

# 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

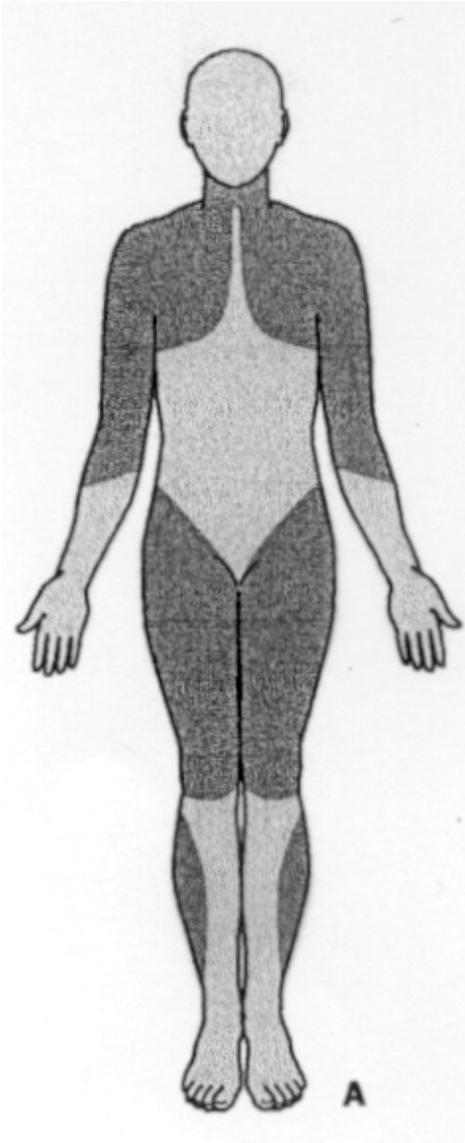
- Moncharmont  
**Patologia Generale (3 capitoli genetica)**  
Editore Idelson Gnocchi
- Da Trattato Italiano di Medicina di Laboratorio vol IX  
Diagnostica molecolare: **Genetica**  
Editore Elsevier Masson
- Strachan-Read  
**Genetica Molecolare Umana**  
Editore Zanichelli
- Sito web <http://www.vincenzonigro.it>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

# eterogeneità genetica

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

- Esempi:
  - 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
  - Le **distrofie muscolari dei cingoli** sono un gruppo geneticamente eterogeneo di distrofia muscolare prossimale, cioè che colpiscono i cingoli pelvico e scapolare

# Distrofinopatie X-linked



- **DMD Duchenne Muscular Dystrophy**

- **1/3,500 maschi nati**

- Insorgenza – infanzia – tra 2 e 6 anni

- **Laboratorio -- CPK (50x - 1.000x), LDH5, ALT, AST, aldolasi aumentate**

- Sintomi – Debolezza generalizzata e deterioramento muscolare che inizia dai muscoli prossimali della spalla e del bacino. I polpacci sono ingrossati. Il cuore è coinvolto

- Progressione – la malattia è lentamente progressiva e alla fine colpisce tutti i muscoli volontari e quelli respiratori. La sopravvivenza è oggi di 30 anni, grazie alla ventilazione notturna

- **BMD Becker Muscular Dystrophy**

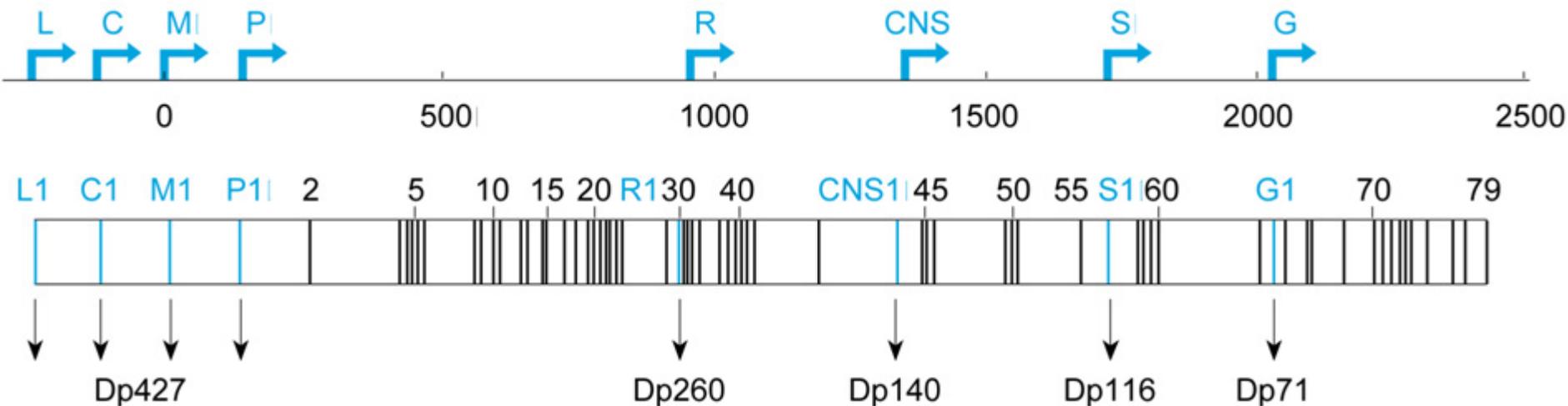
- **1/10,000 maschi nati**

- Insorgenza -- Adolescenza o in età adulta

- Sintomi – Molto simile alla distrofia muscolare di Duchenne, ma tutto è più lieve e più tardivo. Coinvolgimento cardiaco

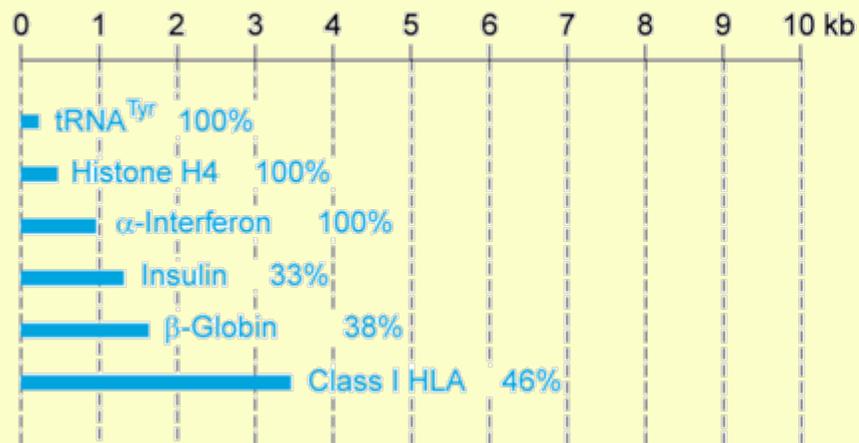
- Progressione – più lenta e più variabile, sopravvivenza fino all'età adulta o oltre in funzione della cardiomiopatia

# Almeno otto promotori sono usati per generare un'espressione cell-specific della distrofina

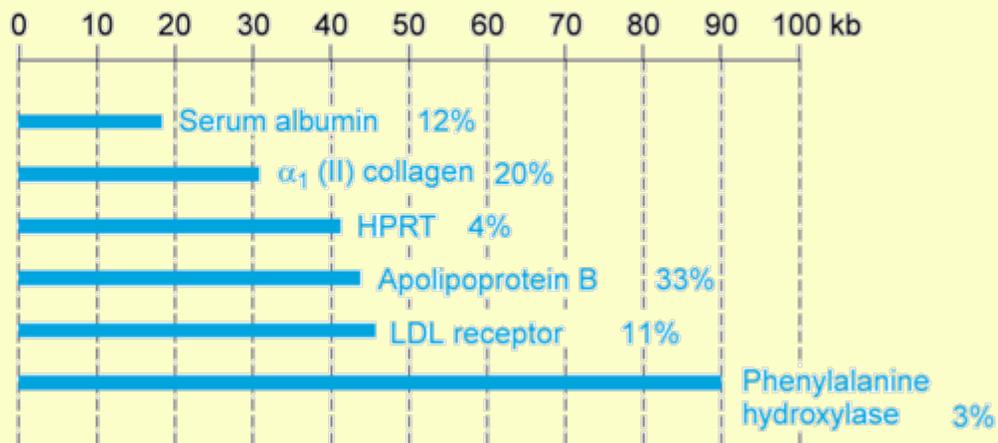


- L = linfociti
- C = corticale
- M = muscolo
- P = Purkinje
- R = retina
- CNS = sistema nervoso centrale
- S = Schwann
- G = generale

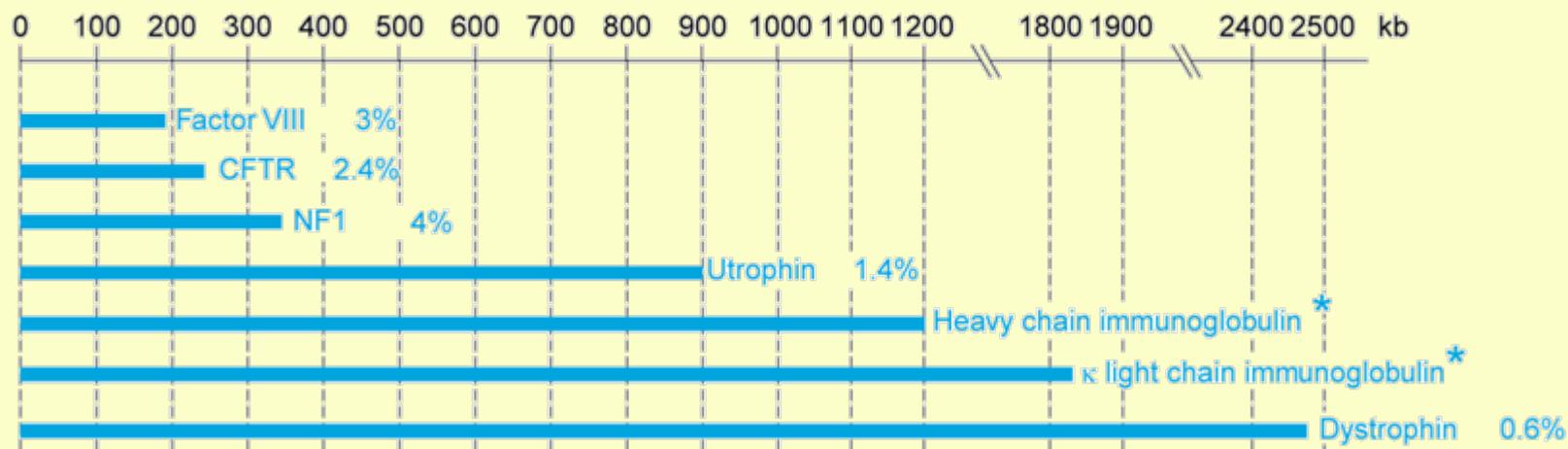
(A) Less than 10 kb



(B) Less than 100 kb

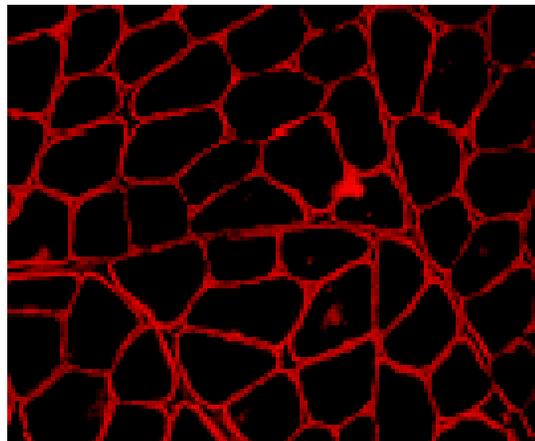


(C) More than 100 kb

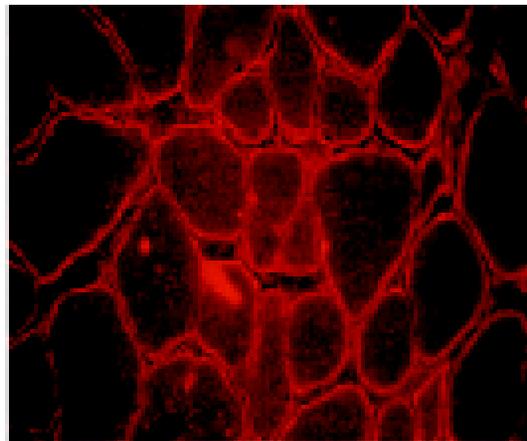




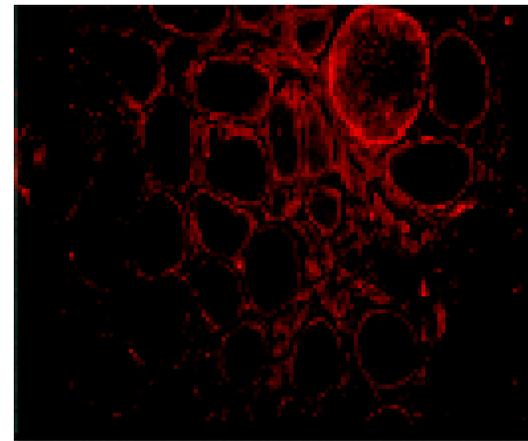
Normal



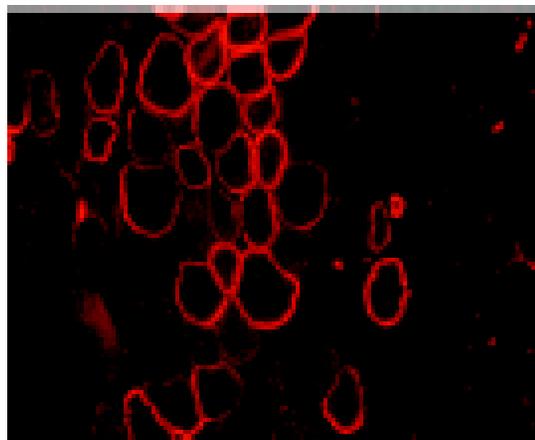
Mild BMD



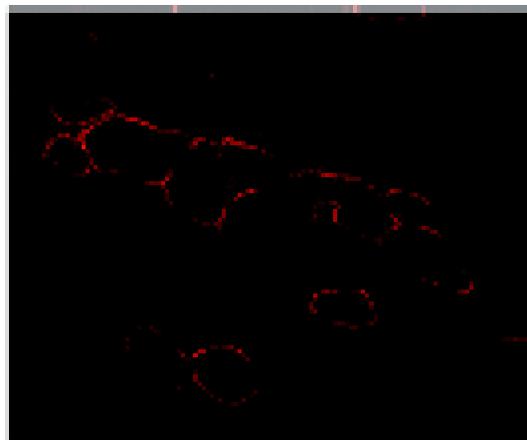
Severe BMD



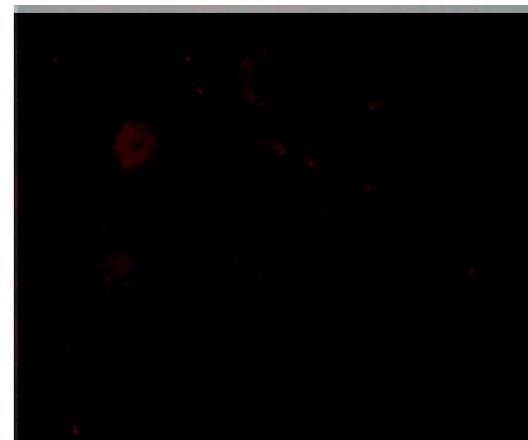
Manifesting carrier  
of DMD

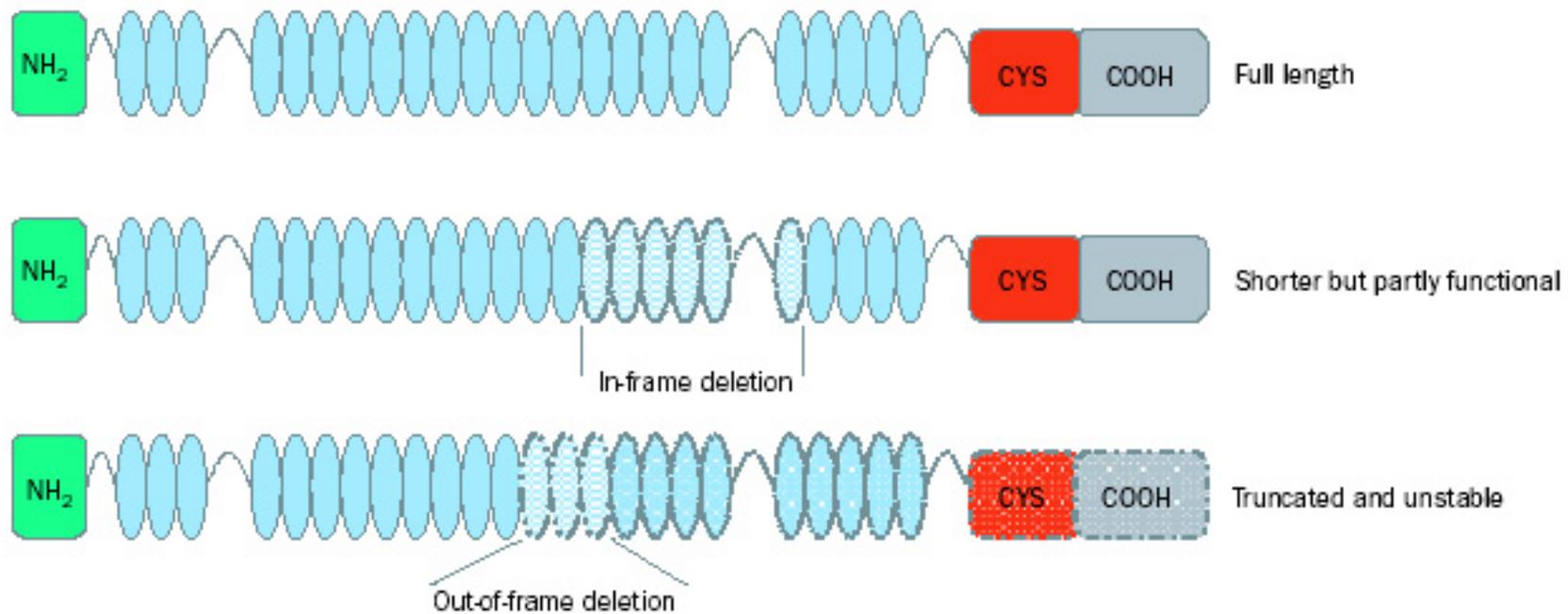


Revertant fibres in a  
patient with IMD

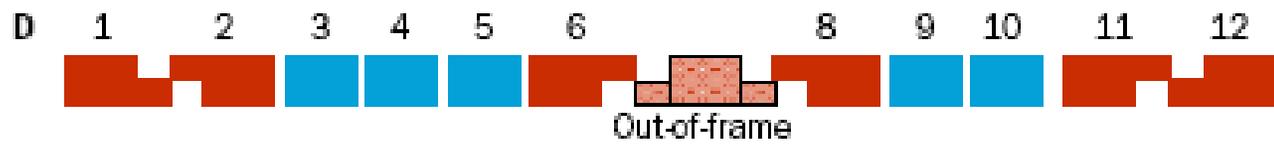
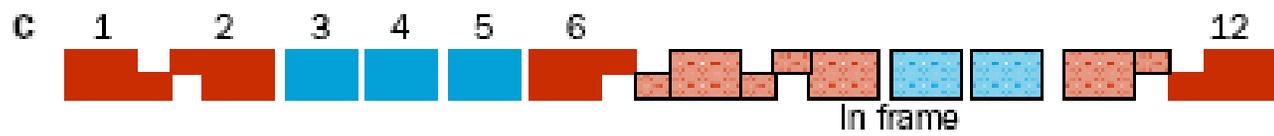
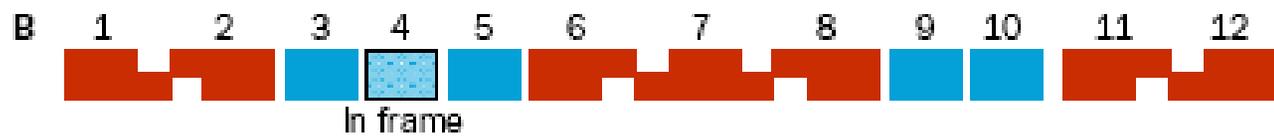


DMD

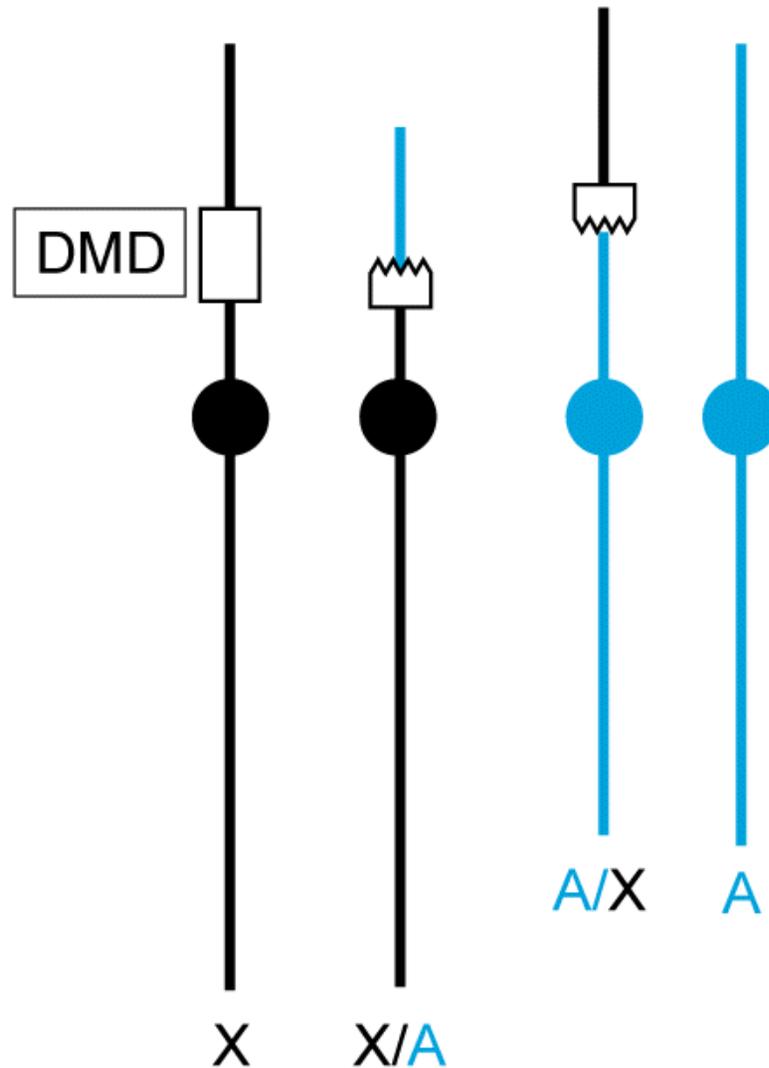


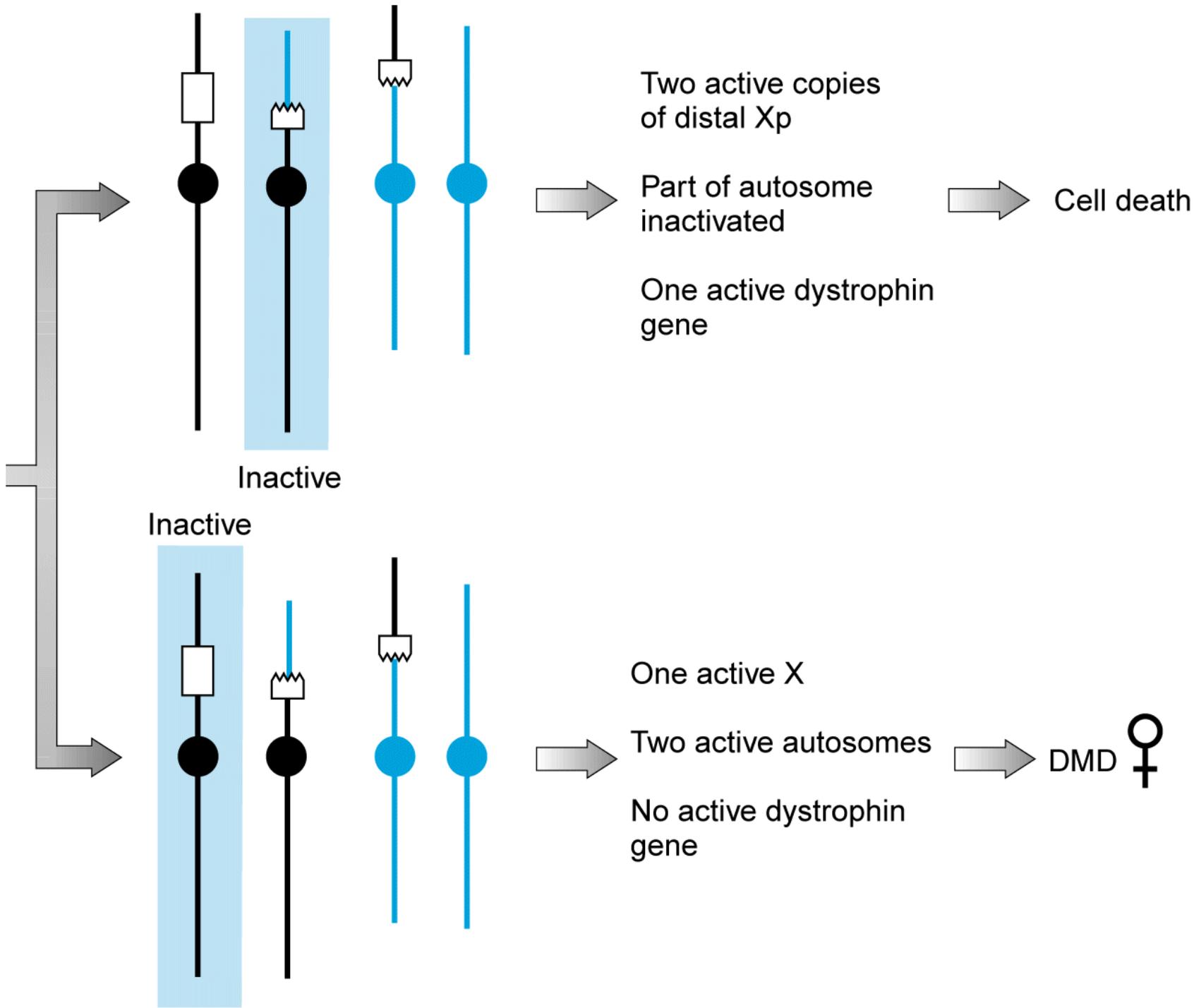




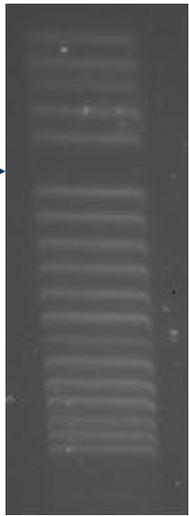


# Carrier of a balanced reciprocal X-autosome translocation

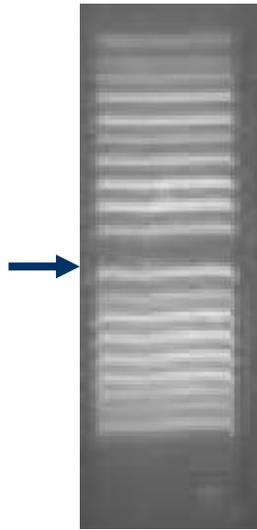




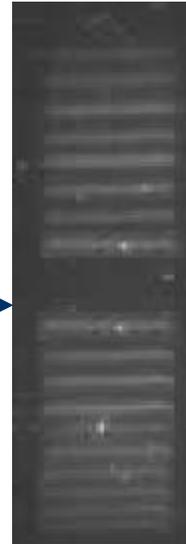
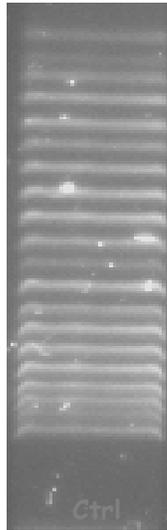
# Log-PCR compared to MLPA



del ex 49  
mix D



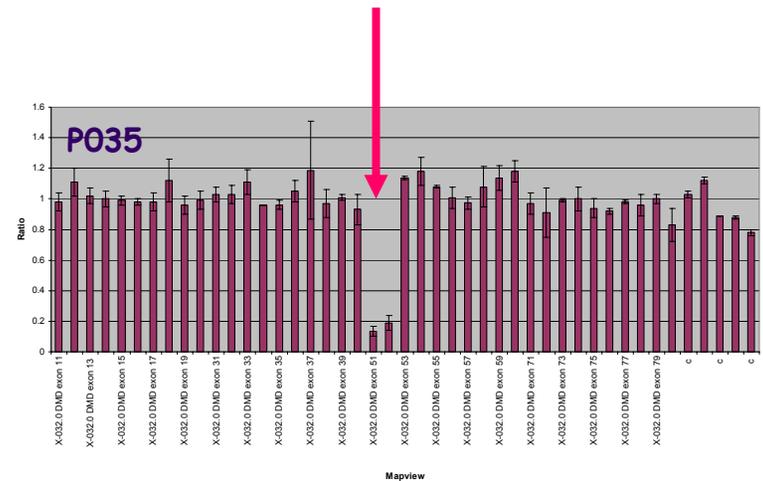
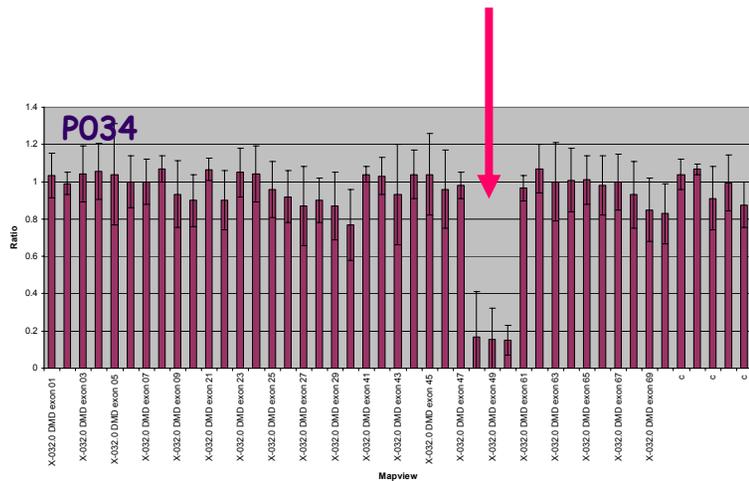
del ex 51  
mix B



Del ex 50-52  
mix A



del ex. 48-52

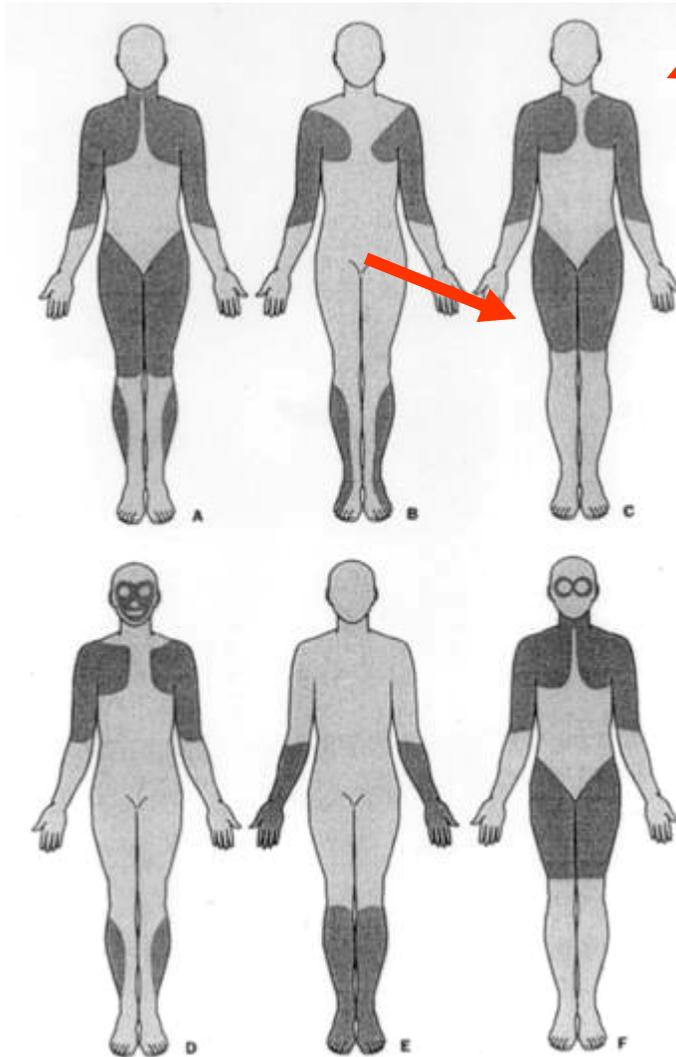


# genetic heterogeneity of autosomal recessive LGMDs

*Nigro, Curr. Opin Neurol 2011*

•LGMD2A	15q15	CAPN3	calpain 3
•LGMD2B	2p13.2	DYSF	dysferlin
•LGMD2C	13q12	SGCG	gamma-sarcoglycan
•LGMD2D	17q21.33	SGCA	alpha-sarcoglycan
•LGMD2E	4q12	SGCB	beta-sarcoglycan
•LGMD2F	5q33	SGCD	delta-sarcoglycan
•LGMD2G	17q12	TCAP	telethonin
•LGMD2H	9q33.1	TRIM32	tripartite motif containing 32
•LGMD2I	19q13.3	FKRP	fukutin related protein
•LGMD2J	2q24.3	TTN	titin
•LGMD2K	9q34.1	POMT1	protein-O-mannosyltransferase 1
•LGMD2L	11p13-p12	ANO5	anoctamin 5
•LGMD2M	9q31	FKTN	fukutin
•LGMD2N	14q24	POMT2	protein-O-mannosyltransferase 2
•LGMD2O	1p34.1	POMGnT1	pr. O-link man b 1,2-N- AcGlucNyl transf
•LGMD2P	3p21	DAG	dystroglycan

# distrofie muscolari dei cingoli

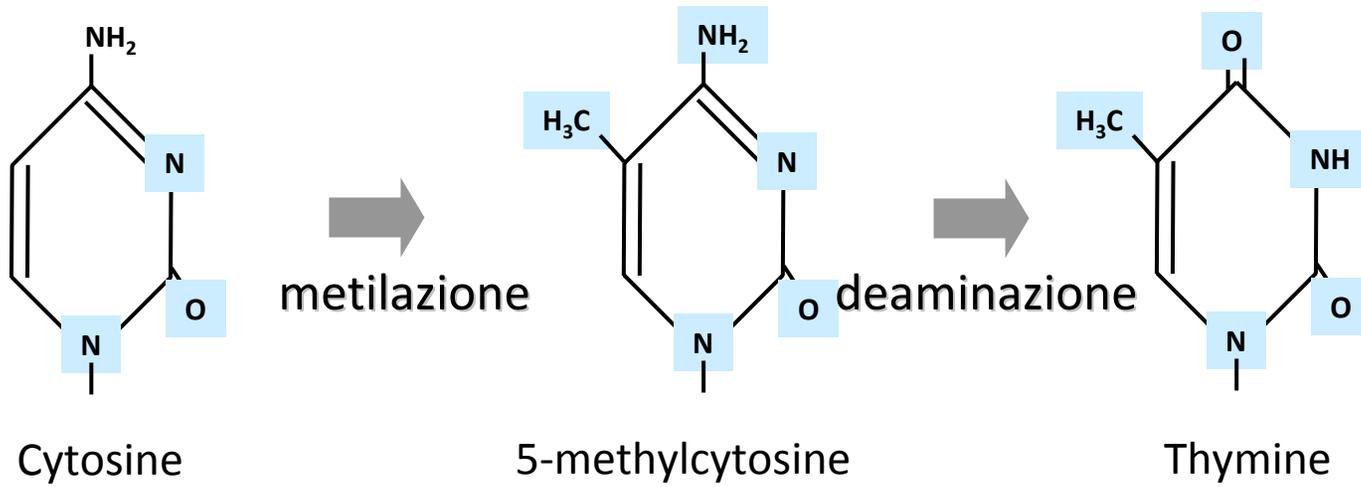


- Colpiscono i muscoli prossimali degli arti
- Eredità non X-linked
- Fenotipo molto variabile da grave (simile alla distrofia di Duchenne) a più lieve della distrofia muscolare di Becker
- Almeno 30 geni differenti

Table 2 Autosomal recessive LGMD

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

# Il meccanismo più comune di mutazione



**CG**  $\Rightarrow$  **TG**

**CG**  $\Rightarrow$  **CA**

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

Key:

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

# mutazioni puntiformi missenso

---

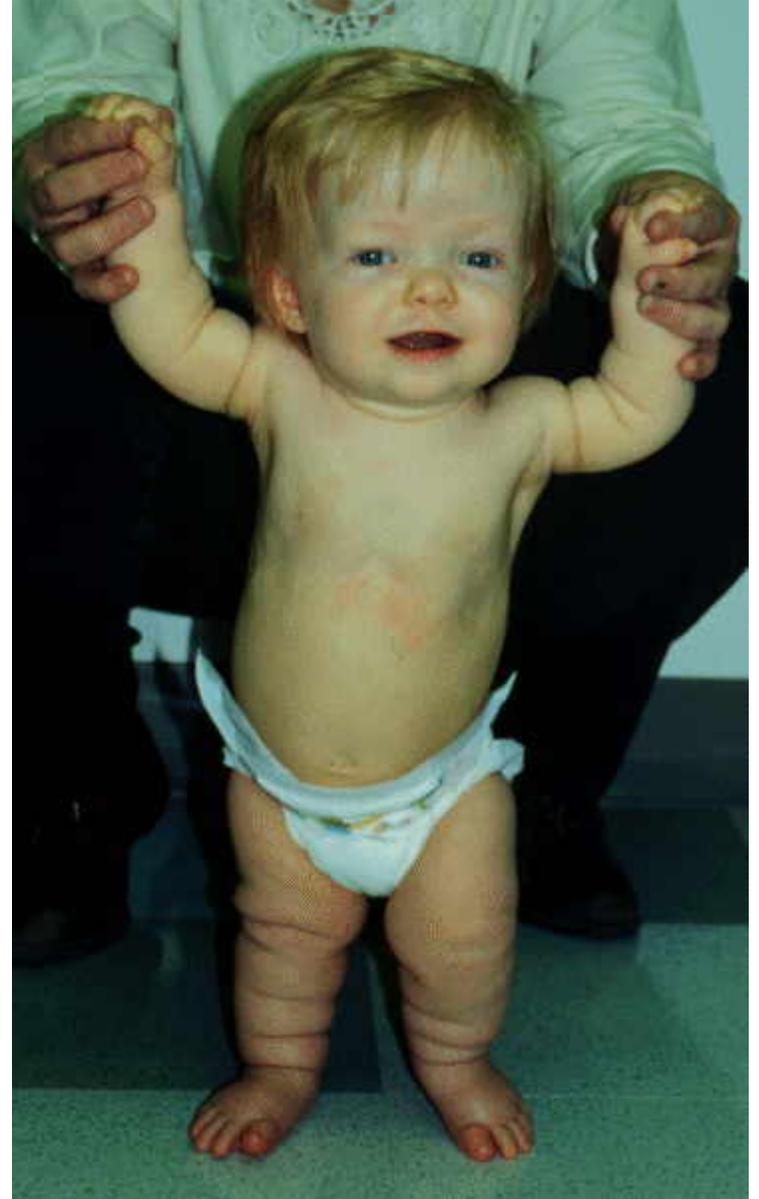
- Le mutazioni **missenso** sono quelle in cui il cambiamento determina nel prodotto proteico la sostituzione di un aminoacido con un aminoacido differente
- Sebbene queste alterazioni generalmente non provochino conseguenze nella funzionalità della proteina (polimorfismi o varianti) , ci sono casi in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



## achondroplasia

---

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



# accondroplasia

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

# ipocondroplasia



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

# acrocefalosindattilia sindrome di Apert



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

# acrocefalosindattilia sindrome di Apert

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



## sindrome di Pfeiffer

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



## disostosi cranio facciale sindrome di Crouzon

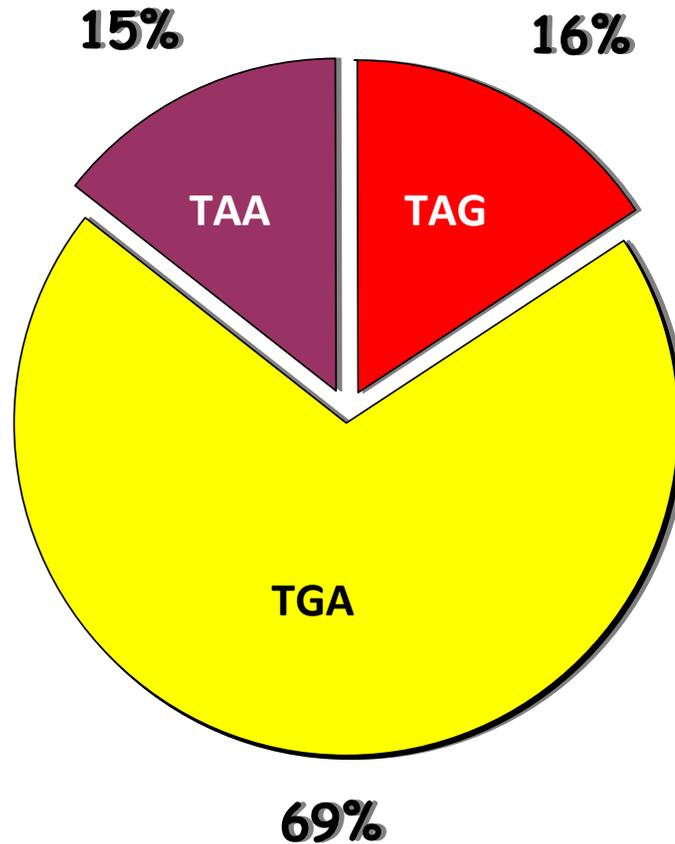
- alcuni pazienti hanno la mutazione (Cys342Tyr) del gene human fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)
- la mutazione è in eterozigosi
- *de novo*
- cromosoma 10q26
- la sindrome è allelica con Pfeiffer e Apert con alcune mutazioni in comune

## mutazioni puntiformi nonsense

---

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

# Tipi diversi di mutazioni nonsense nei geni umani

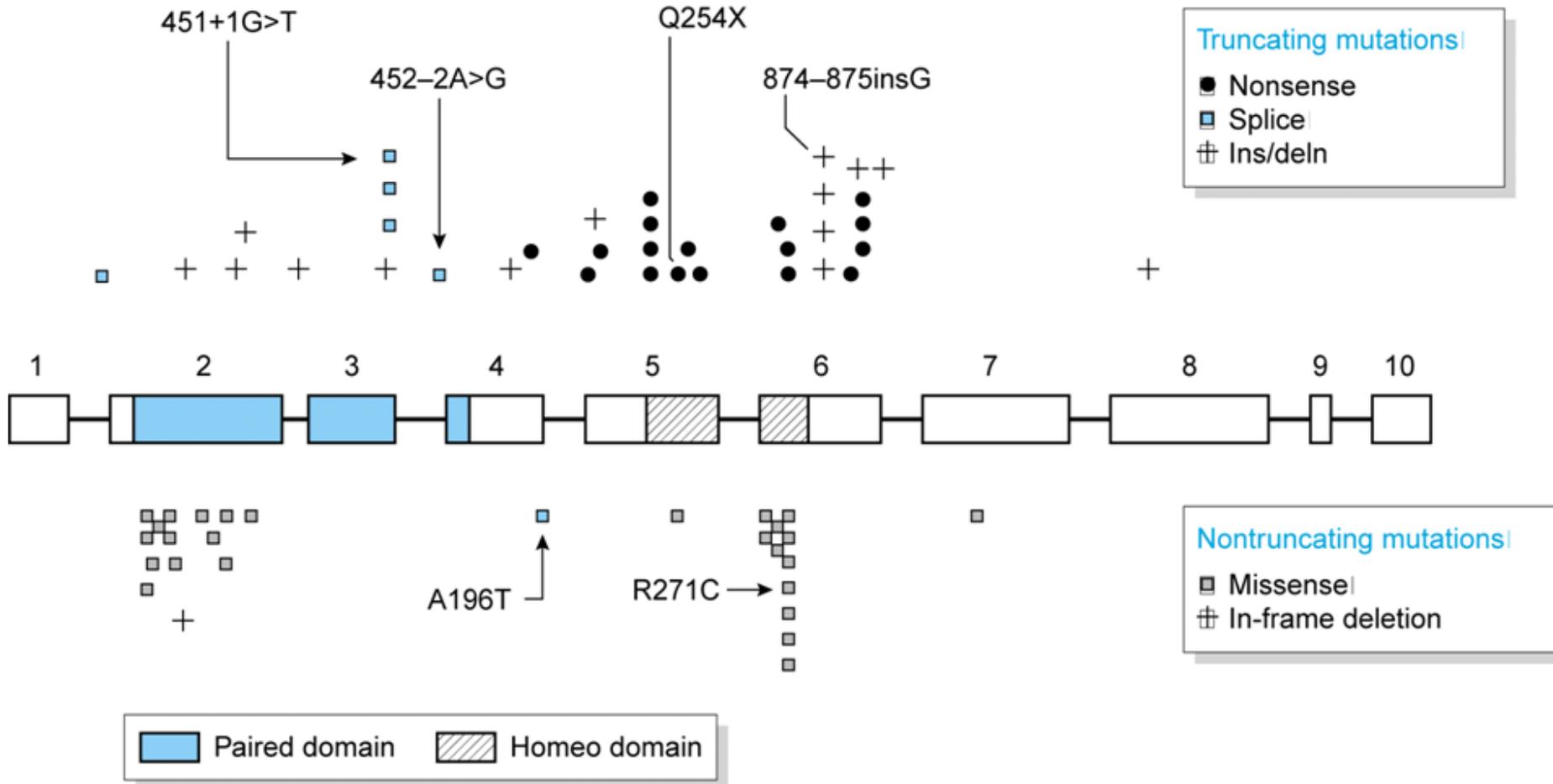


mutazioni in eterozigosi di **PAX3**  
**Waardenburg**



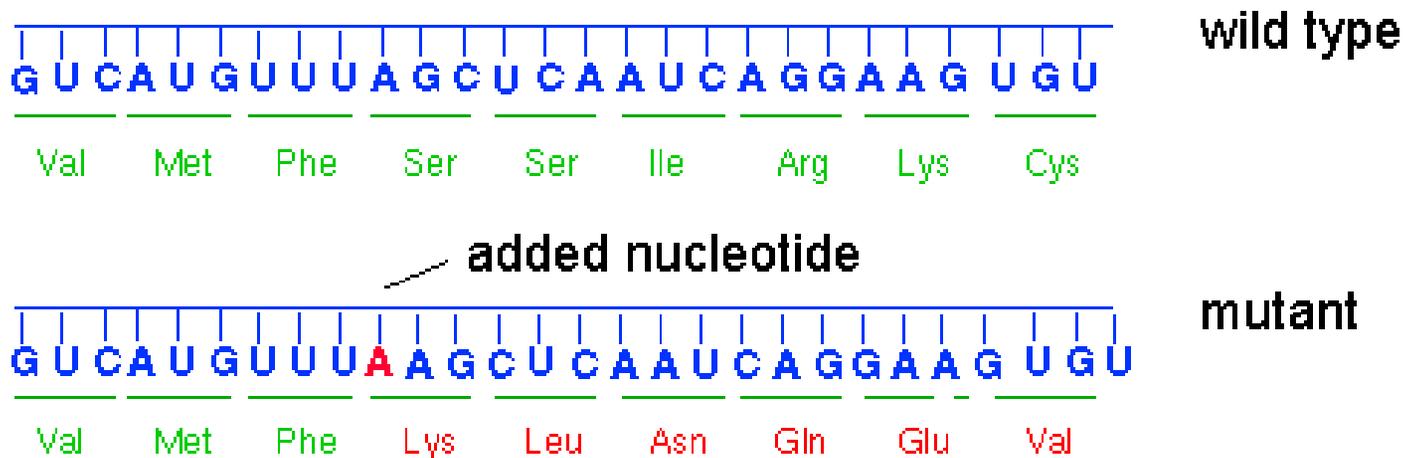
- **sordità bilaterale** (o deficit uditivo di vario livello)
- modifiche nella pigmentazione, sia dei capelli (albinismo parziale, in genere **piebaldismo**) sia della cute
- anomalie nello sviluppo dei tessuti derivati dalla cresta neurale
- lateralizzazione del canto mediale
- **eterocromia**, diverso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

# mutazioni eterozigoti di PAX3 Waardenburg

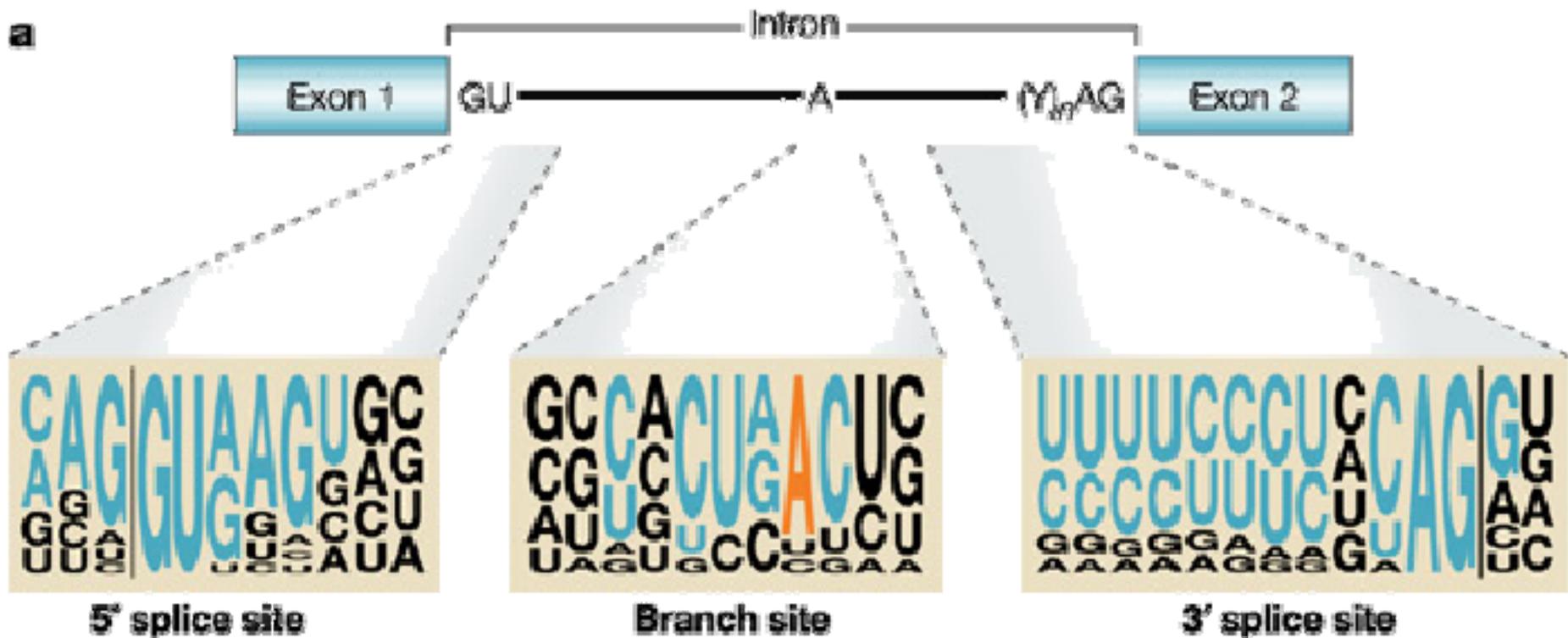


# mutazioni frame-shift

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



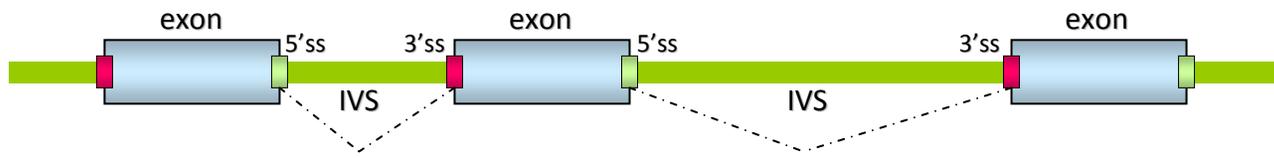
# Motivi classici di splicing



# Nucleotidi intronici fiancheggianti

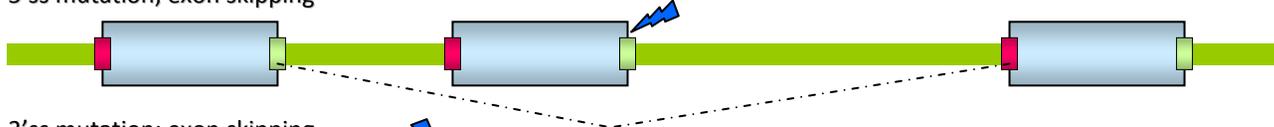
- inizio dell'introne: il numero dell'ultimo nucleotide dell'esone che precede, il segno + e la posizione nell'introne, ad esempio 77+1G, 77+2T, oppure quando il numero dell'esone è noto ed univoco IVS1+1G, IVS1+2T
- fine dell'introne: il numero del primo nucleotide del esone seguente, il segno – e la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

Normal

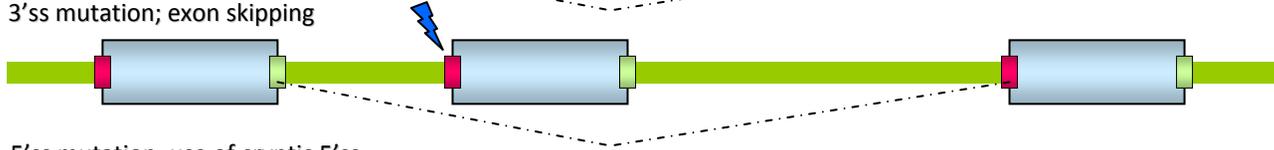


## Splicing Abnormalities

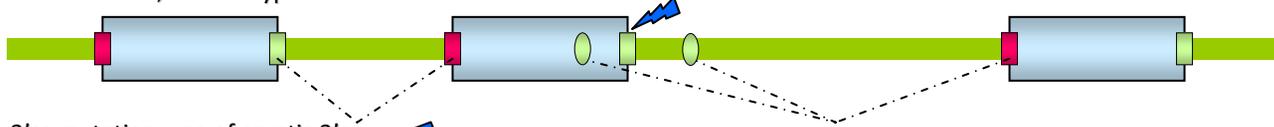
5'ss mutation; exon skipping



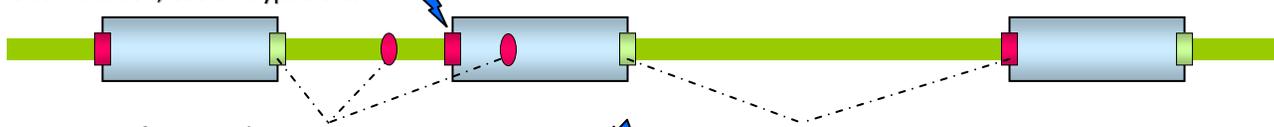
3'ss mutation; exon skipping



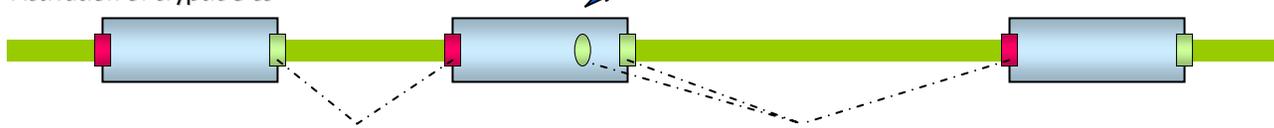
5'ss mutation; use of cryptic 5'ss



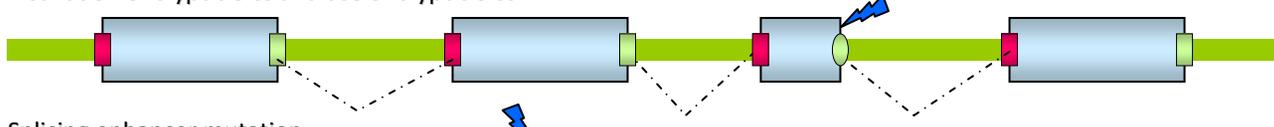
3'ss mutation; use of cryptic 3'ss



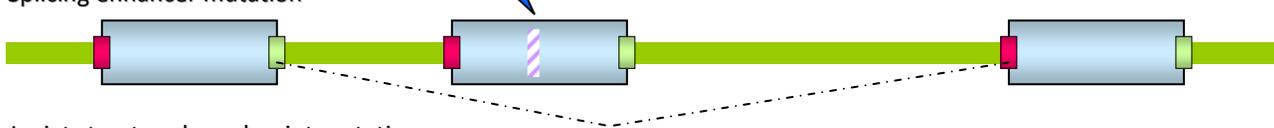
Activation of cryptic 5'ss



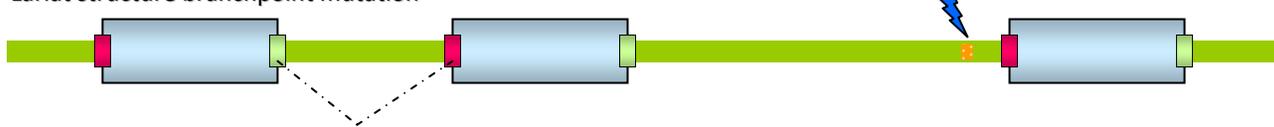
Activation of cryptic 5'ss and use of cryptic 3'ss



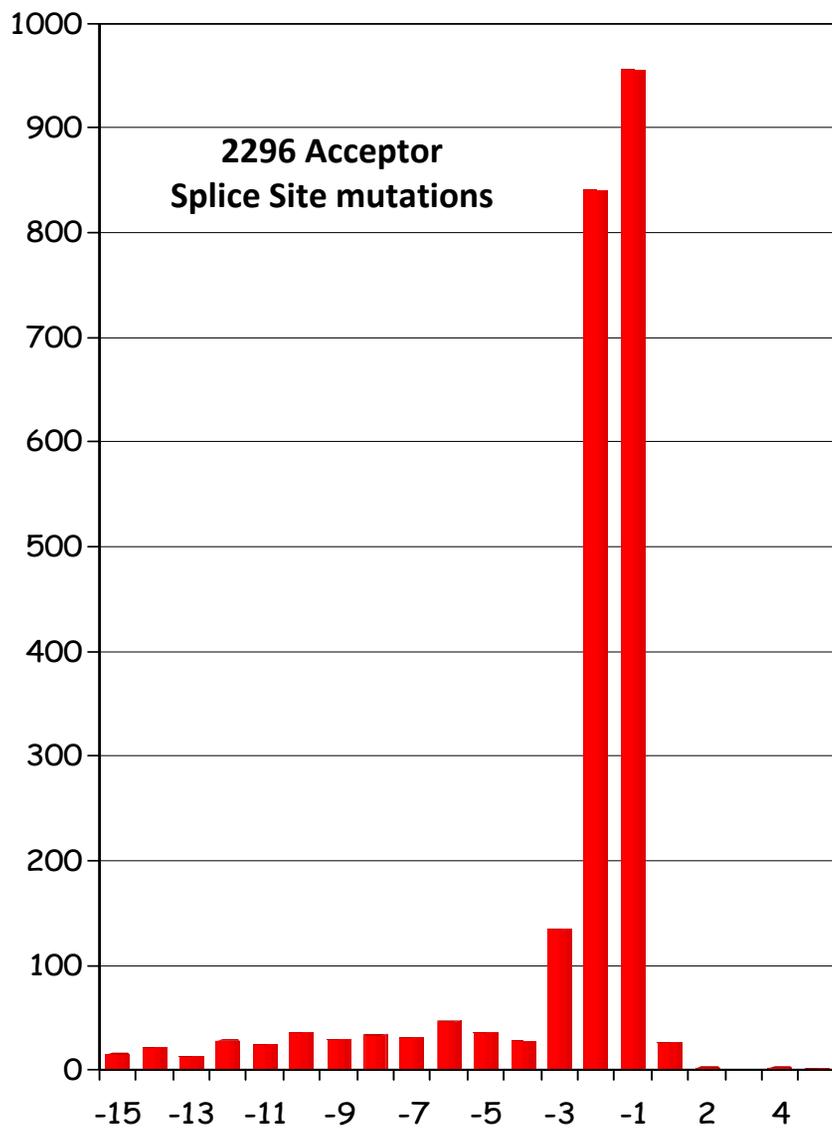
Splicing enhancer mutation



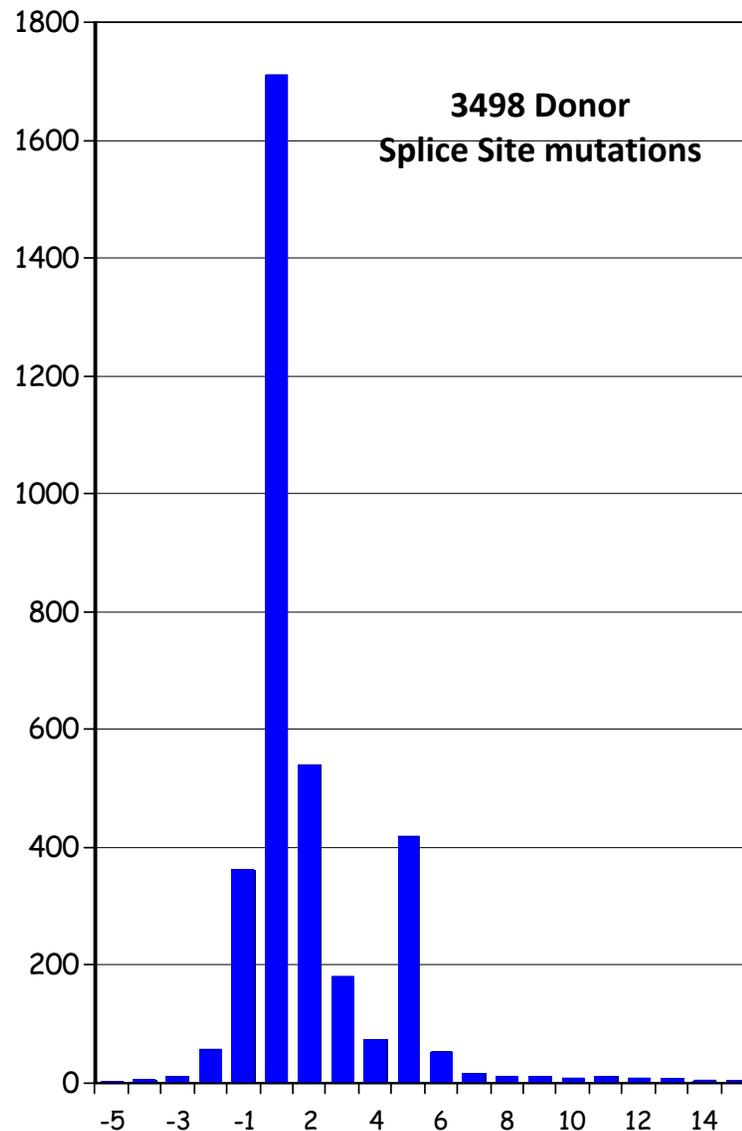
Lariat structure branchpoint mutation



# HGMD Mutations in Intron splice sites (5Jan07)



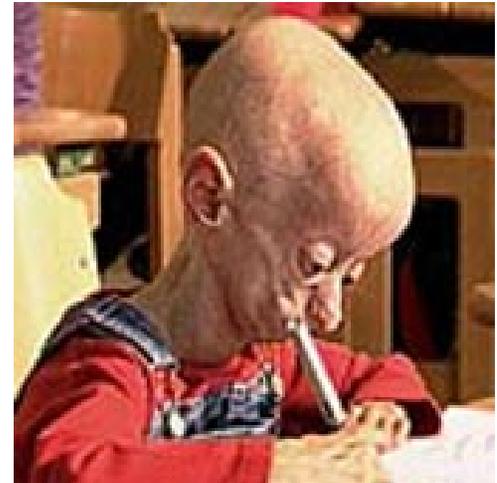
Nucleotide number in the acceptor site



Nucleotide number in the donor site

# Progeria Hutchinson-Gilford

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



# Progeria Hutchinson-Gilford

---

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

