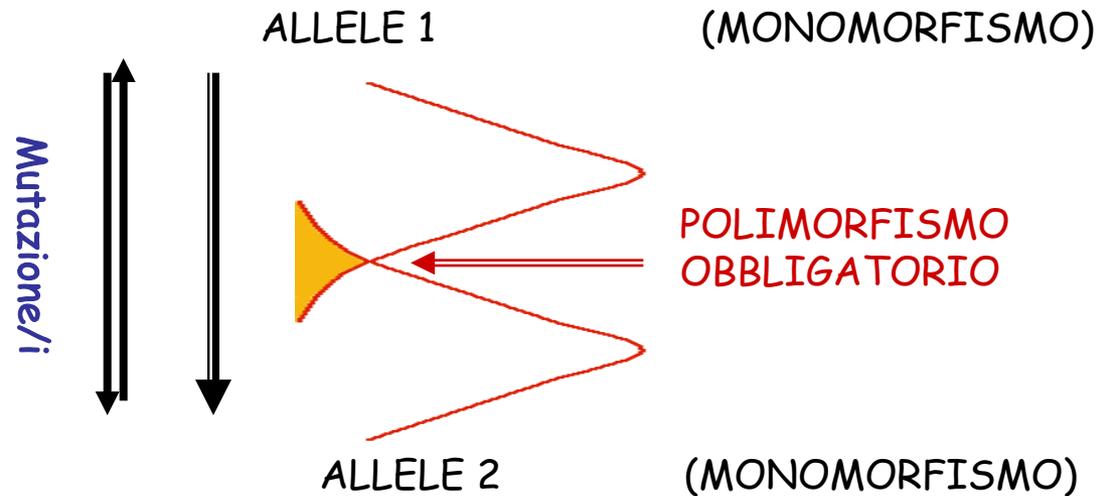


# *Mutazioni*

Basi molecolari della variabilità  
genetica

Il DNA non è un'entità statica ma è soggetto a cambiamenti (**mutazioni**) che insorgono casualmente e che, se ereditati, sono alla base del **PROCESSO EVOLUTIVO**



Un determinato locus è definito **POLIMORFICO** qualora almeno l'1%\* degli individui siano eterozigoti per quel carattere

Un locus è **POLIMORFICO** se 2 o più alleli sono mantenuti in una popolazione

Qualora la frequenza sia inferiore, si parlerà di **mutazione casuale** del locus originario.

\* frequenza sufficientemente elevata da rendere improbabile l'origine casuale

# Quali sono le conseguenze di queste variazioni?

- Variazioni della sequenza del DNA causano mutazioni nei nostri genomi
- le mutazioni sono solitamente associate a perdita di funzione tuttavia, raramente, possono portare un vantaggio selettivo.
- Variazioni della sequenza del DNA neutre, causano polimorfismo nei nostri genomi
- il numero di polimorfismi è ~1 bp/500-1000 bp
- quindi, ~6 X10<sup>6</sup> coppie di basi sono differenti in genomi di individui diversi

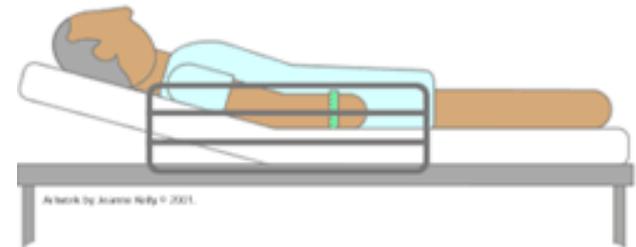
# VARIAZIONI DELLE SEQUENZE GENOMICHE:

Variazioni neutre  
polimorfismi

Variazioni svantaggiose  
mutazioni



Alterazioni fenotipiche

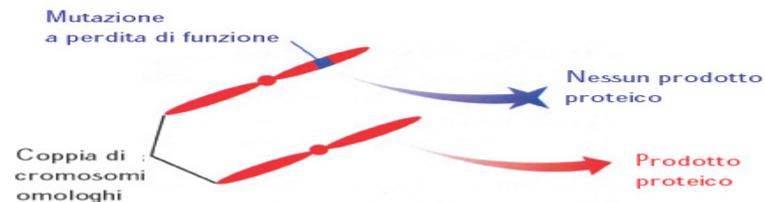


Alterazioni funzionali

# CLASSE DELLA MUTAZIONE E MODALITA' IN CUI VIENE ALTERATA L'ESPRESSIONE DEL GENE MUTANTE

Le mutazioni, se cambiano il fenotipo, vengono classificate in due categorie:

- mutazioni con perdita di funzione "loss of function"; sono per lo più recessive.



**Figura 14.14** Una mutazione a perdita di funzione ('loss of function') è di solito recessiva, perché è presente una versione funzionale del gene nell'altra copia del cromosoma.



T.A. Brown  
Genomi  
EdiSES

- mutazioni con acquisizione di funzione, "gain of function"; sono molto meno comuni. La mutazione deve essere tale da conferire un'attività anormale alla proteina. Molte sono in sequenze regolatrici.

# 1-COSA CAUSA LE MUTAZIONI?

## Mutazioni spontanee:

### Duplicazione.

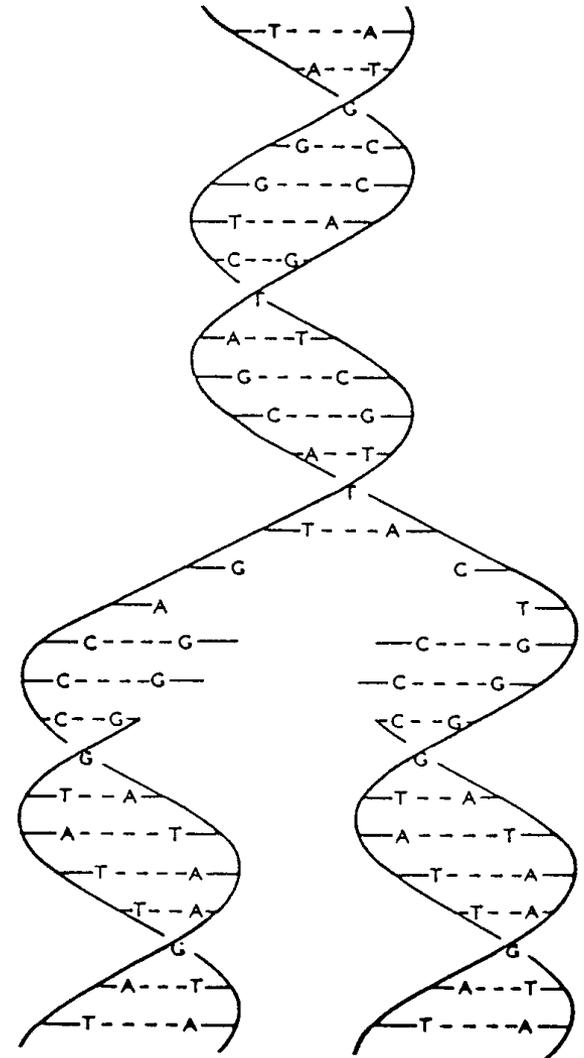
3 miliardi di coppie di basi devono essere replicate ad ogni divisione cellulare, in un periodo di 2-3 ore. Con una velocità di circa 100.000 bp/sec. Avvengono casualmente degli errori

### Ricombinazione.

Processo fondamentale per generare "diversità biologica", a causa della struttura di particolari regioni genomiche, è un'altra fonte di possibili errori.

### Segregazione.

Processo finale della mitosi e della meiosi. Avvengono casualmente degli errori che portano ad una errata ripartizione dei cromosomi nelle cellule figlie.



# 2-COSA CAUSA LE MUTAZIONI?

## Mutazioni indotte:

fattori esogeni (mutageni chimici, ionizzanti e irradiazione UV, calore)

## Radiazioni UV

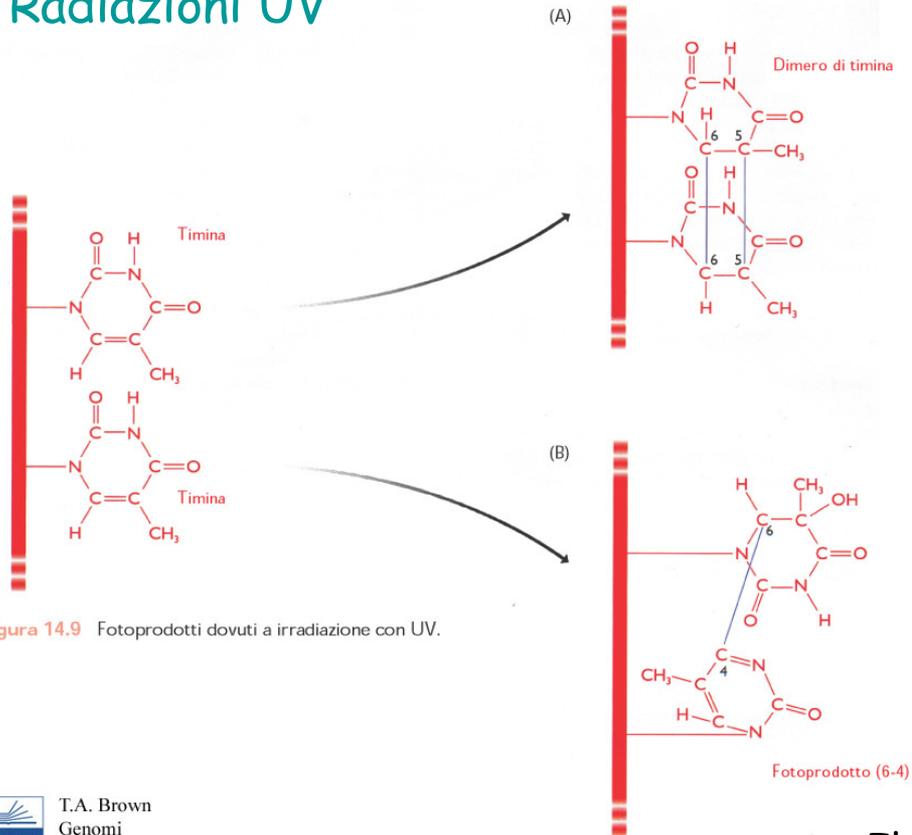
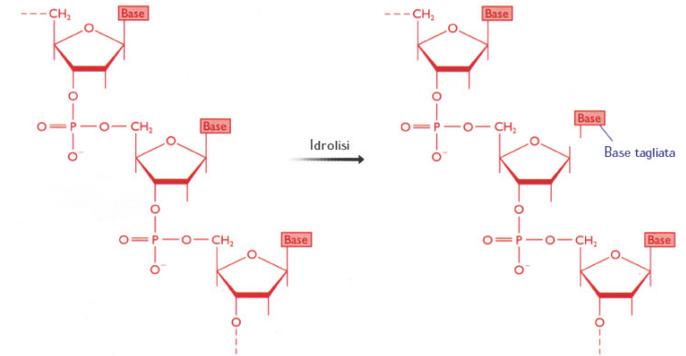


Figura 14.9 Fotoprodotti dovuti a irradiazione con UV.

## Calore

(A) Idrolisi indotta da calore di un legame β-N-glicosidico



(B) Effetto dell'idrolisi su un DNA a doppio filamento

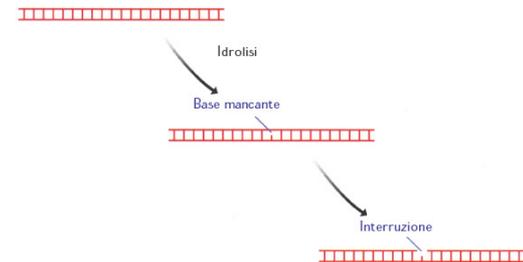


Figura 14.10 Effetto mutageno del calore.

Il calore provoca idrolisi dei legami β-N-glicosidici, creando un sito senza base. Lo zucchero-fosfato rimanenti vengono facilmente persi lasciando così un "buco".

Il risultato è generalmente una delezione.

# TIPI DI MUTAZIONI E STIMA DELLE FREQUENZE

TIPO

MECCANISMO

FREQUENZA

ESEMPIO

Genomiche  
N° cromosomi

Errori di segregazione

$10^{-2}$ /div. cell.

Aneuploidia

Cromosomiche  
Struttura cromosomi

Errori di ricombinazione

$6 \times 10^{-4}$ /div. cell.

Duplicazioni/Delezioni

Geniche  
Poche basi

Errori della duplicazione

$10^{-10}$ /bp/div. cell.  
 $10^{-5-6}$ /locus/gen.

Mut. puntiformi

# DISTRIBUZIONE GENOMICA DELLE MUTAZIONI

Le mutazioni non sono distribuite casualmente ed uniformemente nel genoma.

L'incidenza delle mutazioni nei diversi loci dipende da diversi fattori:

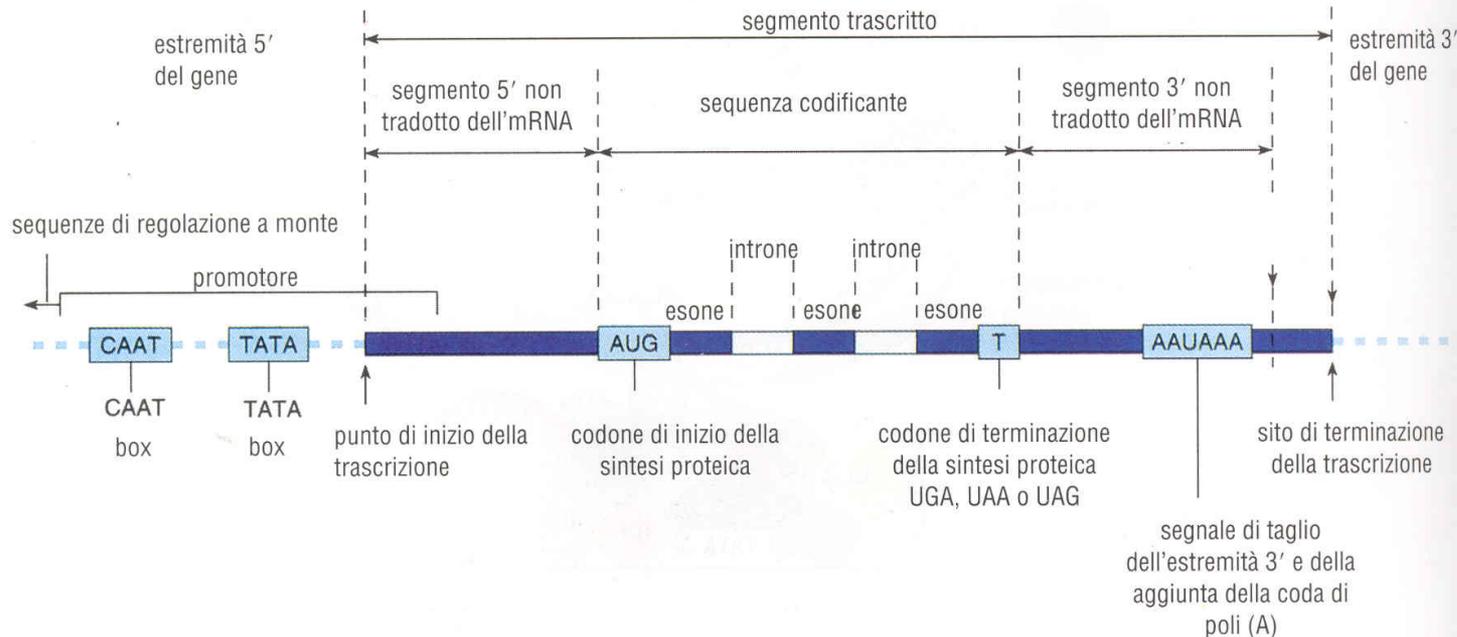
- dimensione del locus considerato
- capacità codificante o meno
- caratteristiche specifiche di sequenza.



**ZONE CALDE DI VARIABILITA'**  
(HOT SPOTS MUTAZIONALI)

# All'interno di uno stesso gene le mutazioni patogene possono verificarsi in posizioni diverse, determinando anche fenotipi diversi.

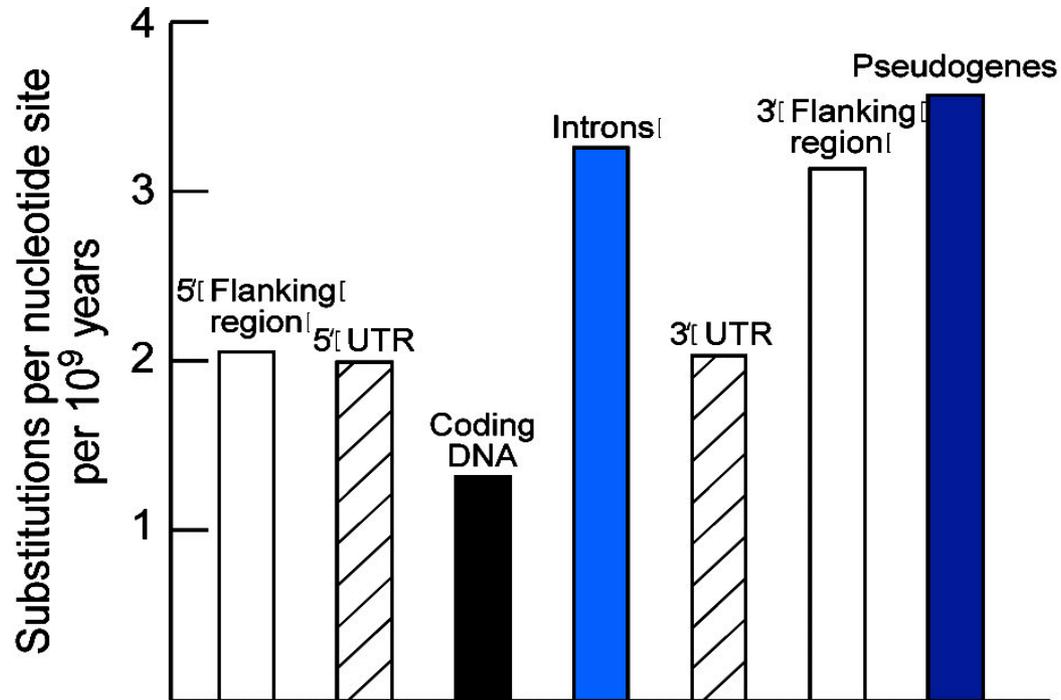
- Nella sequenza codificante (sostituzioni di basi, frame-shift)
- Nelle sequenze non codificanti intrageniche
- Nelle sequenze di regolazione esterne ai geni



**FIGURA 6.15**

L'organizzazione degli elementi che costituiscono i geni codificanti per gli mRNA negli eucarioti (vedi

# Il tasso di mutazione varia in regioni geniche diverse



Il "tasso di mutazione" tiene conto sia dell'evento mutazionale che della pressione selettiva

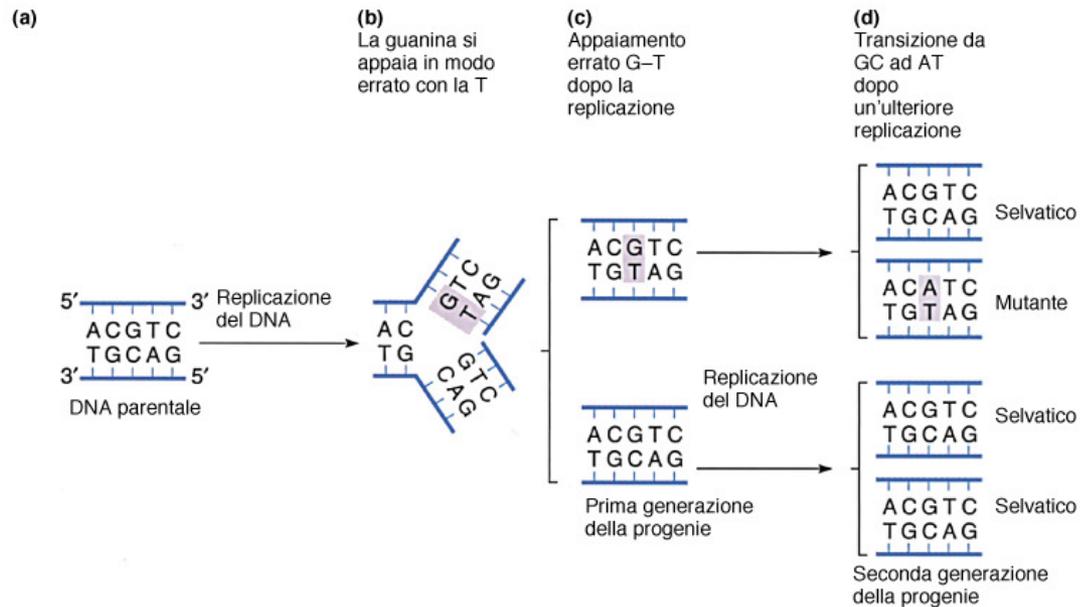
# BASI MOLECOLARI DELLE MUTAZIONI SPONTANEE:

## 1-Sostituzioni di basi

Sono dovute ad errori, che intervengono nei meccanismi di replicazione e di riparazione del DNA

**Figura 19.7**

**Produzione di una mutazione causata da appaiamento errato.** I dettagli sono spiegati nel testo.



• **Deaminazioni e depurinazioni:** Alcuni danni al DNA si originano in soluzione acquosa a causa di reazioni spontanee di idrolisi:

base deaminata

Citosina

Adenina

Guanina

base formata

Uracile

Ipoxantina

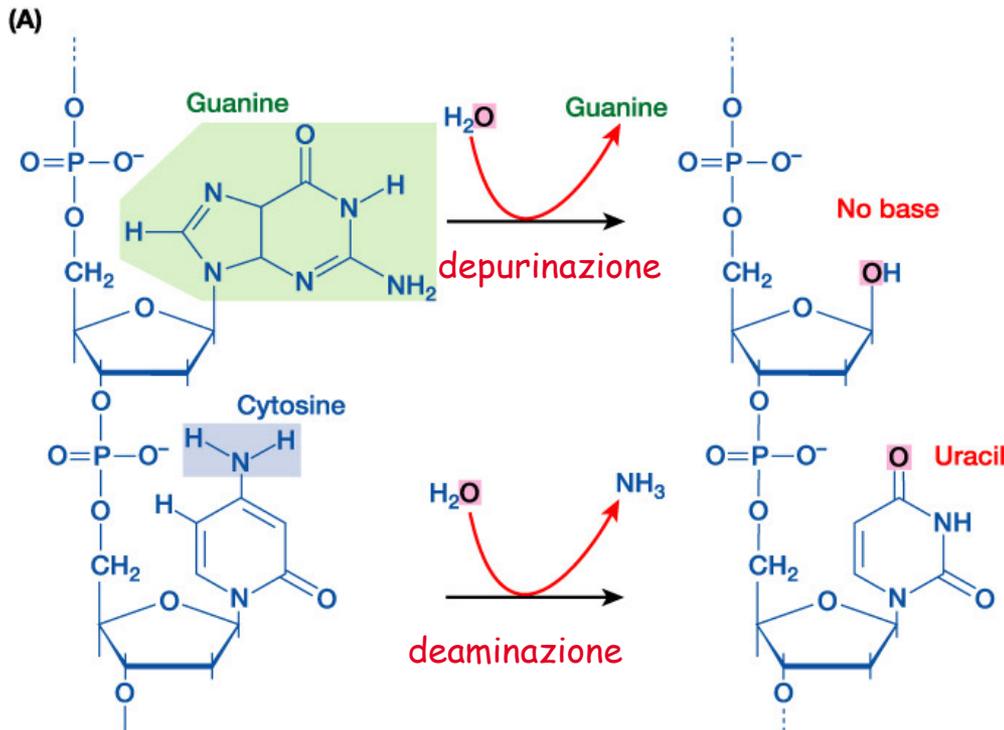
Xantina

sostituzione di coppia di basi

C-G --> (U-A) T-A

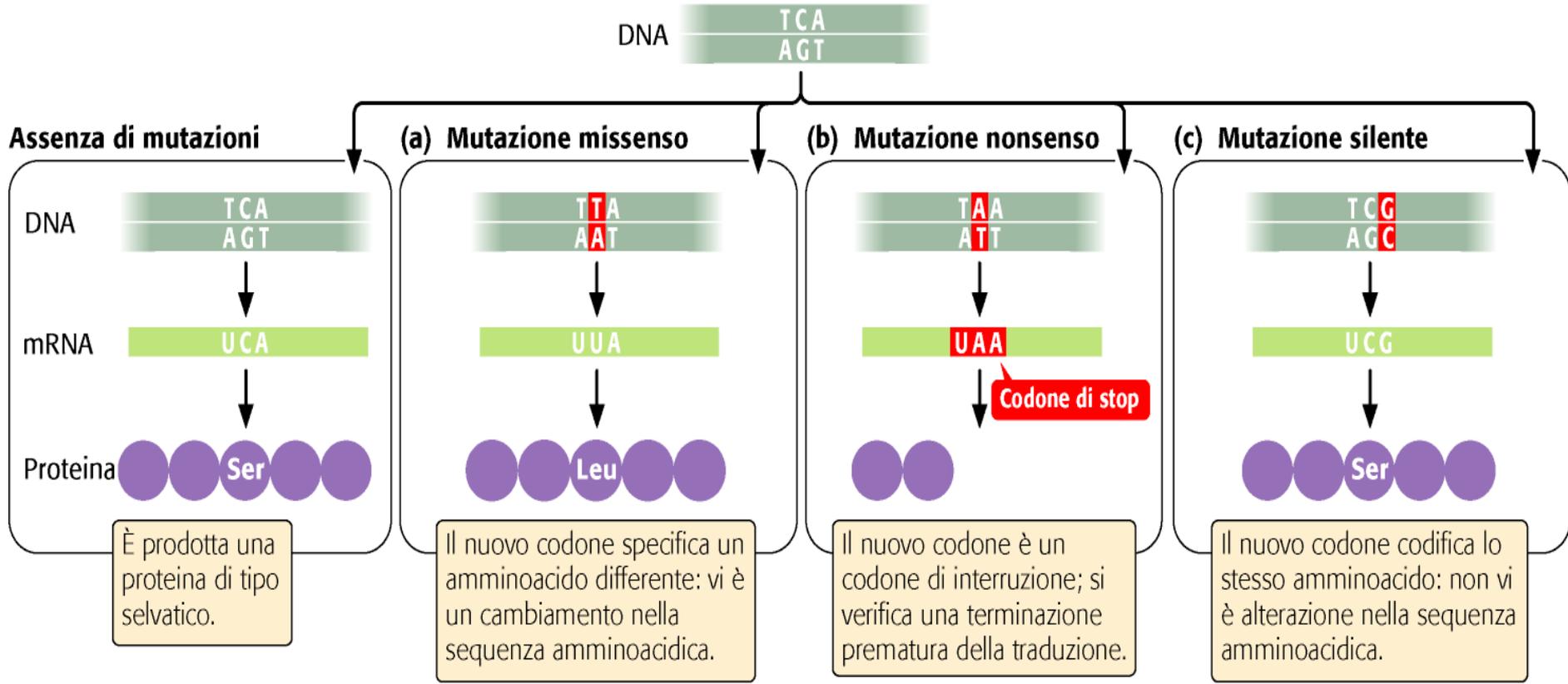
A-T --> (I-C) G-C

G-C --> (X-C) G-C



Ogni giorno circa 5000 adenine o guanine sono perse da ciascuna cellula nucleata umana per rottura spontanea del legame base-zucchero

Ogni giorno circa 100 citosine sono deaminate spontaneamente, in ciascuna cellula nucleata umana, producendo uracile



DNA  
TCA  
AGT

**Assenza di mutazioni**

**(a) Mutazione missenso**

**(b) Mutazione nonsense**

**(c) Mutazione silente**

DNA  
TCA  
AGT

mRNA  
UCA

Proteina  
Ser

È prodotta una proteina di tipo selvatico.

DNA  
TTA  
AAT

mRNA  
UUA

Proteina  
Leu

Il nuovo codone specifica un amminoacido differente: vi è un cambiamento nella sequenza amminoacidica.

DNA  
TAA  
ATT

mRNA  
UAA

Proteina  
Codone di stop

Il nuovo codone è un codone di interruzione; si verifica una terminazione prematura della traduzione.

DNA  
TCG  
AGC

mRNA  
UCG

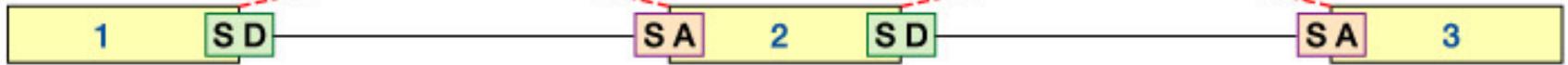
Proteina  
Ser

Il nuovo codone codifica lo stesso amminoacido: non vi è alterazione nella sequenza amminoacidica.

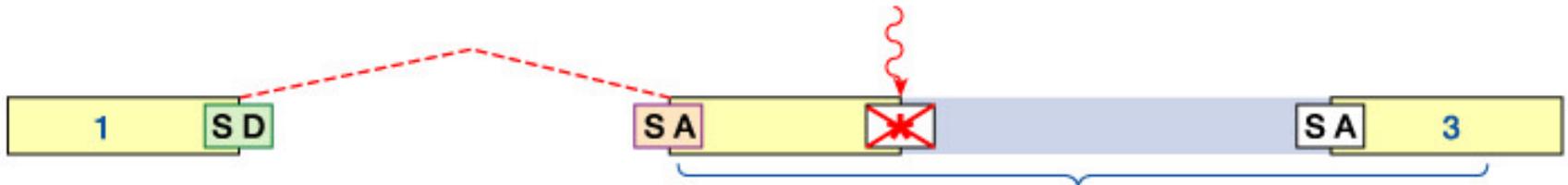
(A)

# Mutazioni nel sito di splicing

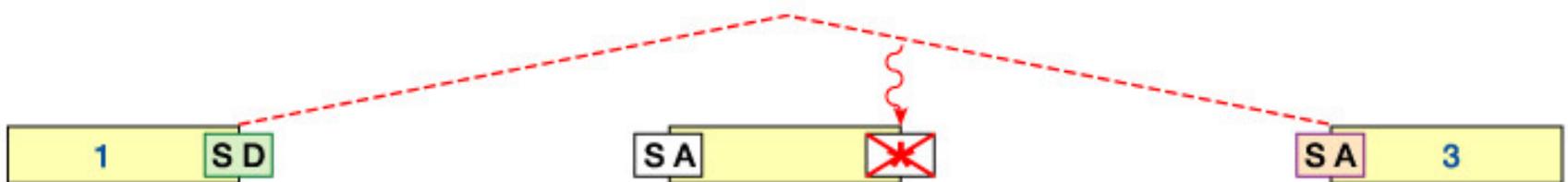
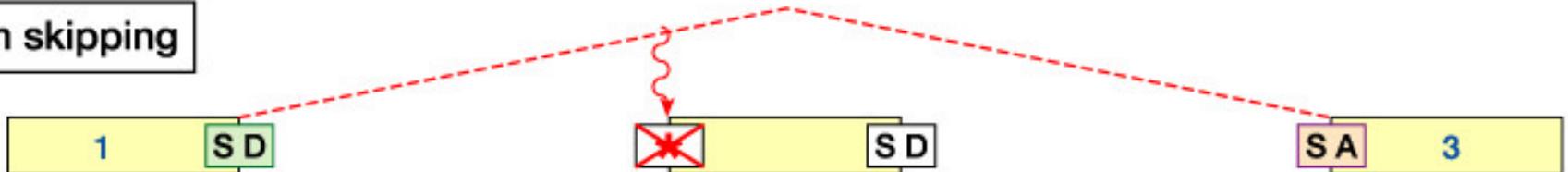
Normal splicing



Intron retention



Exon skipping

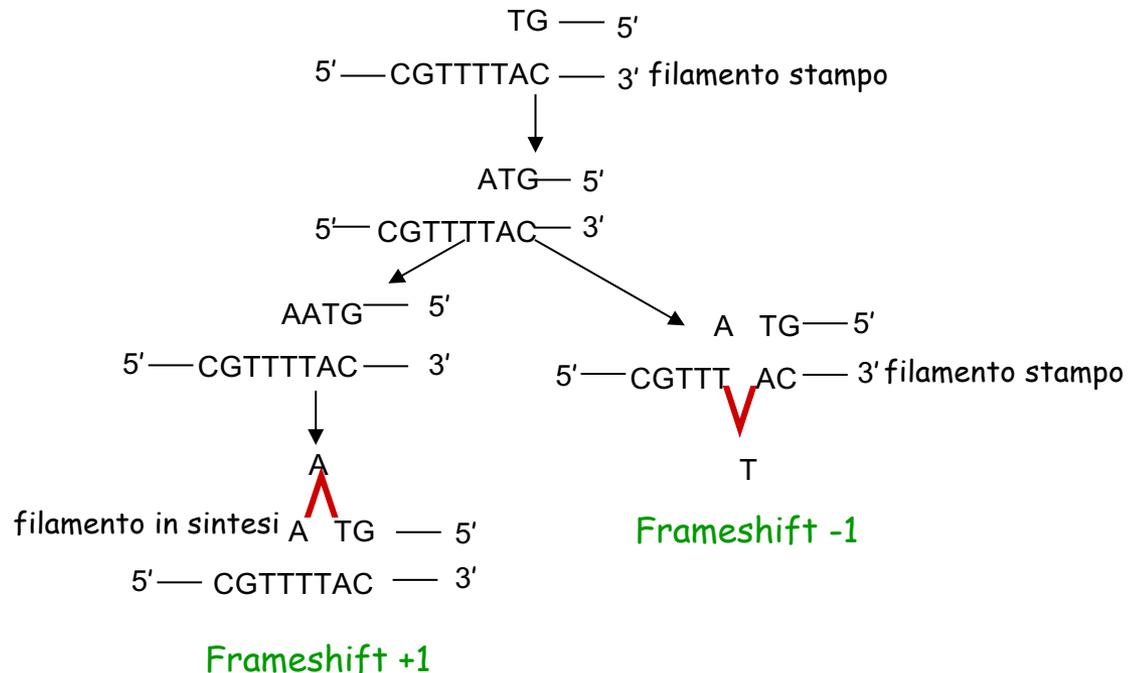


# BASI MOLECOLARI DELLE MUTAZIONI SPONTANEE:

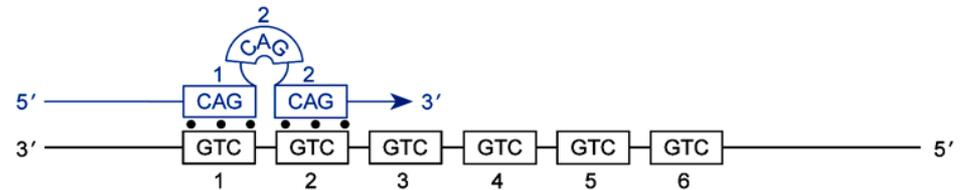
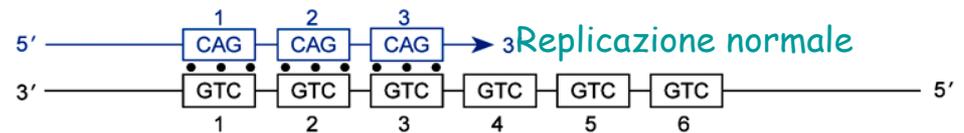
## 2-Inserzione/delezione di poche basi

Il fenomeno dello slittamento della forza replicativa è spesso la causa di brevi inserzioni/delezioni

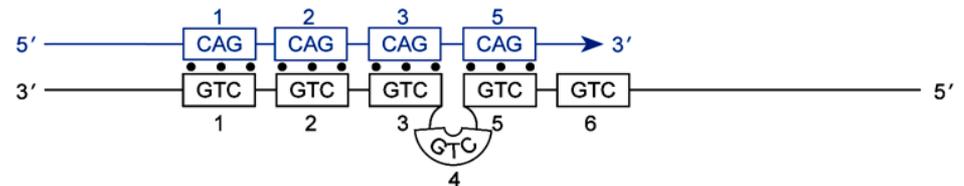
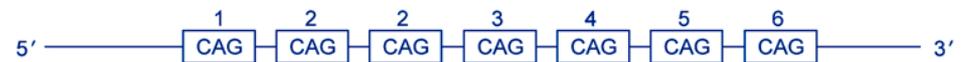
Ripetizioni più o meno estese di una base o di brevi motivi, possono causare piccole inserzioni o delezioni, per il fenomeno detto di slittamento della forza replicativa.



# Corte sequenze ripetute in tandem sono hot spot mutazionali



Slittamento indietro



Slittamento avanti



In questo caso si possono verificare inserzioni/delezioni per appaiamento errato causato da scivolamento di un filamento

# Mutazioni dinamiche e patologia

Malattia	localizzazione della sequenza	ripetizione
<i>espansioni modeste in regioni codificanti: seq. normali ca 4-40 ripetizioni, geni mutati ca 20-100 ripetizioni</i>		
•Huntington's disease	codificante	(CAG) <sub>n</sub>
•Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)	codificante	(CAG) <sub>n</sub>
•Machado-Joseph's disease	codificante	(CAG) <sub>n</sub>
•Kennedy's disease (SBMA)	codificante	(CAG) <sub>n</sub>
•Dentatorubral-pallidoluysian	codificante	(CAG) <sub>n</sub>
<i>espansioni molto estese in regioni non codificanti: seq. normali 2-55 ripetizioni, geni mutati ca 50-4000 ripetizioni</i>		
•Fragile XA syndrome	5' UTR	(CGG) <sub>n</sub>
•Myotonic dystrophy	3' UTR	(CTG) <sub>n</sub>

# Brevi inserzioni o delezioni, trovate in alcuni geni malattia

## GENE

CFTR  
TYR  
HEXA

CFTR  
CFTR  
APC  
 $\beta$  HB  
HPRT

$\alpha$ 1 AT  
 $\beta$  HB  
 $\beta$  HB

## MALATTIA

### brevi ripetizioni:

fibrosi cistica  
albinismo  
morbo di Tay-Sachs

### sequenze rip. dirette:

fibrosi cistica  
fibrosi cistica  
poliposi familiare del colon  
 $\beta$  talassemia  
deficienza di HPRT

### palindromi:

deficienza di  $\alpha$ 1 antitripsina  
 $\beta$  talassemia  
 $\beta$  talassemia

## SEQUENZA

GGATATATATatTCAAGA  
GAACCCCCcAAGGCTCC  
CGTATATCtatcCTTAGG

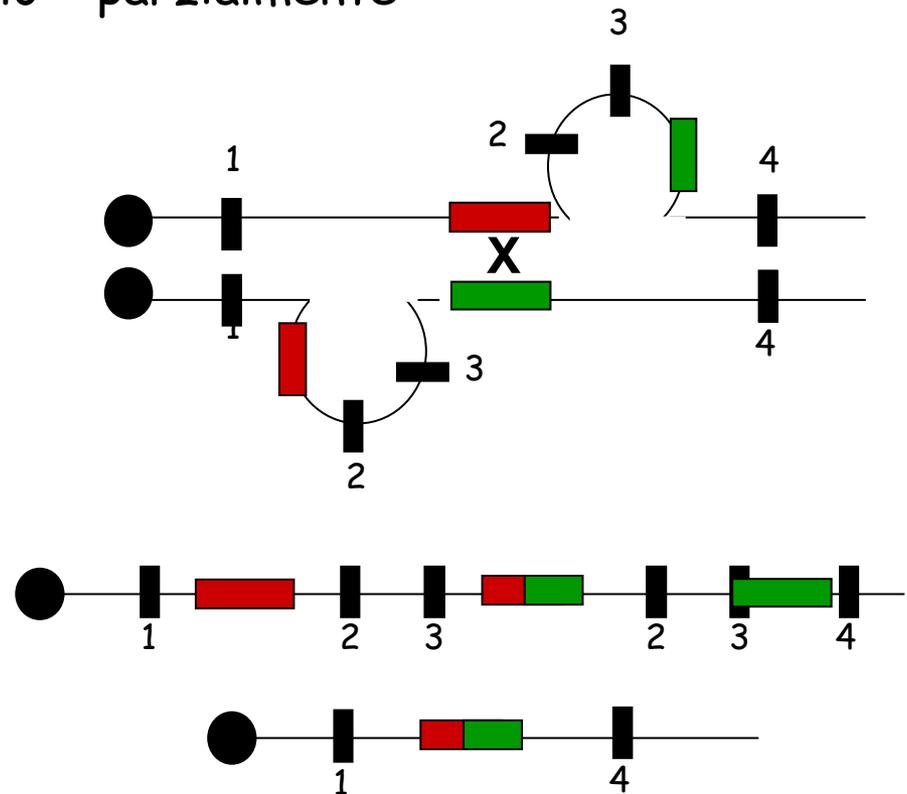
ATCTcttTGGTGTTTCC  
AATATtaGATACAGAAG  
AATAGatagTCTTCCTT  
ggcaaccctaagGTGAAGGCT  
GAAGTgttGGATATAA

GCTGACctTCCGGGGTC  
CCCAGAGGTTctttgagtcCTTTGGGG  
TAGTGATggcctgGCTCACCT

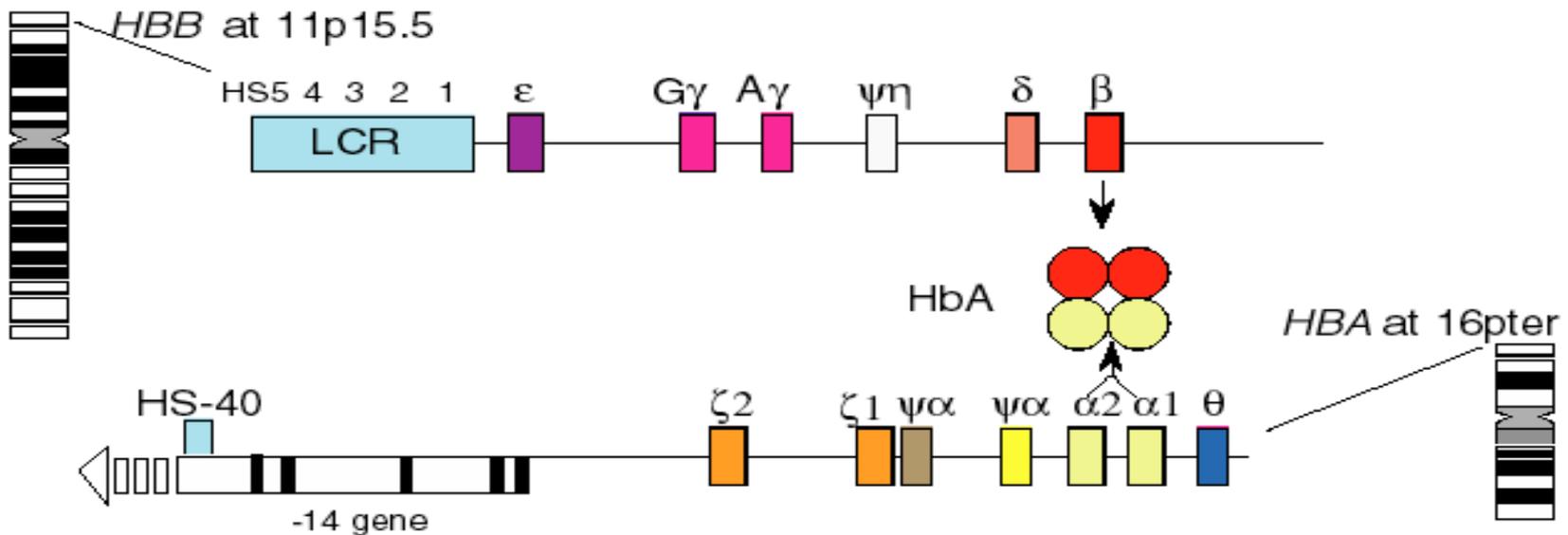
# BASI MOLECOLARI DELLE MUTAZIONI SPONTANEE:

## 3-Inserzione/delezione di grandi regioni

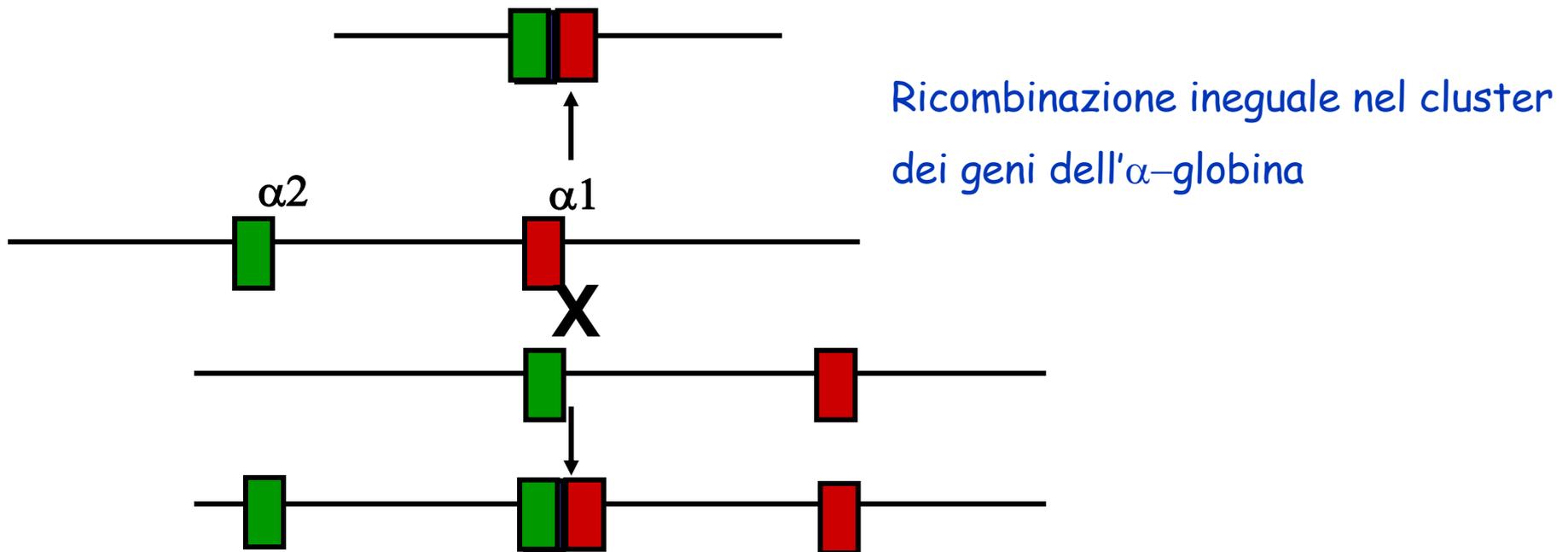
Inserzioni/delezioni estese sono causate da ricombinazione omologa ineguale (sequenze omologhe non alleliche) o ricombinazione non omologa (sequenze non omologhe o solo parzialmente omologhe, intersperse nel genoma).



Le regioni genomiche dove sono presenti sequenze omologhe o parzialmente omologhe, non alleliche (famiglie geniche, sequenze ripetute), sono da ritenersi hot-spots mutazionali.

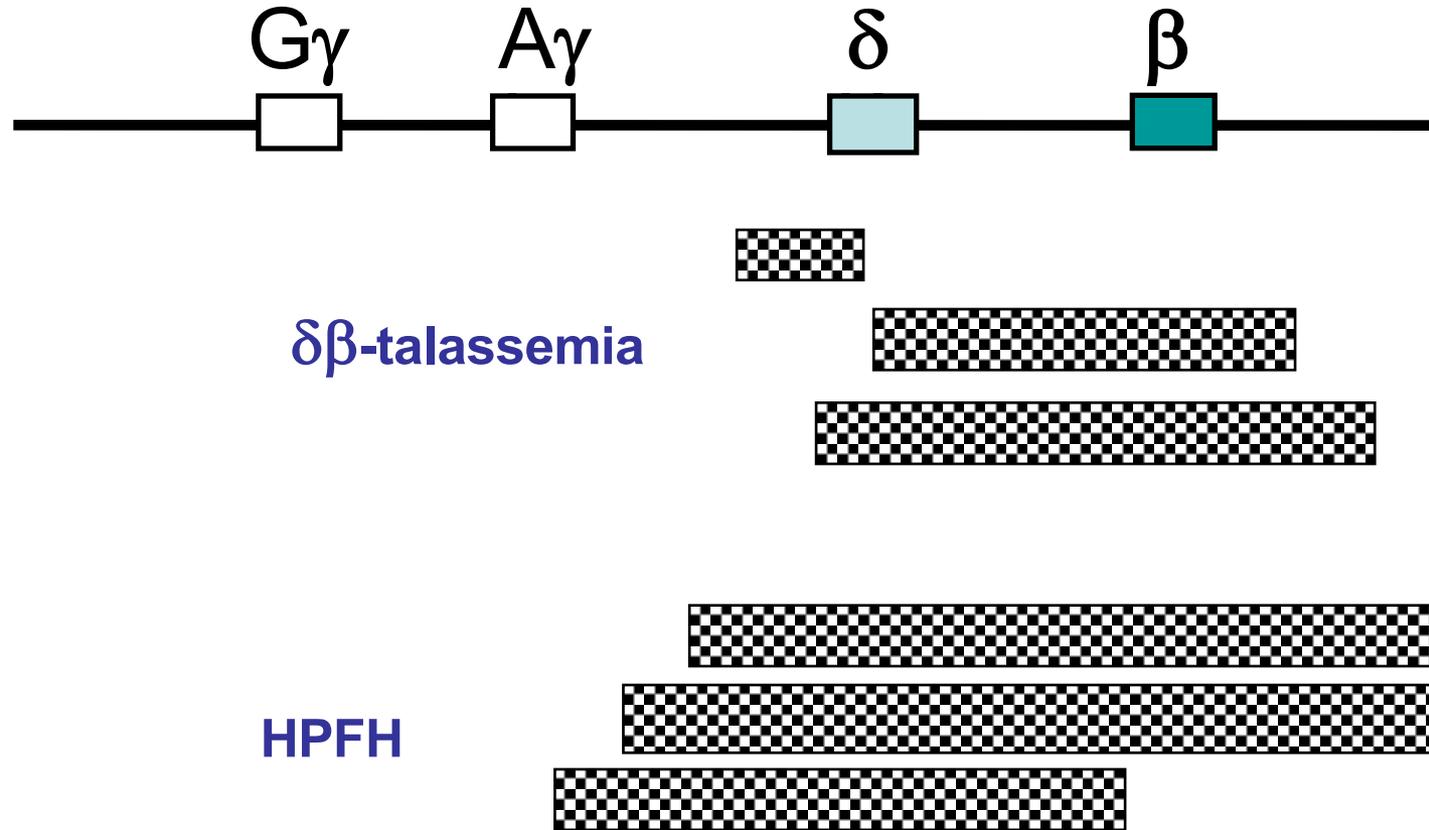


# Crossing over ineguale e $\alpha$ -talassemia



- I due geni dell' $\alpha$ -globina derivano da un meccanismo di duplicazione genica: i due geni sono identici;
- un crossing over ineguale origina la perdita di uno dei due geni;
- la trasmissione del cromosoma deieto origina un individuo affetto da  $\alpha$ -talassemia

# Grandi delezioni

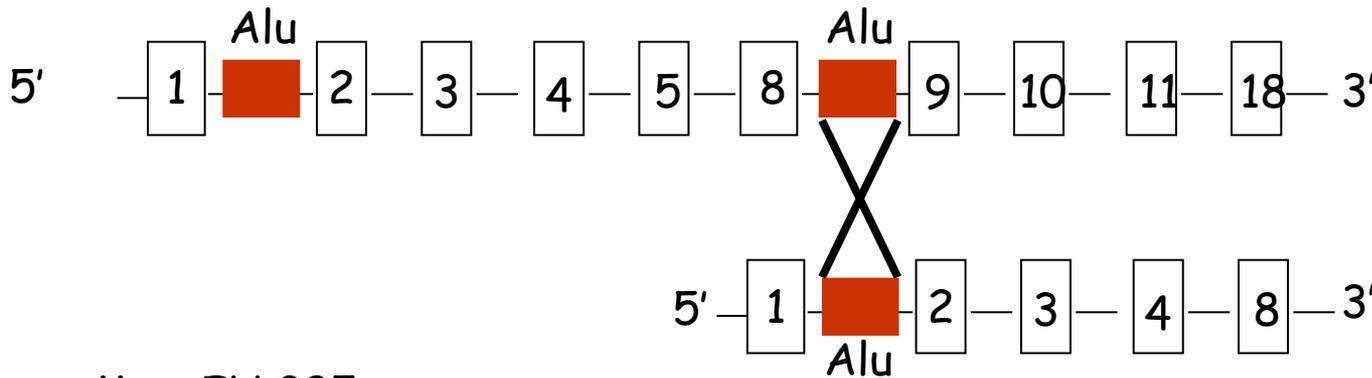


(esempi di grandi delezioni con fenotipo limitato)

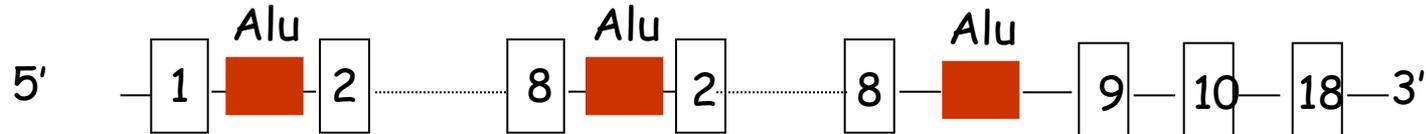
- $\delta\beta$ -talassemia - compensazione per sintesi della catena  $\gamma$
- HPFH - completamente compensata dalla sintesi della catena  $\gamma$

Sequenze ripetute intersperse, quali le sequenze Alu e le sequenze LINE, presenti anche nelle regioni introniche dei geni sono da ritenersi hot-spots mutazionali.

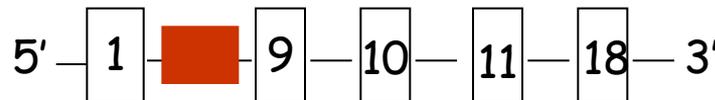
Gene LDLR



Mut. FH 295

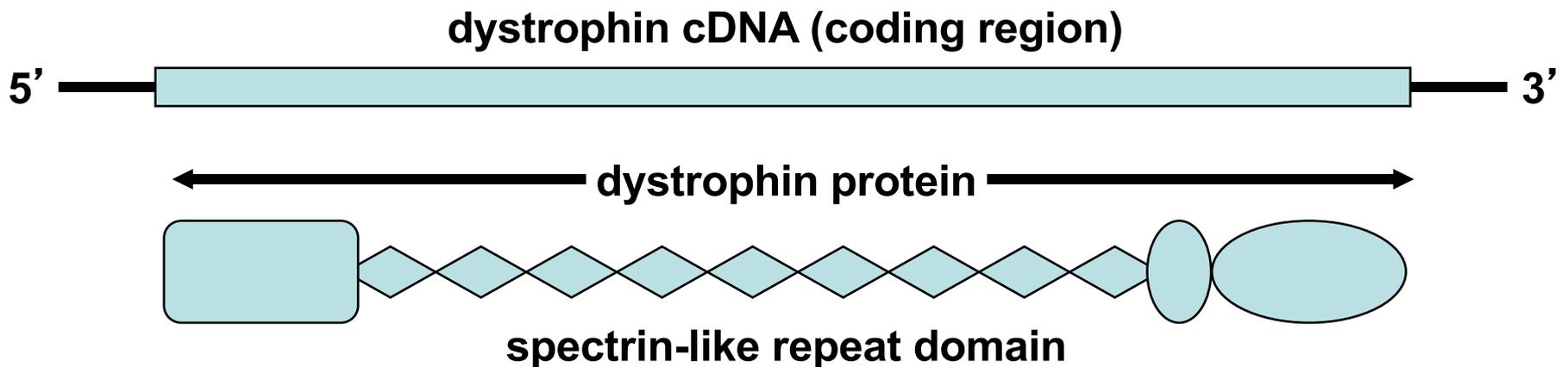


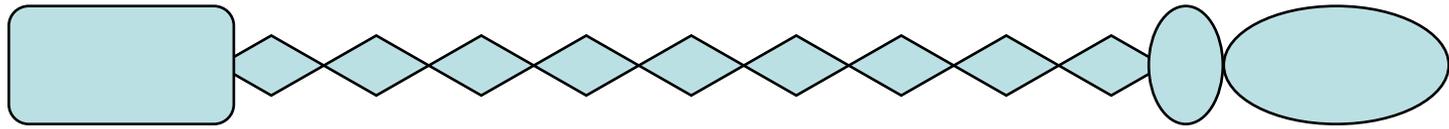
+ Mut. FH?



# Mutazioni nel gene della distrofina

- Distrofia Muscolare di Becker e Duchenne
  - BMD is a less-severe disease (patients are still walking after 16 yrs)
  - DMD is a more-severe disease (patients are not walking at 12 yrs)
- both can be caused by massive deletions in the dystrophin gene (as well as other types of mutations)
- **the severity is not necessarily correlated with the size of the deletion**

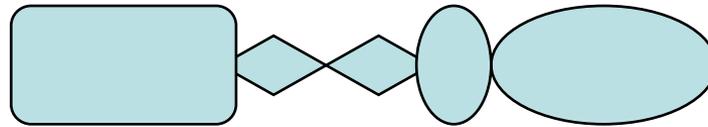




mutations causing BMD can be very large **in-frame** deletions



truncated but functional protein with intact N- and C-termini

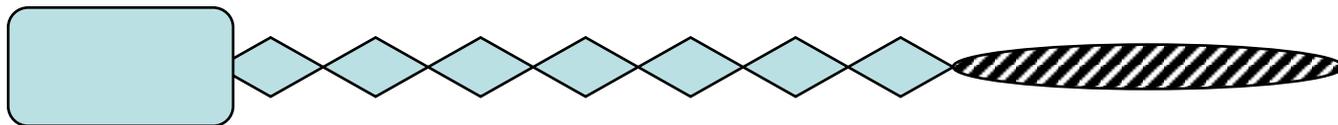


partially functional dystrophin protein

mutations causing DMD can be small out-of-frame deletions

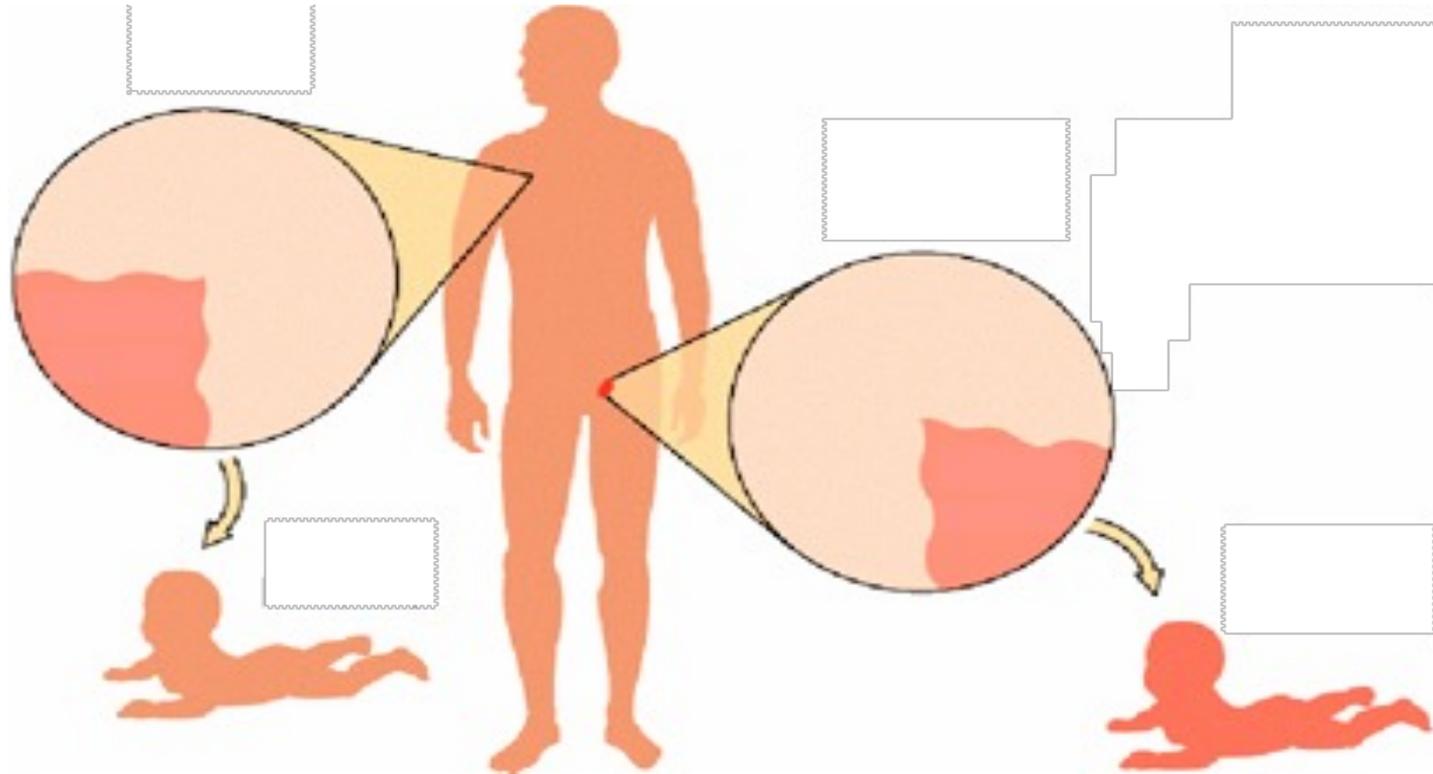


C-terminal truncated protein (with **out-of-frame** translation product)



non-functional dystrophin protein

# LA PATOGENICITA' DI UNA VARIAZIONE E' INFLUENZATA DAL TIPO DI CELLULE IN CUI L'ALLELE MUTANTE E' ESPRESSO



Una mutazione non letale nella linea germinale può essere trasmessa alla progenie. Una mutazione nelle cellule somatiche potrà avere conseguenze solo per l'individuo portatore.

# Determinanti dell'espressione fenotipica

- Natura della mutazione

mutazioni differenti, a carico dello stesso gene possono portare a fenotipi più o meno severi a seconda degli effetti delle diverse mutazioni sull'espressione del gene o sulla funzione del prodotto proteico (es. Emofilia B Di Leyden o di Brandenburg)

- Background genetico

- due individui anche di una stessa famiglia (che non siano gemelli identici) pur avendo la stessa mutazione nello stesso gene, potranno esprimere fenotipi malattia diversi, a causa del diverso "background" genetico.

**DIVERSA PENETRANZA E VARIABILITA' DI ESPRESSIONE**

- Influenza ambientale

- fattori quali lo stile di vita, la dieta, e l'esposizione a sostanze tossiche possono influenzare il fenotipo della malattia (gemelli identici con stessa mutazione possono avere fenotipi diversi).

# IDENTIFICAZIONE ED ANALISI DI MUTAZIONI GENETICHE

# IDENTIFICAZIONE ED ANALISI DI MUTAZIONI GENETICHE

-**Diagnosi diretta** su DNA del probando per evidenziare la presenza di mutazione

-**Diagnosi indiretta** mediante l'uso di marcatori genetici associati alla malattia, per valutare con quale probabilità il probando possa avere ereditato, da un genitore eterozigote, il locus malattia (mappa genetica)

## **Materiale di partenza:**

Sangue periferico

Cellule del cavo orale

Villi coriali ed amniociti

Capelli, sperma

Biopsie e campioni patologici conservati

# Cariotipo umano

1970 Introduzione delle tecniche di bandeggio: diventa possibile individuare i singoli cromosomi



Braccio corto = p (petit)

Braccio lungo = q (queue)

Le bande vengono numerate con numeri progressivi dal centromero verso i telomeri

Le bande prossimali sono quelle più vicine al centromero, quelle distali sono quelle verso i telomeri

Una singola banda è composta da 5-10 Mb

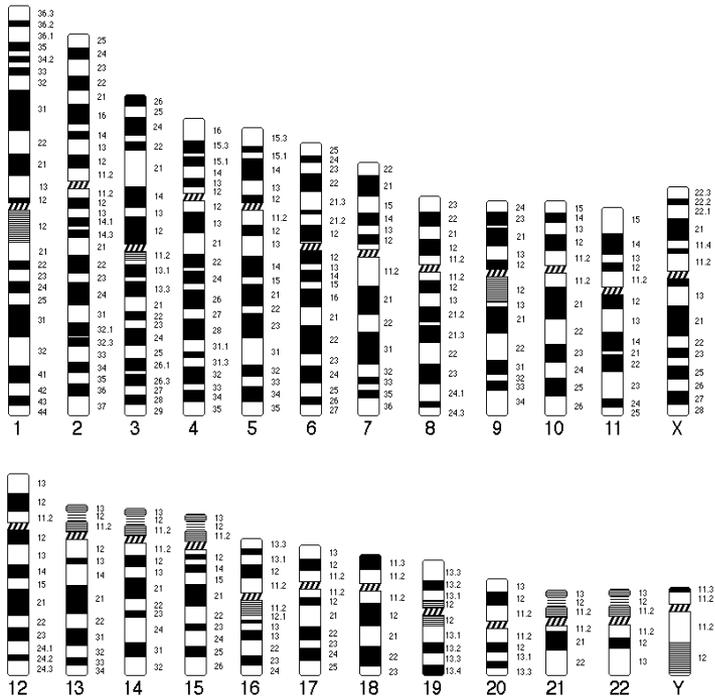
ISCN, International System for human Cytogenetic Nomenclature)

Il **CARIOTIPO** → numero e morfologia di tutti i cromosomi presenti nel nucleo della cellula di un determinato organismo. Nell'uomo il cariotipo standard è 46, XX per le femmine e 46, XY per i maschi

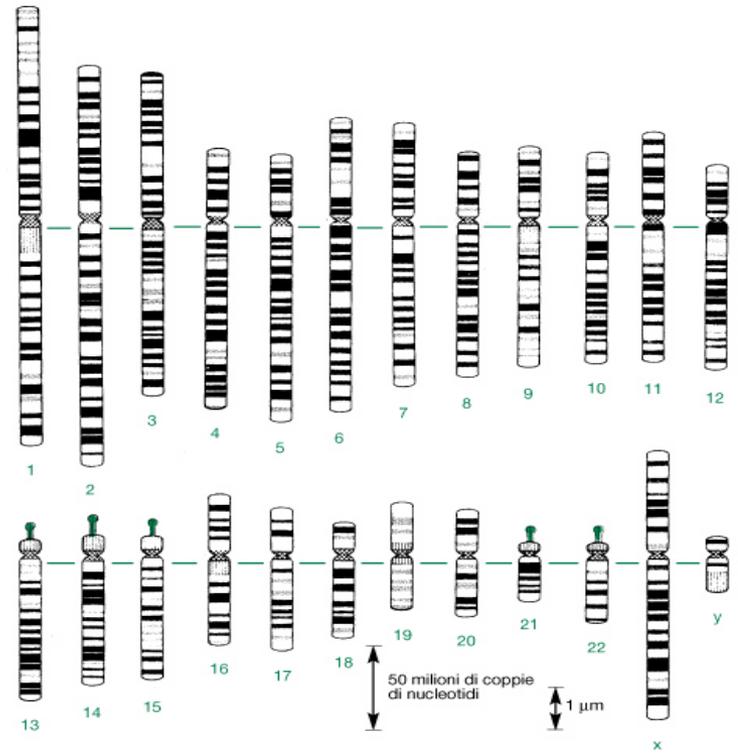
**CARIOGRAMMA** → rappresentazione 'ordinata' del completo assetto cromosomico mitotico di un individuo, mostrato come coppie di cromosomi omologhi

A ciascun cromosoma della 'piastra cromosomica' dell'individuo studiato viene appaiato il suo omologo e ciascuna coppia di omologhi viene disposta in ordine decrescente, per dimensioni e posizione del centromero

**IDIOGRAMMA** → rappresentazione 'ideale' e schematica del cariotipo standard di una determinata specie riferito a tutte le sue caratteristiche morfologiche e al pattern di bandeggio (generalmente bande G)



(a)



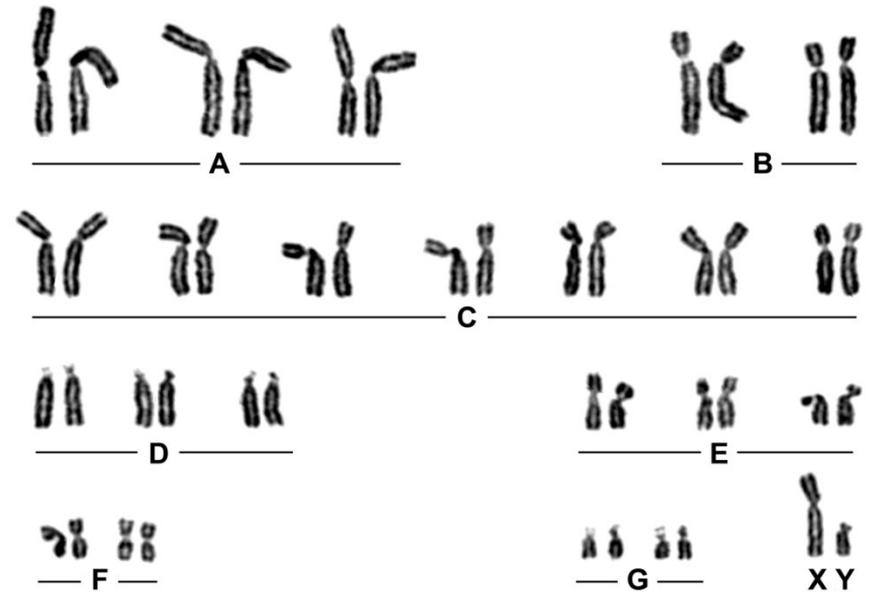
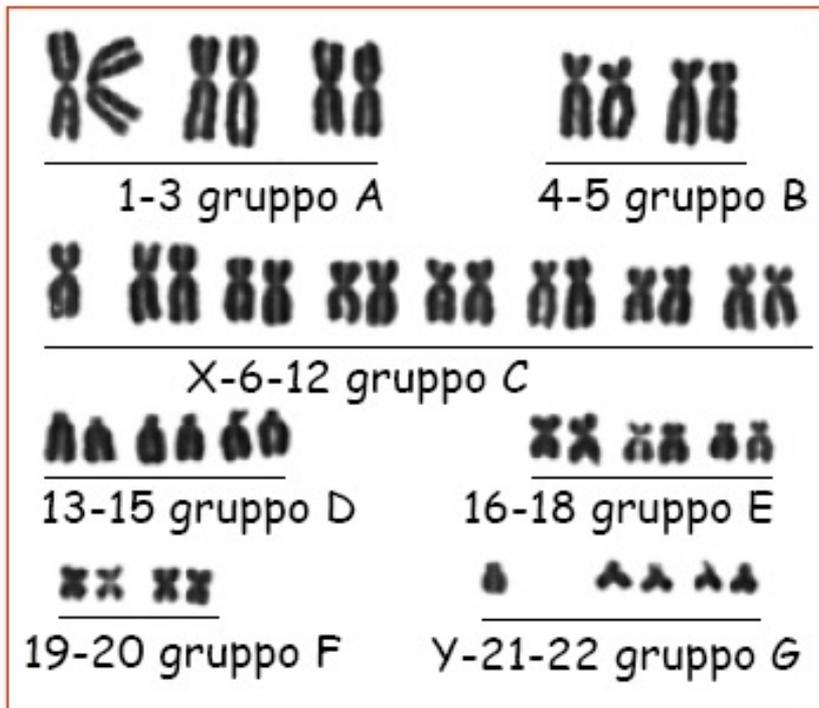
(b)

Ideogrammi del cariotipo umano in (a) metafase e (b) prometafase (in 'alta risoluzione')

**Bandeggio** → consente di identificare i singoli cromosomi e di individuare eventuali anomalie strutturali (delezioni, duplicazioni, inversioni di regioni estese o traslocazioni)

Esistono diverse tecniche di bandeggio che si differenziano per il tipo di trattamento e di coloranti utilizzati. I coloranti si legano in maniera specifica a zone ricche in A/T o in G/C o a regioni costituite da eterocromatina

Prima tecnica di bandeggio utilizzata → **bandeggio Q**  
(mostarda di quinacrina, sostanza fluorescente)



## CARIOGRAMMI DI INDIVIDUI DI SESSO MASCHILE

**i cromosomi umani sono oggi indagati di routine con tecniche di colorazione differenziale che mettono in evidenza lungo l'asse verticale della struttura cromosomica l'alternarsi di zone colorate e zone non-colorate (bande scure e bande chiare)**

**tecniche di bandeggio universalmente adottate:**

**bande GTG ( bande **G** ottenute dopo trattamento con **T**ripsina e colorate con **G**iemsa) (visione in luce normale)**

**bande QFQ ( bande **Q** ottenute dopo colorazione con mostarda di **Q**uinacrina e osservate in **F**luorescenza)**

bande scure (brillanti) positive alla colorazione:

- coloranti che si legano preferenzialmente a regioni ricche in AT (Giemsa e quinacrina)
- si condensano precocemente ma replicano tardi
- contengono pochi geni
- ricche in LINE, povere in Alu

bande chiare (scure) negative alla colorazione:

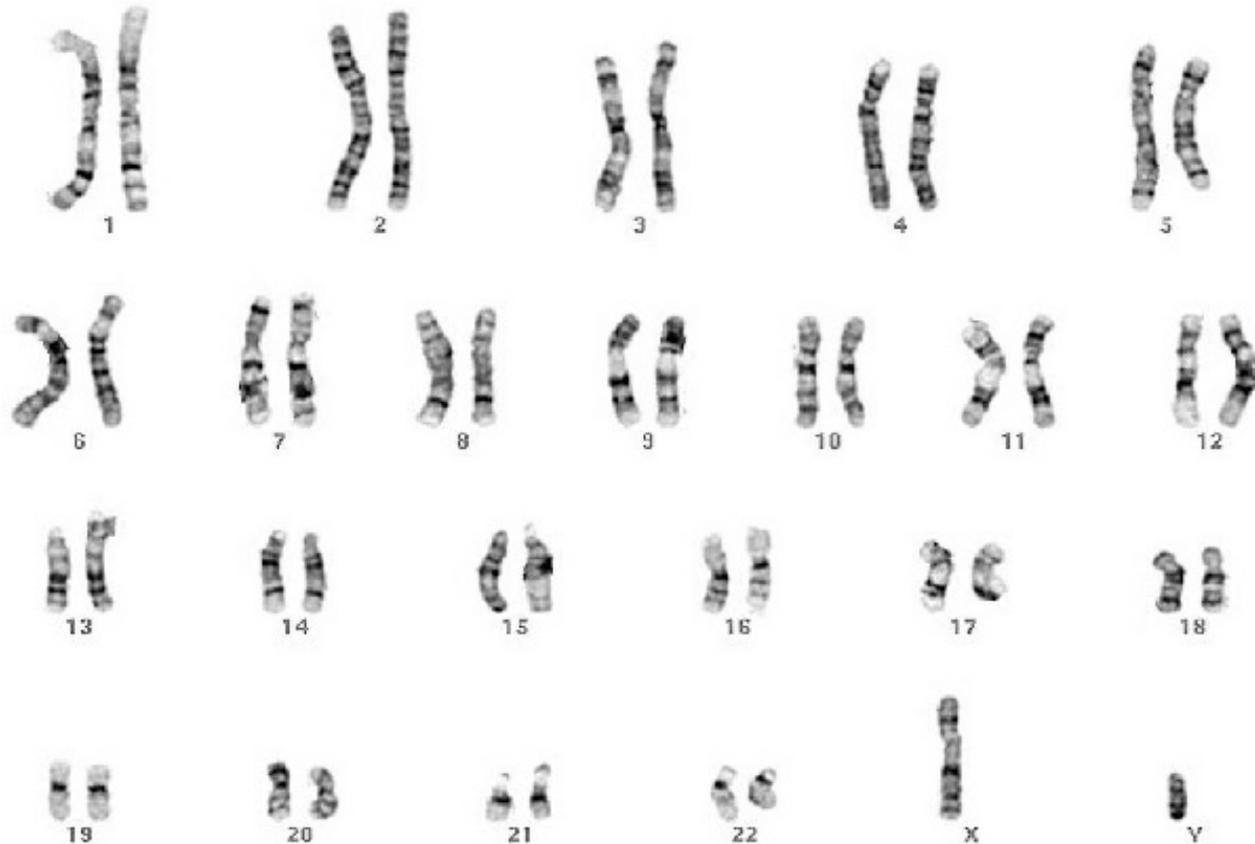
- ricche in GC
- si condensano tardi ma replicano precocemente
- ricche in geni
- povere in LINE, ricche in Alu

# BANDEGGIO G (GTG: G-banding by Trypsin using Giemsa)

Visione in luce diretta

Cromosomi sono trattati prima con un enzima proteolitico (tripsina) e poi colorati con Giemsa.

Pattern di bande scure e chiare sovrapponibile al bandeggio Q (come negativo delle bande Q)



CARIOTIPO AD ALTA RISOLUZIONE

# BANDEGGIO Q

(QFQ: Q-banding by Fluorescence using Quinacrine)

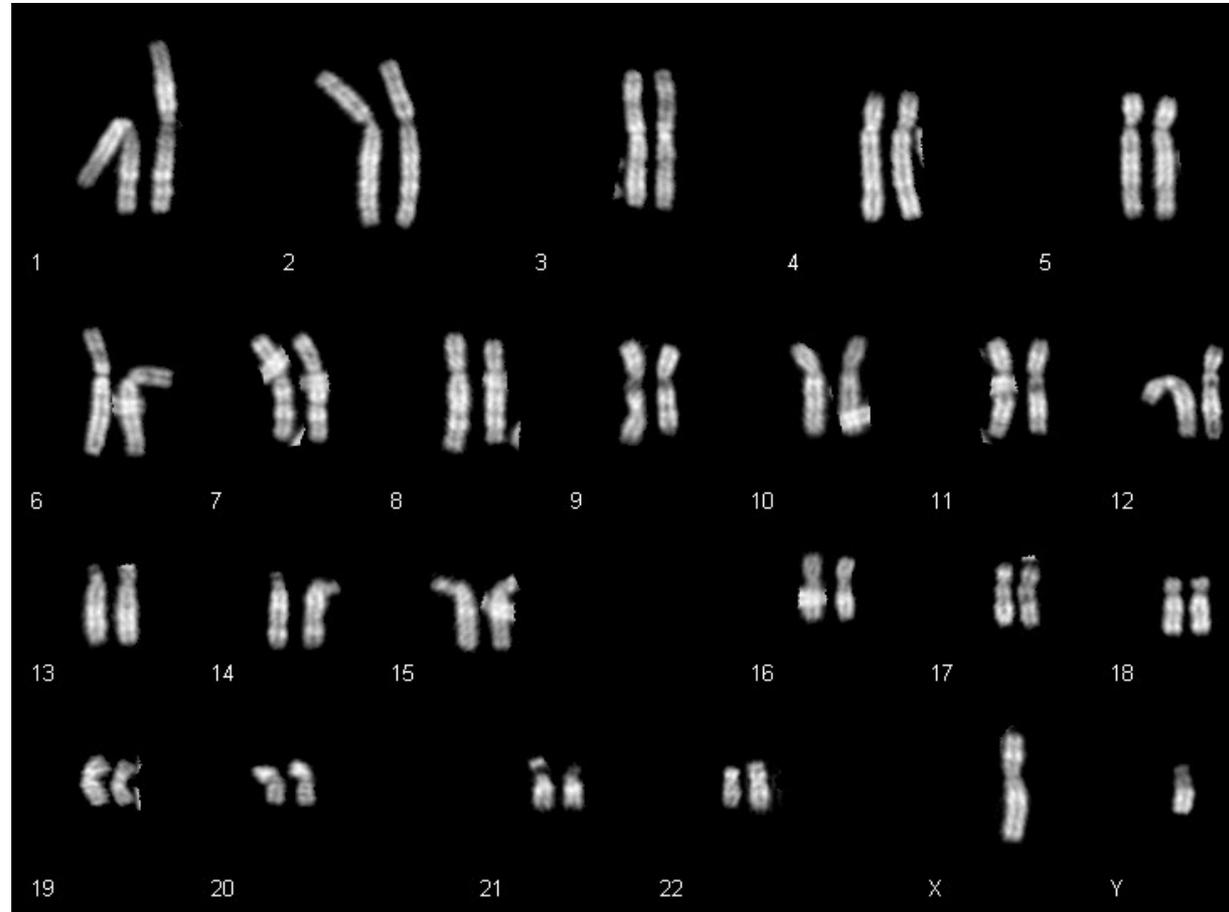
Visione in fluorescenza

Colorante: mostarda di quinacrina (intercalante delle basi azotate)

Crea pattern di bande fluorescenti (chiare) e non (scure).

Fluorescenti: ricche in AT (meno ricche di geni e a replicazione tardiva).

Non: ricche in GC.



CARIOTIPO STANDARD

## riassumendo

- Bandeggio Q
- Bandeggio G
- Bandeggio R



Producono un'alternanza di bande chiare e scure lungo tutto il cromosoma

Si osserva un pattern di bande RIPRODUCIBILE che rende l'identificazione dei singoli cromosomi UNIVOCA.

- Colorazione DA-DAPI
- Colorazione Ag-NOR
- Colorazione CBG



Non producono bande ma colorano specifiche regioni cromosomiche.

**IMPORTANTE!!! IL CARIOTIPO PERMETTE  
UNA RISOLUZIONE DI CIRCA 5 Mb**

Con le tecniche di bandeggio il riconoscimento dei cromosomi avviene su base morfologica, le metodiche di citogenetica molecolare consentono l'identificazione dei cromosomi (o di parte di essi) basandosi sull'omologia di sequenza → uso di sonde marcate

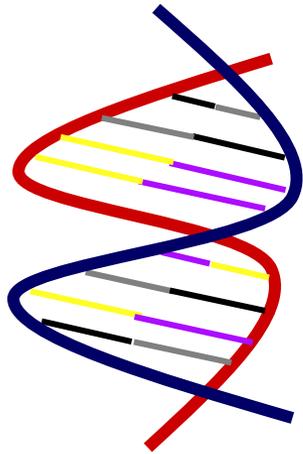
FISH → Fluorescent In Situ Hybridization

# FISH

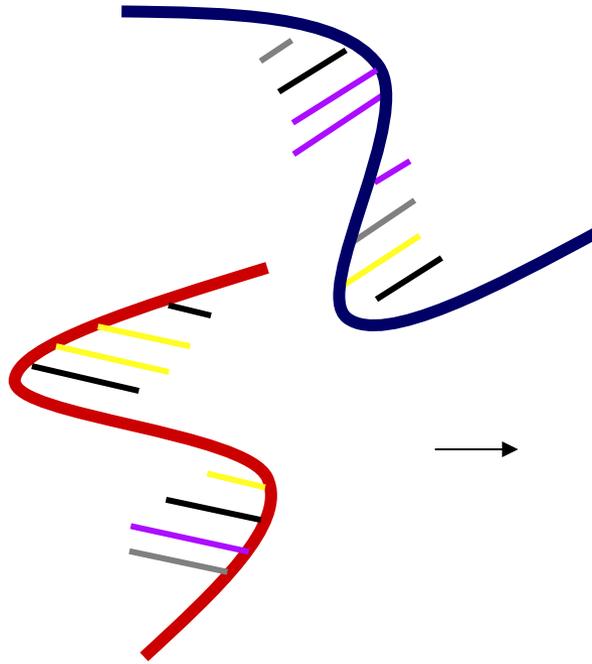
## Fluorescent in situ Hybridization

- sono necessarie le **cellule** e le **sonde di DNA** marcate
- le cellule possono essere in metafase o in interfase
- si sfrutta la capacità di denaturare e rinaturare della cromatina (DNA)
- si procede alla rilevazione (amplificazione) e alla valutazione al microscopio

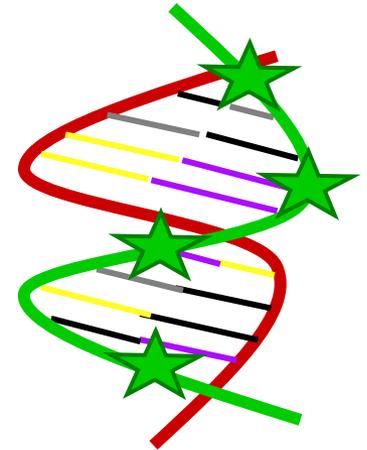
# Nucleic acid hybridisation



Duplex of  
complementary  
base-pairing strands



Denaturation of  
strands e.g. salts  
and heat



Hybridisation of  
complementary  
strands e.g. labeled  
probes

Aspirato midollare  
(sangue periferico)

Conteggio nucleate

Semina in terreno

Coltura per 24 - 72 h

Colchicina

Fissazione e lavaggi

Allestimento  
dei vetrini

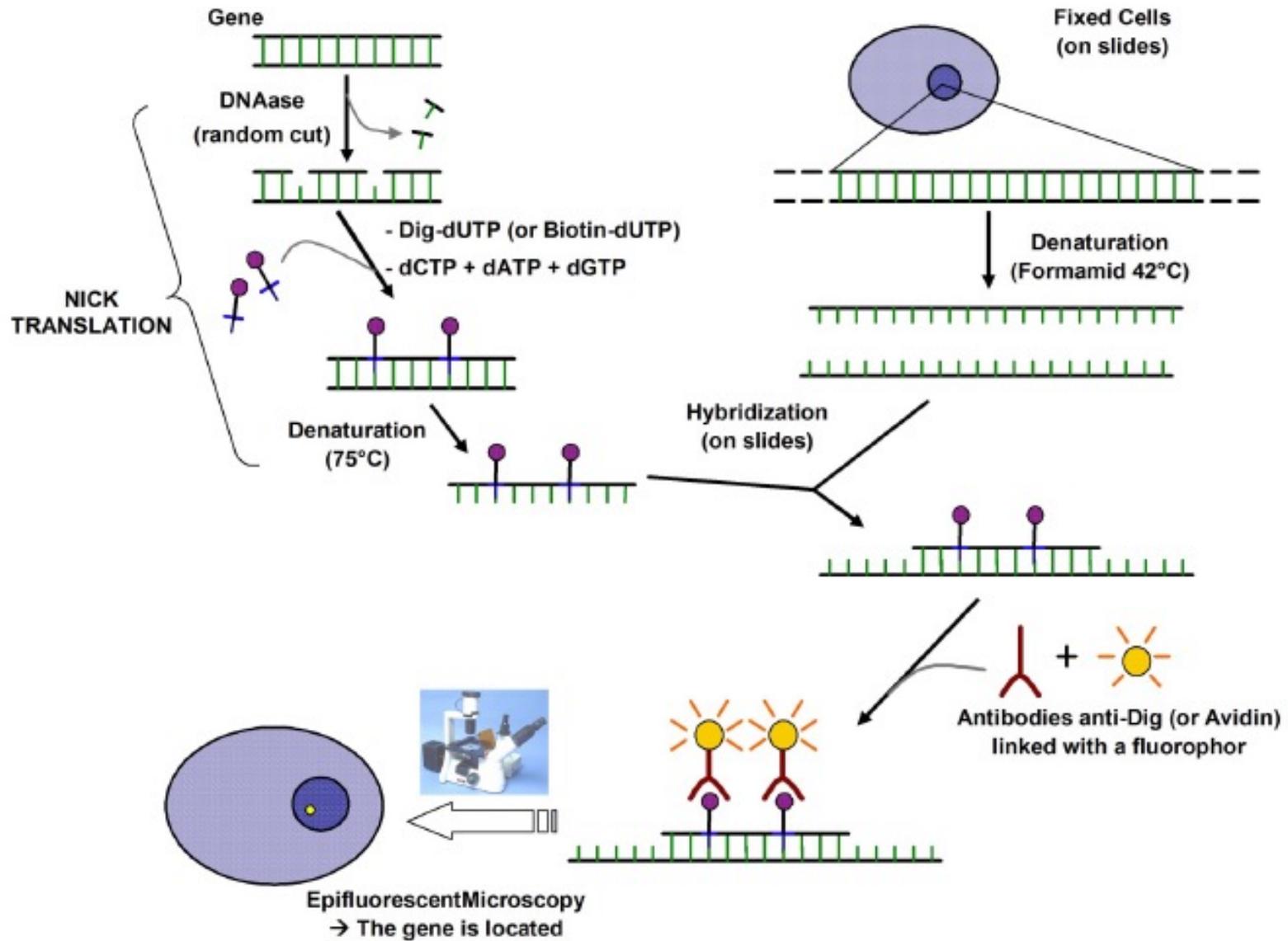
## Cariotipo Convenzionale (CC)

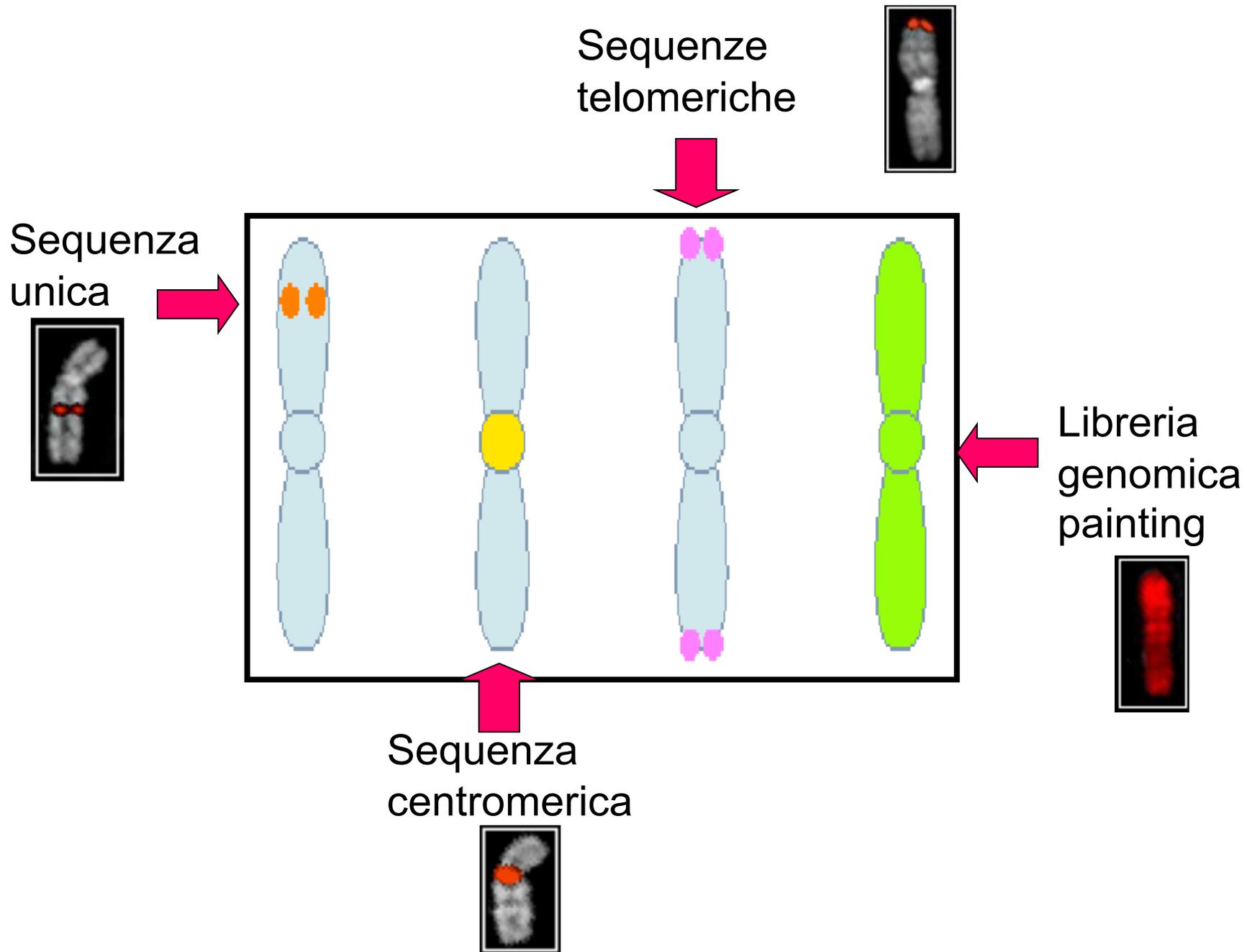


## Ibridazione in Situ (FISH)



# FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)





## FISH METAFASICA

- **traslocazioni bilanciate** per valutazione della reciprocità e per conferma dei punti di rottura
- **traslocazioni sbilanciate** per identificazione delle regioni in eccesso
- **microdelezioni** per evidenziare le perdite di regioni cromosomiche sotto il limite del bandeggio
- **duplicazioni** per identificazione della regione duplicata
- **mosaicismi** per conteggi veloci
- **cr. marcatori** per identificare l'origine (da quale cr.) e il contenuto di DNA

# **CGH: C**omparative **G**enomic **H**ybridization

**tecnica di citogenetica molecolare che si utilizza soprattutto per ricercare perdite e guadagni di regioni genomiche non facilmente identificabili con le tecniche convenzionali**

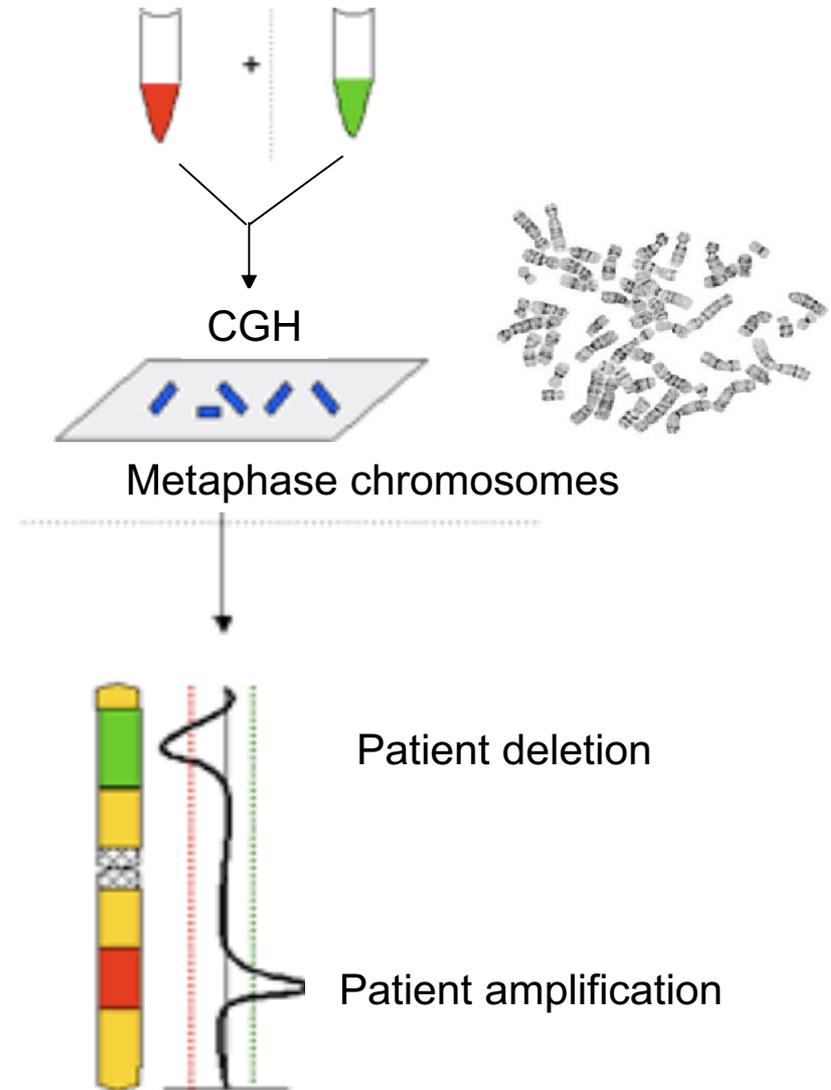
# CGH

A cytological technique where two genomes (e.g. from a cancer patient and a population of unaffected individuals) are fluorescently and differentially labeled, then competitively hybridised (hence 'CGH') to a spread of metaphase chromosomes. The ratio of intensity of the two fluorophores along the chromosomes length reported either deletions or amplifications of that part of the patients genome

**EFFECTIVE BUT CRUDE WITH  
LOW RESOLUTION**

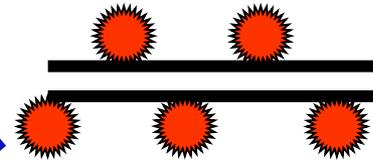
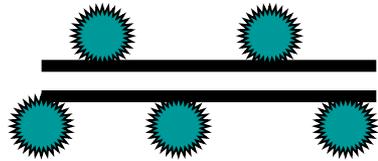
Patients DNA

Reference DNA



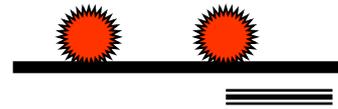
# DNA di riferimento (normale)

# DNA da testare



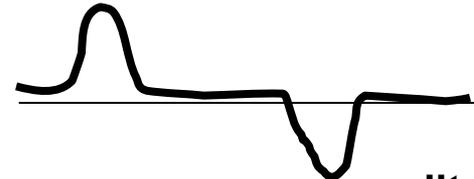
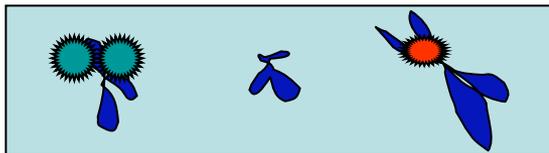
denaturazione

cot-1 DNA



ibridazione

amplificazione

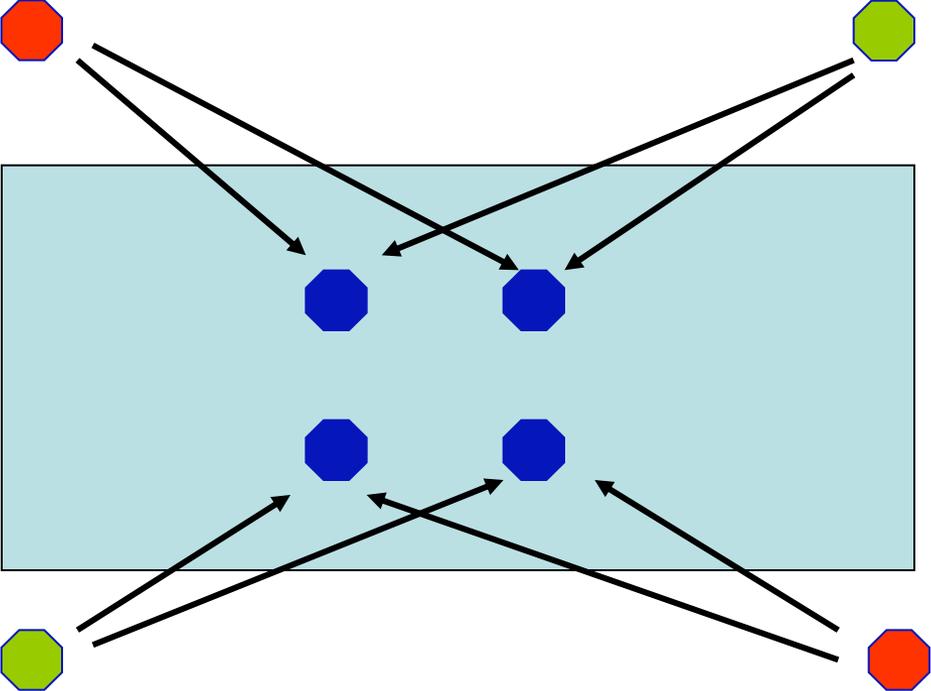


metafasi normali

perdita

# DNA da testare

# DNA normale



cloni BAC/PAC di una specifica regione (o intero genoma)



DNA test marcato Cy3 (rosso)



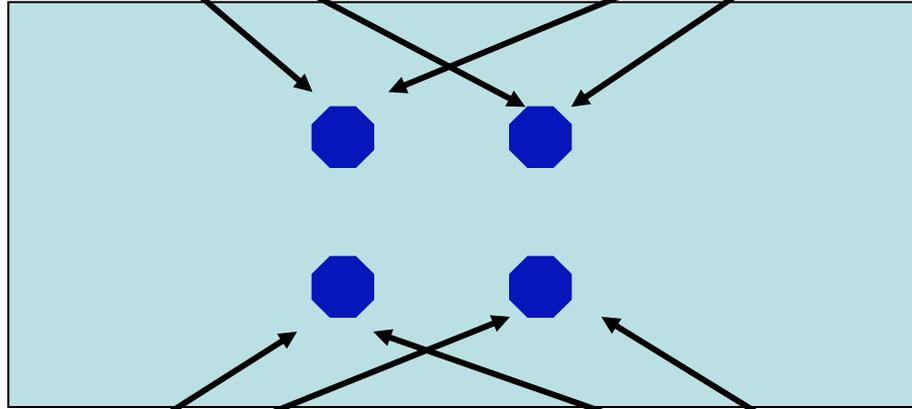
DNA normale marcato Cy5 (verde)

} e viceversa

**DNA test**



**DNA normale**

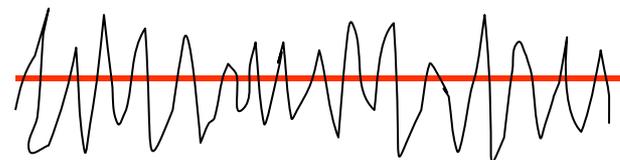
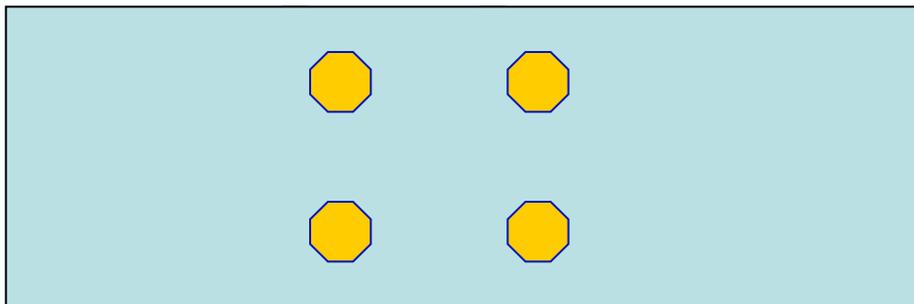


**DNA test normale**

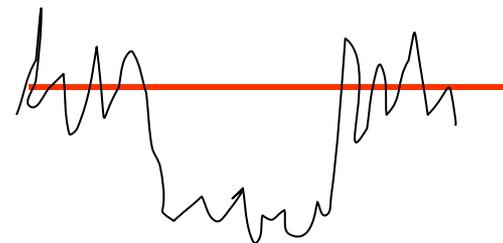
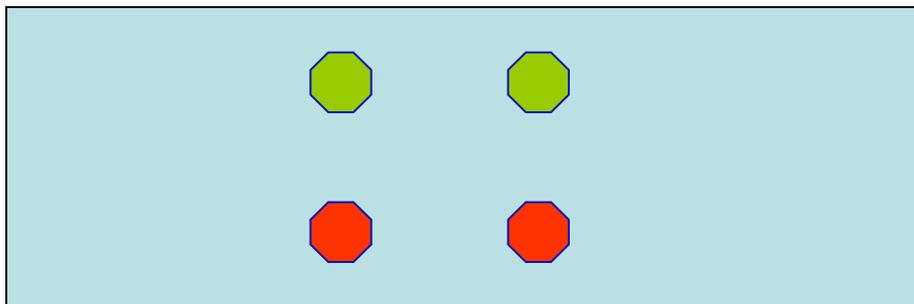
**DNA test delecto**



## DNA test normale



## DNA test delecto



# Conventional CGH nella diagnosi di tumori

[Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.](#)

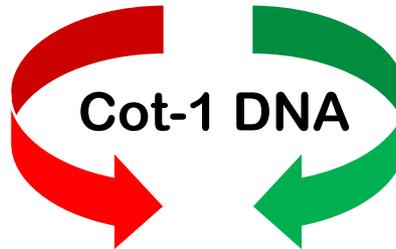
Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D.

Science. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.

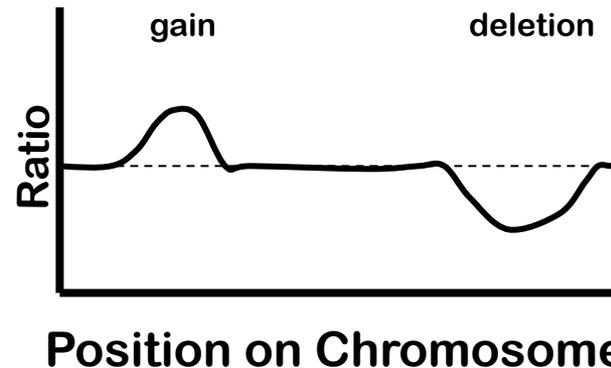
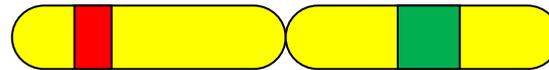
PMID: 1359641 [PubMed - indexed for MEDLINE]

[Related citations](#)

**Test Genomic DNA  
(Tumor DNA)**



**Reference  
Genomic DNA**



Human Cot-1 DNA is placental DNA that is predominantly 50 to 300 bp in size and enriched for repetitive DNA sequences. Is commonly used to block nonspecific hybridization in various techniques.



# ENDONUCLEASI di RESTRIZIONE



Sono enzimi che tagliano entrambi i filamenti della doppia elica del DNA in corrispondenza di specifiche sequenze.

Riconoscono SEQUENZE PALINDROMICHE di 4 o 6 nucleotidi

5'-GAATTC-3'  $\rightleftharpoons$  Entrambe le catene hanno la stessa sequenza  
3'-CTTAAG-5'  $\rightleftharpoons$  se lette in direzione 5'  $\boxtimes$  3'

Si distinguono in due classi:

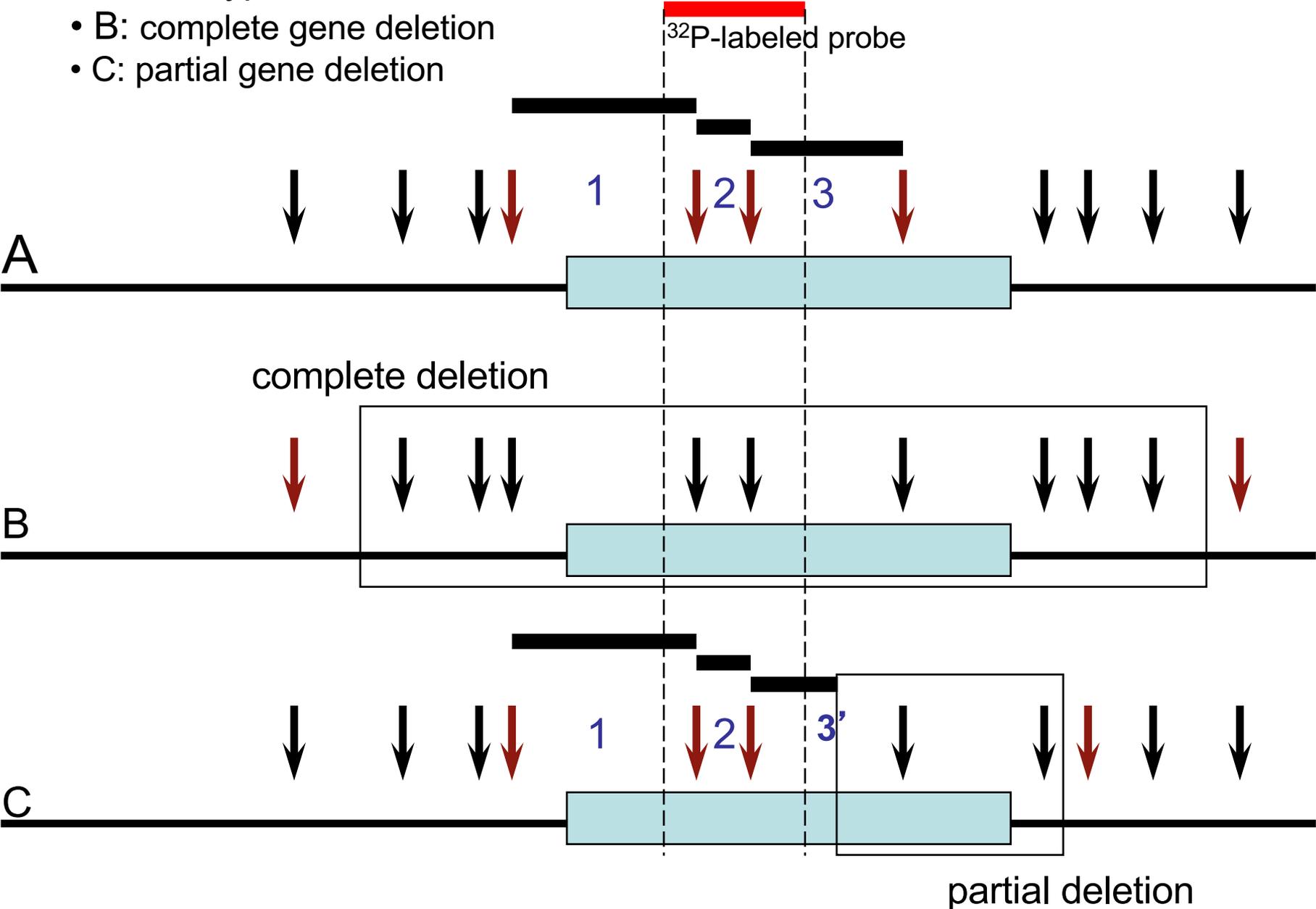
Enzimi di **CLASSE I**  $\rightleftharpoons$  Tagliano il DNA in siti adiacenti alla sequenza riconosciuta

Enzimi di **CLASSE II**  $\rightleftharpoons$  Tagliano il DNA all'interno della sequenza riconosciuta

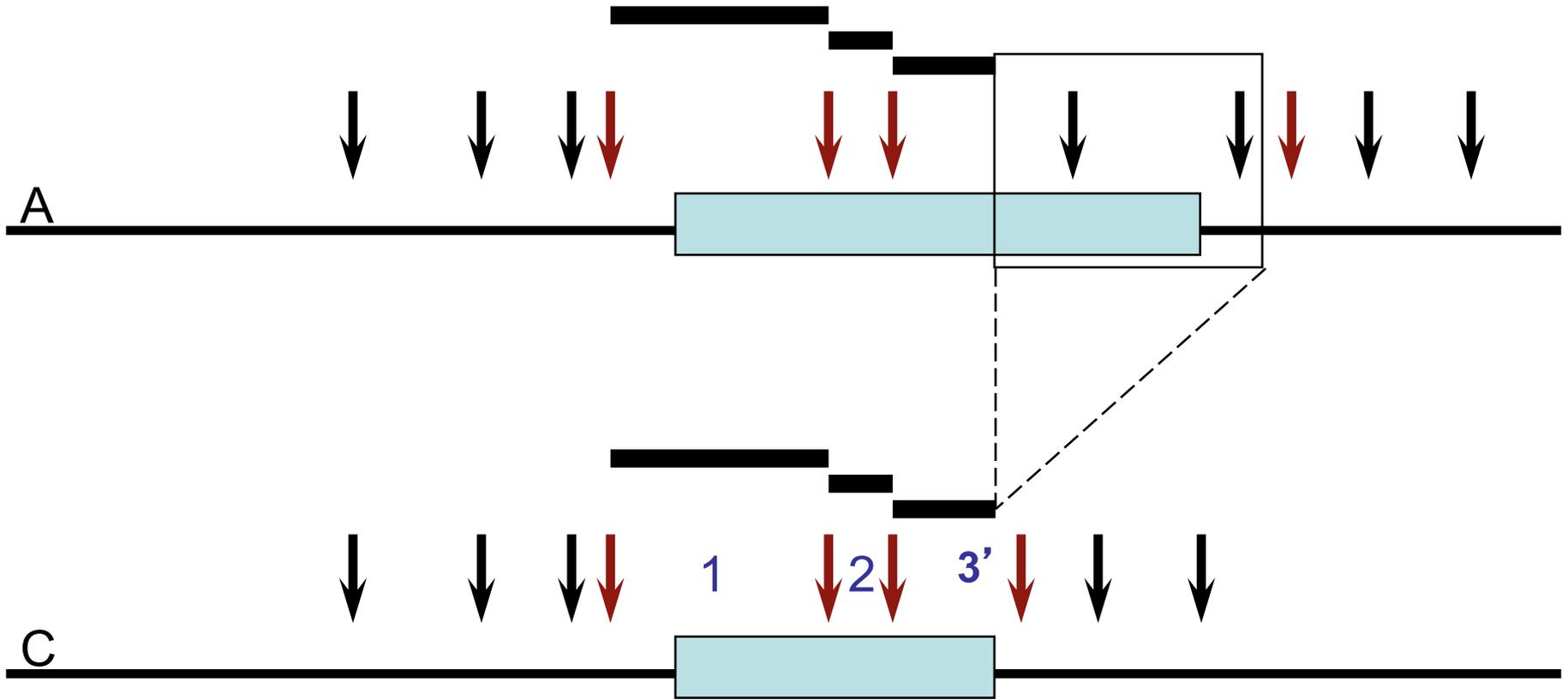


# Southern blotting analysis to detect mutated DNA

- A: wild type
- B: complete gene deletion
- C: partial gene deletion



# Resolution of restriction fragments for the partial deletion

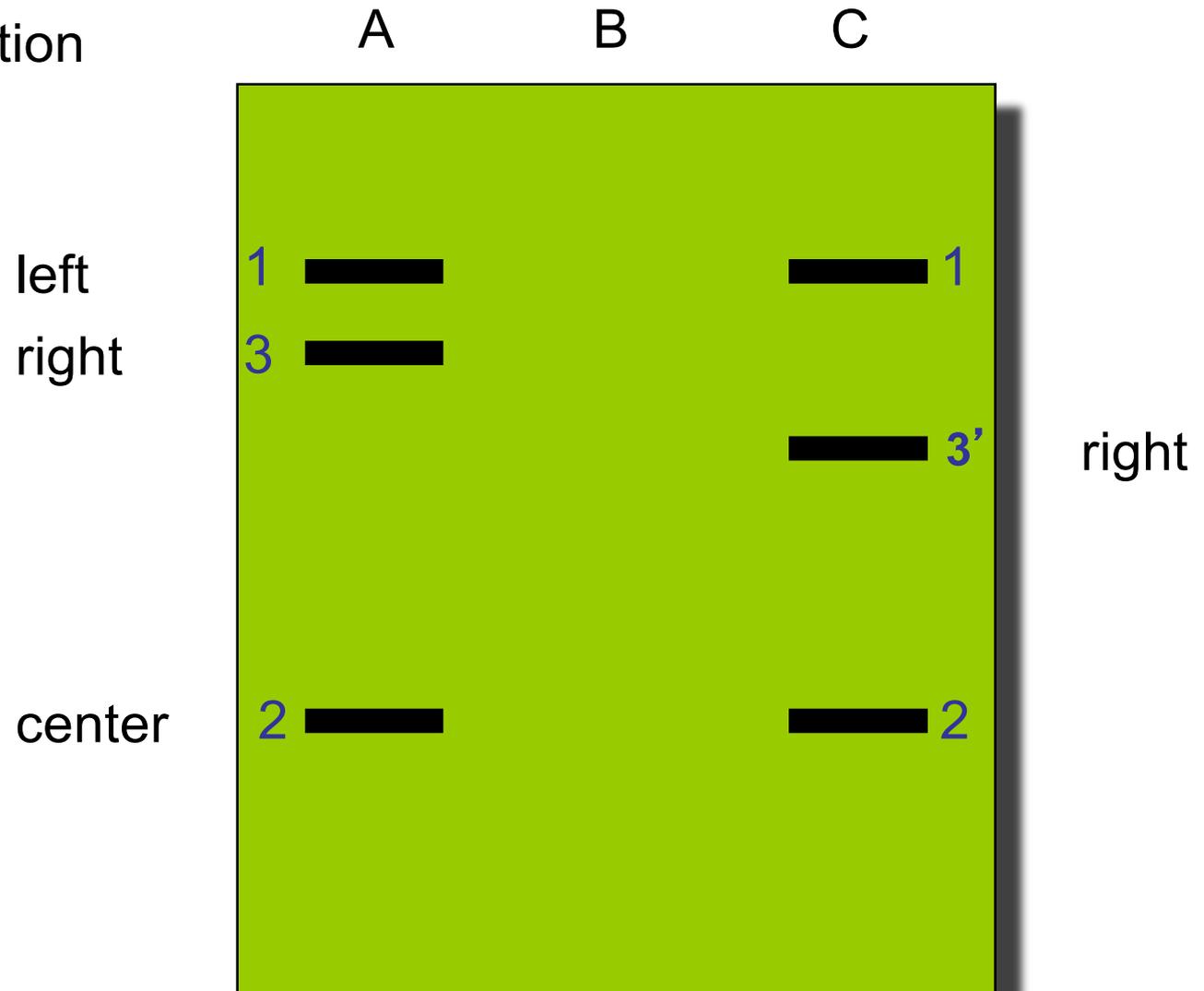


# Southern blotting analysis

A. Normal DNA

B. Complete deletion

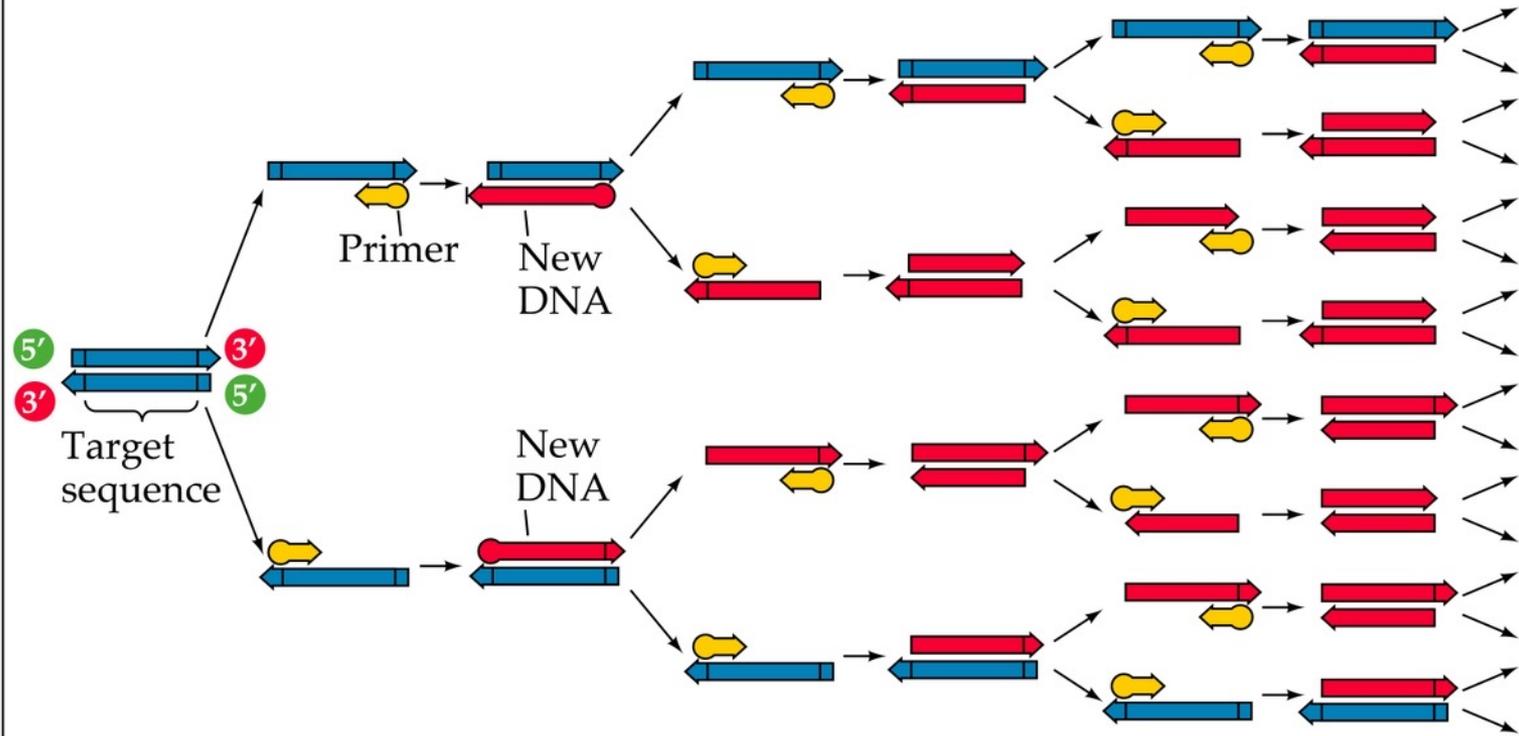
C. Partial deletion



# Applicazioni pratiche della replicazione del DNA

- La tecnica della reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction PCR) usa la DNA polimerasi per replicare ripetutamente il DNA in provetta.

# RESEARCH METHOD

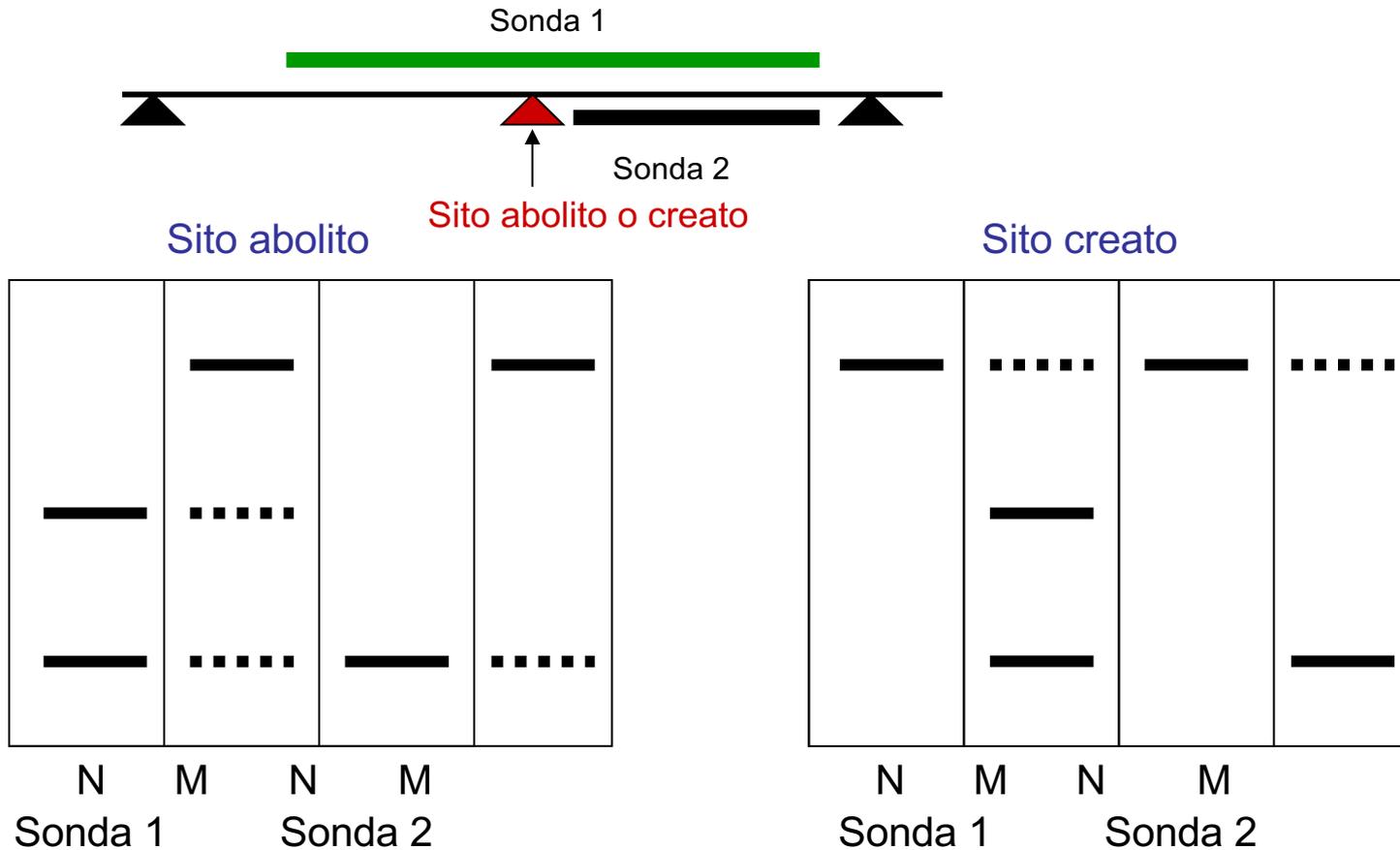


# DIAGNOSI DIRETTA

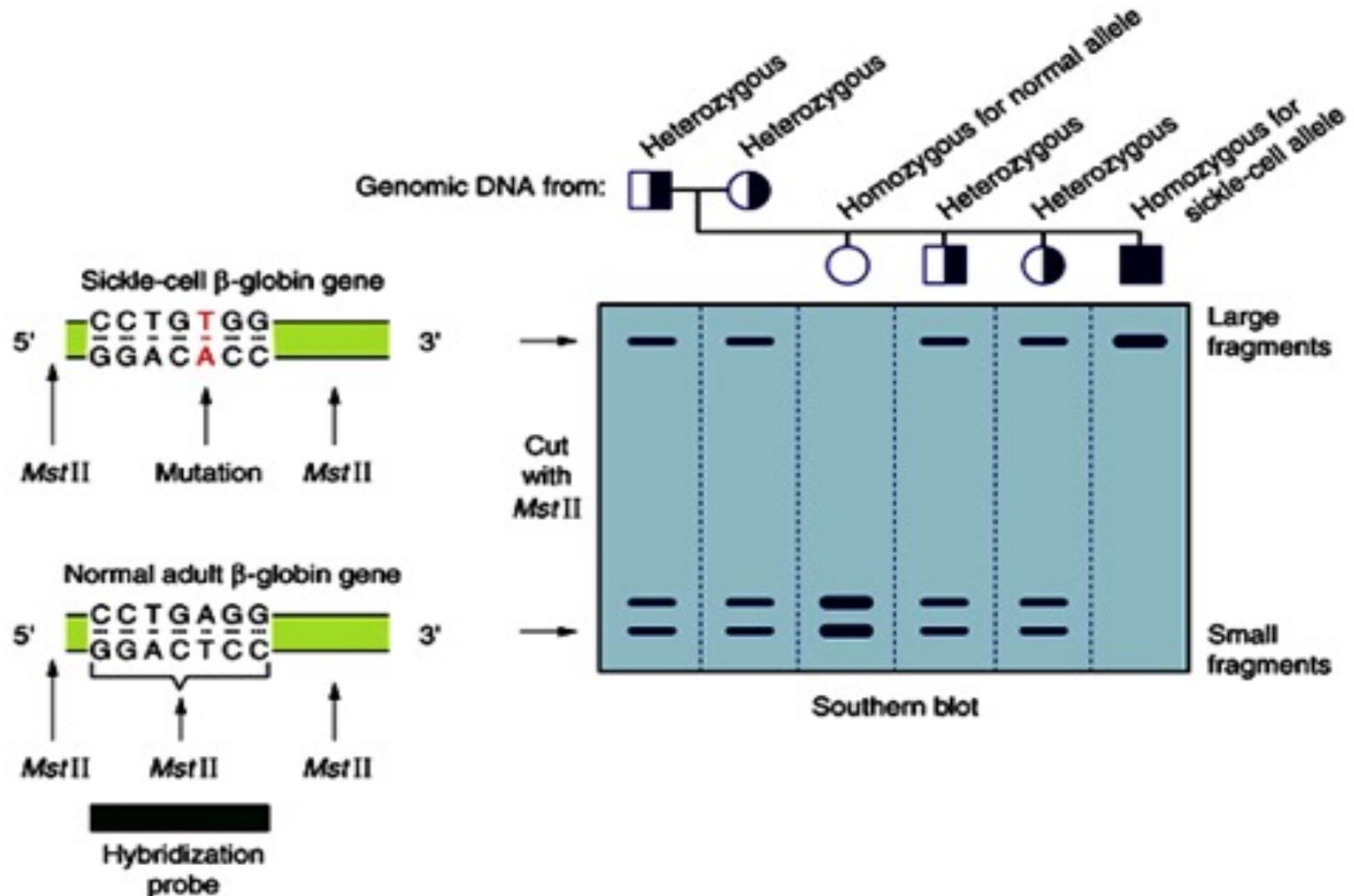
## MUTAZIONI PUNTIFORMI

Assenza o presenza di un sito di restrizione

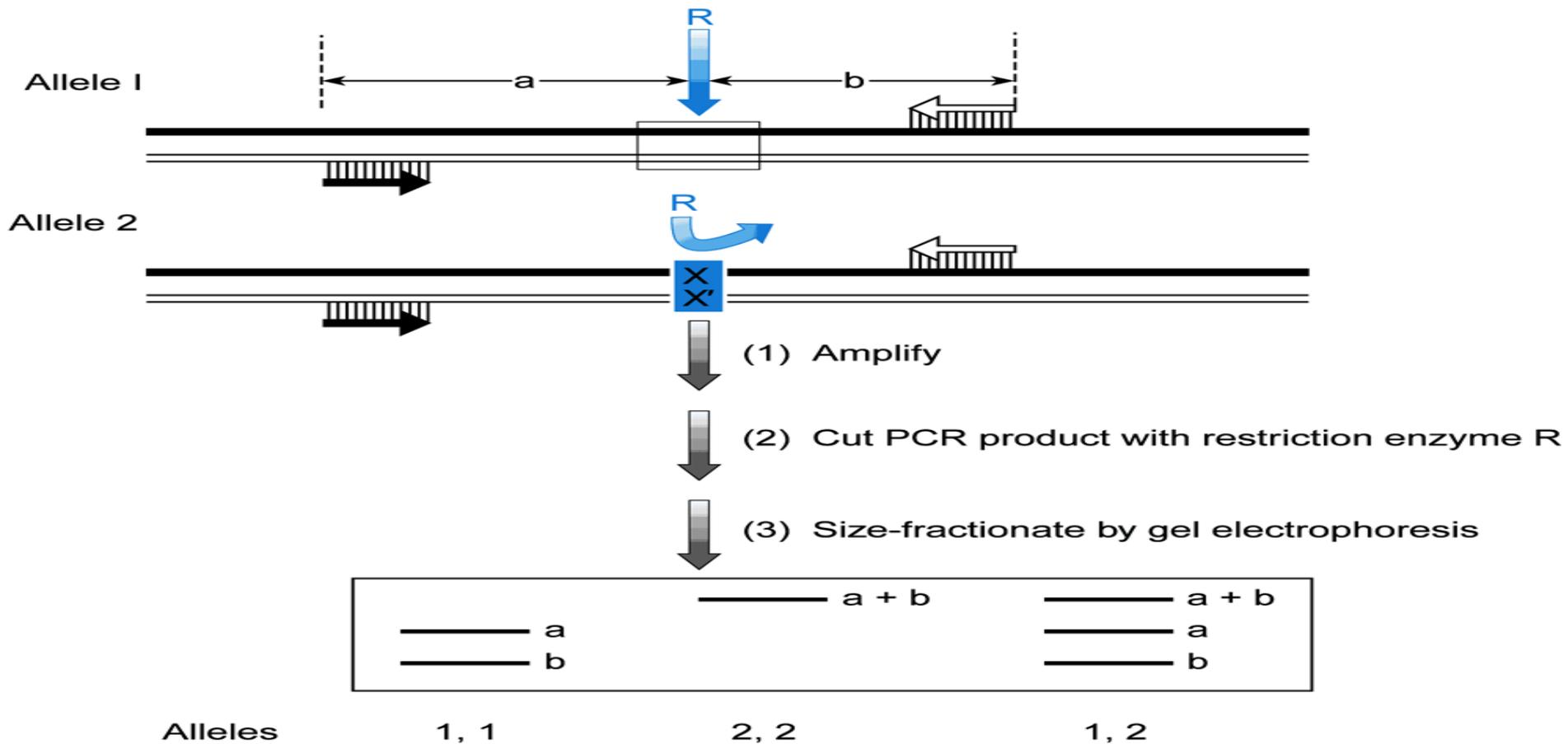
Mutazioni puntiformi la cui insorgenza abolisce o crea un sito di restrizione. Evidenziabili mediante Southern Blot



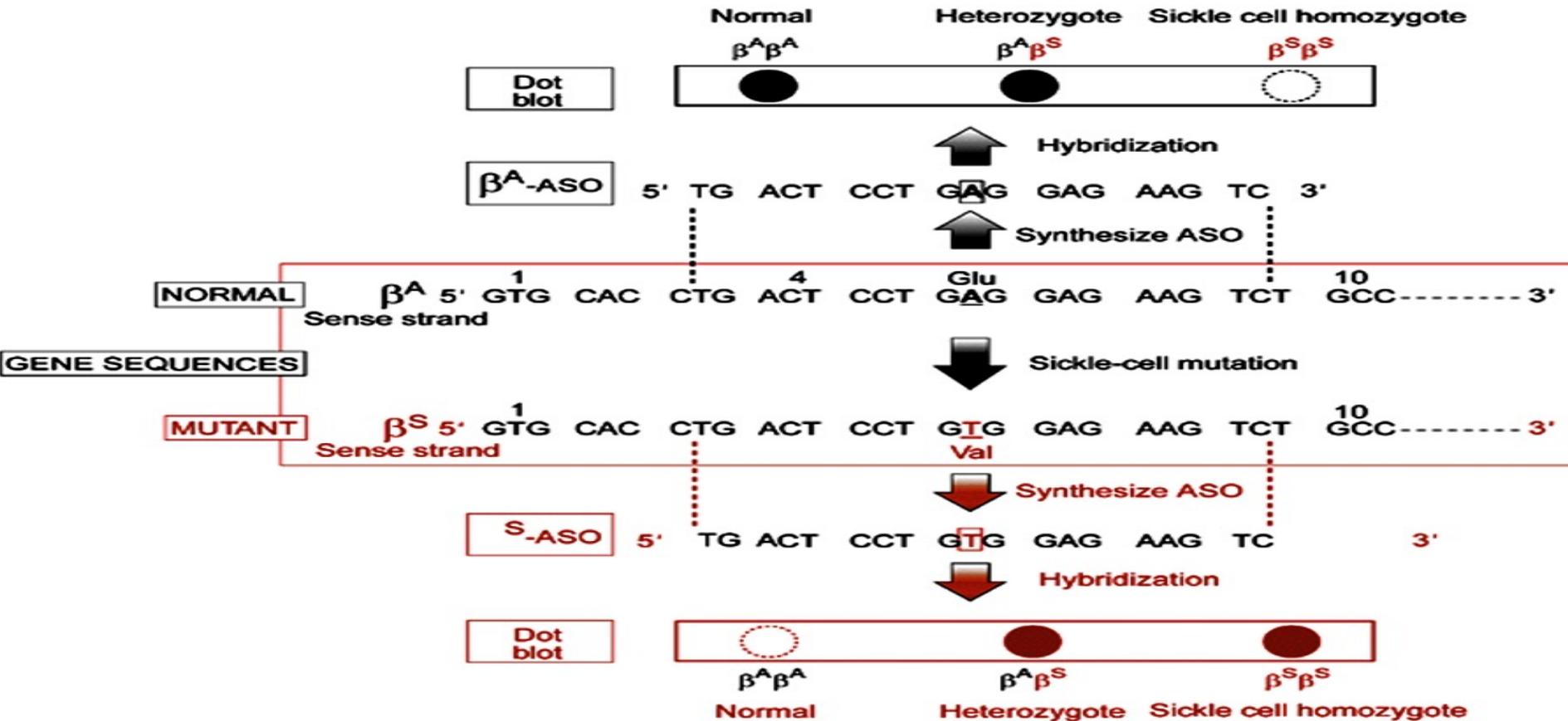
# Mutazione dell'emoglobina S responsabile dell'anemia falciforme GAG -> GTG sul 6° codone del gene della $\beta$ -globina



Le mutazioni puntiformi che creano o aboliscono un sito di restrizione possono essere messe in evidenza anche mediante PCR con primers che fiancheggiano la regione contenente la mutazione



- Ibridazione dei prodotti di PCR a oligonucleotidi allele-specifici (ASO). In condizioni di ibridazione molto stringenti si otterrà ibridazione solo se esiste una perfetta complementarità di basi

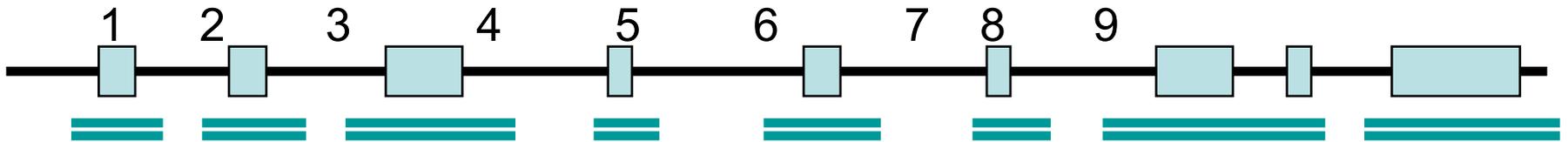


Immobilizzazione del DNA del probando su filtro (dot-blot) ed ibridazione con oligonucleotidi allele-specifici marcati con perossidasi

Reverse dot-blot immobilizzazione degli oligonucleotidi su filtro ed ibridazione con DNA bersaglio marcato

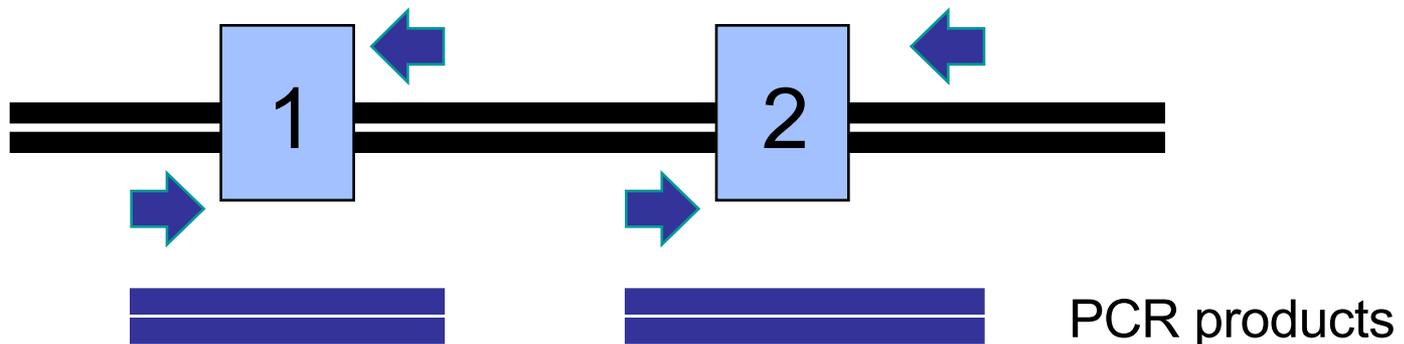
# Detection of Lesch-Nyhan deletions by multiplex PCR

- exons in the HGPRT (HPRT) gene

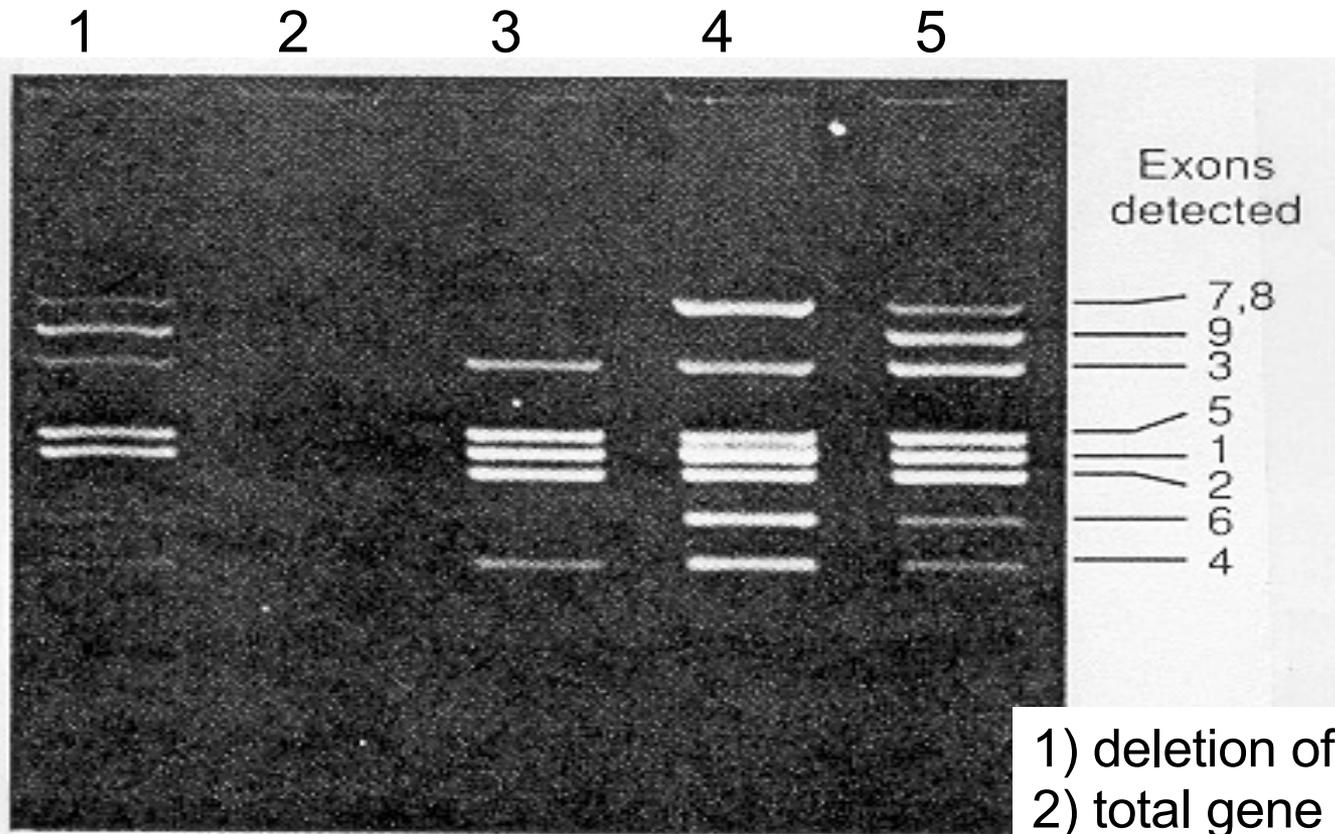


- PCR products resulting from the use of multiplex primers -- each product is flanked by its own set of leftward and rightward primers

- for example, for exons 1 and 2:



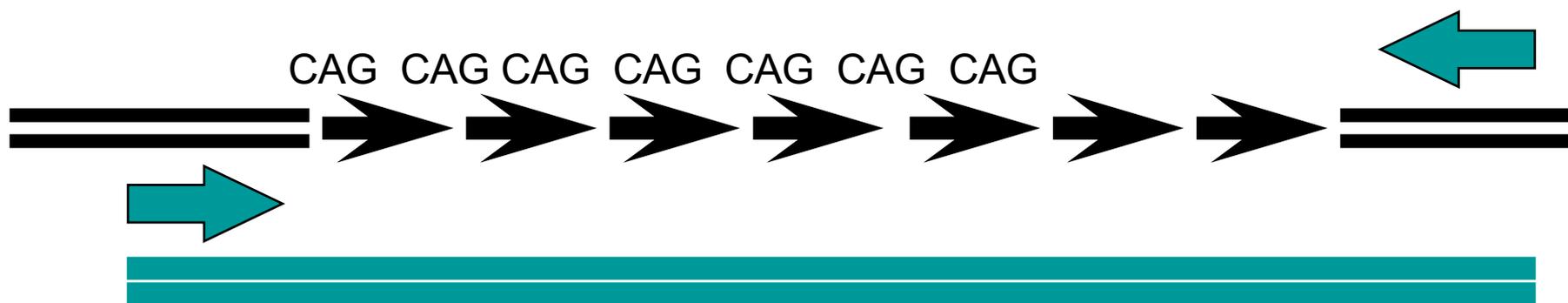
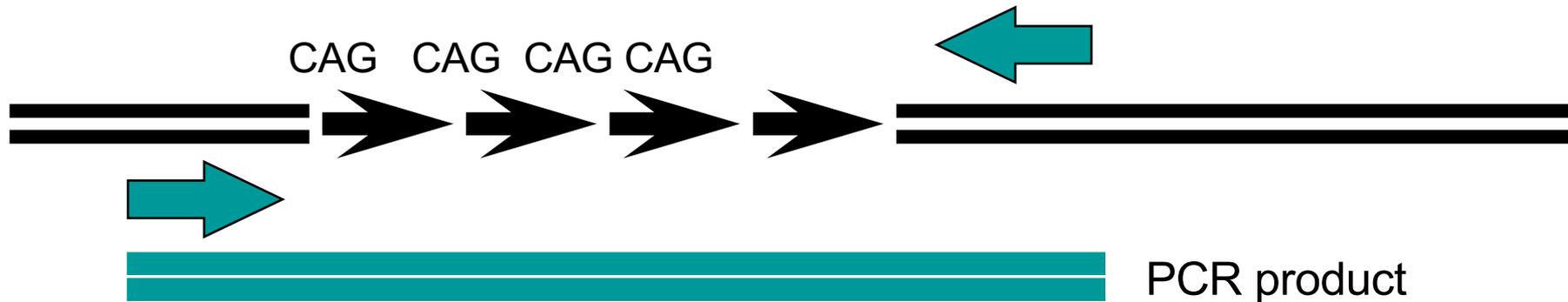
# Detection of Lesch-Nyhan deletions by Multiplex PCR

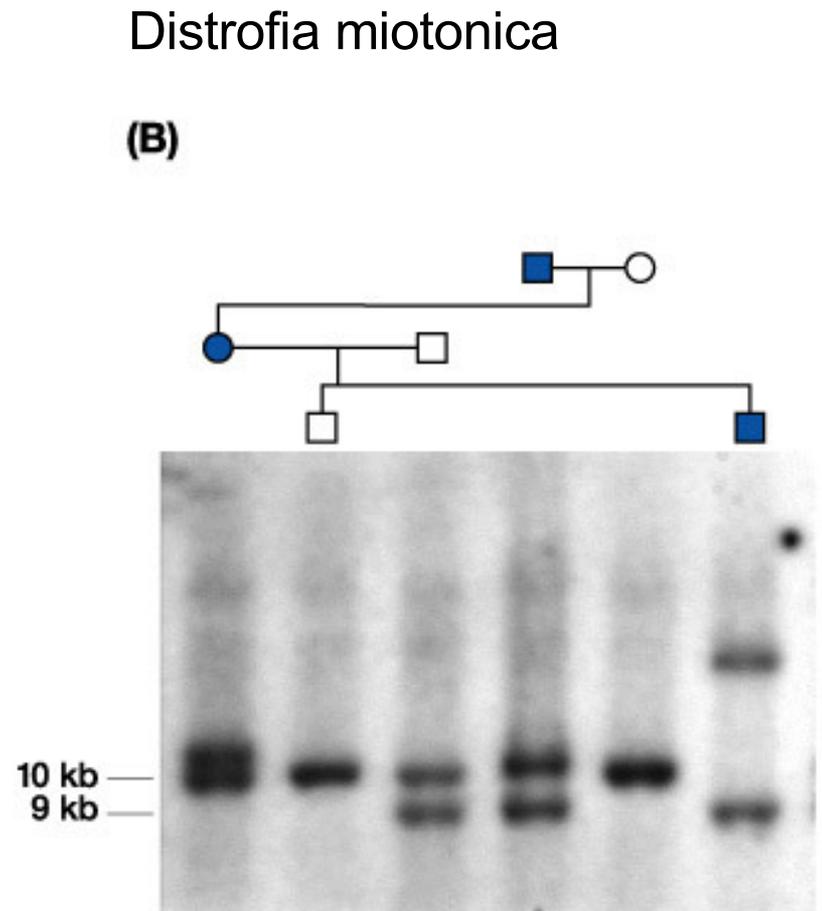
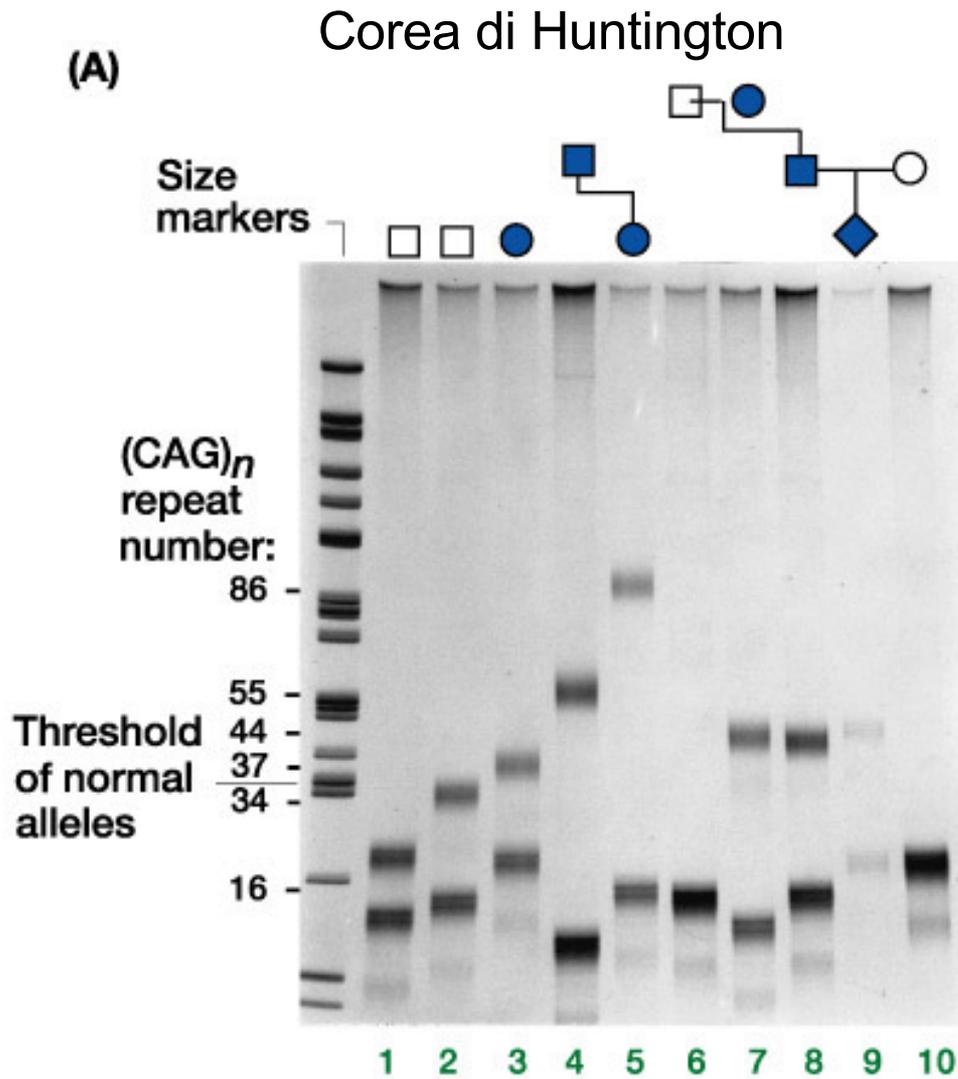


- 1) deletion of exon 2
- 2) total gene deletion
- 3) deletion of exons 6-9
- 4) deletion of exon 9
- 5) normal

# Repeat expansion

- trinucleotide repeats
- VNTRs (variable number of tandem repeats)



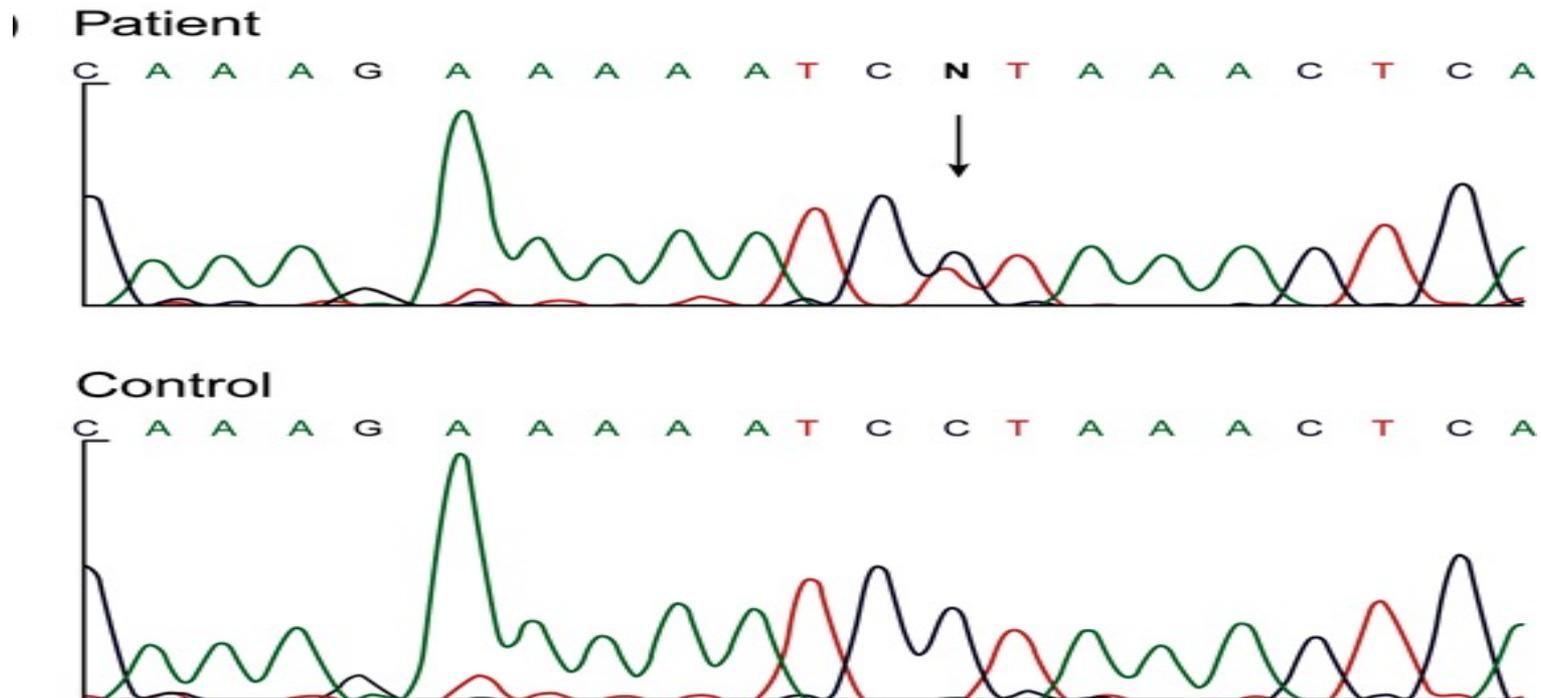


# RICERCA DI MUTAZIONI NON NOTE

## Sequenziamento diretto del DNA.

Individua tutti i cambiamenti e permette la caratterizzazione completa delle mutazioni. Lo svantaggio è legato al costo dell'analisi, soprattutto se devono essere analizzati molti esoni,

Il sequenziamento può inoltre creare degli errori d'interpretazione **nel caso di presenza della mutazione in eterozigosi**



# POLIMORFISMI DI LUNGHEZZA

## Variable Number of Tandem Repeats (VNTR o STR)

Sequenze minisatelliti o microsatelliti, presenti all'interno di specifici loci, che possono variare da individuo a individuo, e quindi da allele ad allele, per numero di ripetizioni.

- La sequenza minisatellite può essere unica, e quindi analizzandola si analizza un unico specifico locus;
- Oppure può essere ripetuta in loci diversi, e quindi analizzandola si guardano contemporaneamente più loci (minisatelliti ipervariabili)

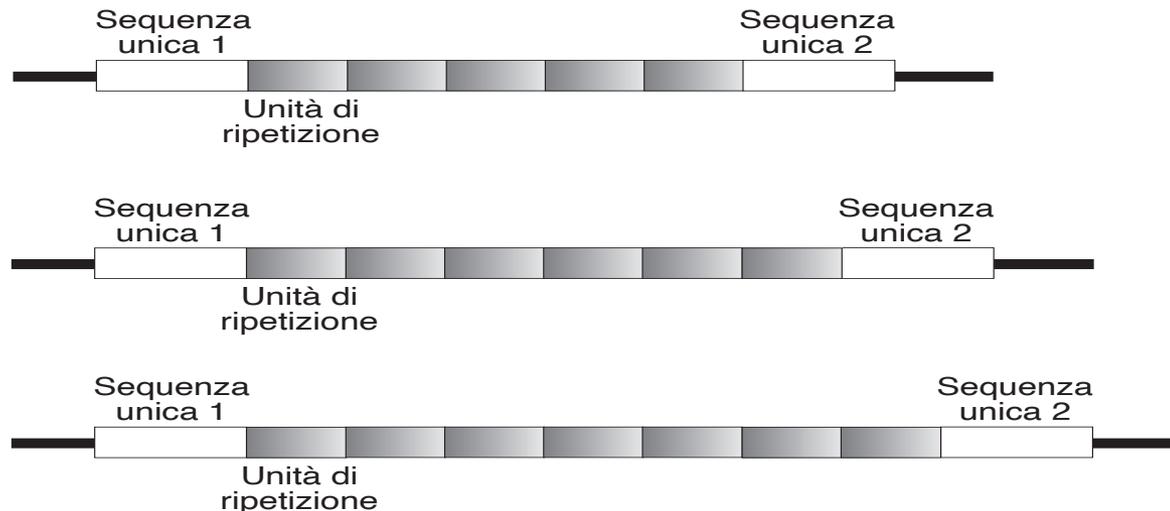
# Minisatelliti ipervariabili

più di 1000 loci caratterizzati da corte unità ripetute in tandem con sequenza variabile ma con un **motivo centrale conservato**

XXZYWZWGGGCAGGAAGZWXXWWY

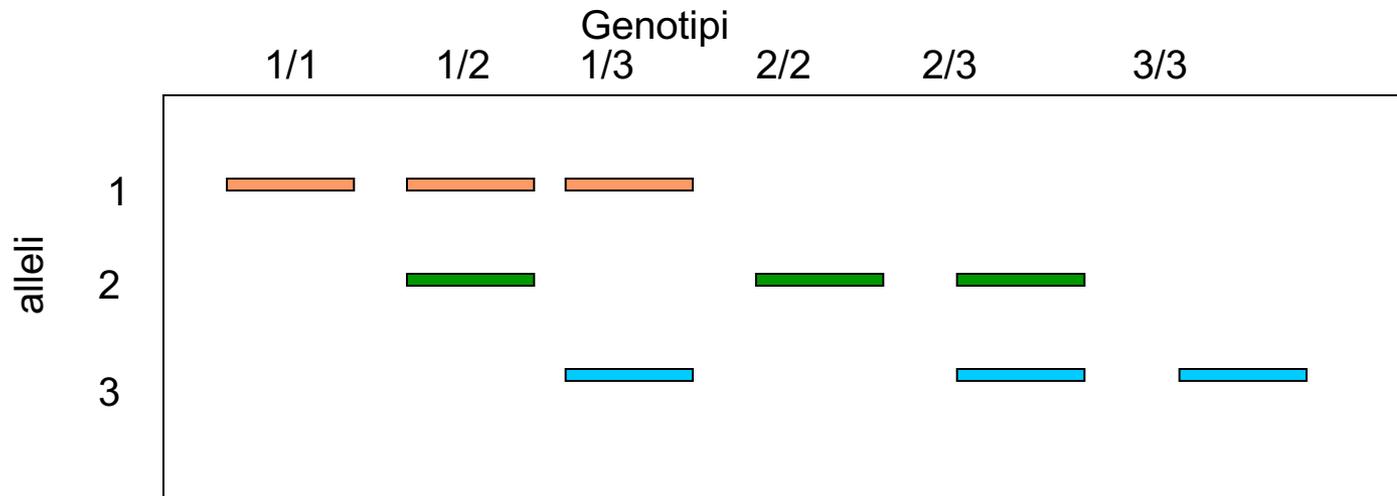
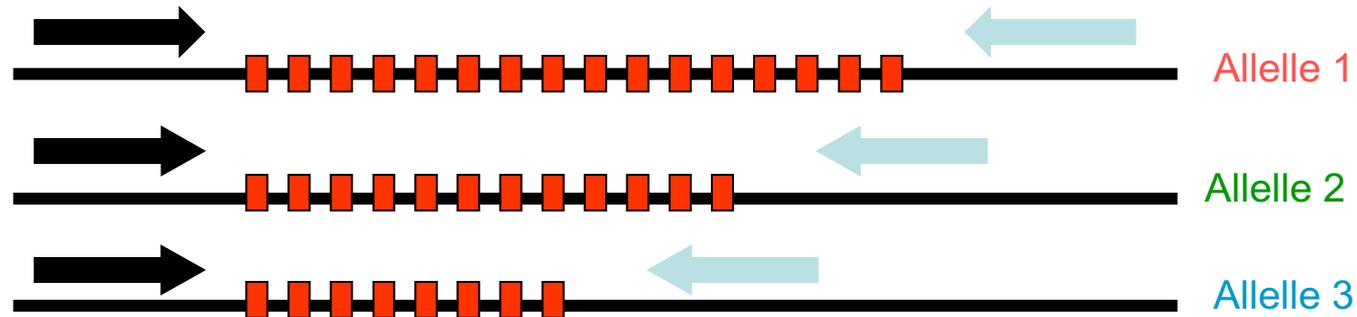
Sequenza mini o micro satellite

La variazione allelica a ciascun locus è dovuta a differenze nel numero delle ripetizioni contenenti la sequenza minisatellite comune

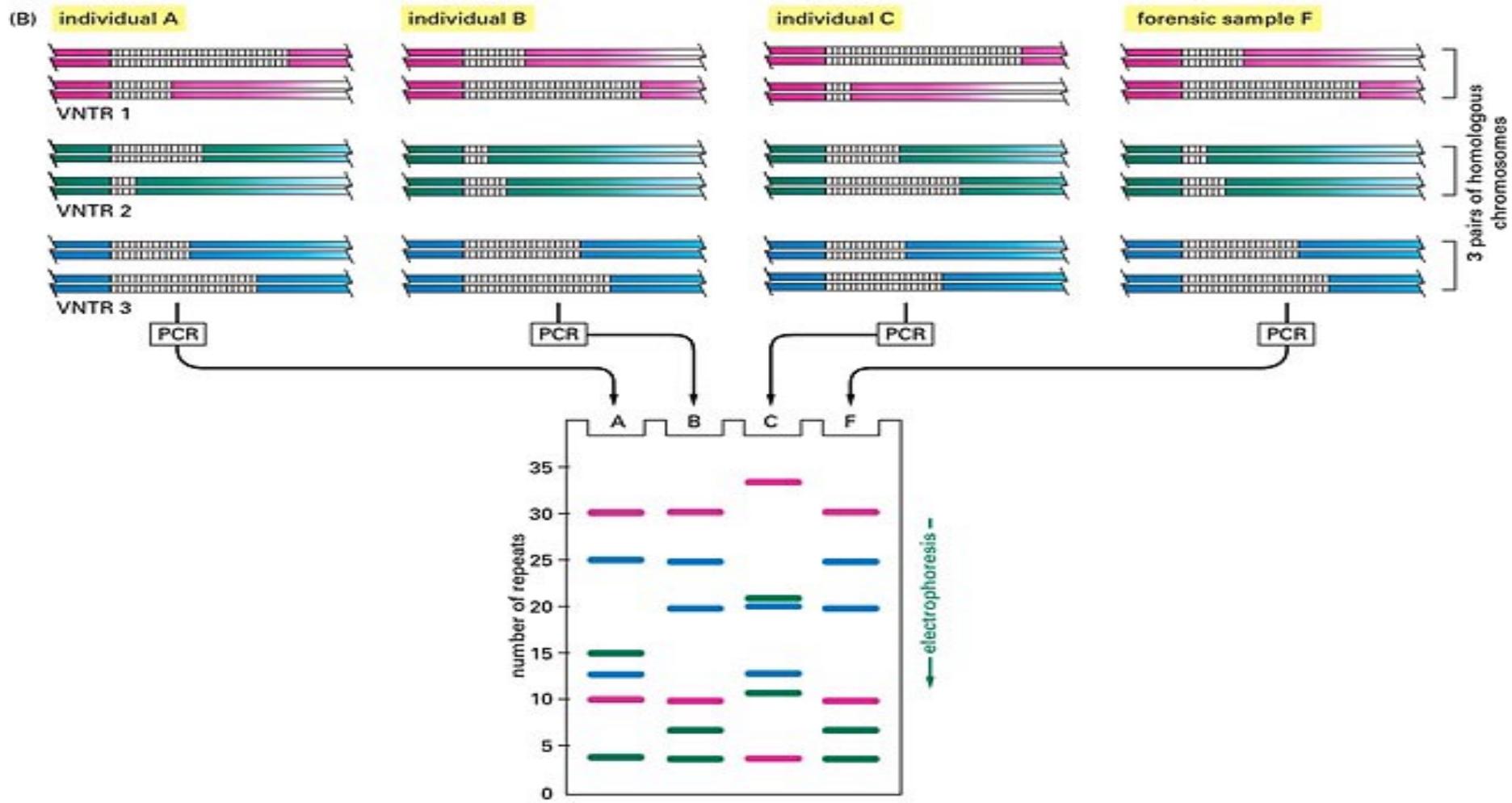
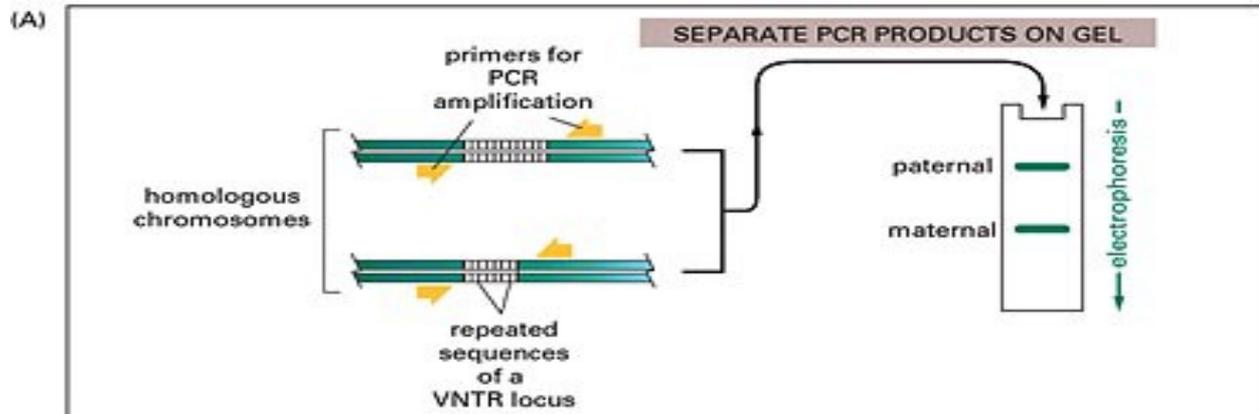


# Micro/mini-satelliti locus specifici

= minisatelliti: blocchi da 0,1-20 Kb di brevi sequenze ripetute  
10-20 basi



PCR con due primer corrispondenti a sequenze uniche fiancheggianti i minisatelliti

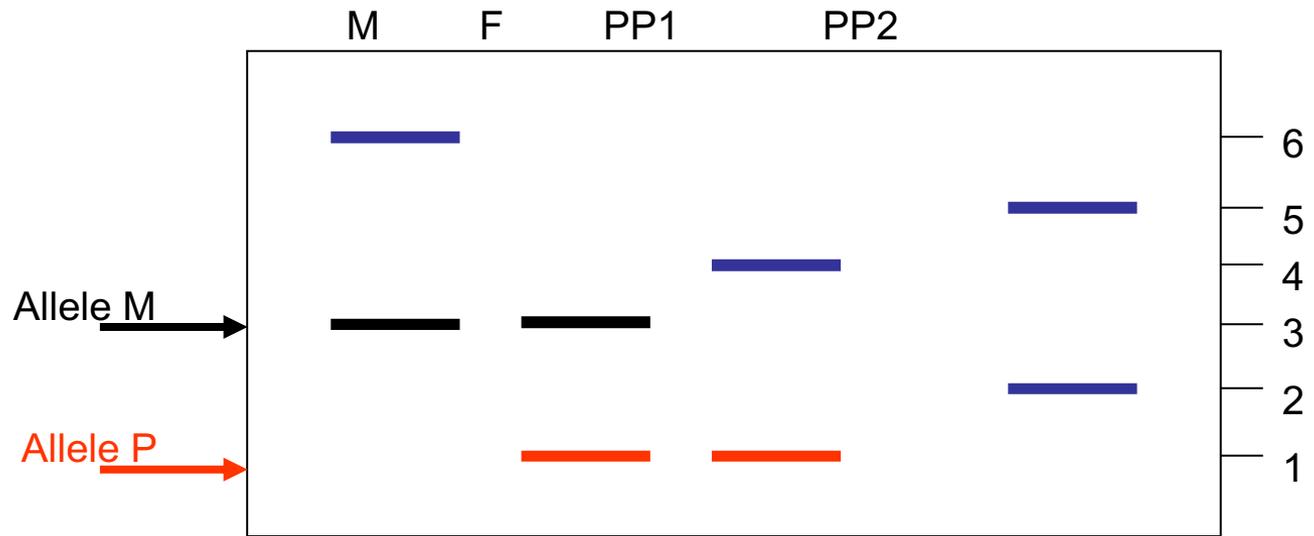
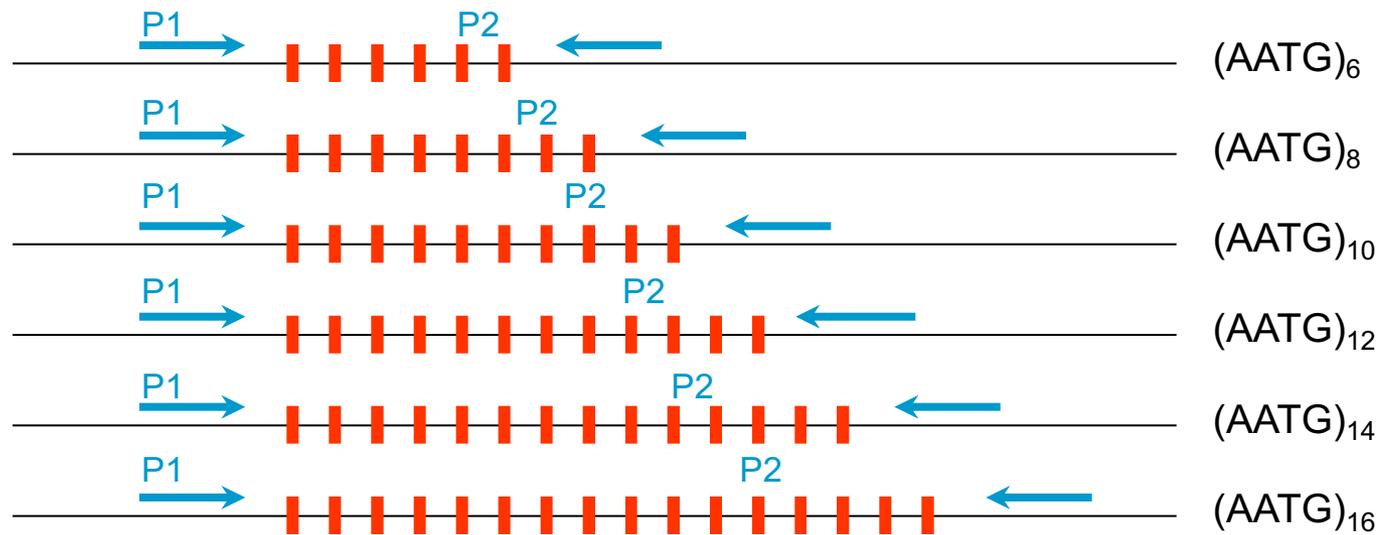


# MICROSATELLITI

## Short Tandem Repeats (STR)

piccoli schieramenti di ripetizioni in tandem (1-4 nt) dispersi in tutto il genoma

Lunghezza del motivo	Sequenza del motivo	
1 pb	$(A)_n/(T)_n$	Sequenze poly(A) all'interno delle ripetizioni <i>Alu</i>
2 pb	$(CA)_n/(GT)_n$ $(TC)_n/(AG)_n$	Sono i più frequenti (1 ogni 25-100 kb)
3pb	$(TTA)_n/(AAT)_n$ $(AGC)_n/(TCG)_n$	1 ogni 300-500 kb
4 pb	$(AATC)_n/(TTAG)_n$ $(AATG)_n/(TTAC)_n$ $(ACAG)_n/(TGTC)_n$ $(AAAT)_n/(TTTA)_n$ $(AAAG)_n/(TTTC)_n$	Motivi polimorfici derivati dalle sequenze poly(A) all'interno delle ripetizioni <i>Alu</i>



## Impronta digitale del DNA (DNA fingerprint)

Il DNA umano contiene 60 loci  
minisatelliti ipervariabili  
riconosciuti dalla sonda  
PML33.15

(AGAGGTGGGCAGGTGG)

Digestione con *Hin* fI  
e ibridazione con la sonda  
danno un quadro di ibridazione  
tipo "codice a barre"

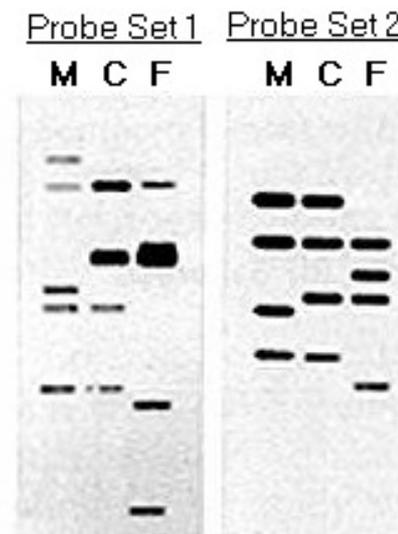
( $p=3 \times 10^{-11}$ )

Due Gemelli Identici  
hanno bande identiche,  
Padre e Figlio hanno 50%  
delle bande in comune



## Single Locus Fingerprinting

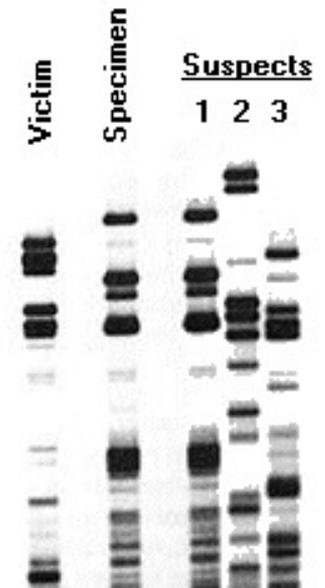
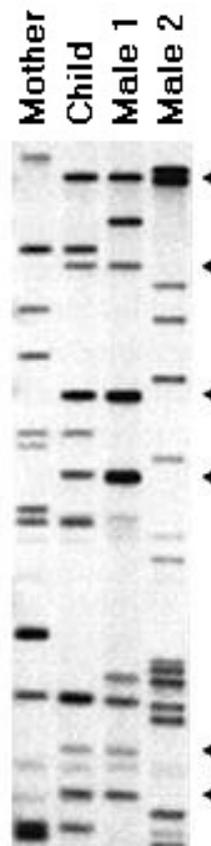
Minisatellite fingerprinting to demonstrate kinship using mixtures of two or three single locus probes (probe sets 1 and 2). The loci detected in the child (C) are clearly a composite of those present in the mother (M) and father (F).



## Multilocus Fingerprinting

Microsatellite fingerprinting to establish parentage. The probe, (CAG)<sub>5</sub>, recognizes a large number of loci. Examine the bands detected in DNA from the child that are not detected in DNA from the mother.

Multilocus fingerprinting to match trace evidence from a crime with suspects.



# Applicazioni pratiche del DNA Fingerprinting

---

## 1. Paternità e Maternità

Poiché ciascun individuo eredita le regioni VNTRs dai propri genitori, il quadro dei VNTR può essere usato per stabilire le relazioni di parentela.

L'analisi del quadro dei VNTR genitore-figlio viene usato per risolvere normali casi di identificazione paterna, così come per confermare relazioni di parentela in caso di immigrazione e, domande di adozione di figli biologici.

## 2. Identificazione Criminale e Medicina Forense

Il DNA isolato da sangue, capelli, cellule cutanee, o altre tracce biologiche trovate sulla scena di un crimine, può essere comparato, mediante analisi dei VNTR, con il DNA di un sospetto, per determinarne l'innocenza o la colpevolezza.

Il pattern dei VNTR può anche essere utile per stabilire l'identità di una vittima (omicidio o rapimento in giovane età).

## 3. Identificazione Personale

I VNTR possono anche essere utilizzati per costruire una speciale carta di identità (codice a barre) dei singoli individui.



# I POLIMORFISMI OGGI

Sono oggetto di studi approfonditi per:

- Marcatori
- Accertamenti Medico-legali
- Comprendere la diversa suscettibilità degli individui alle patologie complesse
- Comprendere la diversa risposta degli individui ai medicinali

# Pharmacogenetics - Selecting the “Right Medicine for the Right Patient”

