

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, amorfo, ipomorfo, ipermorfo, neomorfo, antimorfo**
 11. **Monosomie e trisomie autosomiche (16, Down, Edwards, Patau), il mosaicismo**
 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*: acrodisplasia, 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)

classificazione funzionale delle mutazioni

1. allele equivalente
2. allele ipomorfo
3. allele amorfo
4. allele ipermorfo
5. allele neomorfo
6. allele antimorfo

1. allele equivalente

- variazione che non modificano né la quantità, né la qualità biochimica e funzionale del prodotto genico
- il prodotto genico risulta invariato e normalmente localizzato
- esempi sono le circa 12,000 differenze della sequenza del DNA codificante che si osservano nella popolazione umana che non hanno alcuna conseguenza patologica

2. allele ipomorfo

- variazione della sequenza del DNA che riduce la quantità di prodotto genico e/o la sua qualità funzionale
- tali alleli sono silenti e recessivi e possono agire più come modificatori del fenotipo che come causa diretta di patologia
- alleli ipomorfi possono però essere causa di malattia se in emizigosi
- esempio: gli alleli ipomorfi del gene della distrofina localizzato sul cromosoma X che determinano quadri di distrofia muscolare di Becker nei maschi in quanto hanno una singola copia del gene

3. allele amorfo

- variazione di sequenza del DNA più drastica: corrisponde classicamente alla delezione (cancellazione) della sequenza codificante del gene
- un allele amorfo può essere prodotto da altri tipi di mutazione che abbiano la medesima conseguenza di una delezione totale del gene
- causa in emizigosi una malattia genetica quando colpisce una funzione genica essenziale (es emofilia, distrofia muscolare di Duchenne, ecc)
- l'allele amorfo in eterozigosi in genere è presente in un portatore sano di una malattia autosomica recessiva
- può da solo essere causa di malattia se riguarda un gene in cui il 50% del dosaggio (prodotto dall'altro allele non mutato) è insufficiente a mantenere lo stato di salute (aploinsufficienza)

4. allele ipermorfo

- ipermorfo (iper= aumentato) è l'allele che determina l'aumentata quantità o funzione di un prodotto genico
- l'allele ipermorfo può essere semplice o avere una combinazione di altri effetti come ad esempio, quello di essere presente in una localizzazione impropria o in un tempo sbagliato
- è associato di regola ad un tratto genetico dominante, in quanto l'aumentata espressione/funzione non può essere limitata dall'allele non mutato
- un esempio è l'aumentata funzione del recettore per l'FGF3 che causa l'acondroplasia (nanismo dismorfico) che è appunto a trasmissione autosomica dominante

5. allele neomorfo

- neomorfo (neo=nuovo) definito come causato da una mutazione che porta ad un prodotto genico nuovo o una funzione nuova
- si distingue solo didatticamente dall'allele ipermorfo, in quanto è in pratica una variante che è difficile da distinguere nelle singole condizioni
- valgono le stesse considerazioni fatte per l'allele ipermorfo sulla natura dominante della mutazione
- in alcune forme di cancro l'allele neomorfo è una chimera di due geni, dovuta ad una traslocazione cromosomica, come il cromosoma di fusione Philadelphia con la comparsa di nuove proteine Bcr-abl in casi di leucemia mieloide cronica

6. allele antimorfo o dominante negativo

- antimorfo (anti=contro) definito come causato da una mutazione che porta ad un prodotto genico antagonistico
- è il risultato di una mutazione che colpisce un gene il cui prodotto proteico funziona in cooperazione con altre proteine
- particolari mutazioni rendono la proteina di disturbo a tutte le altre pur essendo queste ultime perfettamente normali
- un esempio è dato dal collagene in cui più geni (e due alleli per ogni gene) contribuiscono alla formazione delle proteine ciascuno producendo una parte delle catene di base: una mutazione in un solo allele produce un effetto negativo complessivo

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)

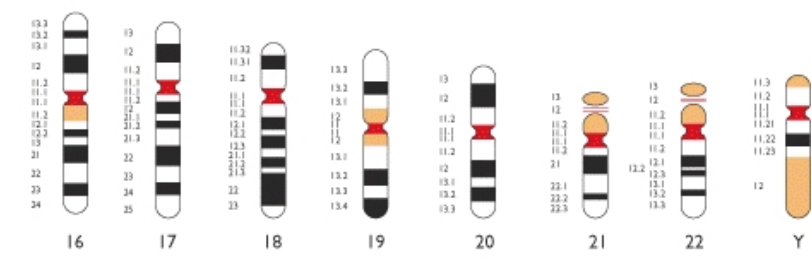
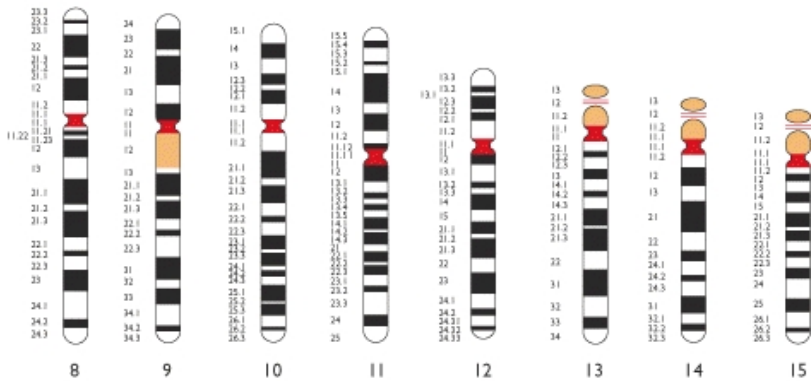
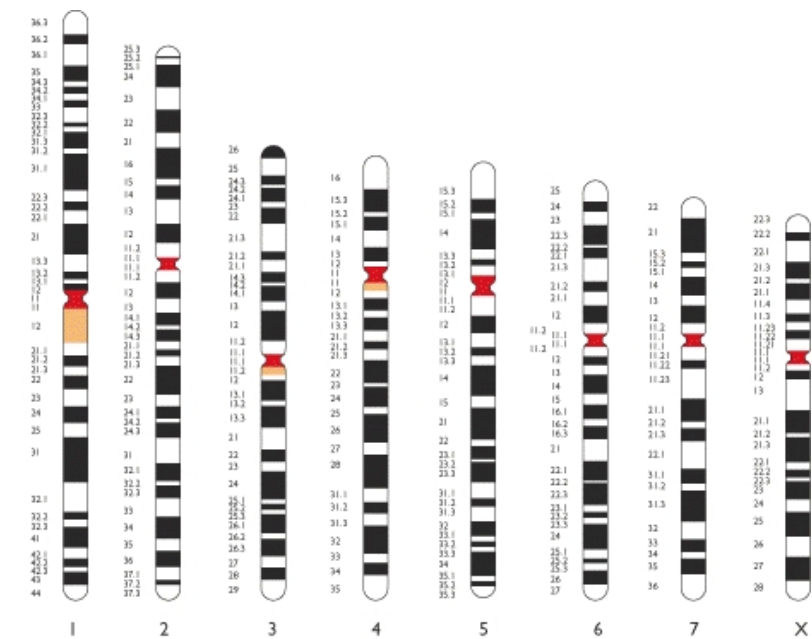
a queste quattro classi appartengono in modo indistinguibile tanto le variazioni innocue quanto le mutazioni causative di malattia

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

sostituzioni

- 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



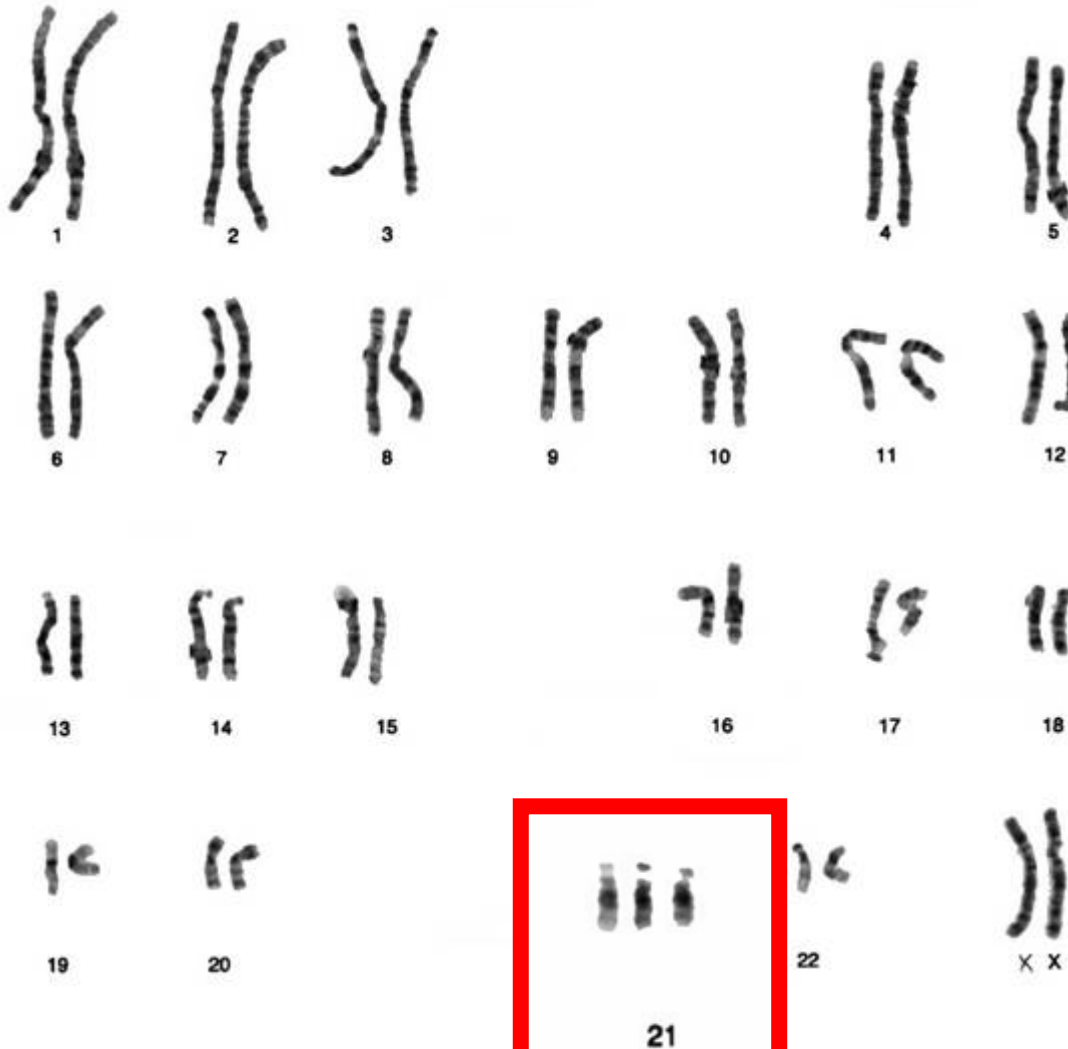
CCDS IDs per chromosome	
Chromosome	Count
1	2,513
2	1,548
3	1,299
4	898
5	1,028
6	1,236
7	1,094
8	807
9	921
10	971
11	1,509
12	1,240
13	385
14	749
15	711
16	967
17	1,370
18	350
19	1,616
20	672
21	282
22	530
X	967
Y	53
XY	23

Frequenza di anomalie cromosomiche negli aborti spontanei (39.8%-40.9%)

- trisomie autosomiche 49-52%
- Turner (45, X) 15-19%
- triploidia (69) 15-16%
- tetraploidia (92) 5-6%
- altre anomalie 6-14%

trisomia 21 Down

Trisomy 21
47,XX,+21



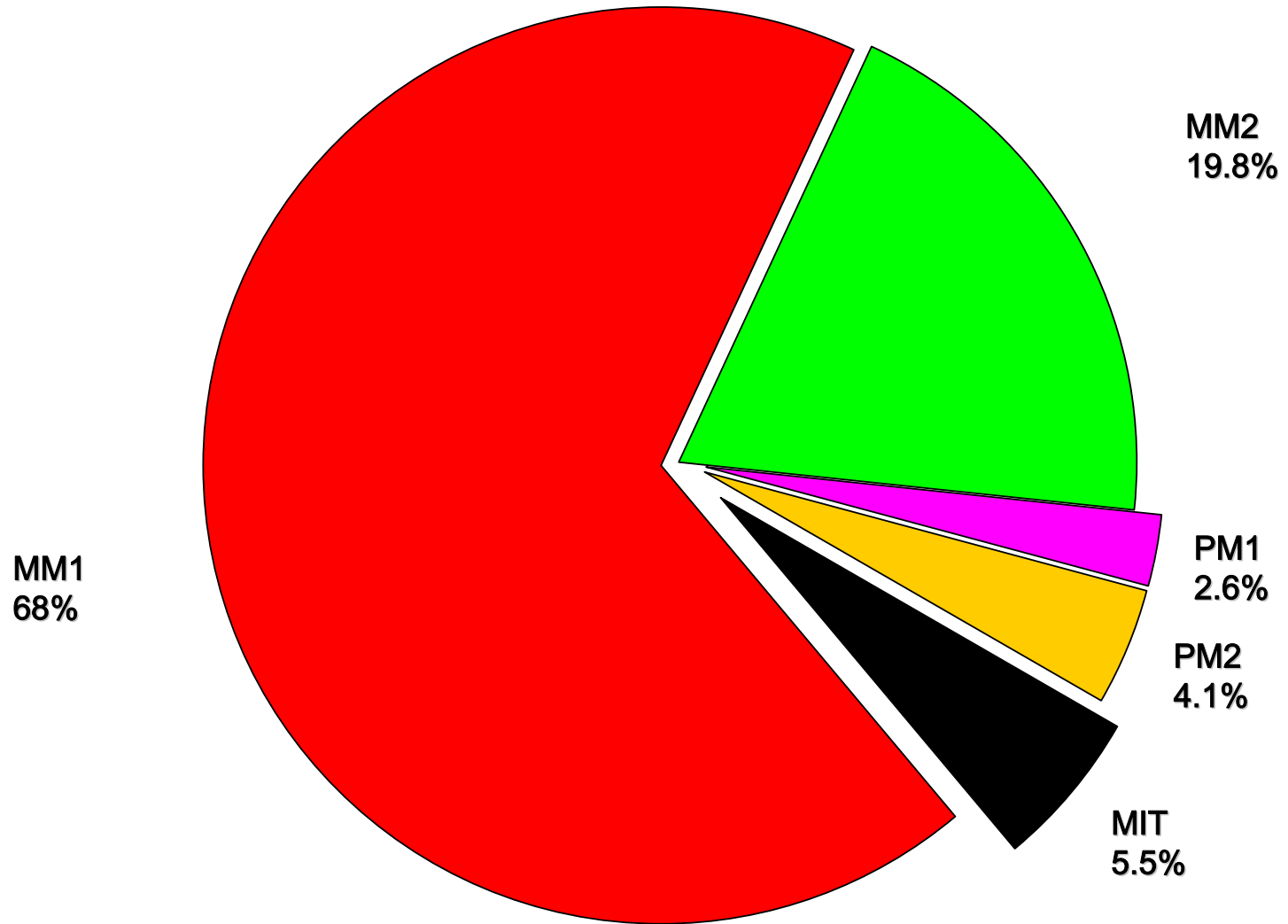
Il 70% delle gravidanze non giunge a termine

donna di 37 anni e mezzo alla data presunta del parto

ANNI	MESI COMPLETATI											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
25	1376	1372	1367	1363	1358	1353	1348	1343	1338	1333	1328	1322
26	1317	1311	1306	1300	1294	1289	1283	1277	1271	1264	1258	1252
27	1245	1239	1232	1225	1219	1212	1205	1198	1191	1183	1176	1169
28	1161	1154	1146	1138	1130	1123	1115	1107	1099	1090	1082	1074
29	1065	1057	1048	1040	1031	1022	1014	1005	996	987	978	969
30	960	951	942	932	923	914	905	895	886	877	867	858
31	848	839	829	820	810	801	791	782	772	763	753	744
32	734	725	716	706	697	687	678	669	660	650	641	632
33	623	614	605	596	587	578	570	561	552	544	535	527
34	518	510	502	494	486	478	470	462	454	446	439	431
35	424	416	409	402	395	387	381	374	367	360	354	347
36	341	334	328	322	316	310	304	298	292	287	281	275
37	270	265	259	254	249	244	239	235	230	225	221	216
38	212	207	203	199	195	191	187	183	179	175	171	168
39	164	161	157	154	151	147	144	141	138	135	132	129
40	126	124	121	118	116	113	111	108	106	103	101	99
41	97	94	92	90	88	86	84	82	81	79	77	75
42	73	72	70	69	67	65	64	63	61	60	58	57
43	56	54	53	52	51	49	48	47	46	45	44	43
44	42	41	40	39	38	37	36	35	35	34	33	32
45	31	31	30	29	29	28	27	27	26	25	25	24

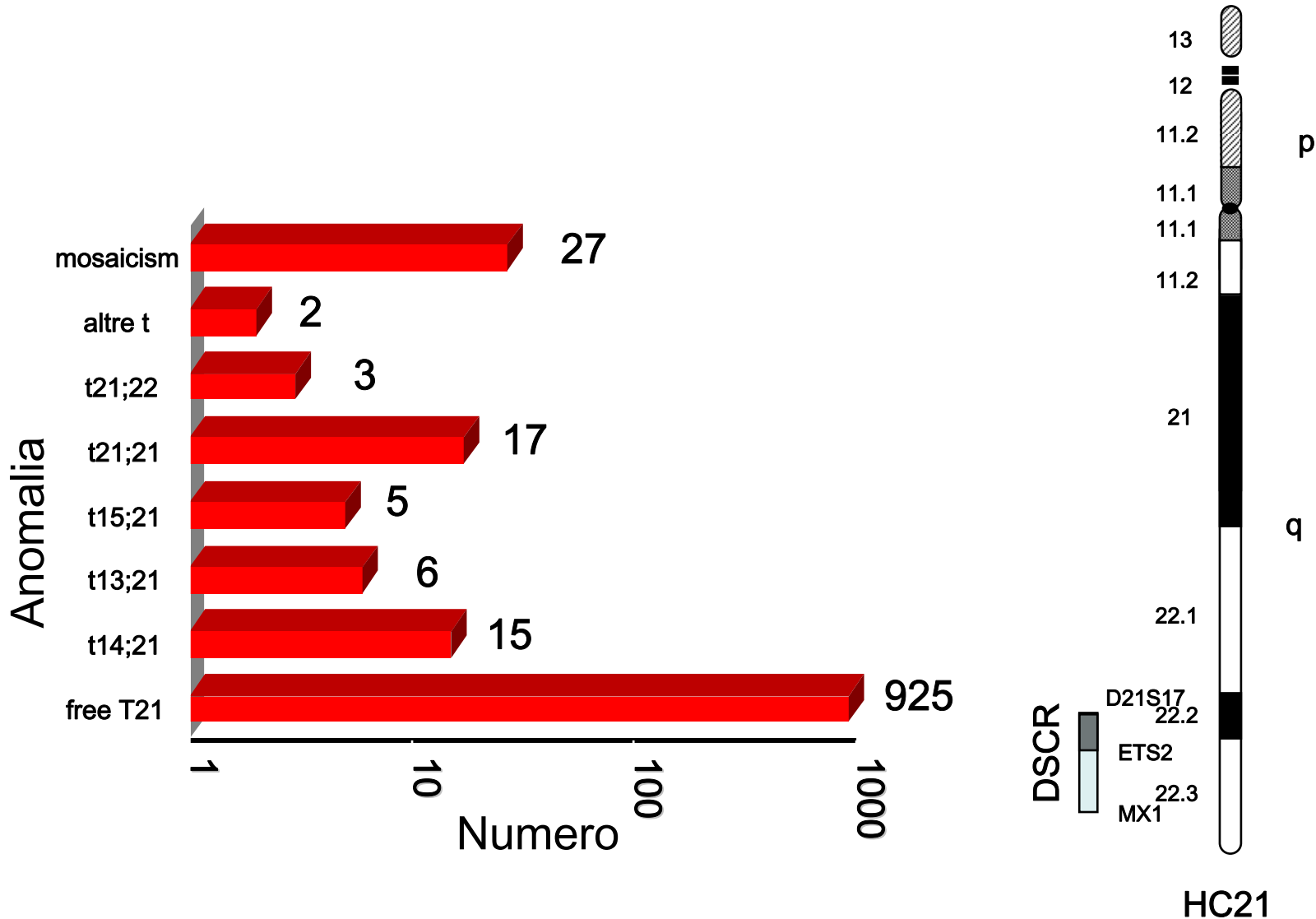
Rischio di 1/239 di figlio con sindrome di Down

origine dell'extra cromosoma 21

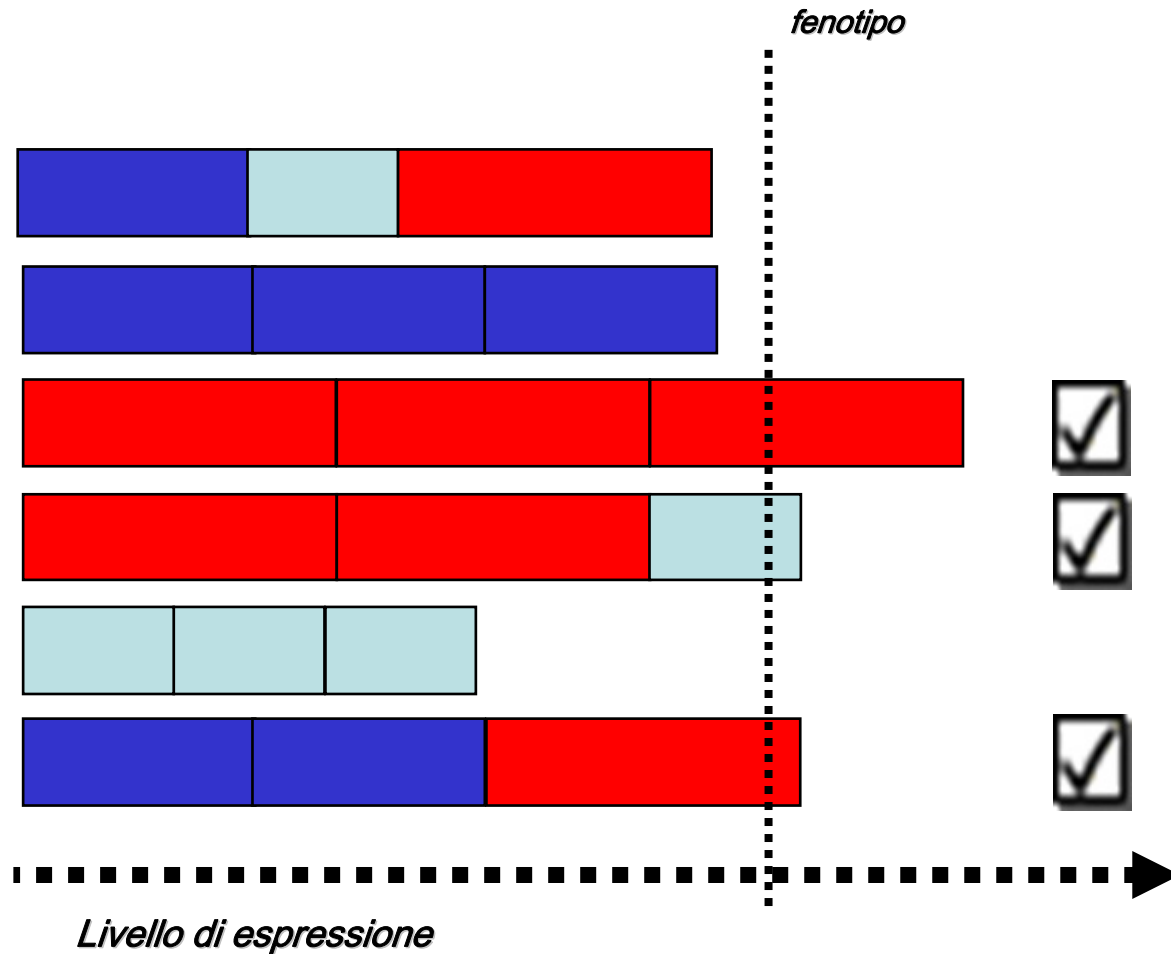


Data from the Antonarakis and Hassold laboratories

anomalie cromosomiche riscontrate



Ipotesi sulla variabilità del fenotipo di 6 individui diversi in caso di trisomia 21 in presenza di varianti alleliche





40.000 casi in Italia

trisomia 21 Down



Neurologici :

Ritardo mentale	100%
Alzheimer dopo i 35anni	100%
Ipotonia muscolare	100%
Bassa statura	70%

Testa :

Brachicefalia	75%
Epicanto	60%
brushfield spots iride	55%
lingua protrudente	45%
orecchie displastiche	50%



trisomia 21 Down



Arti corti, mani larghe 65%

Mignolo corto 60%

Solco palmare trasverso 60%

Cuore

Difetti cardiaci congeniti 40%

Canale atrioventricolare 16%

Anomali gastrointestinali

Atresia/stenosi duodenale 250x

ano imperforato 50x

Hirschsprung 300x

Sangue:

Leucemia acuta megacariocitica 300x

Leucemia (ALL e AML) 10-20x

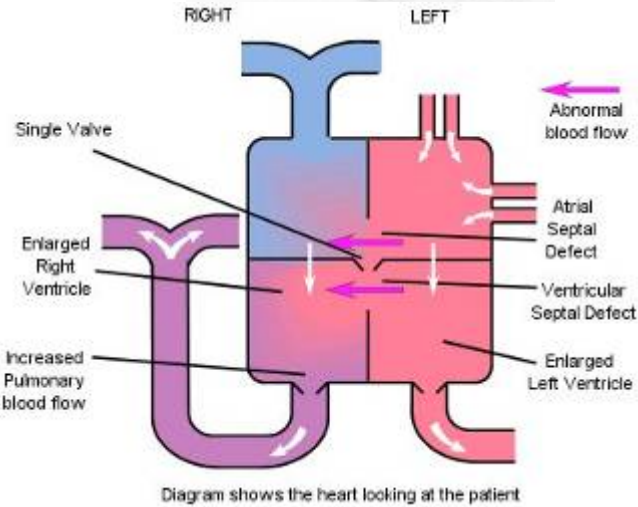
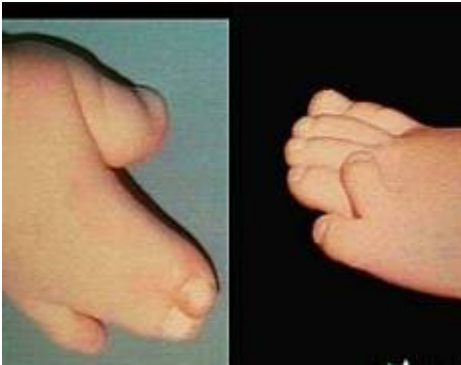


Diagram shows the heart looking at the patient



trisomia 18 Edwards

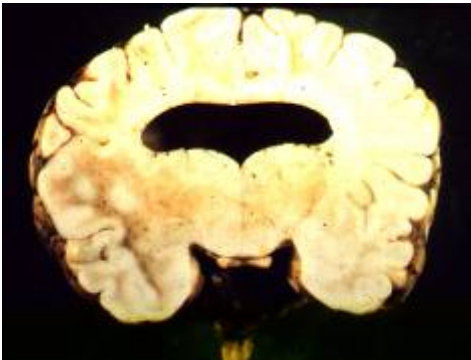


- (1/6.500 nati)
- 90% dei casi nondisgiunzione materna
- M/F = 1/4
- Giunge a termine solo il 2.5% dei concepimenti
- Di questi il 33% muore nel primo mese, il 50% entro 2 mesi
- Oltre 100 anomalie
 - Peso sotto la norma, difficoltà suzione
 - Ipotonia
 - Idrocefalo, epilessia
 - Malformazioni cardiache
 - sinclinodattilia, unghie poco sviluppate
 - piedi a calcagno prominente
 - Gambe incrociate



trisomia 13 Patau

<http://www.livingwithtrisomy13.org>



(1/10.000-20.000 nati)

nondisgiunzione materna o traslocazione robertsoniana

Giunge a termine solo il 4% dei concepimenti
1/3 ragazze superano i 5 anni, 1/10 i 10 anni,
mentre nessun maschio raggiunge i 10 anni

Peso sotto la norma, difficoltà suzione

Oloprosencefalia, microcefalia

Cecità e sordità

Occhi che possono fondersi

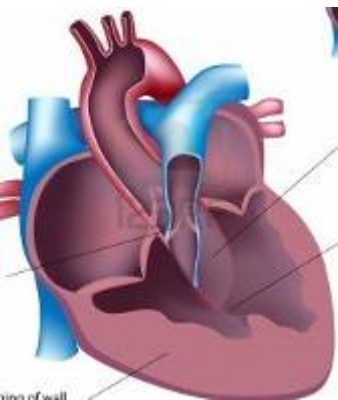
Labiopalatoschisi 80%

epilessia

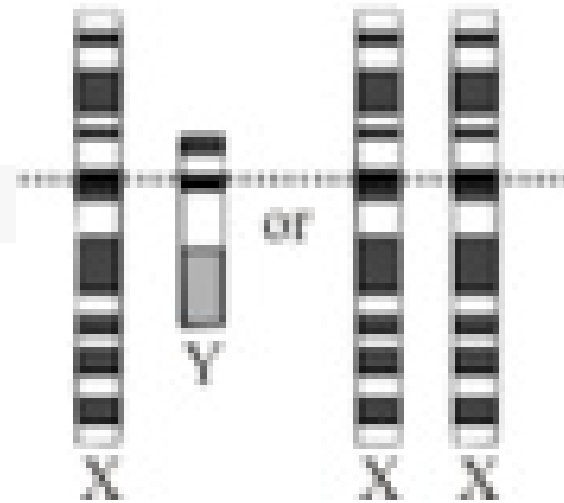
Malformazioni cardiache (T Fallot)

sinclinodattilia

piedi a calcagno prominente



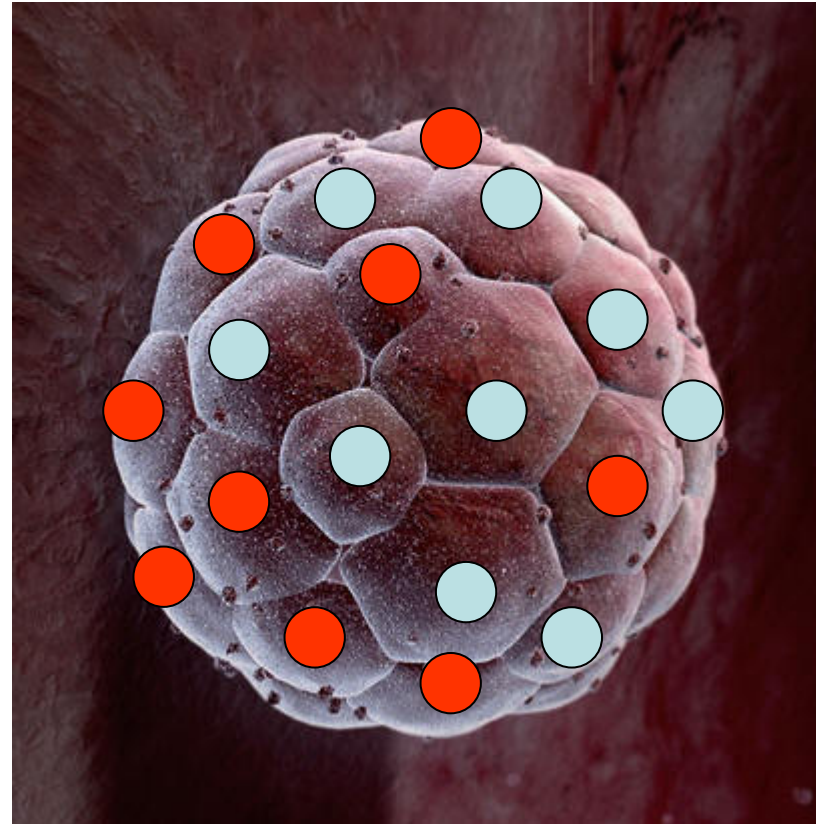
XX o XY



- Il sesso maschile è determinato dalla presenza del cromosoma Y
- Si sono evoluti meccanismi per compensare la differenza di dosaggio genico del cromosoma X, presente in 2 copie nelle femmine e in 1 copia nei maschi

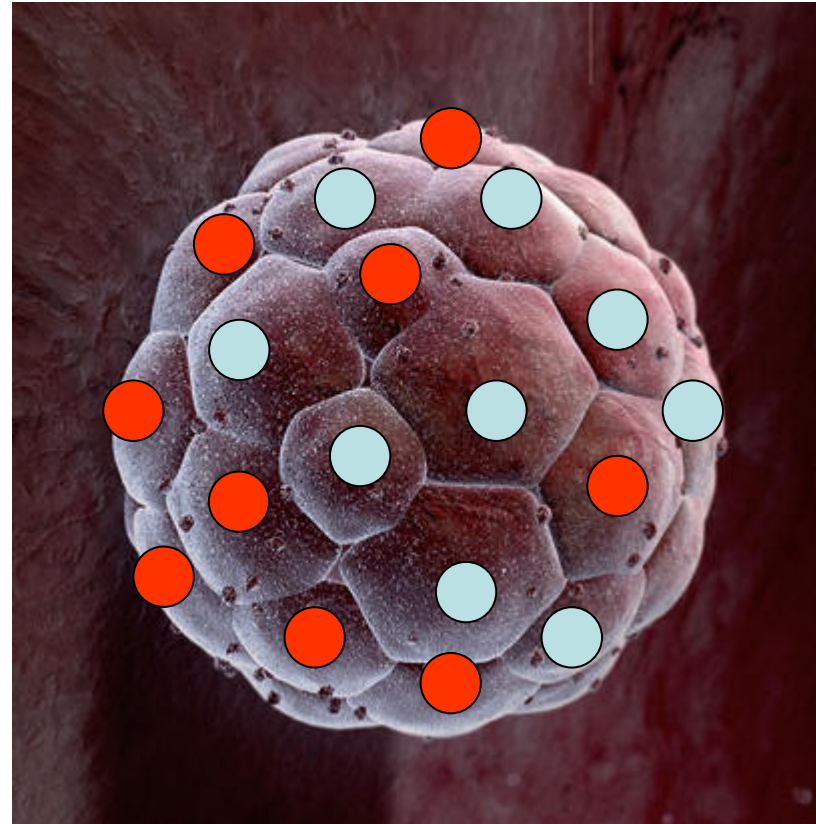
2 cromosomi X nelle donne,
1 solo negli uomini?

1. il cromosoma X raddoppia l'espressione di tutti i geni contenuti, cioè si produce 2 volte più RNA
2. nelle femmine uno dei due cromosomi X è inattivato casualmente in ciascuna cellula allo stadio di blastocisti



Il Klinefelter?

1. Nel Klinefelter (XXY) uno dei due cromosomi X è inattivato casualmente in ciascuna cellula allo stadio di blastocisti
2. Quindi il dosaggio sarebbe mantenuto

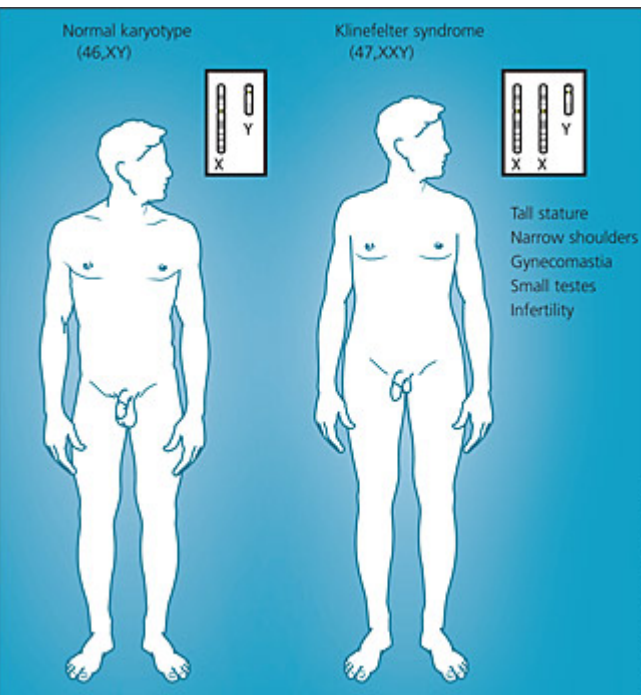




Sindrome di Klinefelter (47, XXY)

1:900-1:600 maschi

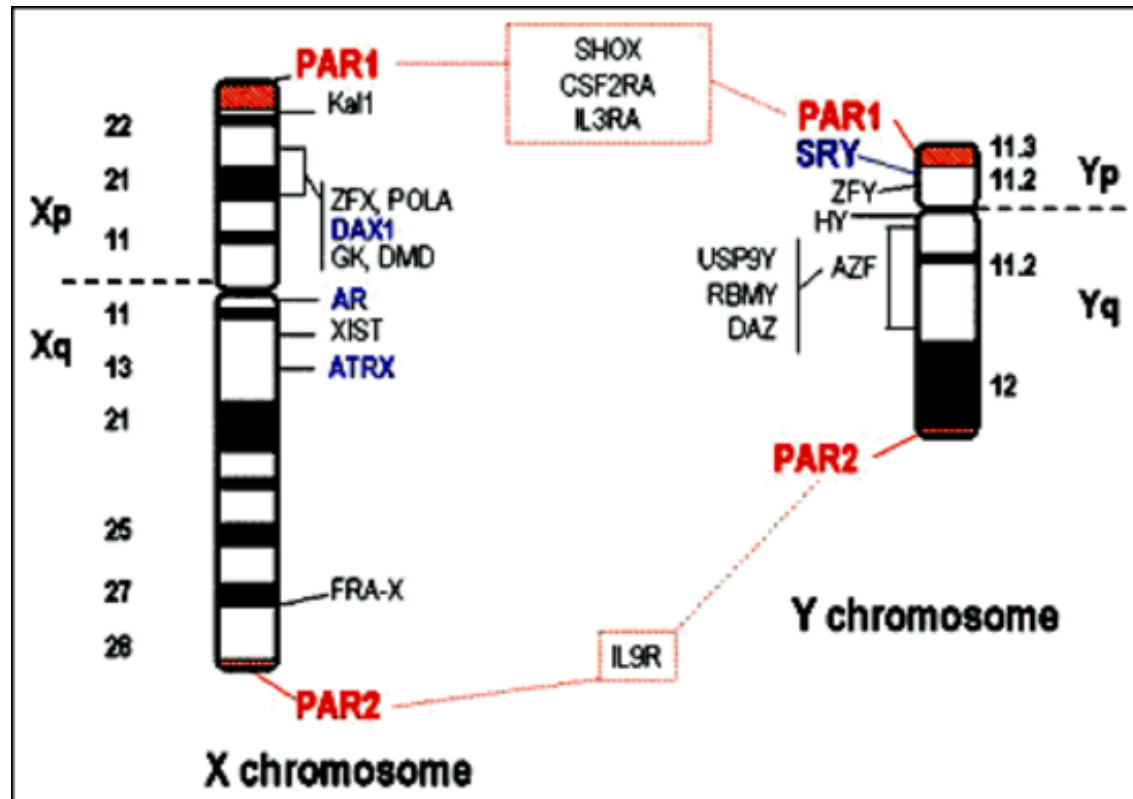
- Il 50% delle gravidanze giunge a termine
- Fenotipo maschile
- Caratteristiche principali:
- Statura alta, osteoporosi
- Ipogonadismo, bassi livelli di testosterone, mancata produzione di spermatozoi (azoospermia) e quindi sterilità
- Ginecomastia, riduzione massa e tono muscolare
- Sia l'intelligenza sia l'attesa di vita sono quasi normali



Altre forme citogenetiche

- Ma ci sono anche Klinefeler **48,XXYY** and **48,XXXY** in 1 caso su 17,000 e 1 su 50,000 nati maschi
- **49,XXXXY** in 1 caso su 85,000 -100,000
- Ci sono maschi **46,XX** in cui avviene una traslocazione di parte di cromosoma Y sul cromosoma X che include la sex determining region (SRY)
- mosaici

Le regioni PAR presenti sui cromosomi sessuali contengono geni che non sono inattivati, perché il doppio dosaggio è assicurato comunque



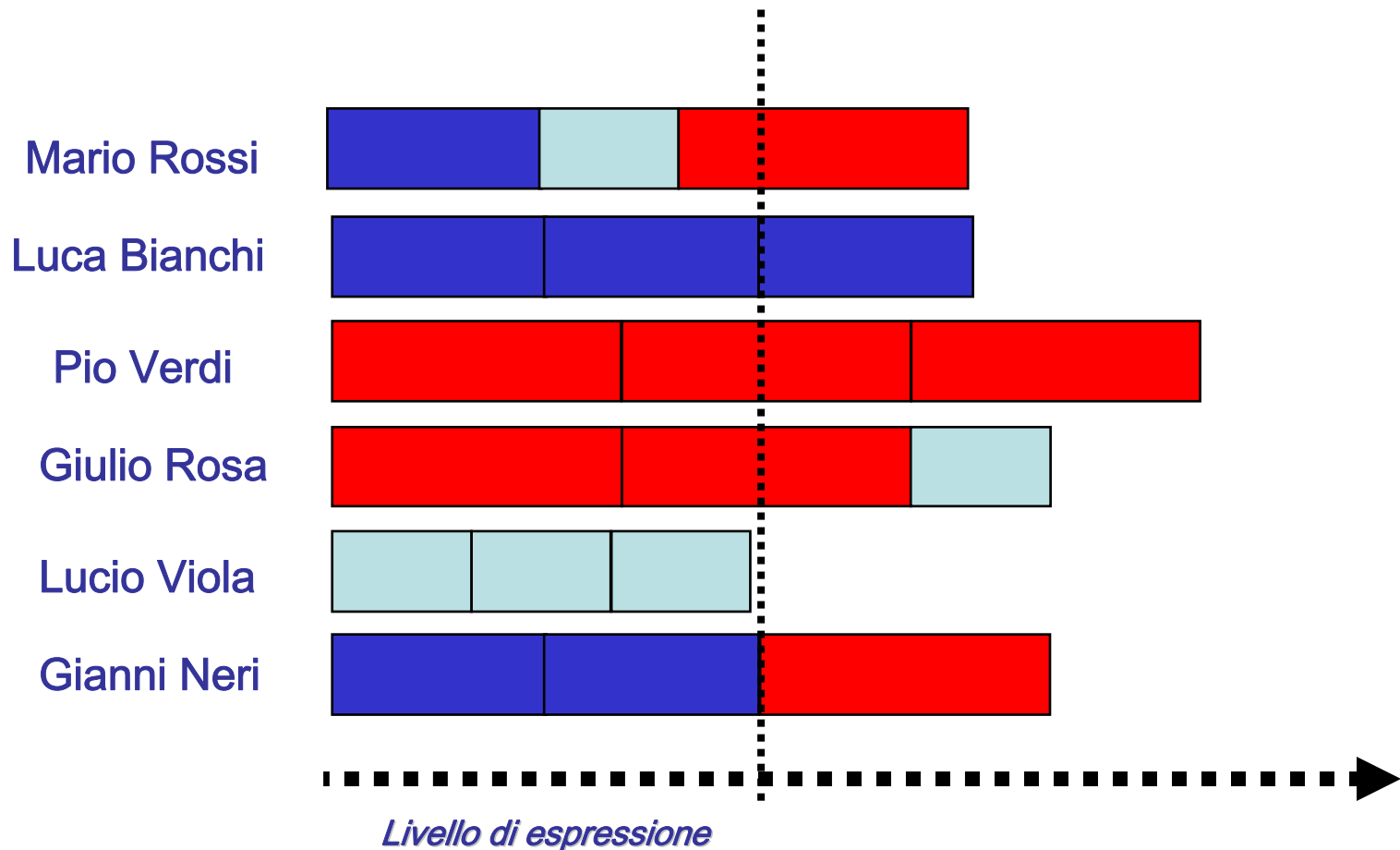
PAR1 ha 24 geni, PAR2 ha solo 4 geni

Il gene SHOX

Short stature HOmeoboX-containing

- Mutazioni o delezioni del gene SHOX nella regione PAR1 (aploinsufficienza) causa ritardo di crescita e bassa statura
- L'incidenza delle mutazioni di SHOX è 1/2000-1/5000 nella popolazione generale, ma 1/40-1/150 tra le persone di bassa statura
- La bassa statura (ma anche il quarto metacarpo corto) delle Turner (X0) è il risultato di una sola copia di SHOX
- La maggiore statura nel Klinefelter (XXY) e nella tripla X (XXX) potrebbe essere il risultato di 3 copie di SHOX

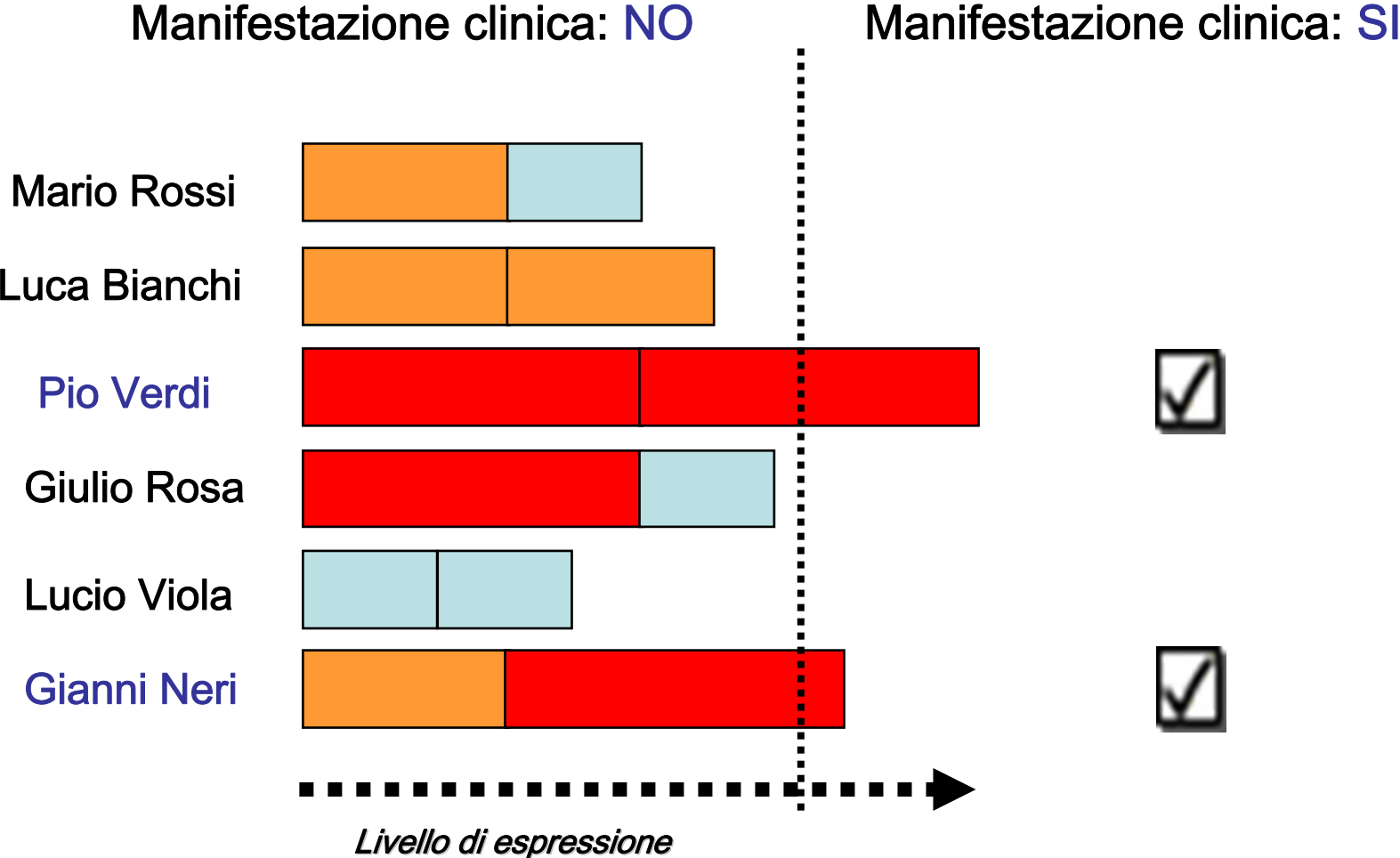
variabilità dei geni del cromosoma X delle regioni
PAR, quindi non inattivati
3 copie nel Klinefelter, ma anche nella tripla X



A complicare le cose...

- circa il **15 % dei geni umani presenti sull'X sfugge all'inattivazione**, mentre nel topo questa è un'evenienza rara (solo 6 geni in tutto)
- alcuni sono espressi al 50-100% altri al 10%
- questo fenomeno è quindi incompleto e le donne hanno una elevata eterogeneità nell'espressione di geni dell'X

ipotesi sulla variabilità di ogni singola manifestazione clinica di Klinefelter in presenza di varianti in geni del cromosoma X non inattivati



Quanti Klinefelter?

- Prevalenza di XXYs è cresciuta da 1.09 a 1.72 per 1000 maschi nati ($P=0.023$)
- Questo incremento non è dovuto all'aumento dell'età materna
- Sono nati 290.330 maschi in Italia e 31.573 maschi in Campania nel 2007
- max 300-500 nuovi Klinefelter ogni anno in Italia (32-52 in Campania)
- XXY è la sola trisomia nota in cui circa il 50% dei casi è causato da una non disgiunzione alla prima divisione meiotica paterna

Trisomia X (47,XXX)

1:1.200

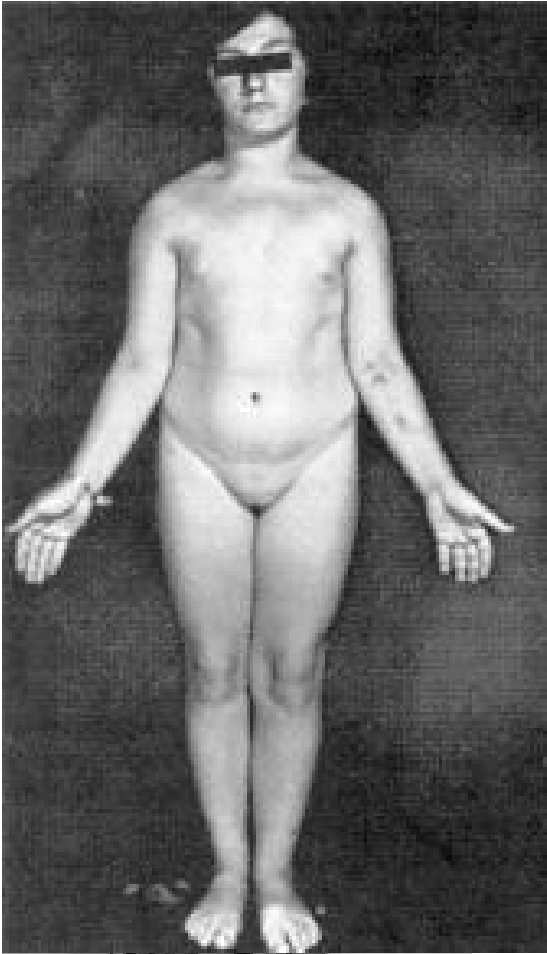
- Il 70% delle gravidanze giunge a termine
- Errore nella disgiunzione materna e correla con l'età materna
- Caratteristiche principali:
 - Statura alta
 - Fertilità normale, irregolarità ciclo
 - Sia l'intelligenza sia l'attesa di vita sono normali

Maschio (47,XYY)

1:1.000 maschi

- Fenotipo maschile
- Caratteristiche principali:
 - Statura alta
 - Fertilità normale
 - Non vi è correlazione con l'età paterna
 - Sia l'intelligenza sia l'attesa di vita sono perfettamente normali

Monosomia X (45,X0) Turner



Prende il nome dall'endocrinologo Henry Turner che la descrisse nel 1938

La sindrome di Turner (TS) definisce un complesso fenotipo umano femminile, dovuto a completa o parziale assenza del secondo cromosoma sessuale

Dipende da un errore nella spermatogenesi nell'80% dei casi e non correla con l'età dei genitori

Un precedente figlio con TS non aumenta il rischio riproduttivo previsto per una coppia di pari età

Monosomia X (45,X0) Turner

È l'unica monosomia compatibile con la vita, ma il 98% di tutti i feti monosomici TS va incontro ad aborto spontaneo

L'incidenza negli aborti è circa il 7-10%, mentre alla nascita è 1/2500 femmine.

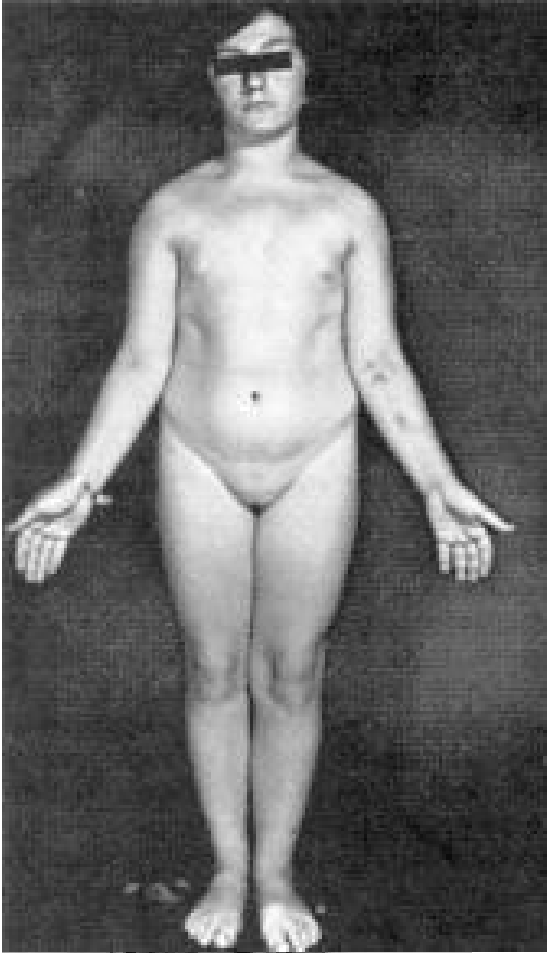
Non è chiaro perché il cariotipo 45, X0 sia letale in utero ed invece compatibile con la sopravvivenza postnatale

La vera monosomia del cromosoma X è responsabile del 45% dei casi TS; gli altri hanno mosaicismi (45, X0/46, XX) e/o un anormale cromosoma X o Y

Un basso livello di mosaicismi somatici Turner, inferiore al 2%, è di normale riscontro nella popolazione



Monosomia X (45,X0) Turner



“la menopausa precede il menarca”

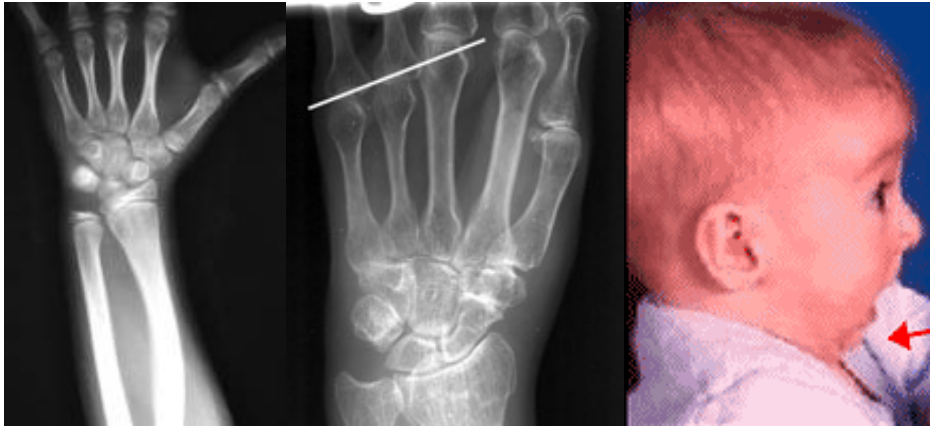
Le ovaie sono allungate e formate da tessuto stromale privo di follicoli: gli oociti sono spesso andati in apoptosi prima dei 2 anni di vita

L'insufficienza ovarica prepuberale porta ad amenorrea primaria, sterilità e carenza di estrogeni

In meno del 10% dei casi, la pubertà può verificarsi e sono possibili gravidanze con un aumentato rischio di perdita fetale

Anche in rapporto all'eterogeneità del genotipo, il fenotipo si manifesta in modo molto variabile

Monosomia X (45,X0) Turner 1:2.500



- per la perdita di una copia del gene SHOX (aploinsufficienza) hanno :
 - ~20cm in meno di altezza rispetto alle sorelle
 - il quarto metacarpo (anulare) più corto
 - la deformità di Madelung (accorciamento e dall'incurvamento del radio e dell'ulna)
- patologie dell'orecchio medio (otite media ricorrente)
- infedema con rigonfiamento delle mani e dei piedi
- pterigio del collo (presenza di pliche cutanee con aspetto di sfinge)
- una mandibola più piccola (micrognazia)
- torace largo con aumento degli spazi intercostali
- l'attaccatura bassa delle orecchie e dei capelli
- Si possono anche riscontrare cardiopatia sinistra (valvola aortica bicuspidale, coartazione aortica), ipertensione e anomalie renali

feto con anomalia cromosomica (mosaicismo)

- trisomie a mosaico 8, 9, 13, 18, 21
- crescita in coltura di cellule materne
- mosaicismo vero (livello III)
- pseudomosaicismo (livelli II e I)