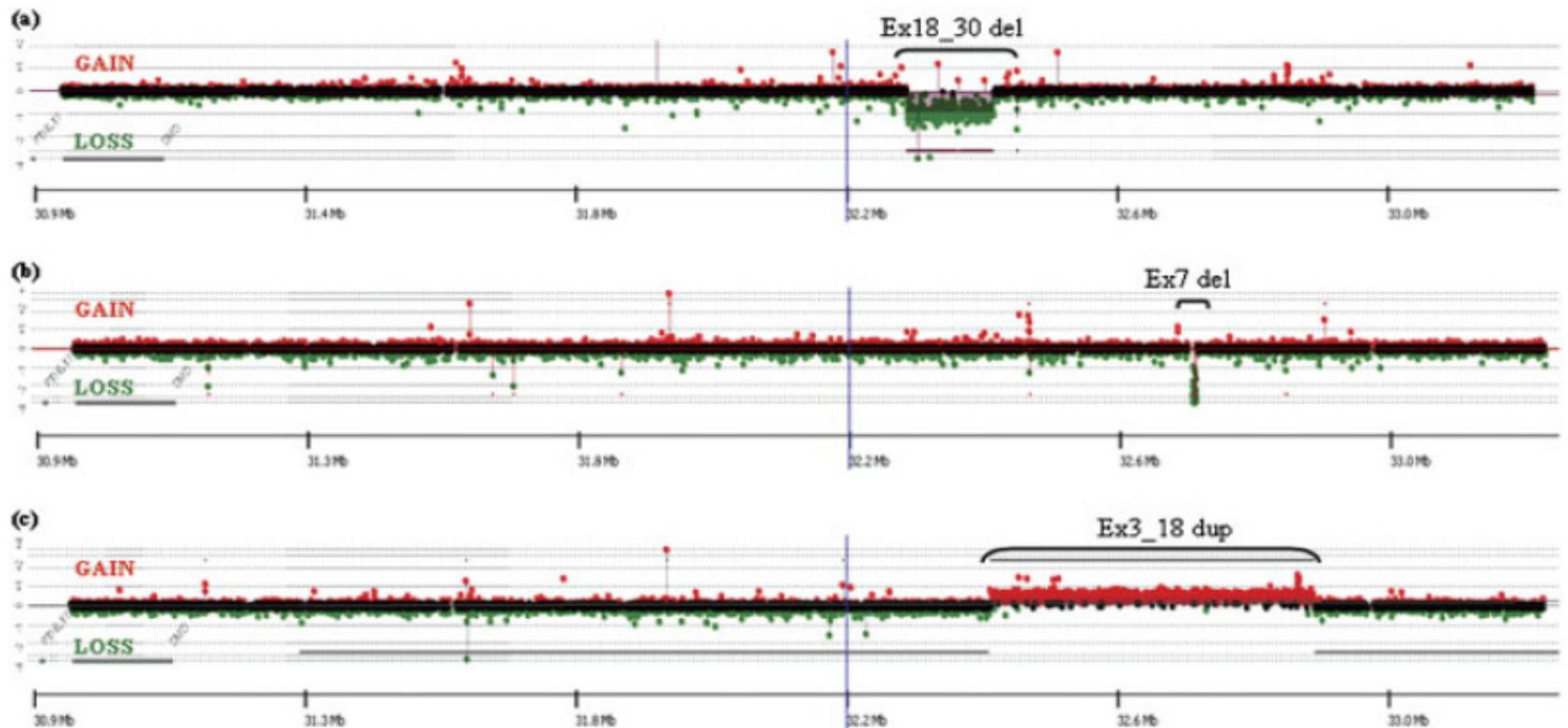


44,000-oligonucleotide with 8,769 interrogating probes
(60-mer oligonucleotides) Agilent Technologies

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

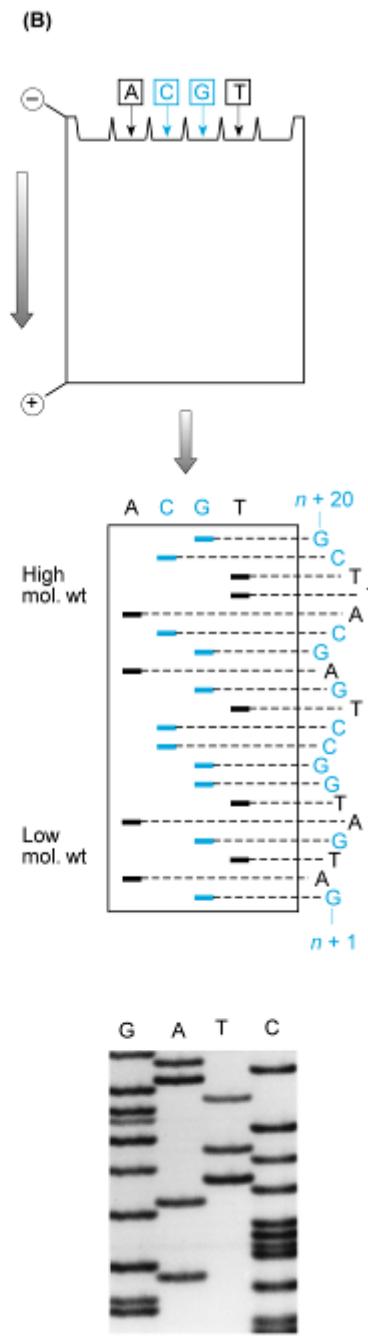
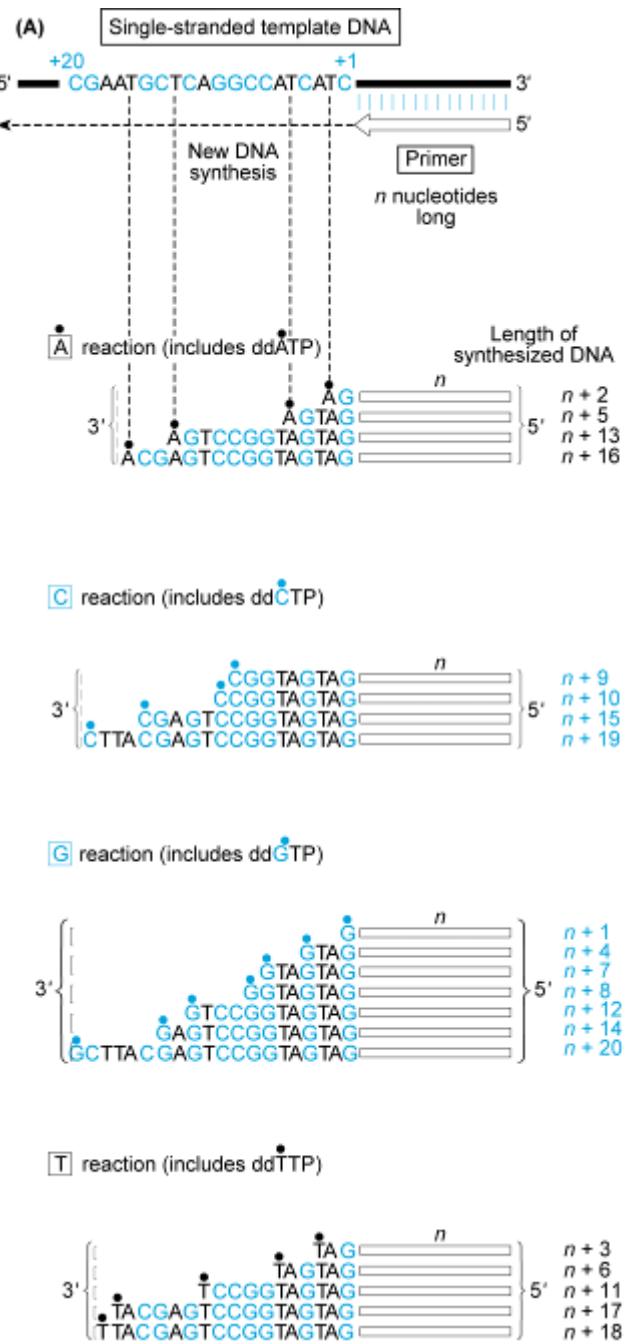
digestion with Alul and Rsa I and labeling

Agilent CGH-Analytics V3.4s software



F

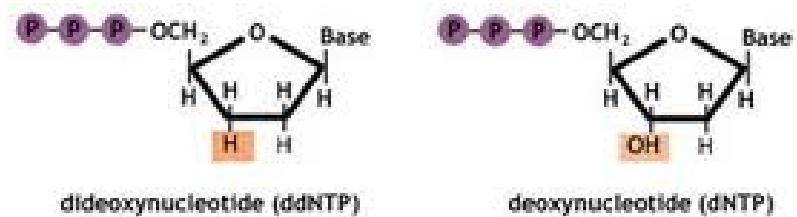
F





Frederick Sanger
Nobel price 1958 and 1980
born August 13 1918, died
November 19 2013

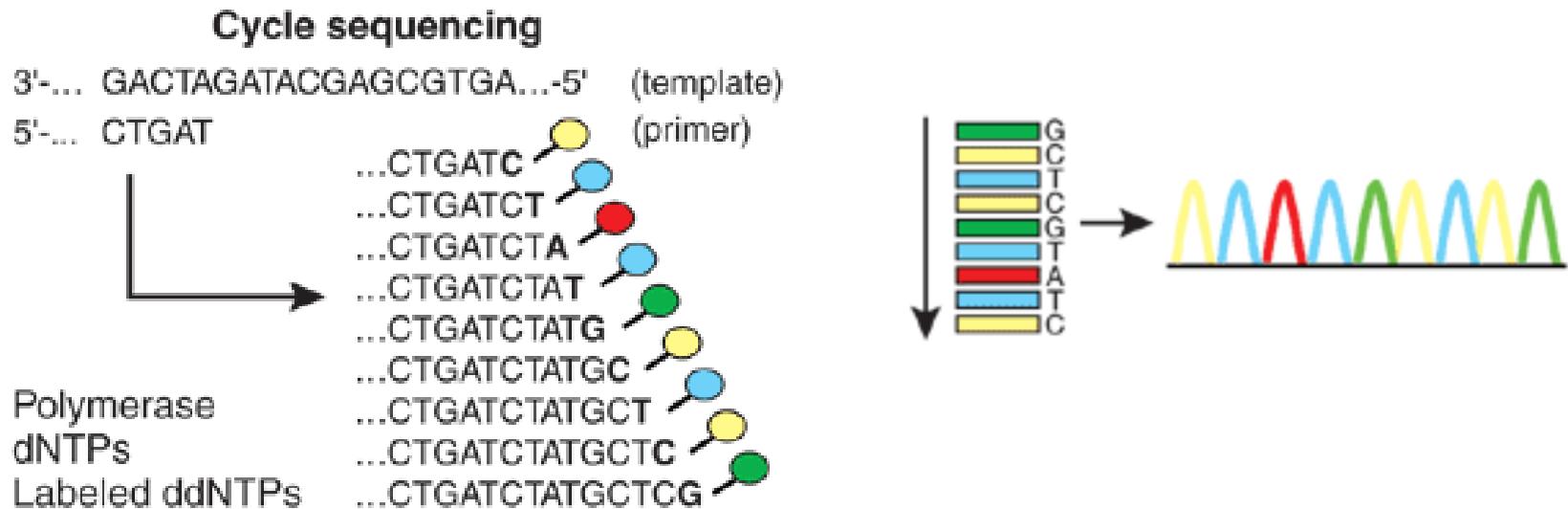
storia: Sanger sequencing



I ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) sono detti terminatori perché bloccano la polimerizzazione del DNA

Metodo “Sanger” modificato

- le reazioni di sequenziamento sono ricopiature di milioni di stampi di DNA tutti identici
- ciascuna si blocca per l'inserimento casuale di un nucleotide fluorescente terminatore al posto di un nucleotide normale che avrebbe fatto continuare la ricopiatura
- la separazione dei frammenti fluorescenti per dimensione consente la decodifica



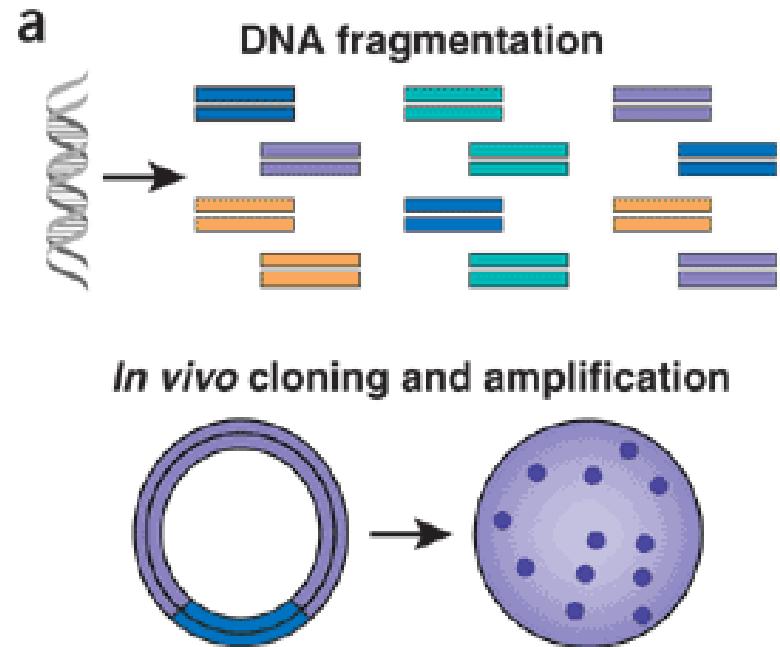
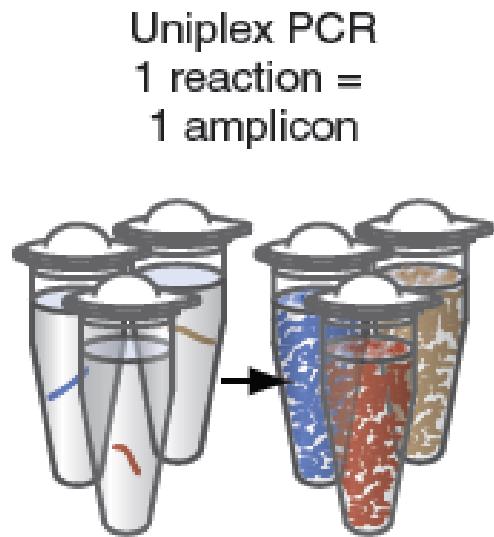
“prima generazione” ***sequenziamento del DNA secondo il metodo Sanger***

Il sequenziamento con tutte le versioni modificate del metodo **Sanger** ha dominato nella scienza e nell'industria per almeno 20 anni e ha consentito la lettura del genoma umano e la scoperta di oltre 2.500 malattie genetiche monogeniche

Il metodo Sanger rappresenta la tecnologia di **“prima generazione”**, mentre i nuovi metodi sono denominati **“next-generation sequencing (NGS)”**

Metodo “Sanger”

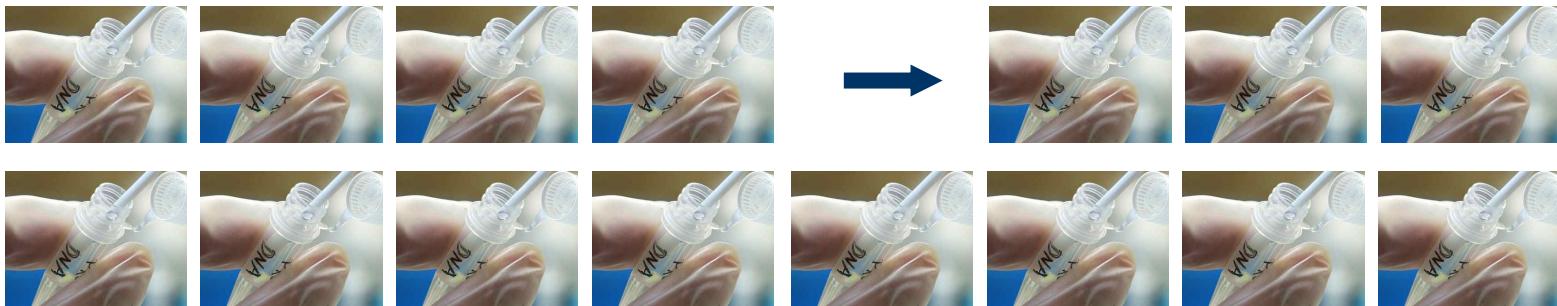
- prima si isolano segmenti di DNA chimicamente omogenei
- si replicano fino a nanogrammi di DNA
- poi partono le singole reazioni





Basato su Sanger è il gene-by-gene testing

- Troppo costoso e lungo per trovare la causa di malattie genetiche eterogenee

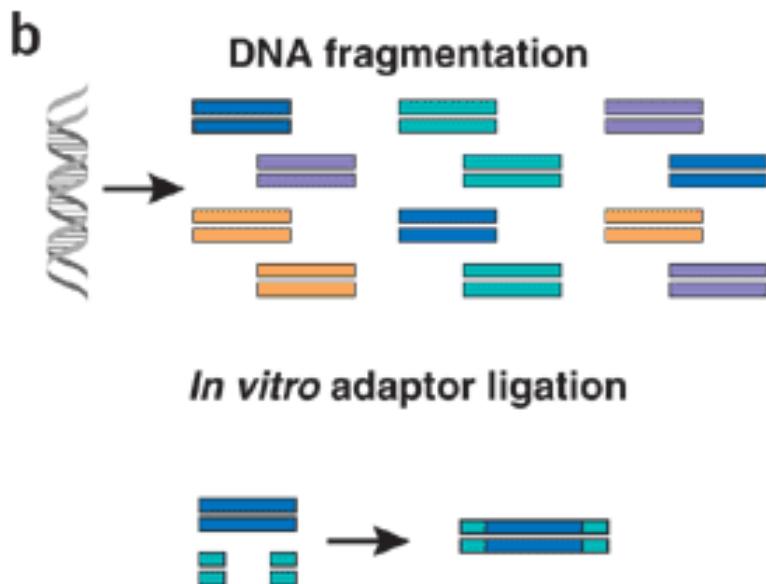


2^a generazione “next-generation sequencing (NGS)”

- Il principale vantaggio è poter lavorare con **milioni** di molecole di DNA senza doverle separare
- la possibilità tecnica di produrre un volume enorme di dati a **costi** estremamente più bassi ed in **tempi** estremamente più rapidi
- Il potenziale dell'NGS è simile ai primi tempi della PCR con il limite principale dovuto all'immaginazione

2^a generazione “next-generation sequencing (NGS)”

- prima si frammenta il DNA casualmente
- si aggiungono adattatori comuni
- poi partono milioni di reazioni di sequenziamento individuali

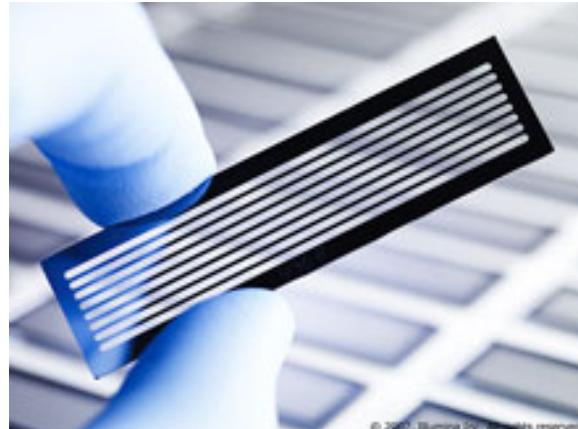


flow cell

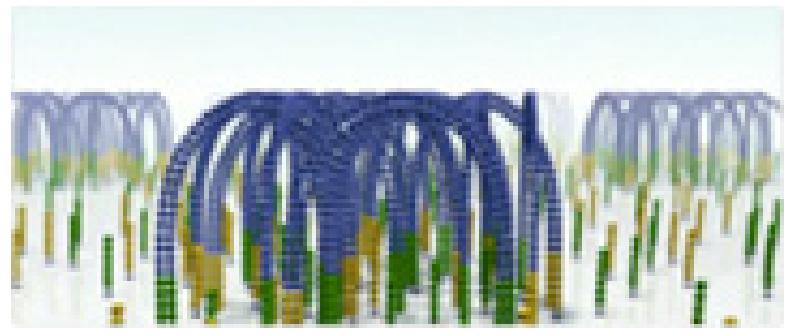
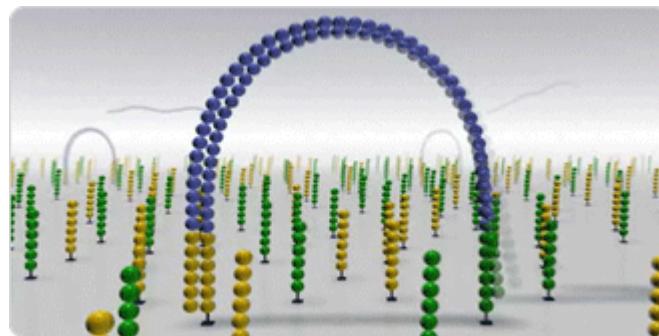


© 2007, Illumina Inc. All rights reserved.

la Solid-phase amplification può generare fino a 2.000 milioni di clusters di molecole di DNA distinte (Illumina HiSeq) per vetrino



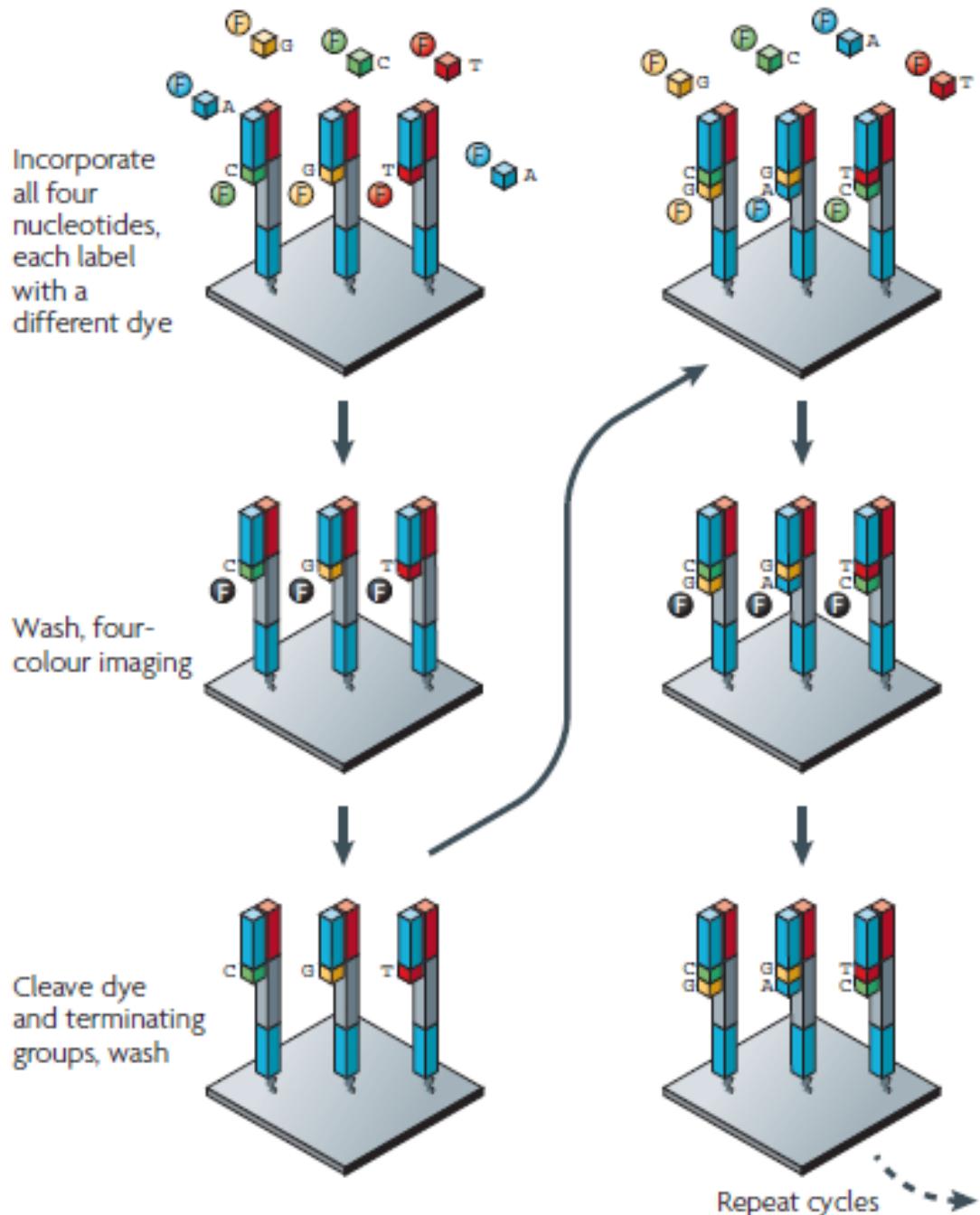
flow cell



Bridge PCR

illumina®

a Illumina/Solexa — Reversible terminators

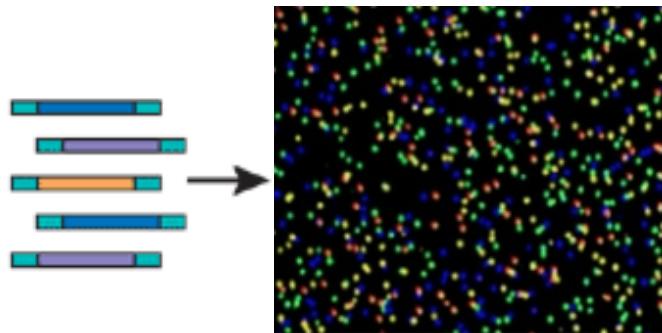


illumina®

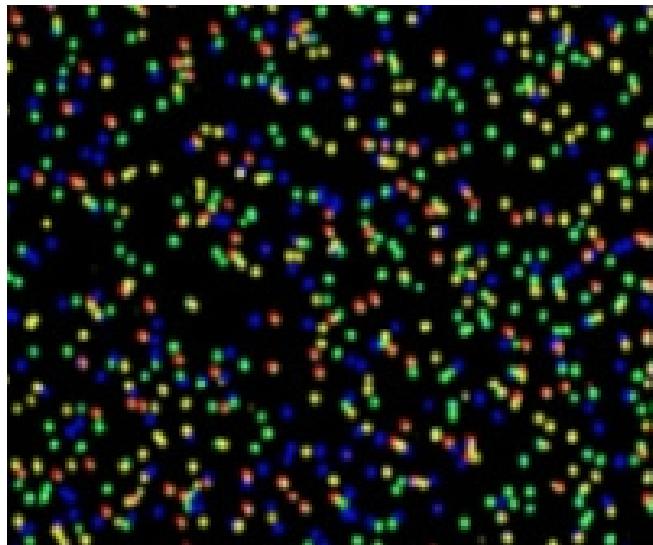
I gruppi bloccanti
attaccati al 3' causano
un ostacolo
nell'incorporazione di un
altro nucleotide, ma
l'ostacolo è rimosso
dopo ogni lettura e la
reazione prosegue

Sistema Illumina

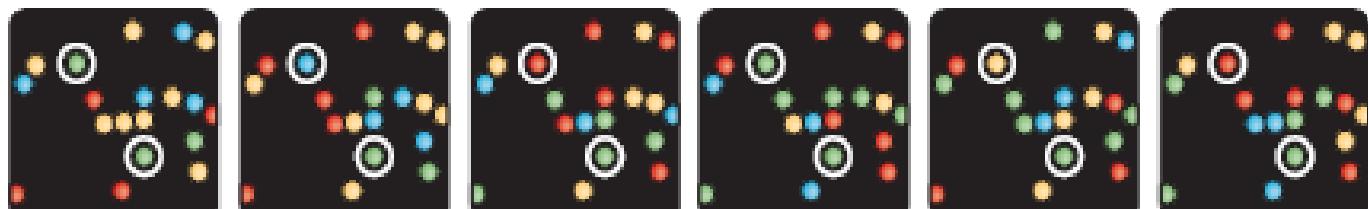
- ciascun frammento di DNA è immobilizzato su una superficie solida
- molecole di DNA spazialmente separate permettono di eseguire simultaneamente milioni di reazioni di sequenziamento
- ciascuna reazione produce una fluorescenza puntiforme che è fotografata
- la scansione di queste immagini consente di leggere la sequenza per ogni punto



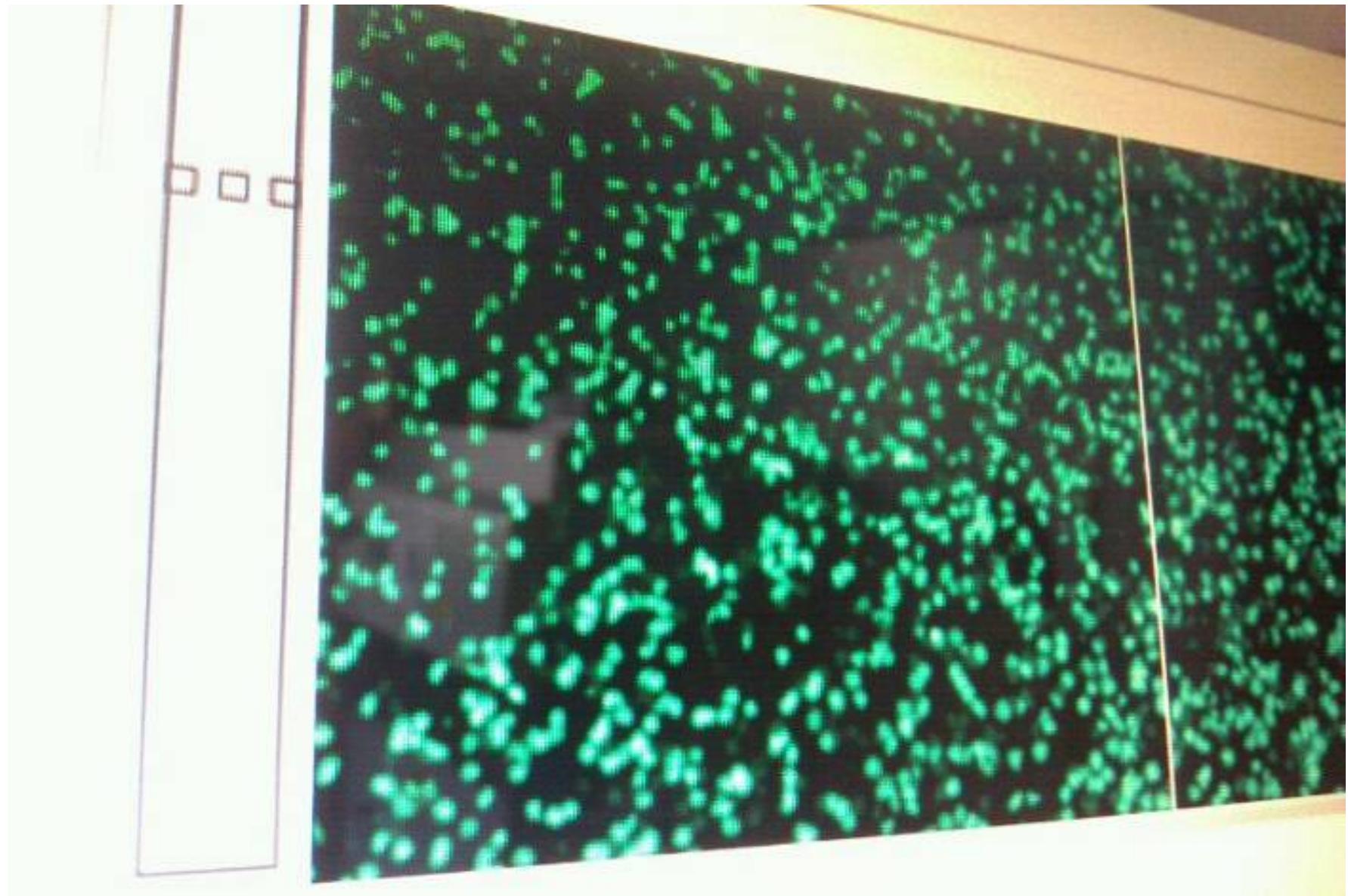
L'Illumina HiSeq2000 legge
oltre 600.000.000.000 di basi
di DNA per corsa



illumina®



Top: CATCGT
Bottom: ccccccc



Il termine “NGS” indica tipologie di analisi differenti



©2011, Illumina Inc. All rights reserved.

genoma

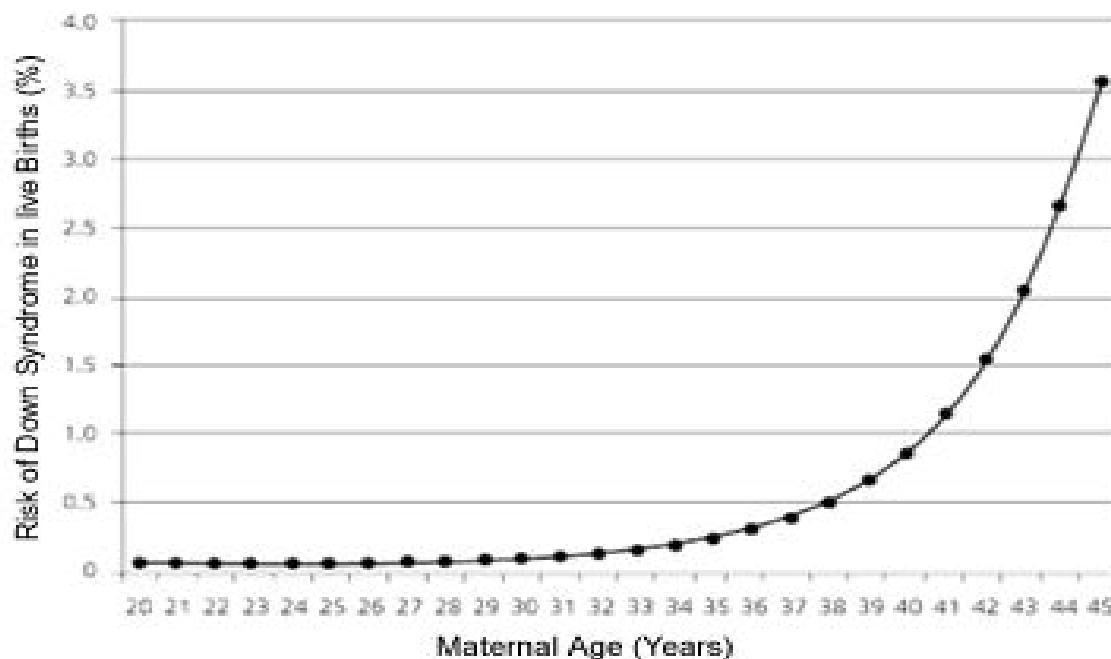
copertura @40 x (\sim 150 Gb
of sequenze/campione) =
1,000 Gbytes

esoma

copertura @60 x (\sim 8
Gb/campione)
= 60 Gbytes/campione

Rischio di sindrome di Down in rapporto all'età materna

età	Frequenza(nati vivi)
< 35	< 0.3 %
37	0.5 %
40	1 %
50	10 %



tritest
di screening, non diagnostico

anomalia fetale	AFP Alfa-feto proteina	hCG Gonadotropina corionica umana	uE estriolo non coniugato
NTD =difetti del tubo neurale*	↑	Normale	Normale
Trisomia 21 sensibilità 70% specificità 95%	↓	↑	↓
Trisomia 18	↓	↓	↓

* NTD: anencefalia, spina bifida and encefalocele

Il duotest (double screen) include la valutazione del PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A) e la frazione libera della gonadotropina corionica (free-betaHCG).

Viene effettuato tra la 10ma e la 13ma settimana di gravidanza dal siero della gestante

	Translucenza nucale	free-βHCG	PAPP-A
Trisomia 21	++	++	-
Trisomia 13,18	+++	--	--
S. di Turner	++++	+/-	-
Triploidia materna	+/-	-----	----
Triploidia paterna	+++	++++	+/-

Classical Down syndrome screening

NT (mm)	PAPP-A (MoM)	B-HCG (MoM)
Normal : 2.0	Normal : 1.0	Normal : 1.0
T21 : 3.4	T21 : 0.5	T21 : 2.0
T18 : 5.5	T18 : 0.2	T18 : 0.2
T13 : 4.0	T13 : 0.3	T13 : 0.5

NIPT

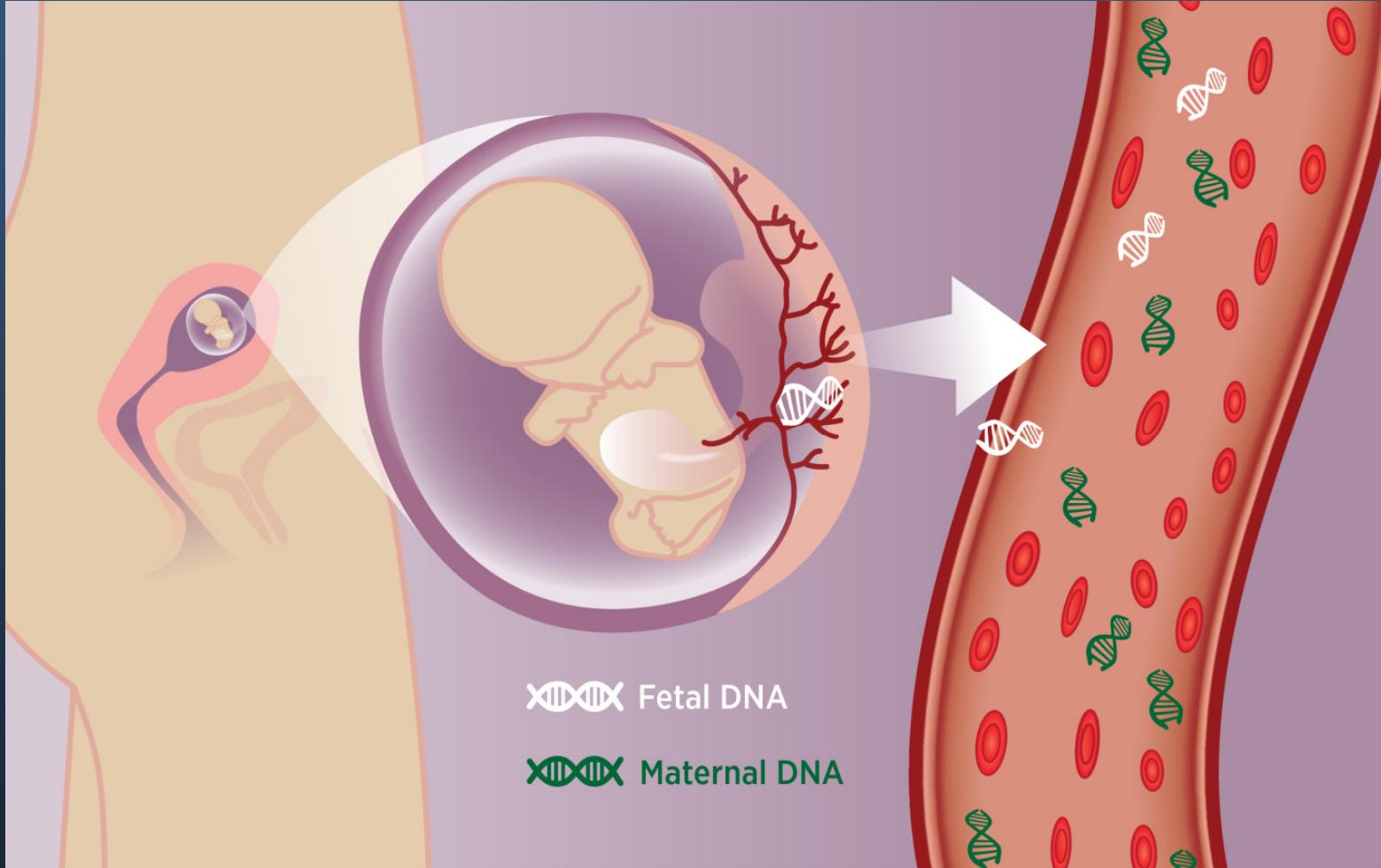
NON – INVASIVE PRENATAL TESTING

Testing delcff DNA (cell free fetal DNA)

dal sangue materno durante la gravidanza a partire dalla 10^o settimana

Per trisomie 21, 18 and 13

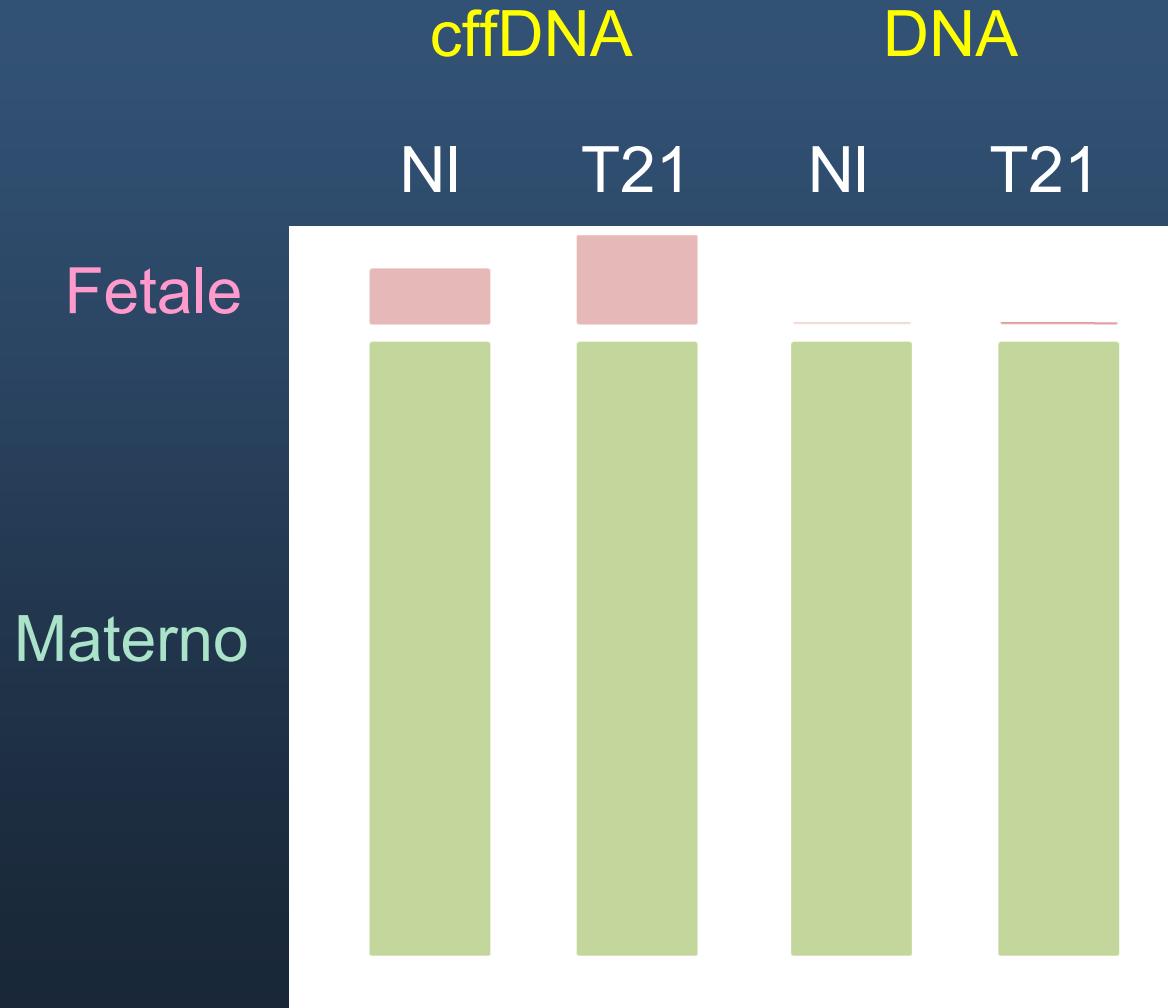
Cell Free Fetal DNA (cff DNA) in Maternal Blood



NIPT cff DNA

- < 1 % del DNA totale nel circolo materno è fetale
- 5-30 % del cell-free DNA nel circolo materno è fetale
- La NIPT misura il rapporto tra le sequenze che appartengono ai cromosoma 21, 18 e 13 rispetto alle sequenze di controllo

NIPT cffDNA



Importanza della frazione fetale

