

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)

Alberi genealogici (simboli)

matrimonio/partnership	
divorzio/separazione	
matrimonio/partnership tra consanguinei	
fratelli/figli	
gemelli identici (monozigoti)	
gemelli non identici (dizigoti)	

	maschio	femmina	n.d.
individuo			
individuo affetto (una specifica condizione)			
molti individui (vedere numero)			
molti individui deceduto			
gravidanza in corso P=pregnancy			
aborto			
propositus persona da cui è partito l'albero			

Alberi genealogici (simboli)

matrimonio/partnership	
divorzio/separazione	
matrimonio/partnership tra consanguinei	
fratelli/figli	<p>sibship line</p> <p>individual line</p>
gemelli identici (monozigoti)	
gemelli non identici (dizigoti)	

	maschio	femmina	n.d.
individuo			
individuo affetto (una specifica condizione)			
molti individui (vedere numero)			
molti individui deceduto			
gravidanza in corso P=pregnancy			
aborto			
propositus persona da cui è partito l'albero			

distinguiamo due grandi categorie di patologie genetiche:

1) monoalleliche, dovute alla mutazione di una sola copia del DNA

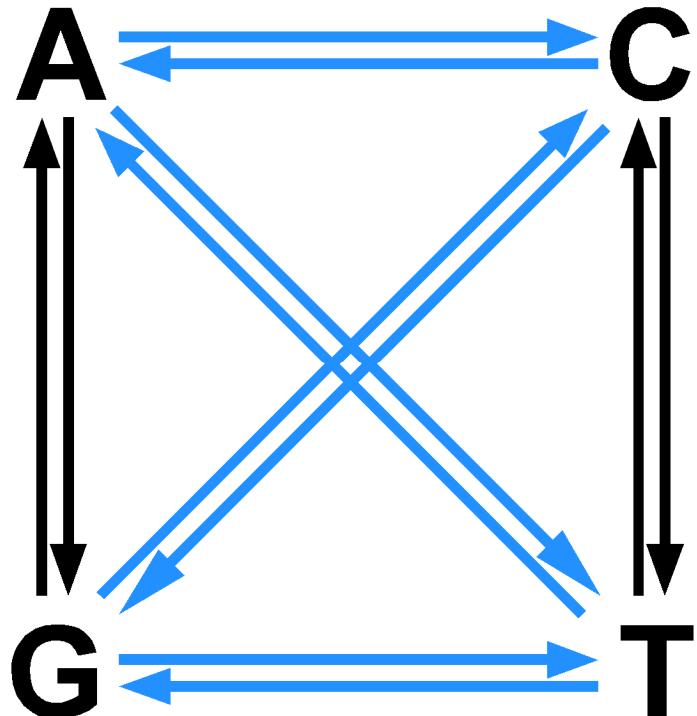
2) bialleliche, dovute a mutazioni di entrambe le copie del DNA

- patologie a penetranza completa (in genere disordini mendeliani)
- a penetranza incompleta, o addirittura “circoscritta”.

La consulenza genetica cerca di stabilire quali membri della famiglia sono interessati ed eventualmente quali possono essere portatori, e quindi calcolare la probabilità di ogni altra persona nella famiglia (anche non ancora nata) di essere un portatore o di ereditare la malattia

La sostituzione di una purina (A o G) in una pirimidina (C o T), come pure di una pirimidina in una purina è detta **trasversione (frecce azzurre)**

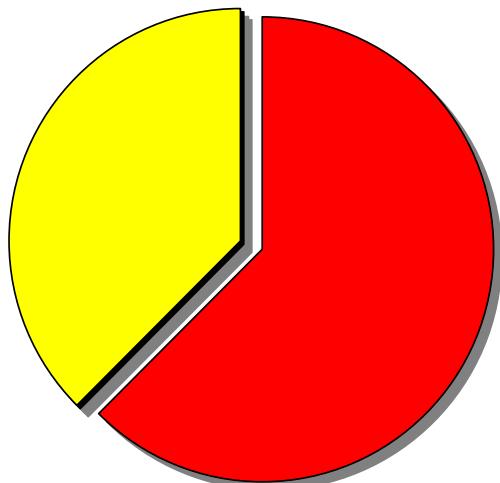
La sostituzione di una purina in una purina, o di una pirimidina in una pirimidina è detta **transizione (frecce nere)**



Mutationi osservate

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

trasversioni



transizioni

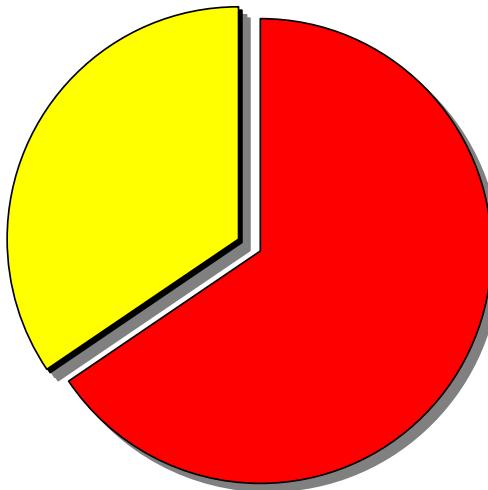
T>C, C>T, G>A, A>G

46,000

SNPs (polimorfismi)

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

trasversioni



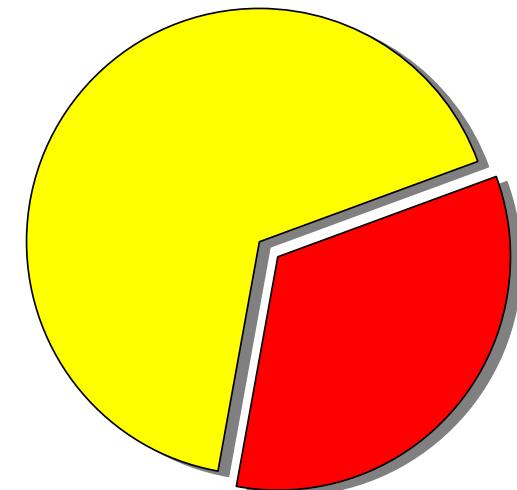
transizioni

T/C, A/G

12,000,000

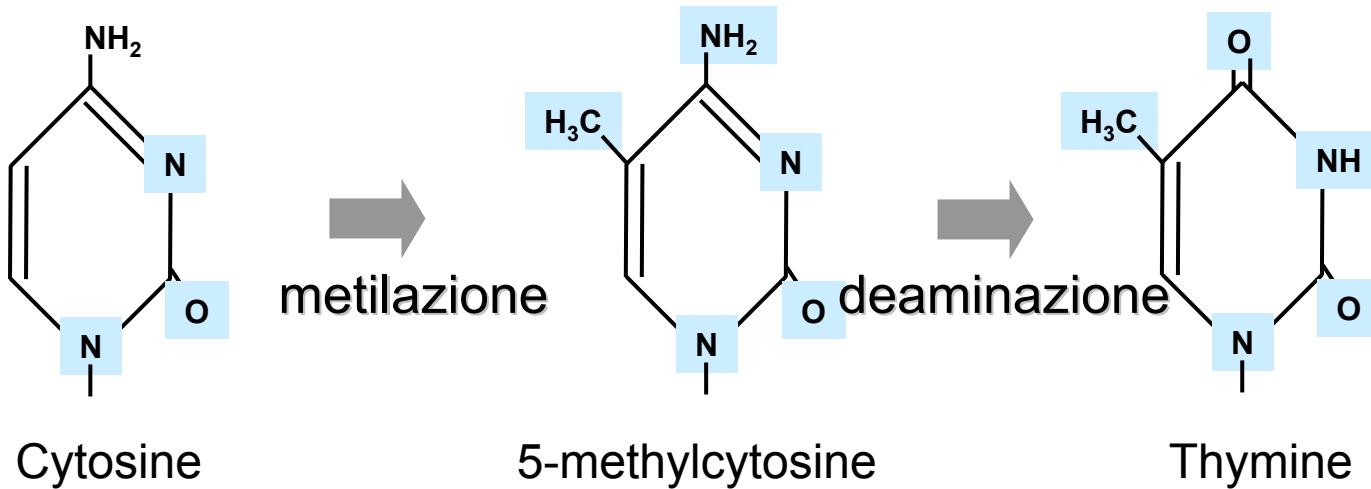
Teoricamente attese

trasversioni



transizioni

Il meccanismo più comune di mutazione



CG \Rightarrow **TG**
CG \Rightarrow **CA**

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

AAA	22.2	Lys	CC A	14.6	Pro	AGA	9.9		CU C	19.9	
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	Arg	CU A	6.2	Leu
AAU	16.6		CC U	15.5		CG G	10.4		CU G	42.5	
CAA	11.1	Gln	GC A	14.0		CG C	11.3		UU A	5.3	
CAG	33.6		GC C	29.1	Ala	CG U	4.7		UU G	11.0	
CAC	14.2	His	GC G	7.2		GG A	17.1		UU C	22.6	Phe
CAU	9.3		GC U	19.6		GG C	25.4		UU U	15.8	
GAA	26.8		UC A	9.3		GG G	17.3	Gly	GU A	5.9	
GAG	41.4	Glu	UC C	17.7		GG U	11.2		GU C	16.3	
GAC	29.0		UC G	4.2	Ser	UG C	14.5		GU G	30.9	Val
GAU	21.7	Asp	UC U	13.2		UG U	9.9		GU U	10.4	
UAC	18.8		AG C	18.7		UG G	13.8				
UAU	12.5	Tyr	AG U	9.4		AU A	5.8				
AC A	14.4					AU C	24.3	Ile			
AC C	23.0					AU U	14.9				
AC G	6.7	Thr				AU G	22.3	Met			
AC U	12.7										

Key:

N Nondegenerate site

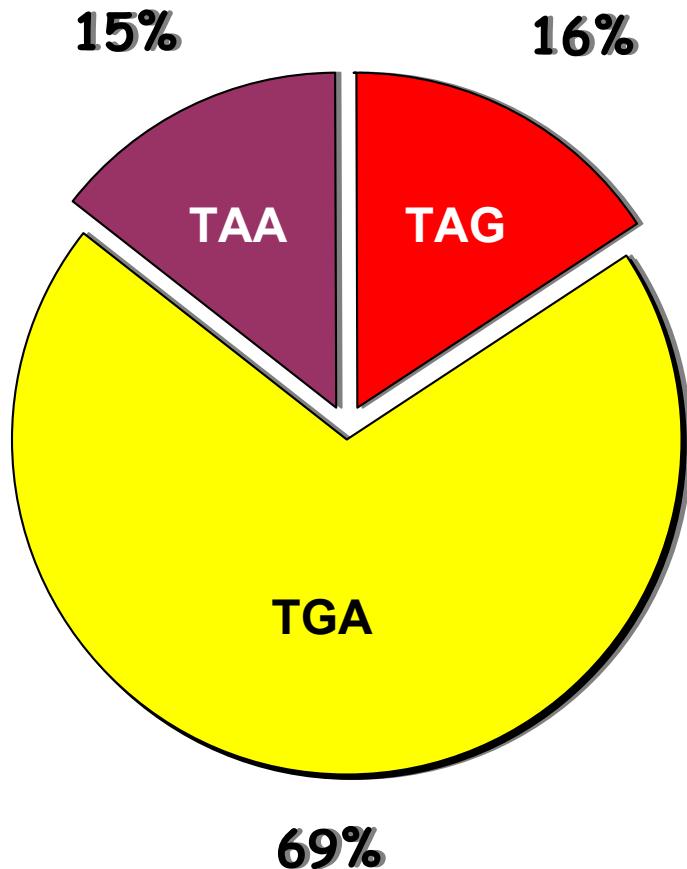
N Twofold degenerate site

N Fourfold degenerate site

mutazioni puntiformi nonsenso

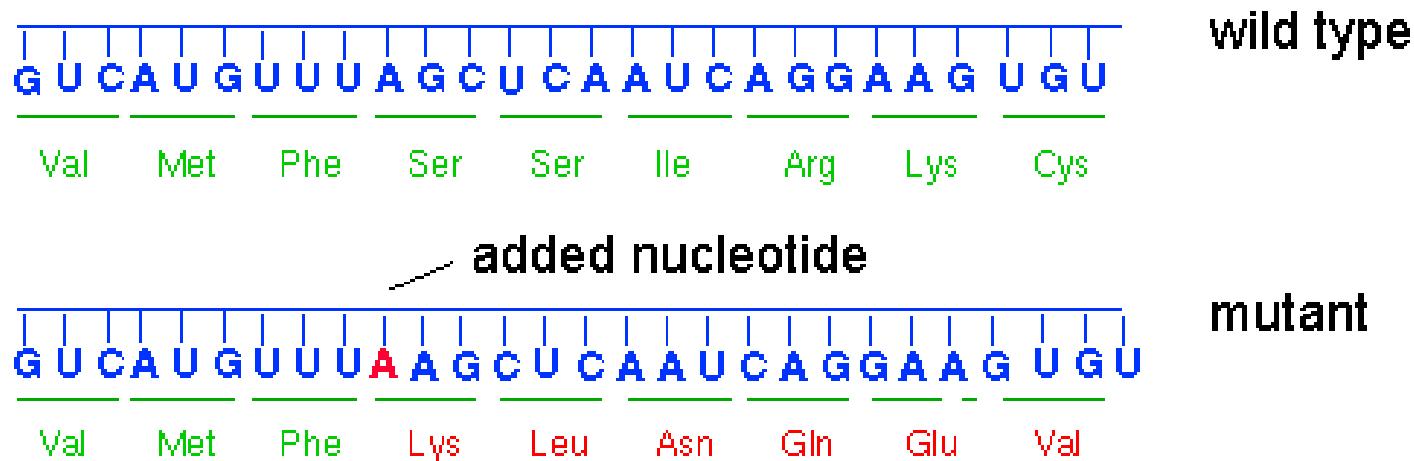
- La mutazione **nonsense** è quella in cui la modifica nucleotidica provoca la creazione di un tripletta di stop, che blocca la sintesi della proteina prematuramente.
- In questo caso, la funzionalità della proteina dipenderà dalla posizione dello stop.

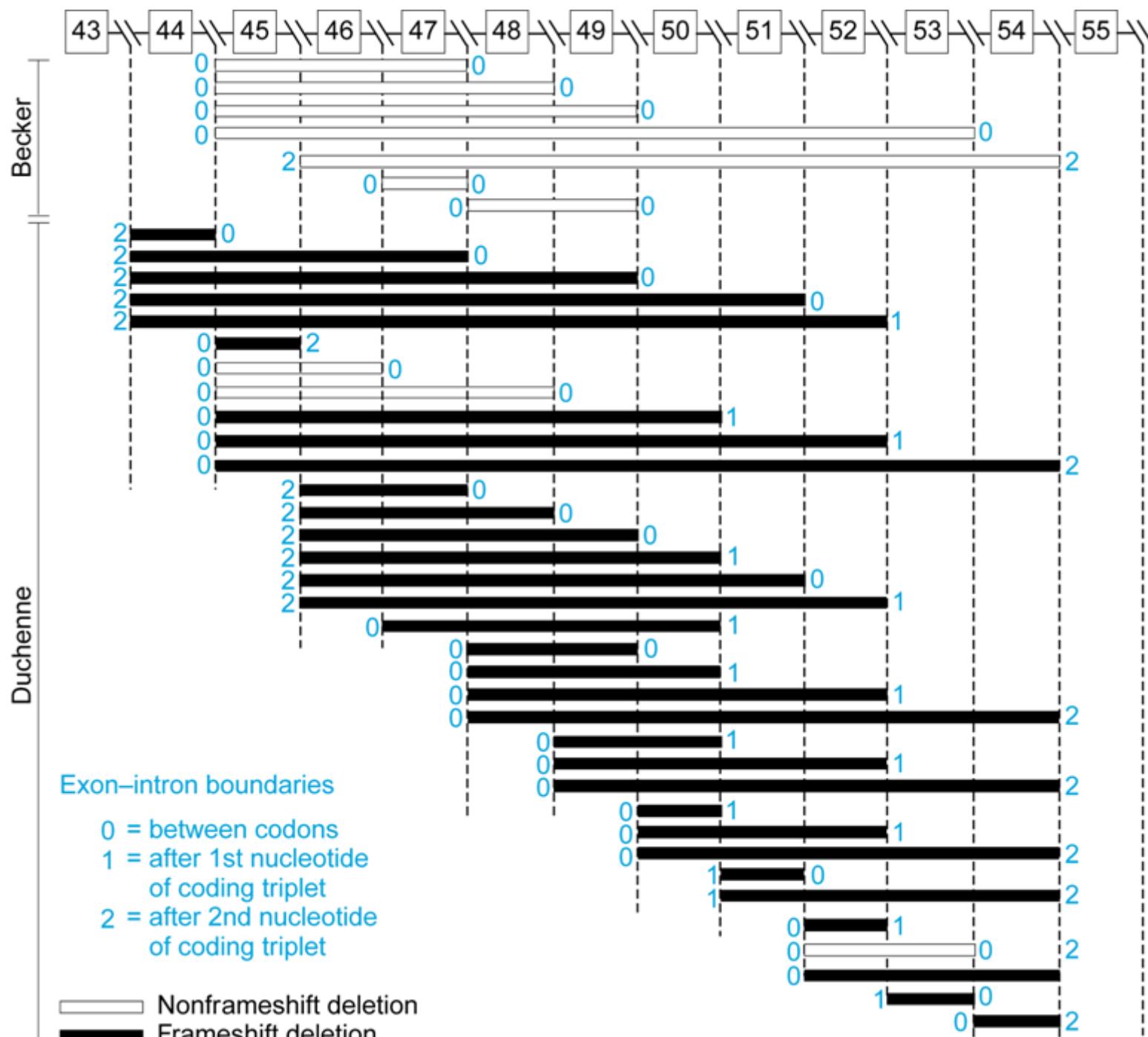
Tipi diversi di mutazioni nonsenso nei geni umani

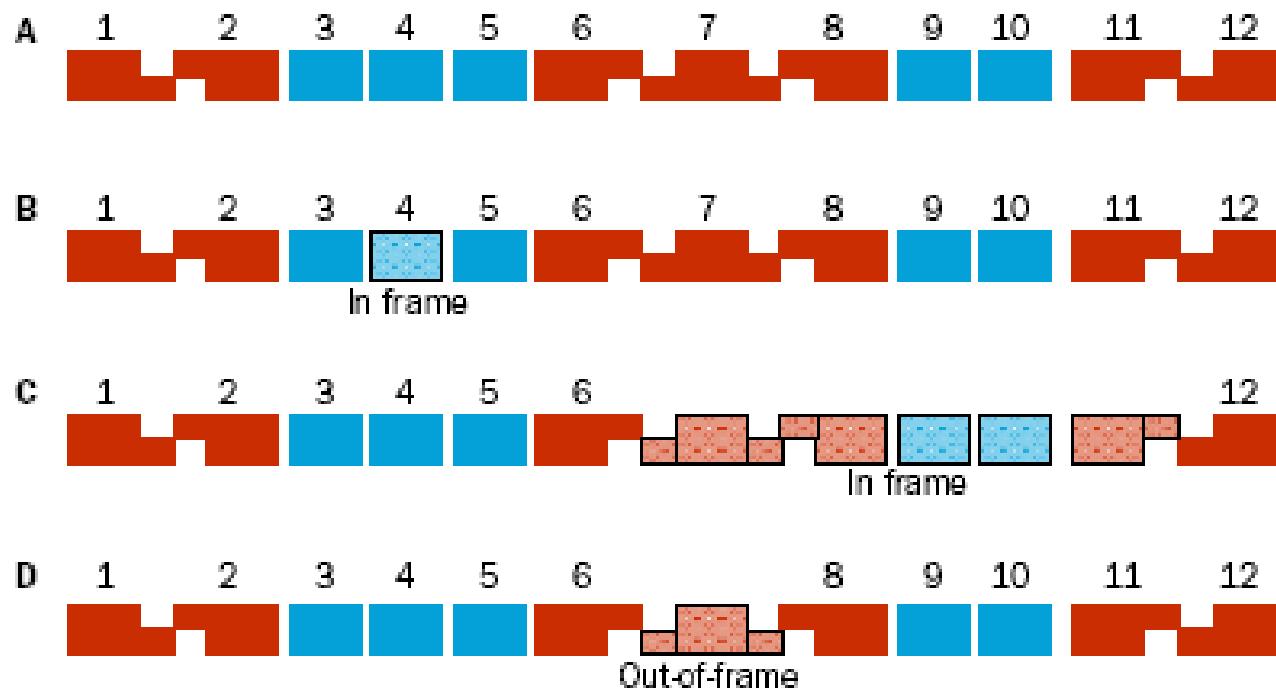


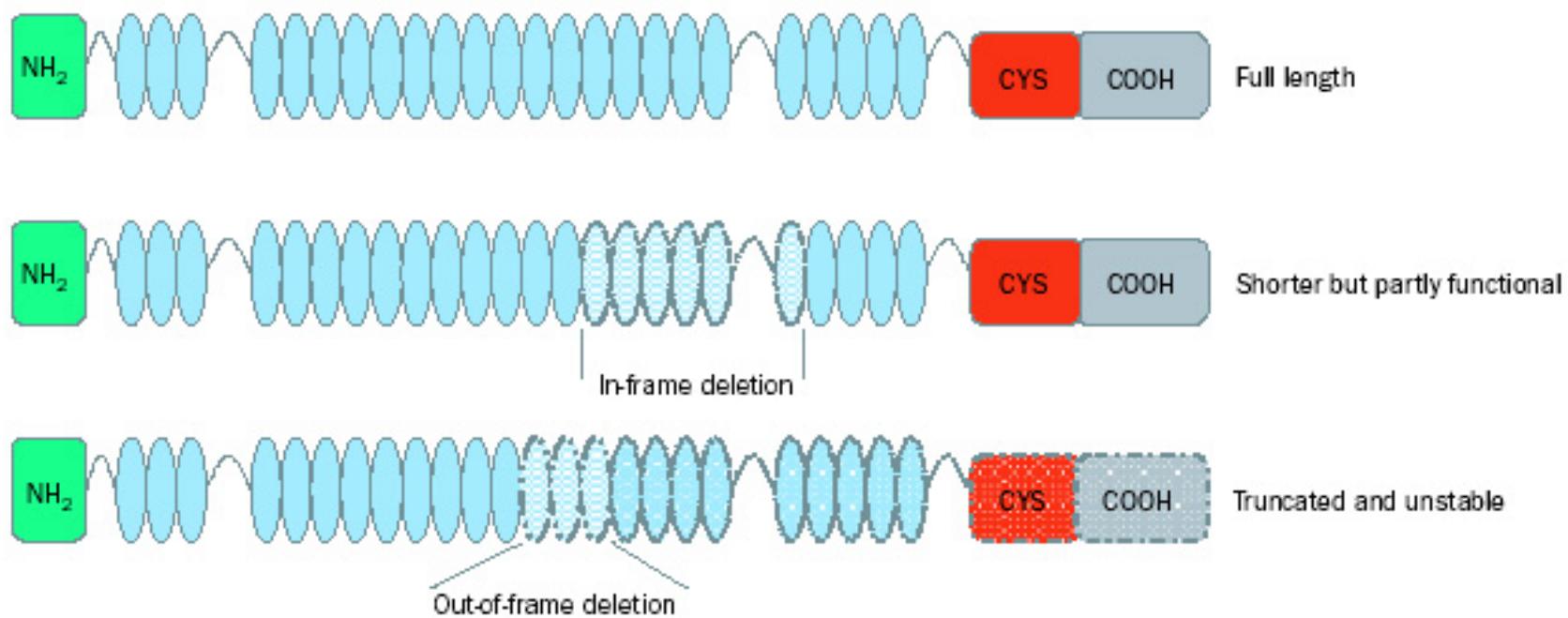
mutazioni frame-shift

- 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.



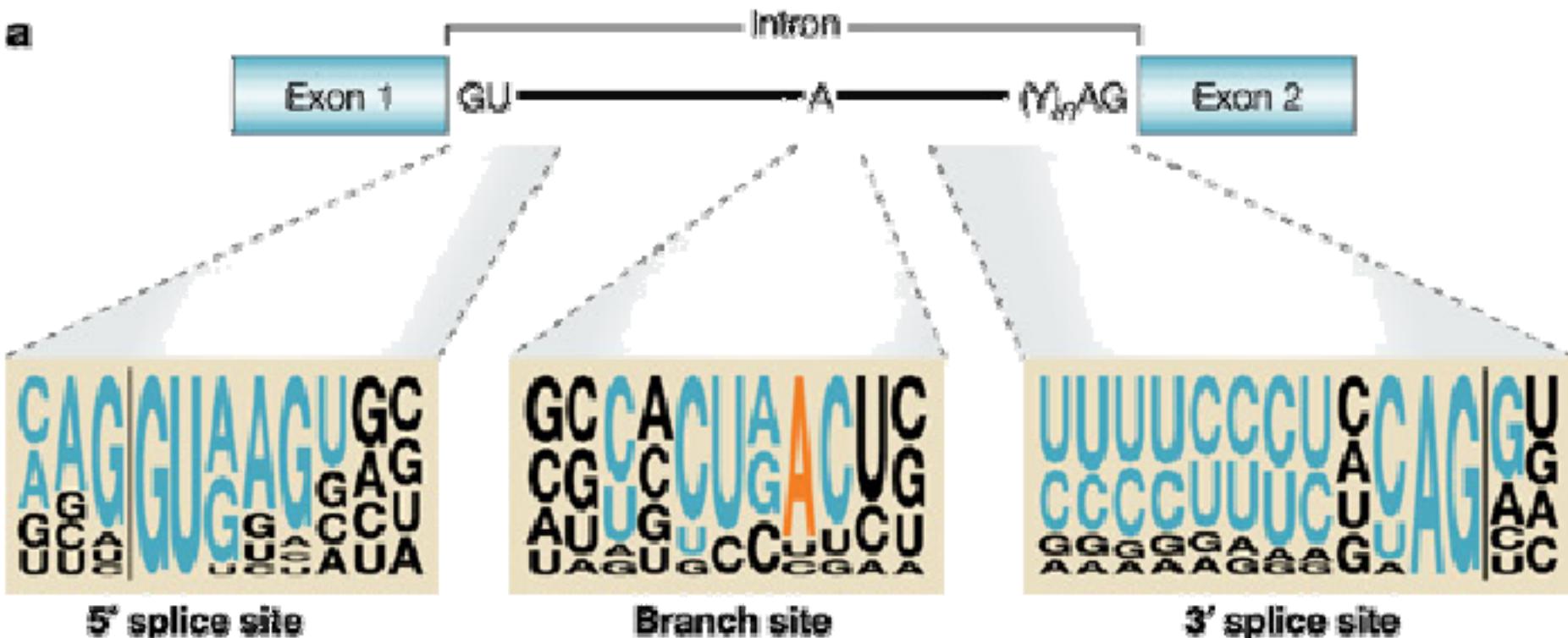


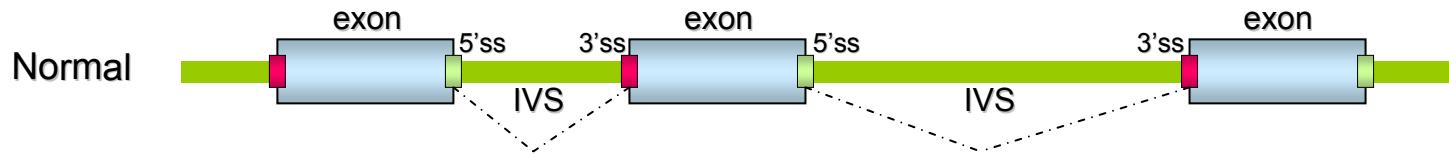




Motivi classici di splicing

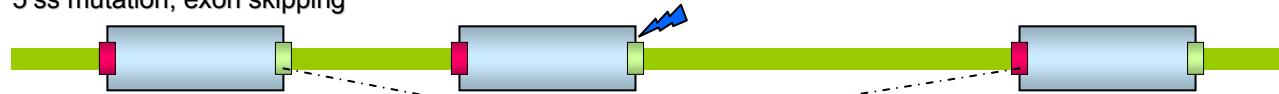
a



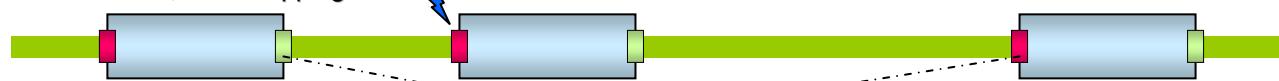


Splicing Abnormalities

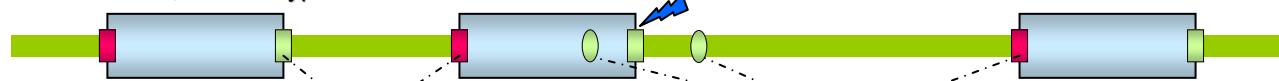
5'ss mutation; exon skipping



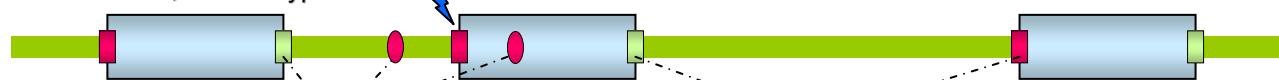
3'ss mutation; exon skipping



5'ss mutation; use of cryptic 5'ss



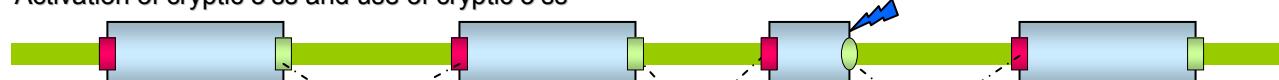
3'ss mutation; use of cryptic 3'ss



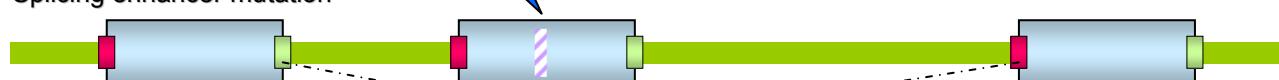
Activation of cryptic 5'ss



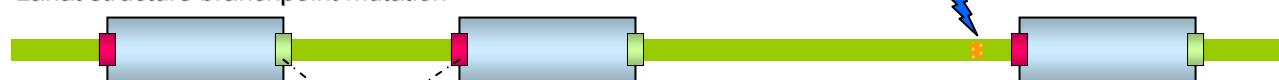
Activation of cryptic 5'ss and use of cryptic 3'ss



Splicing enhancer mutation



Lariat structure branchpoint mutation

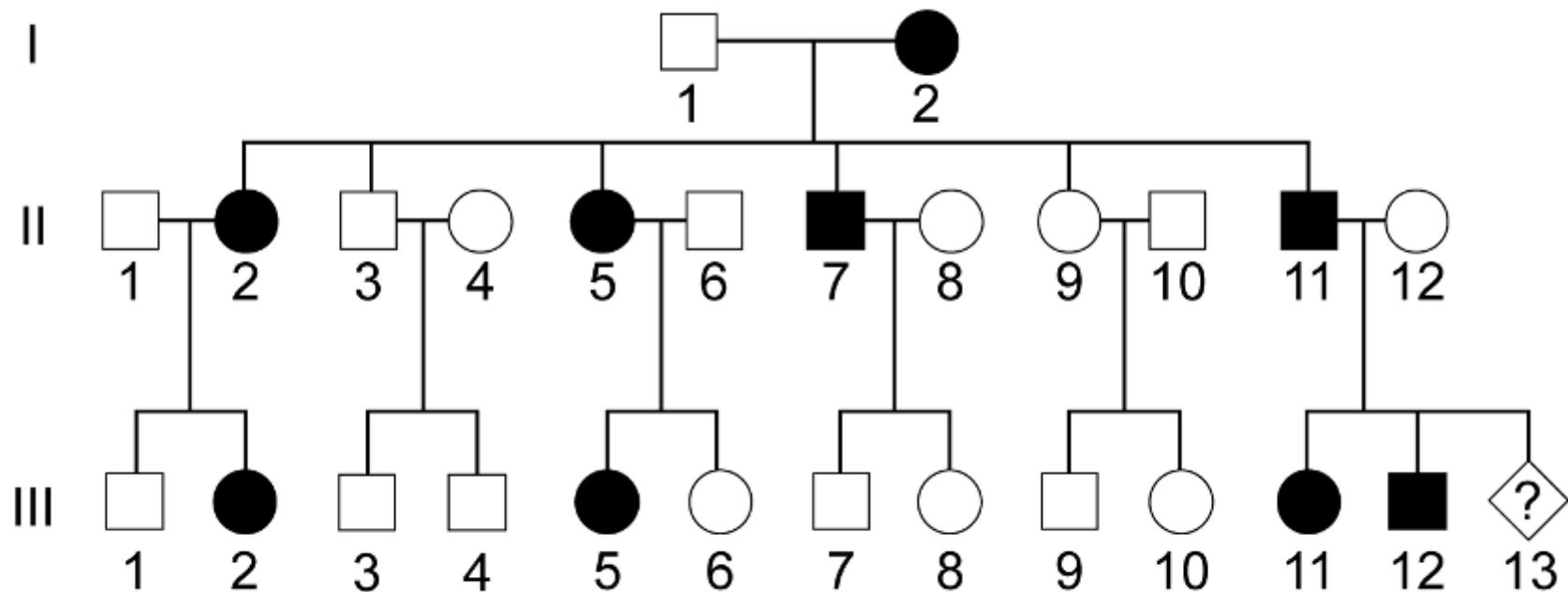


malattie genetiche da mutazione in 1 allele

Le mutazioni monoalleliche possono causare disordini a trasmissione dominante o recessiva legata all'X negli uomini

- Se la malattia a trasmissione dominante è **grave** in età fertile e pertanto limita o annulla la capacità riproduttiva (bassa fitness), le mutazioni monoalleliche sono nuove e spesso distribuite in modo casuale
- Se la malattia dominante **non è grave** in età fertile e non limita in alcun modo la capacità riproduttiva (normale fitness), le mutazioni monoalleliche sono ereditate da un genitore e spesso si tramandano da molte generazioni
- Se la malattia è **recessiva legata all'X ed è letale** ha una vita media di tre generazioni, perché le donne trasmettono gli alleli mutati in eterozigosi e gli uomini li eliminano

eredità autosomica dominante a penetranza completa (malattia che non modifica la fitness riproduttiva)



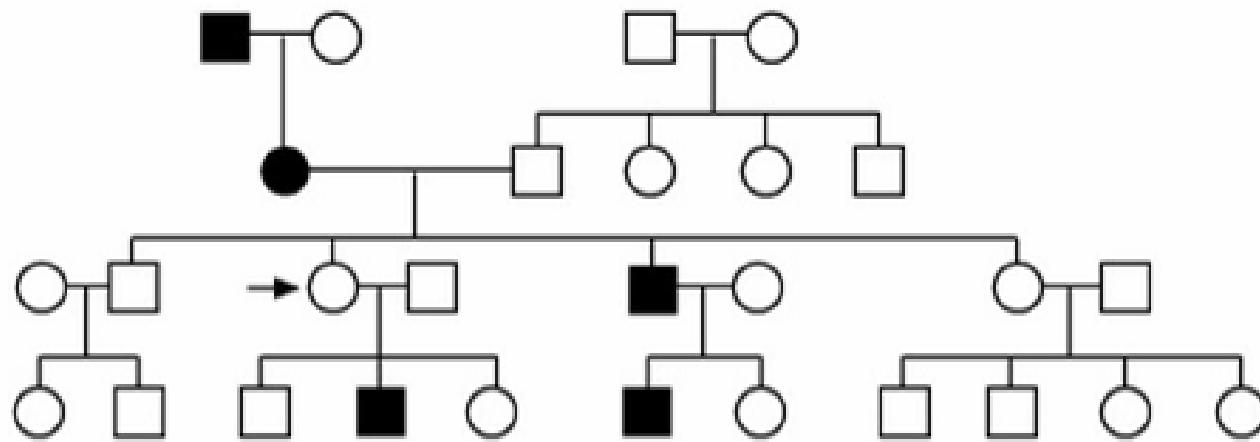
Cos'è una mutazione causativa?

Una variazione della sequenza del DNA

- ..che è trovata solo negli individui affetti
- ..che non è mai ritrovata in quelli non affetti
- ..che spiega il processo patologico
- ..che, quando corretta per tempo, fa recuperare un fenotipo normale

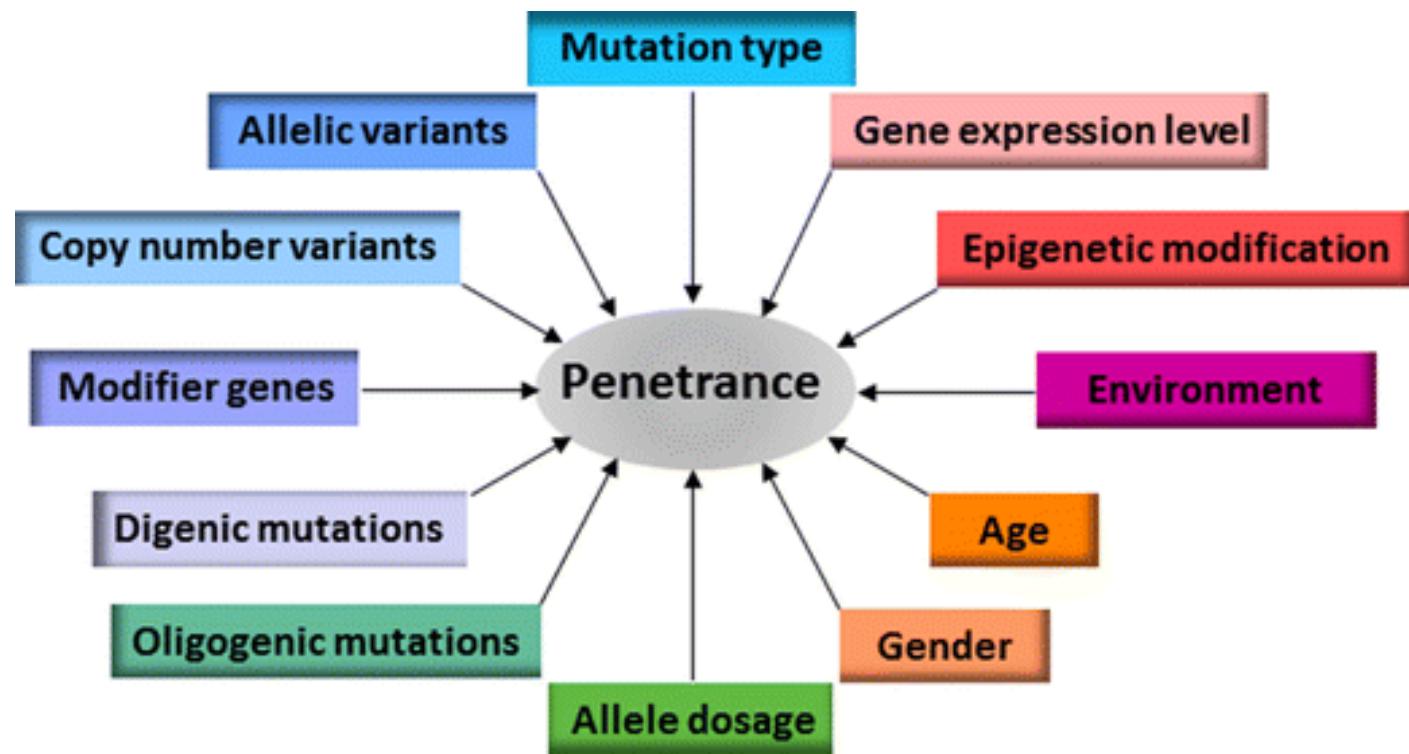
....che è trovata solo negli individui affetti
..che non è mai ritrovata in quelli non affetti

penetranza incompleta



che è ritrovata **più frequentemente** negli
individui affetti rispetto ai non affetti...

meccanismi alla base della penetranza incompleta



Malattie da mutazioni in 1-allele

Le mutazioni monoalleliche sono alla base di malattie ad eredità autosomica dominante o X-linked

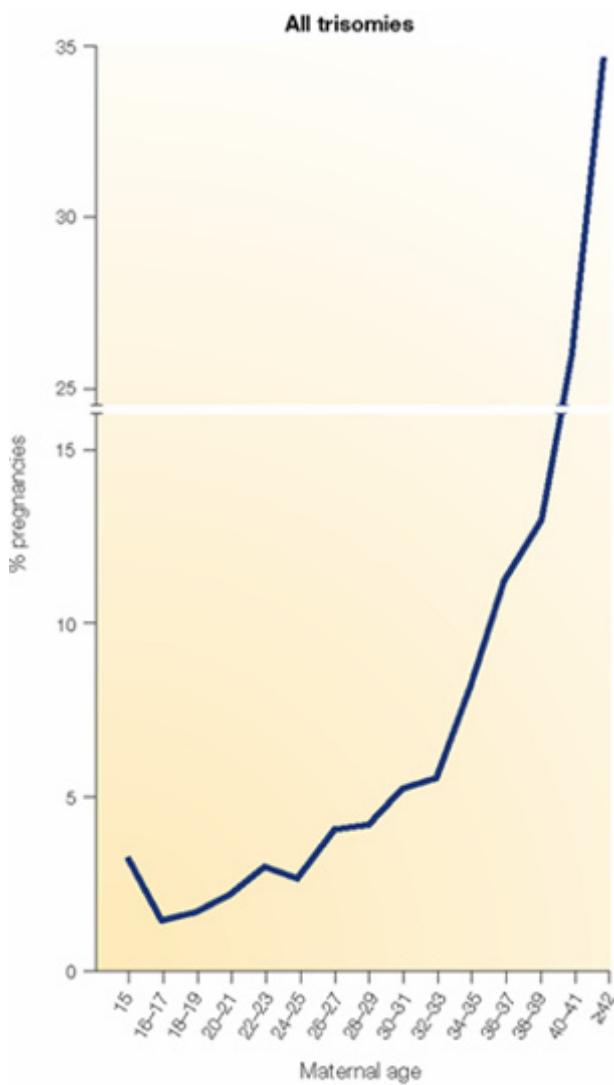
le mutazioni **random** sono la regola con un pattern di distribuzione non legato all'etnia

denovo sono assenti in entrambi i genitori

devono essere assenti o molto rare nella popolazione generale

(i.e. con il 50% penetranza e 1/20.000 frequenza della malattia, gli alleli causativi in totale dovrebbero essere <0.0001)

Le alterazioni cromosomiche e in particolare le **trisomie** sono più frequenti al crescere dell'età materna



Le mutazioni ***denovo*** (sostituzioni, indels, delezioni submicroscopiche) sono più frequenti nelle linea germinale maschile

Aumentano con l'età paterna in base al numero di divisioni cellulari che avvengono ogni 15 gg nella linea germinale maschile

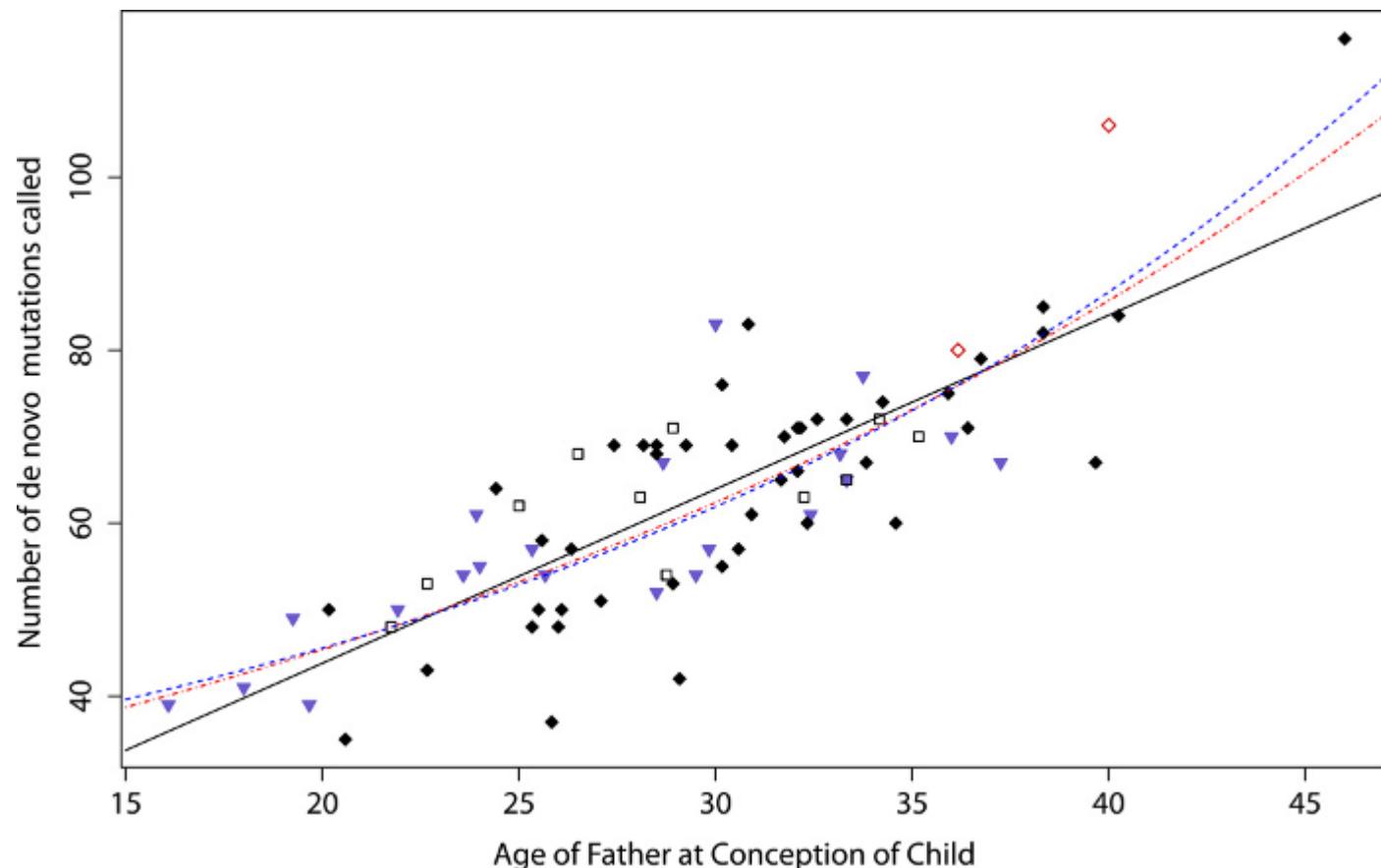
Age	Chromosome replications
15	35
20	150
30	380
40	610
50	840

mutazioni *de novo*

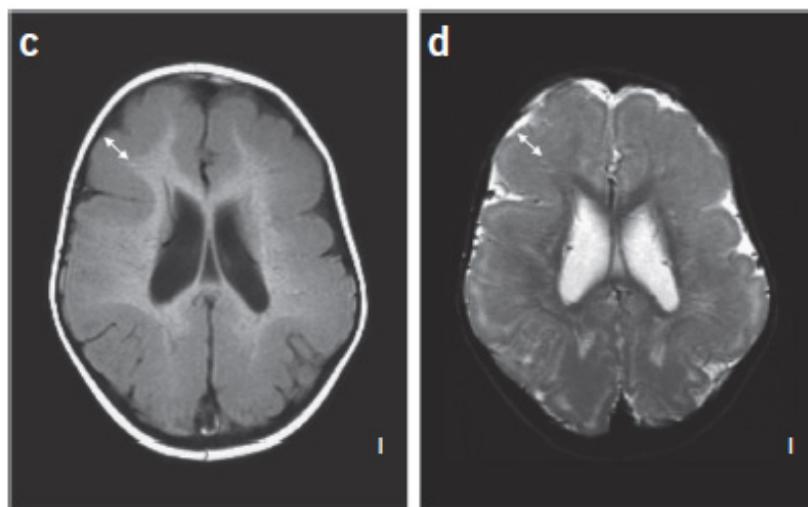
- hanno una frequenza di 1.2×10^{-8} , ovvero 1 ogni 80.000.000 di basi, se il padre ha 29.7 anni
- L'età paterna è il fattore di rischio
- possono associarsi a malattie genetiche in eterozigosi (un solo allele mutato)
- entrambi i genitori dell'affetto sono non affetti
- possono causare malattie genetiche anche gravi o letali o che condizionano lo sviluppo fetale
- si trasmettono alla prole solo le mutazioni che non compromettono la riproduzione

rapporto tra numero di mutazioni *denovo* ed età paterna al momento del concepimento

2 mutazioni in più per ogni anno di età del padre

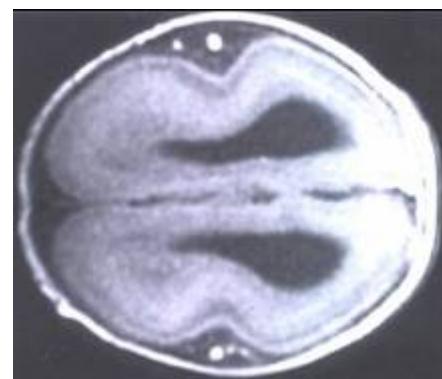
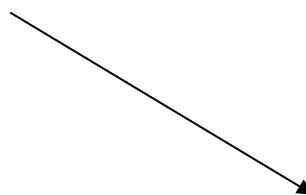
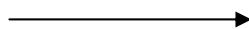


Sindrome di Baraitser-Winter



Sindrome di Baraitser-Winter clinica

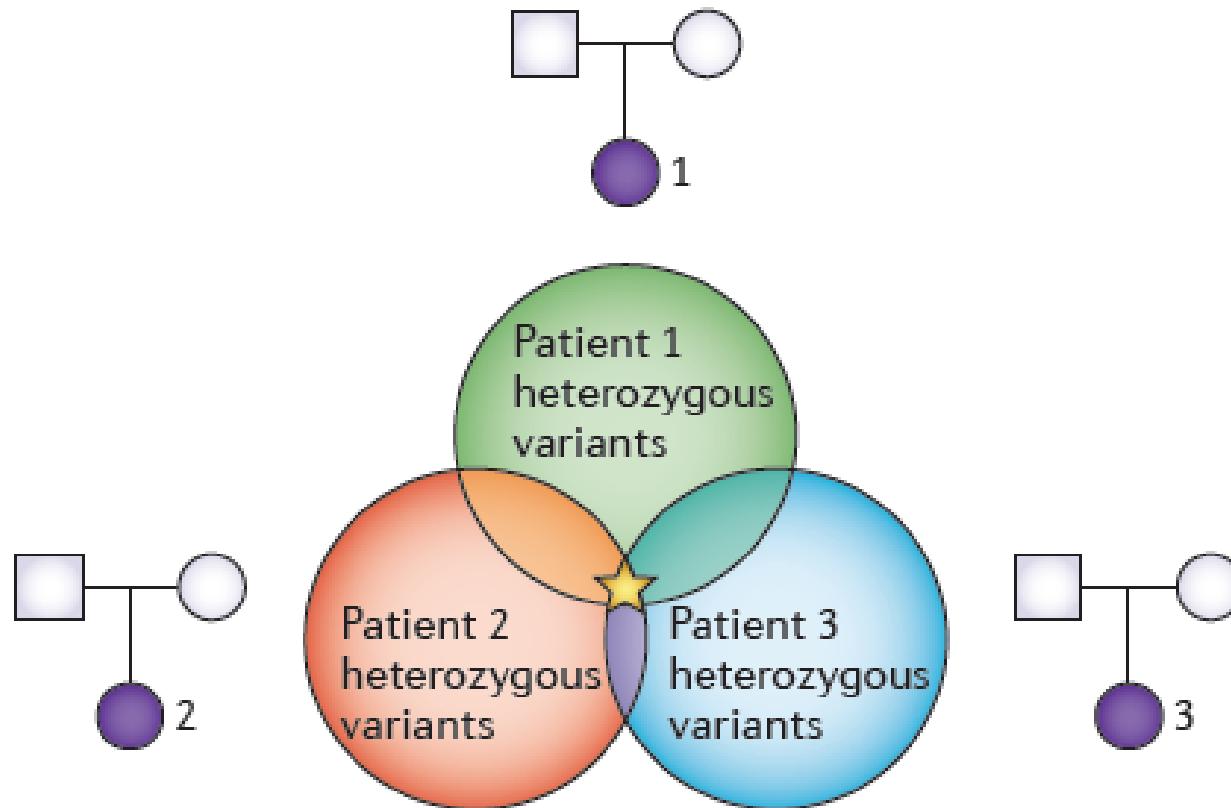
- Ipertelorismo
- Ptosi congenita
- Bassa statura
- Coloboma
- Malformazioni cerebrali (lissencefalia)
- Sordità
- Epilessia
- Ritardo mentale



Sindrome di Baraitser-Winter eredità?

- Nessuna ricorrenza familiare
- Nessuna consanguinità
- Nessuna alterazione cromosomica
- Nessuna alterazione di CNV all'analisi CGH array
- E' su base genetica?
- Mutazioni *de novo*??

Come scoprire un'eventuale nuova malattia genetica da mutazioni *denovo* usando l'NGS?



Sequenziamento di tutti i geni (esoma)

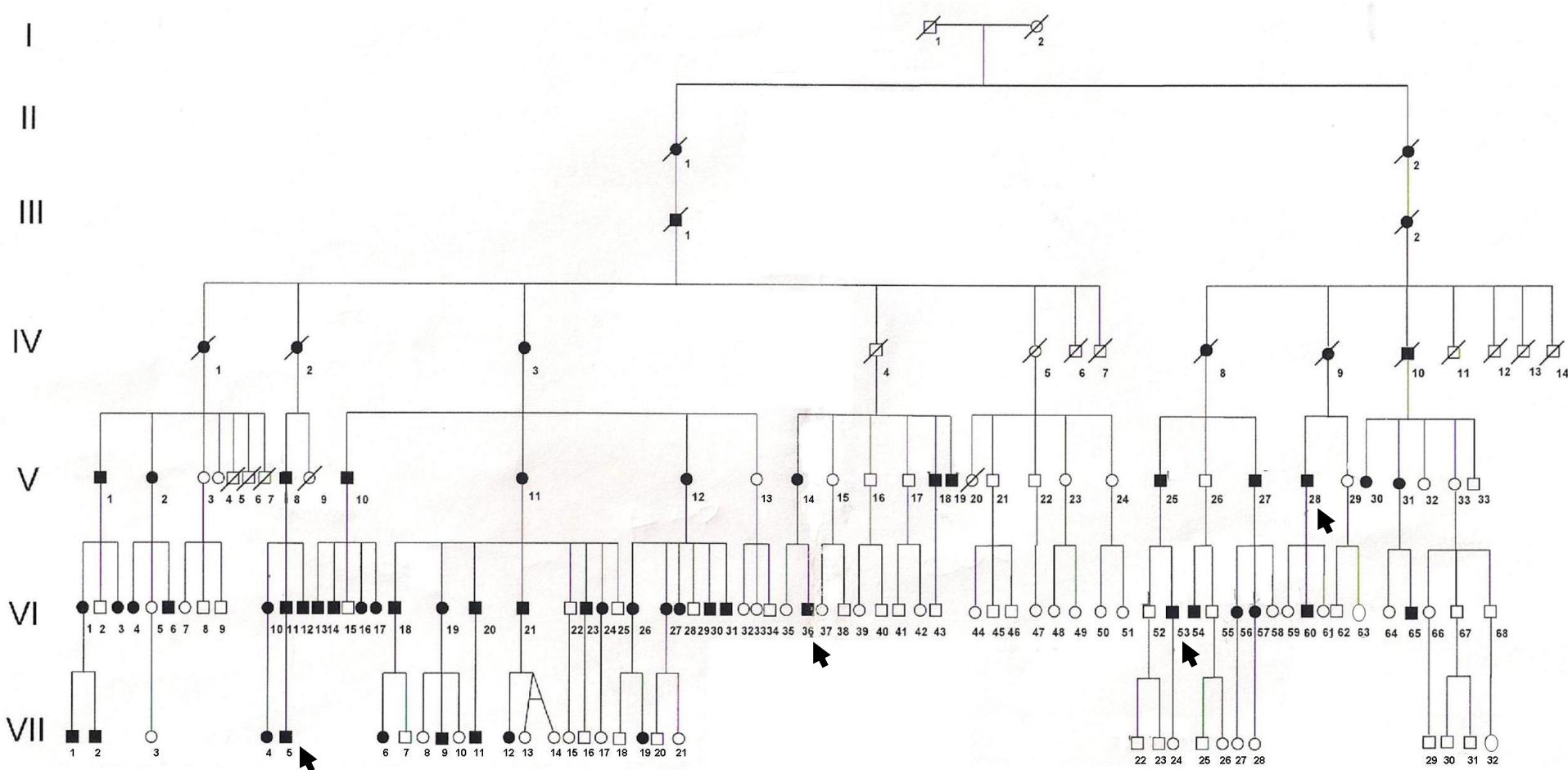
- Padre-madre-figlio affetto (trio), cercando solo le mutazioni esclusive del figlio
- 22.591 a 29.685 variazioni a testa
- da 2 a 6 variazioni *de novo*
- Variazione p.Arg196His Actina Beta (ACTB)
- Variazione p.Ser155Phe Actina Gamma (ACTG)

Sequenziamento di altri casi

Table 2 Summary of *ACTB* and *ACTG1* mutations in 18 individuals with Baraitser-Winter syndrome

Sample ID	Chr.	Position (hg19)	Ref./alt. alleles	Gene	cDNA change	Amino-acid change	GERP score	Grantham score
LP98-085	7	5569255	T/C	<i>ACTB</i>	c.34A>G	p.Asn12Asp	4.45	23
LP90-050	7	5568962	G/C	<i>ACTB</i>	c.193C>G	p.Leu65Val	4.33	32
61456	7	5568128	G/A	<i>ACTB</i>	c.586C>T	p.Arg196Cys	0.50	180
58248 ^a	7	5568127	C/T	<i>ACTB</i>	c.587G>A	p.Arg196His	4.22	29
59169	7	5568127	C/T	<i>ACTB</i>	c.587G>A	p.Arg196His	4.22	29
LR04-173	7	5568127	C/T	<i>ACTB</i>	c.587G>A	p.Arg196His	4.22	29
LR09-079	7	5568127	C/T	<i>ACTB</i>	c.587G>A	p.Arg196His	4.22	29
LR06-298	7	5568127	C/T	<i>ACTB</i>	c.587G>A	p.Arg196His	4.22	29
11-11287 ^b	7	5568127	C/T	<i>ACTB</i>	c.587G>A	p.Arg196His	4.22	29
11-10211	7	5568127	C/T	<i>ACTB</i>	c.587G>A	p.Arg196His	4.22	29
61458	17	79478933	G/A	<i>ACTG1</i>	c.359C>T	p.Thr120Ile	4.16	89
LR06-241	17	79478612	G/A ^c	<i>ACTG1</i>	c.404C>T	p.Ala135Val	2.95	64
LR04-298	17	79478552	G/A	<i>ACTG1</i>	c.464C>T	p.Ser155Phe	4.25	155
LP98-096	17	79478552	G/A	<i>ACTG1</i>	c.464C>T	p.Ser155Phe	4.25	155
11-10857	17	79478552	G/A	<i>ACTG1</i>	c.464C>T	p.Ser155Phe	4.25	155
58431 ^a	17	79478408	G/T	<i>ACTG1</i>	c.608C>A	p.Thr203Lys	3.11	78
LR03-033	17	79478256	G/A	<i>ACTG1</i>	c.760C>T	p.Arg254Trp	0.08	101
LP92-083 ^a	17	79478250	G/A	<i>ACTG1</i>	c.766C>T	p.Arg256Trp	1.60	101

kindred with autosomal dominant LGMD



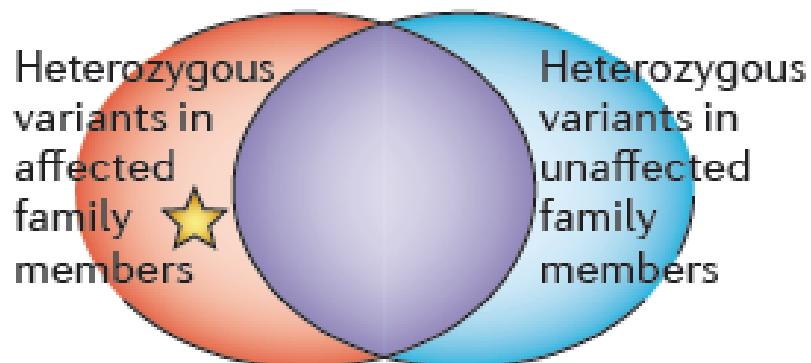
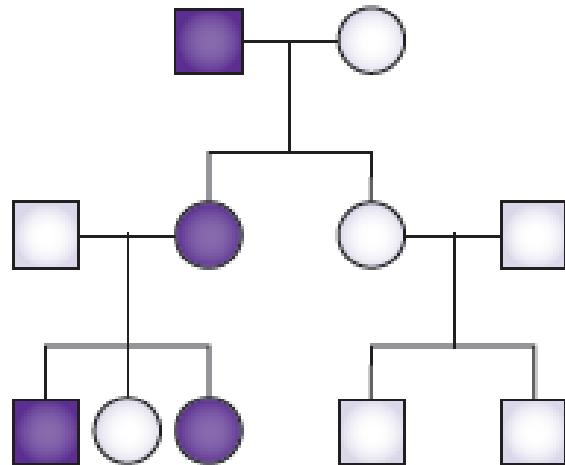
15 DNA samples of affected members

9 DNA samples of non affected members

2 muscle biopsies of affected members

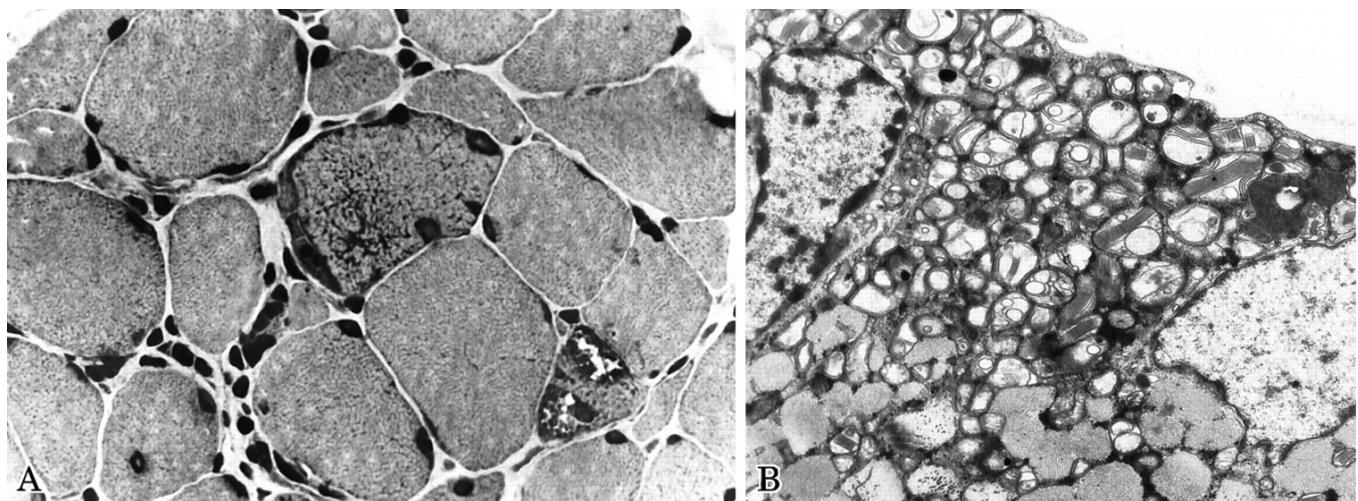
Come scoprire una nuova malattia genetica a trasmissione autosomica dominante usando l'NGS?

Autosomal dominant





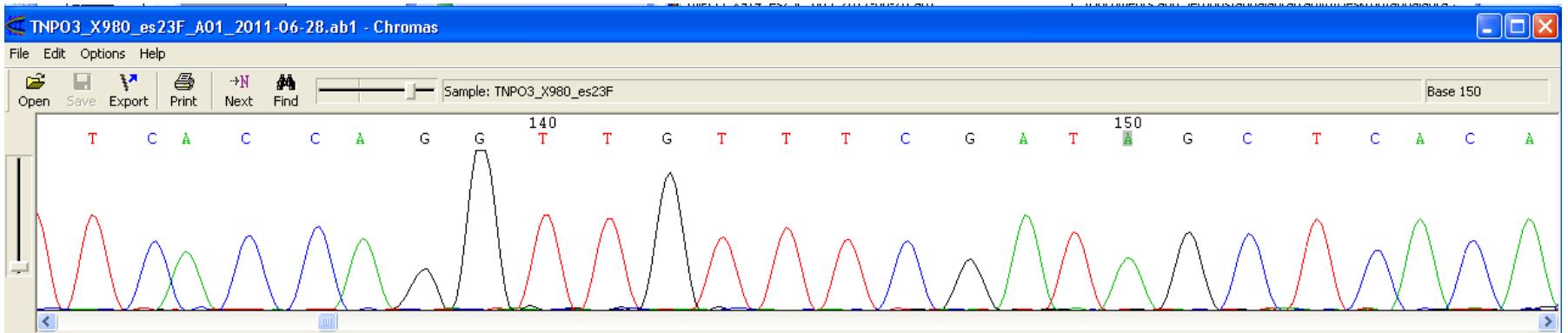
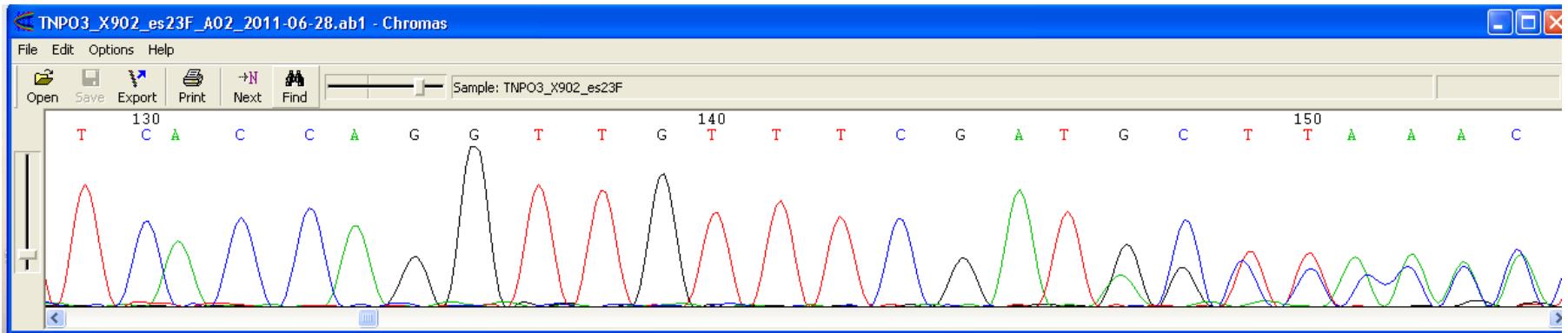
Patients show lordosis, scapular winging, proximal wasting affecting the pelvic and shoulder muscles, and a sparing of the facial muscles



A) Muscle cryostat section.
Notice increased fiber size variability, one small fiber with two prominent rimmed vacuoles (bottom right corner) and a fiber with subsarcolemmal basophilia and marked intermyofibrillary network, indicative of mitochondrial proliferation (center) (hematoxylin–eosin 360 before reduction).

B) Electron micrograph
Skeletal muscle fiber cut transversally.
Notice increased number of paranuclear mitochondria with abnormal cristae and paracrystalline inclusions

chr	start	end	reference	observed	snp indel	func	gene	exonicFunction	aachange	Status	SampleWithMutations
19	56029616	56029616	-	CCA	in_del	exonic	SSC5D	nonframeshift insertion	NM_001144950:c.3973_3974insCCA;p.P1325delinsPT	Het	-A23-A24-A25
1	91403885	91403885	T	G	snv	exonic	ZNF644	nonsynonymous SNV	NM_201269:c.A3026C:p.K1009T	Het	-A23-A24-A25
1	150972421	150972421	G	A	snv	exonic	FAM63A	nonsynonymous SNV	NM_001040217:c.C329T:p.A110V	Het	-A23-A24-A25
10	102684428	102684428	C	A	snv	exonic	FAM178A	nonsynonymous SNV	NM_018121:c.C1670A:p.P557H	Het	-A23-A24-A25
11	2154249	2154249	C	G	snv	exonic	IGF2	nonsynonymous SNV	NM_001007139:c.G511C:p.A171P	Het	-A23-A24-A25
14	21796615	21796615	A	C	snv	exonic	RPGRIPI	nonsynonymous SNV	NM_020366:c.A2928C:p.E976D	Het	-A23-A24-A25
14	95557556	95557556	C	T	snv	exonic	DICER1	nonsynonymous SNV	NM_177438:c.G5511A:p.M1837I	Het	-A23-A24-A25
15	78295771	78295771	A	C	snv	exonic	TBC1D2B	nonsynonymous SNV	NM_144572:c.T2450G:p.F817C	Het	-A23-A24-A25
15	85400304	85400304	G	T	snv	exonic	ALPK3	nonsynonymous SNV	NM_020778:c.G2941T:p.V981L	Het	-A23-A24-A25
16	72137553	72137553	C	G	snv	exonic	DHX38	nonsynonymous SNV	NM_014003:c.C1690G:p.Q564E	Het	-A23-A24-A25
16	72828890	72828890	T	C	snv	exonic	ZFHX3	nonsynonymous SNV	NM_001164766:c.A4949G:p.Q1650R	Het	-A23-A24-A25
17	47295132	47295132	G	A	snv	exonic	ABI3	nonsynonymous SNV	NM_001135186:c.G299A:p.R100Q	Het	-A23-A24-A25
20	30898177	30898177	G	C	snv	exonic	KIF3B	nonsynonymous SNV	NM_004798:c.G597C:p.Q199H	Het	-A23-A24-A25
20	61537174	61537174	C	A	snv	exonic	DIDO1	nonsynonymous SNV	NM_080796:c.G1653T:p.W551C	Het	-A23-A24-A25
6	88346152	88346152	G	C	snv	exonic	ORC3	nonsynonymous SNV	NM_001197259:c.G901C:p.E301Q	Het	-A23-A24-A25
9	125673271	125673271	T	A	snv	exonic	ZBTB6	stopgain SNV	NM_000020:c.A1081T:p.K361Y	Het	-A23-A24-A25
7	128597310	128597310	T	-	in_del	exonic	TNPO3	stoploss SNV	NM_012470:c.2771delA:p.X924C		-A23-A24-A25



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

disordine genomico submicroscopico

un disordine genomico submicroscopico è una patologia causata da

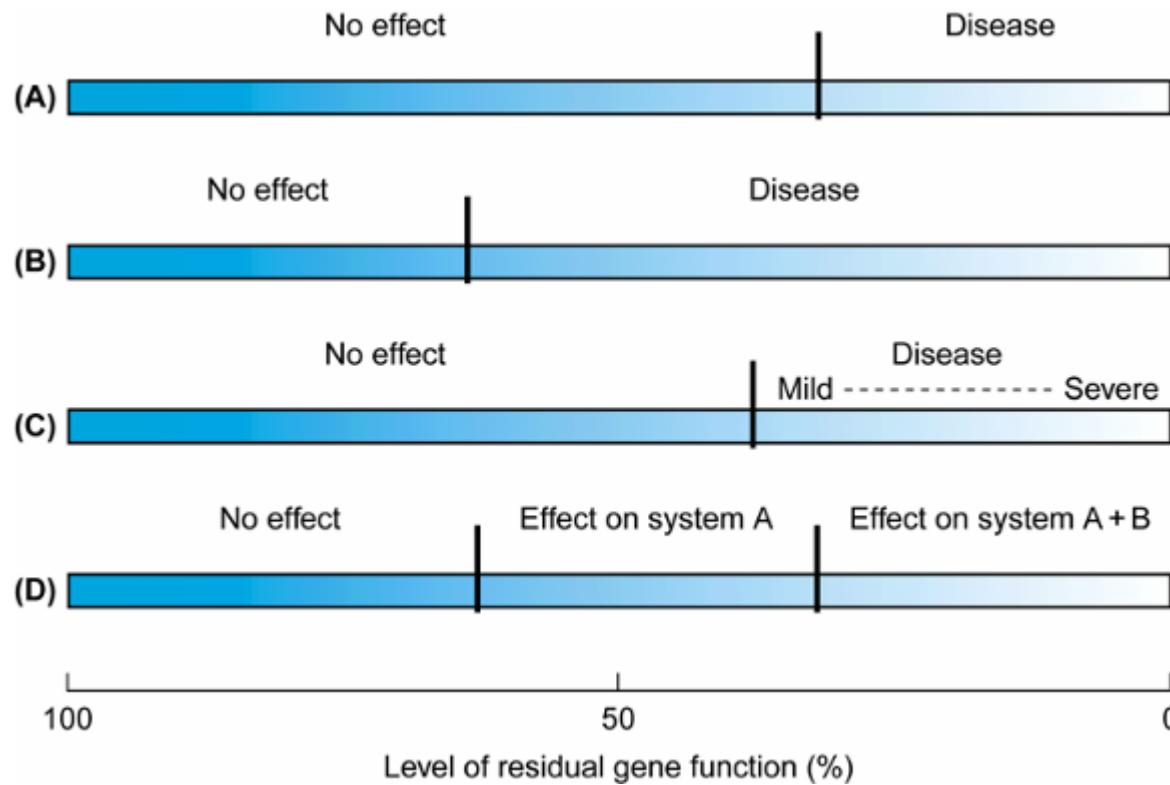
- acquisizione
- perdita
- alterazione

di uno o più geni contigui le cui variazioni di dosaggio possono produrre effetti fenotipici

La base molecolare è rappresentata da riarrangiamenti genomici, quali **duplicazioni, delezioni, inversioni**, senza alterazioni apparenti del cariotipo (<5Mb)

aploinsufficienza

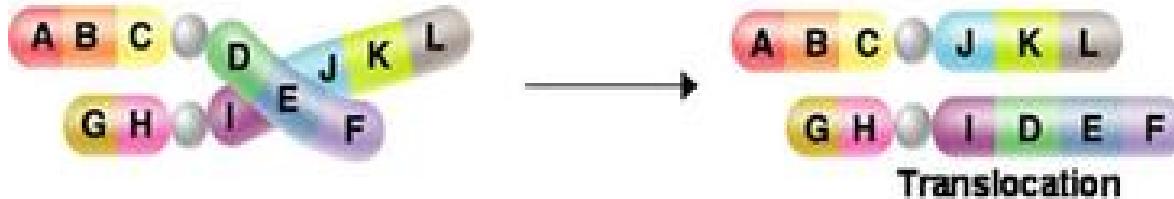
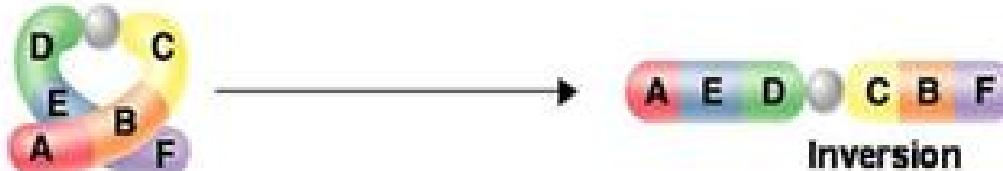
- insufficiente quantità di prodotto genico causata da una mutazione in eterozigosi
- la mutazione classica è di tipo **delezione (allele amorfico) in eterozigosi**
- colpisce geni per i quali il **50%** di prodotto genico non è abbastanza per garantirne la funzione
- spesso un dosaggio preciso è richiesto ai fattori di trascrizione e alle molecole di segnale espressi nel corso delle prime fasi dello sviluppo embrionale
- il quadro clinico è per questo motivo **sindromico, dismorfico** e con il coinvolgimento del SNC



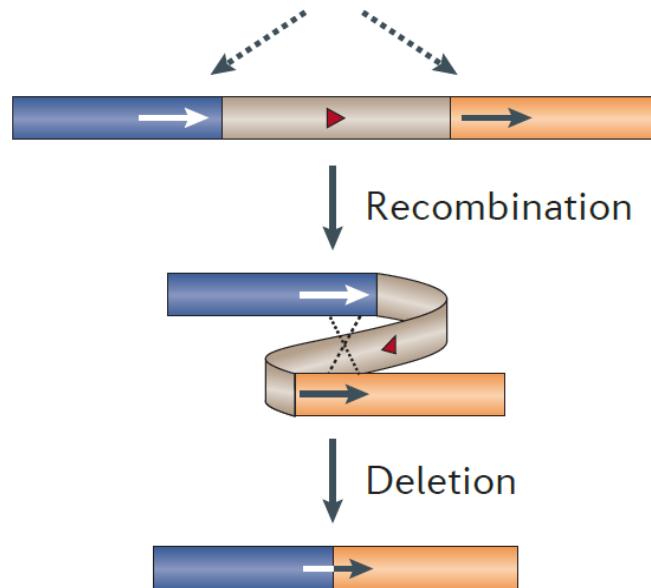
La maggior parte dei geni autosomici si trova nella condizione A o C: il dosaggio genico critico è <50%. In tal caso, si osserva un fenotipo patologico solo se entrambi gli alleli sono colpiti

I geni autosomici responsabili della patogenesi dei **disordini genomici** si trovano nella condizione B o D: si osserva un fenotipo già in eterozigosi per **aploinsufficienza**. Spesso anche un dosaggio genico aumentato >>100% può determinare una patologia

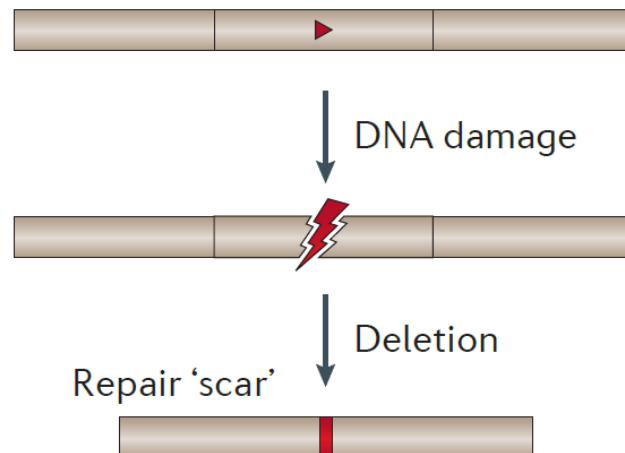
Grandi riarrangiamenti genomici



Non-allelic homologous recombination (NAHR)

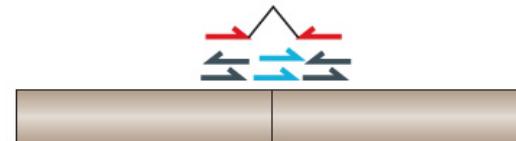


d Non-homologous end joining (NHEJ)



Sample genome

Deletion



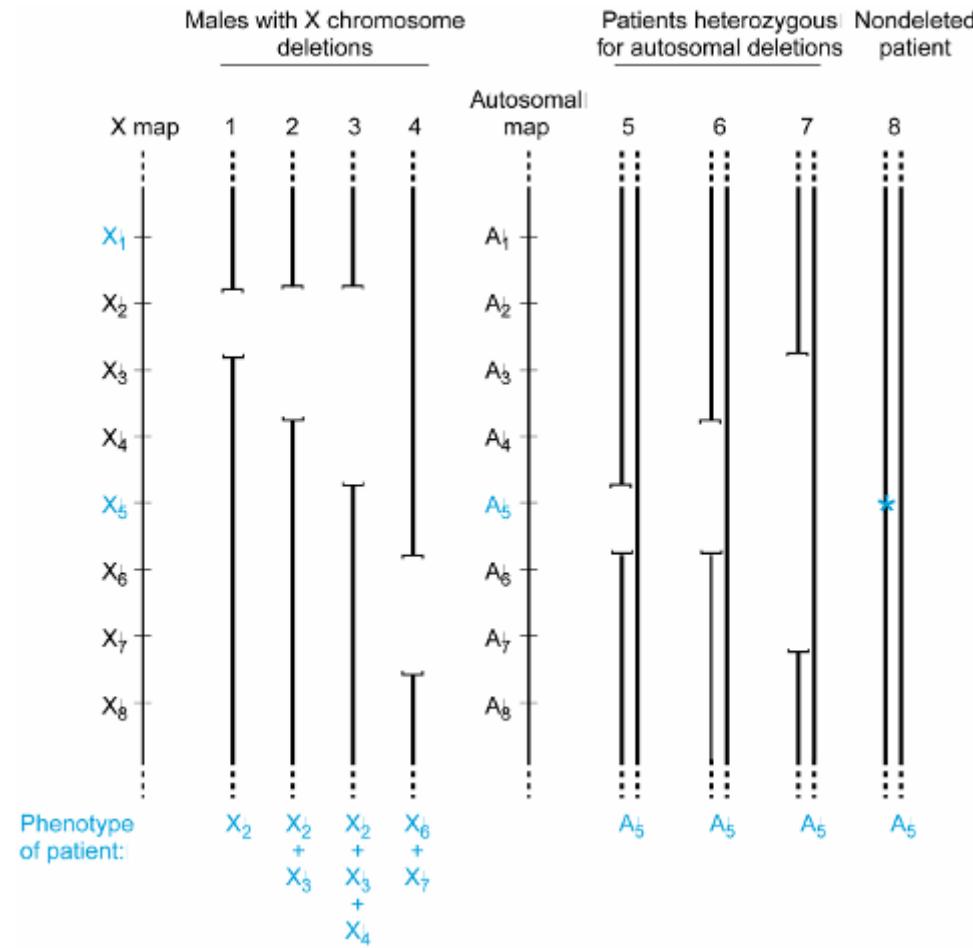
Reference genome

Duplication

Sample genome

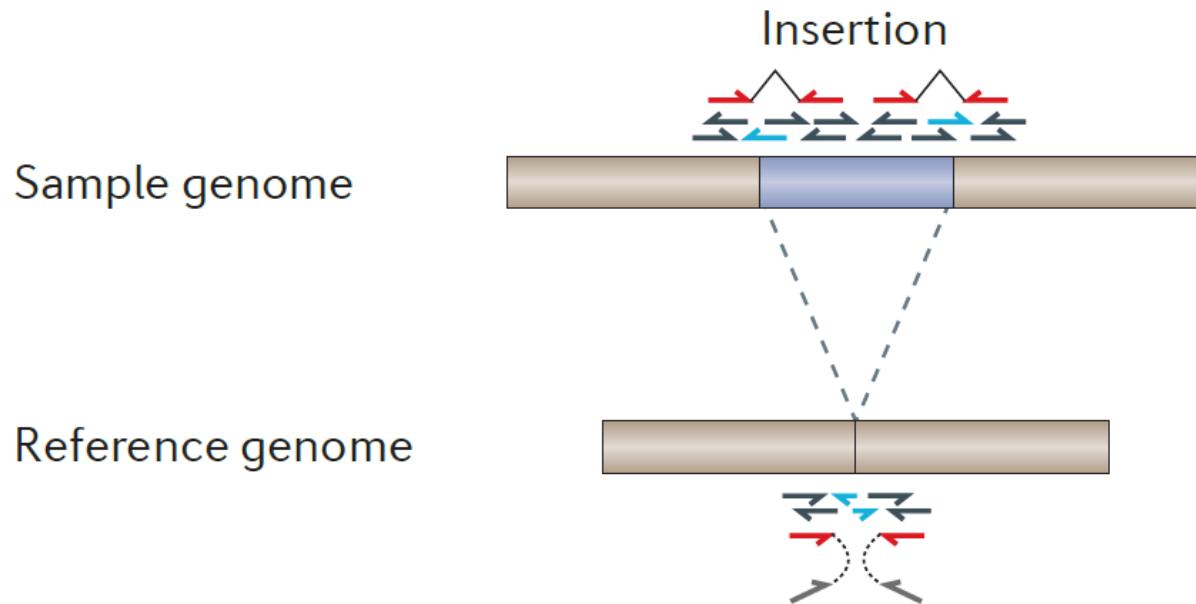


Reference genome

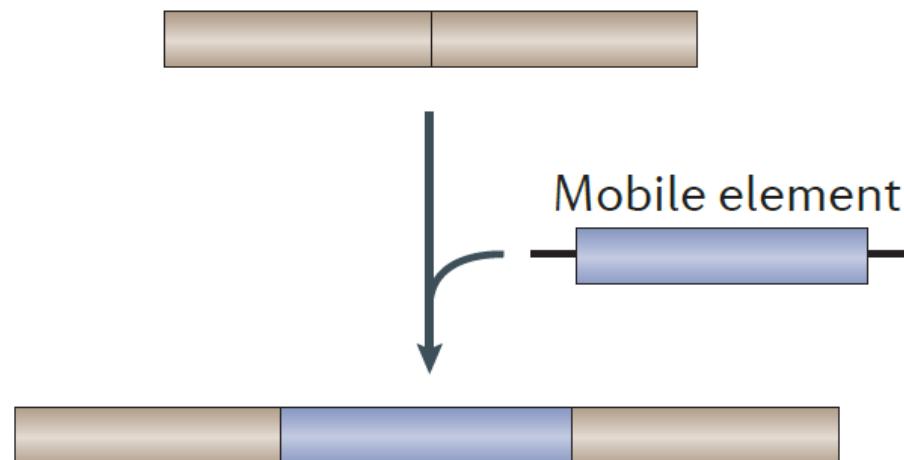


In caso di **delezioni del cromosoma X** nei maschi si osserva direttamente in fenotipo come sindrome da geni contigui

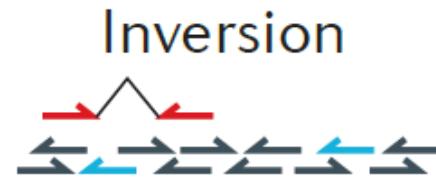
In caso di **delezioni autosomiche in eterozigosi**, molto spesso il dosaggio dimezzato non è causa di malattia. Quando si osserva una sindrome da delezione, è risolutivo trovare la stessa sindrome causata da una mutazione puntiforme in uno solo dei geni. Se questa non si trova, la sindrome esiste solo come somma di più difetti.



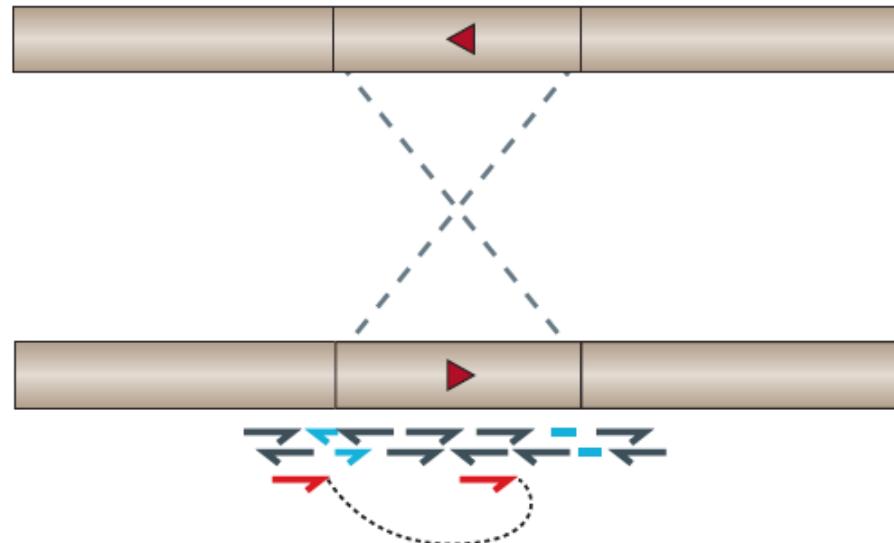
Mobile element insertion (MEI)



Sample genome



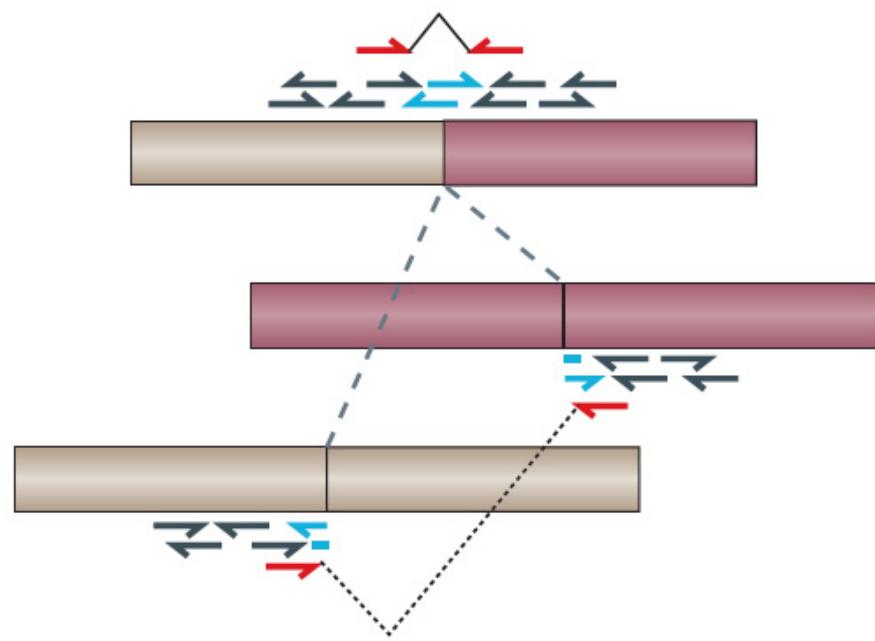
Reference genome



Sample genome

Reference genome

Translocation



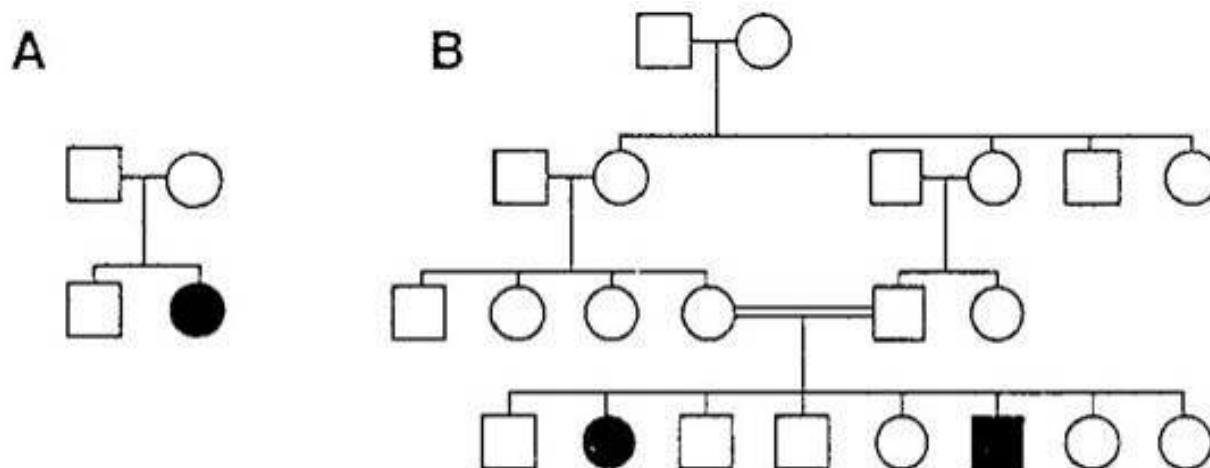
malattie genetiche da mutazione in 2 alleli

Le mutazioni bialleliche possono causare disordini a trasmissione autosomica recessiva

- Se la malattia a trasmissione recessiva è **grave** in età fertile e limita o annulla la capacità riproduttiva (bassa fitness), le mutazioni **non si estinguono comunque** perché i portatori sani sono 10-10.000 volte più numerosi degli affetti
- Le mutazioni in genere si trasmettono da 100-1000 generazioni, mentre le nuove mutazioni sono rare
- Solo se la malattia è biallelica le mutazioni hanno una **firma etnica** che caratterizza una località di origine e un **fondatore comune** eterozigote sano

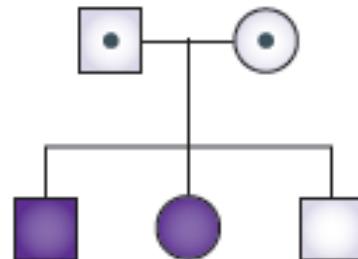
Malattie genetiche da 2 alleli

- L'alto numero di portatori è un fattore di rischio per l'**eterozigosi composta** (due mutazioni differenti nei due alleli). Questo potrebbe essere causato da una fitness migliore degli eterozigoti nei confronti di un fattore negativo **vedi A**
 - La consanguineità è un fattore di rischio per l'**omozigosità** (due alleli identici) anche se la mutazione è rarissima **vedi B**

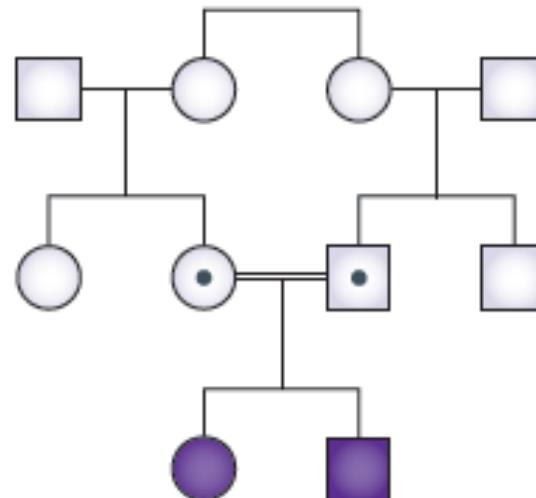


Come scoprire una nuova malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva usando l'NGS?

Autosomal recessive



Consanguineous autosomal recessive



Compound
heterozygous
variants in
affected
siblings

Heterozygous
variants in
unaffected
parents

Homozygous
variants in
affected
siblings

Heterozygous
variants in
unaffected
parents

Malattie da mutazioni in 2 alleli

patologie a trasmissione autosomica recessiva

in genere «loss-of-function»

le mutazioni nuove sono rare, di solito hanno una lunga storia (100-1000 generazioni) con un fondatore

hanno una «**ethical signature**» con un pattern di distribuzione geografica riconoscibile

la consanguineità è pertanto il fattore principale di rischio

è più facile distinguere i polimorfismi, ma molti portatori

con la penetranza al 50% e la frequenza di 1/20.000, gli alleli causativi possono avere nella popolazione generale una frequenza fino a 0.02