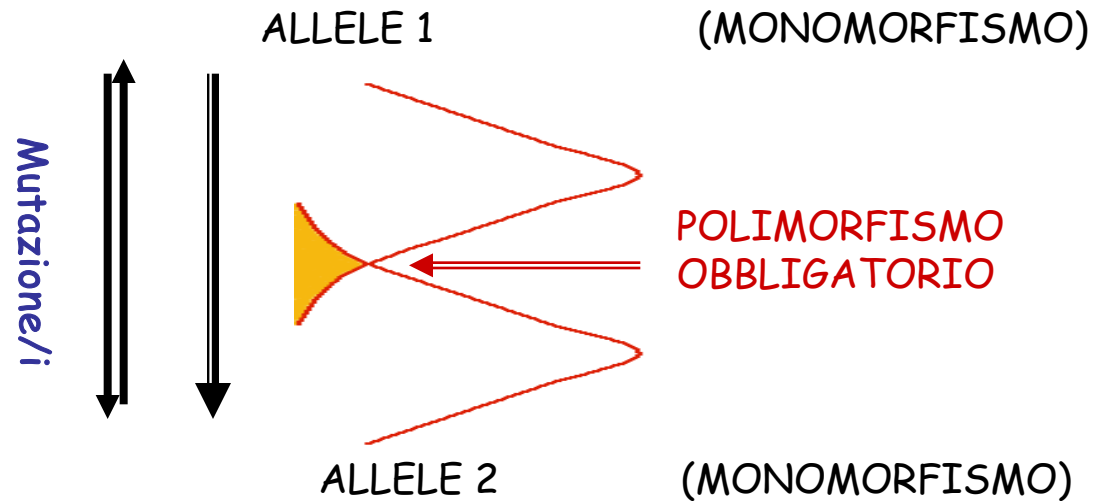


Mutazioni

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

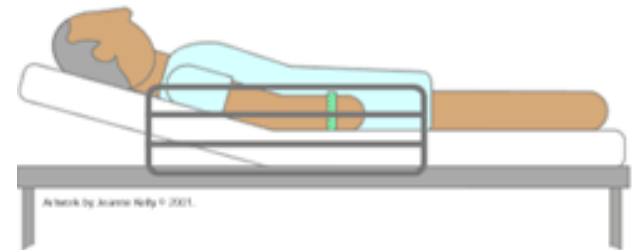
Quali sono le conseguenze di queste variazioni?

- 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 X10⁶ 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.

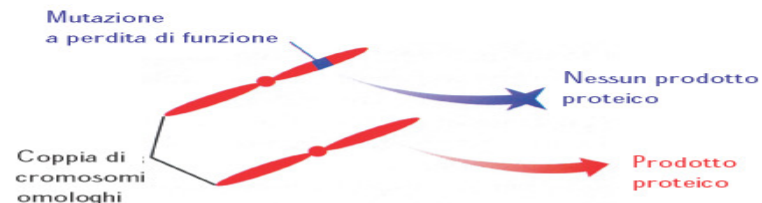


Figura 14.14 Una mutazione a perdita di funzione ('loss of function') è di solito recessiva, perché è presente una versione funzionale del gene nell'altra copia del cromosoma.



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.

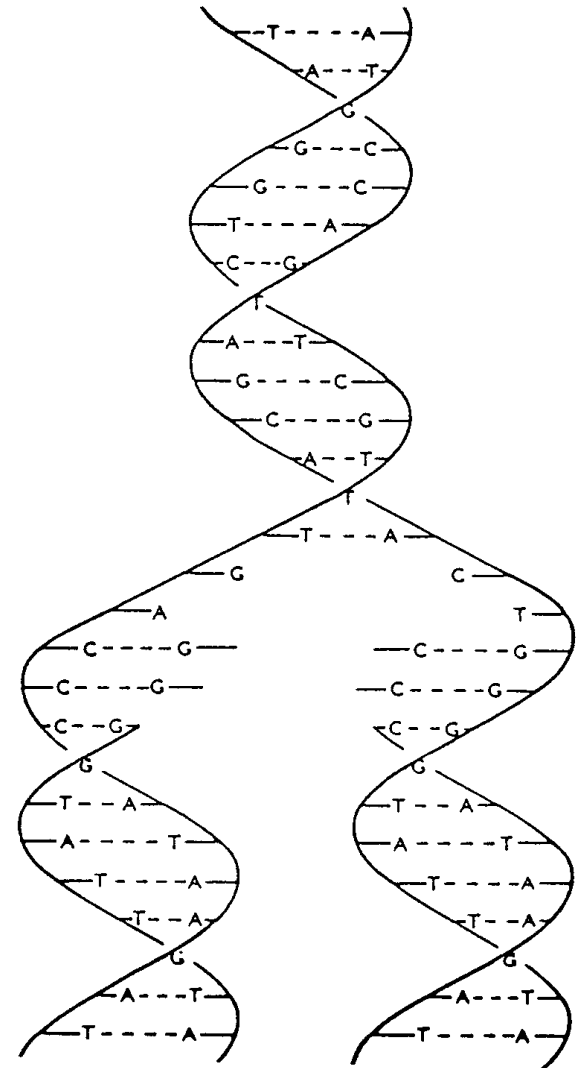
3 miliardi di coppie di basi devono essere replicate ad ogni divisione cellulare, in un periodo di 2-3 ore. Con una velocità di circa 100.000 bp/sec. Avvengono casualmente degli errori

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

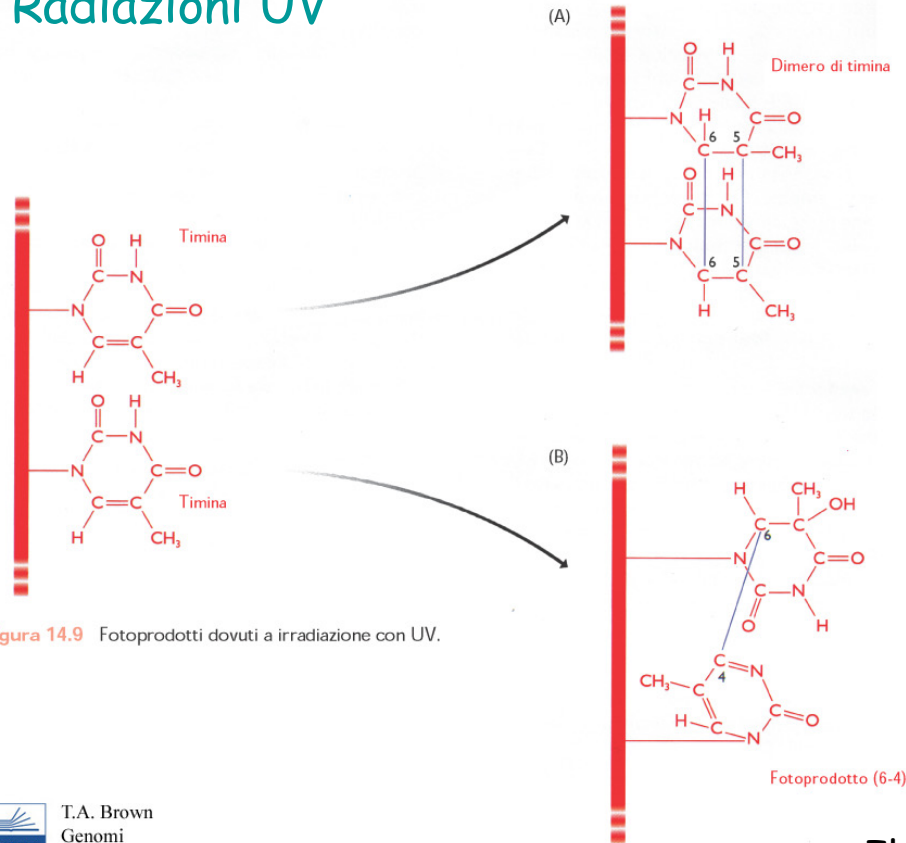
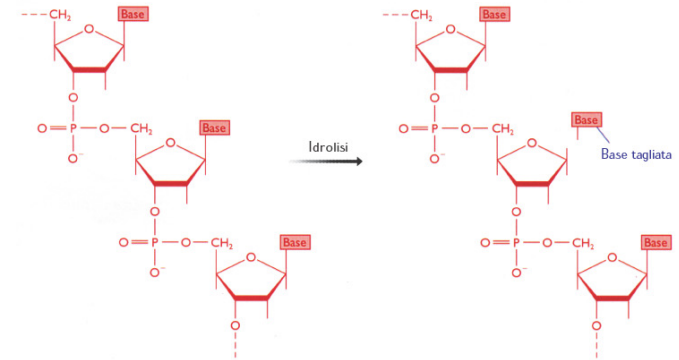


Figura 14.9 Fotoprodotto dovuti a irradiazione con UV.

Calore

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



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

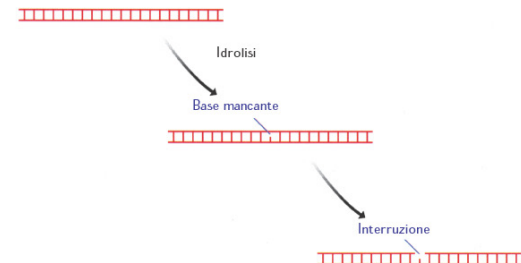


Figura 14.10 Effetto mutageno del calore.

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".

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 | 6×10^{-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

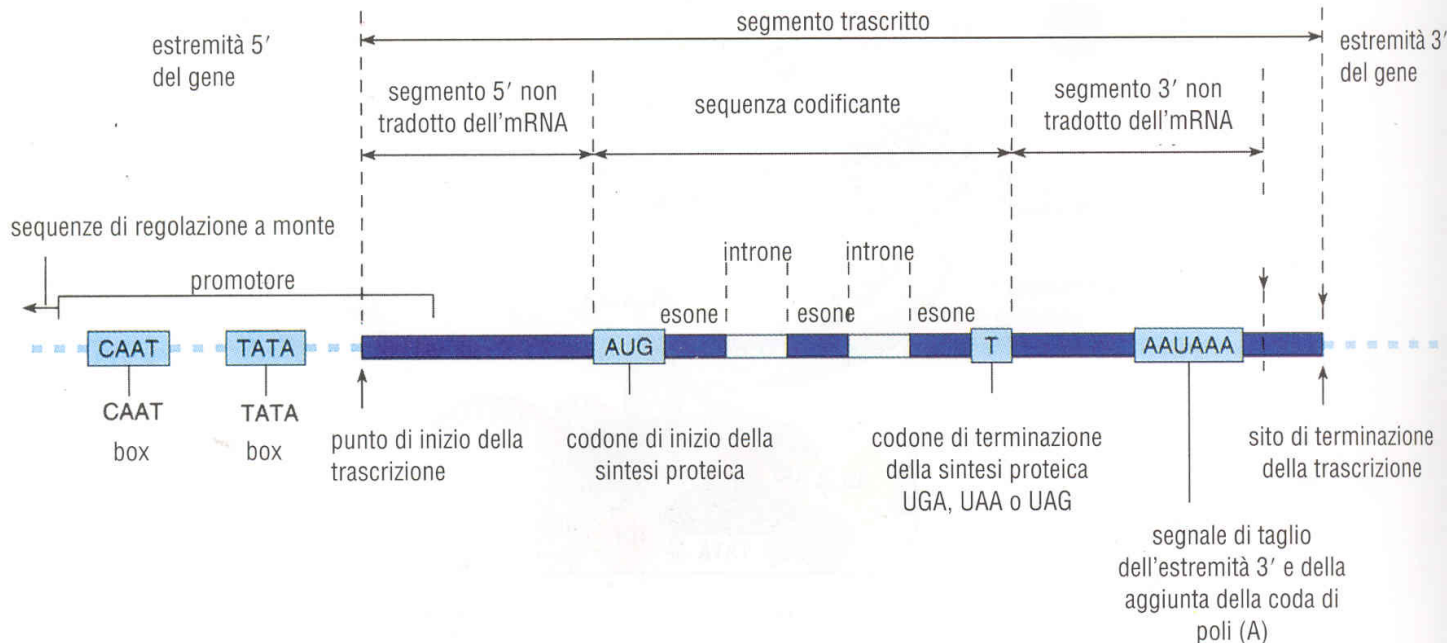
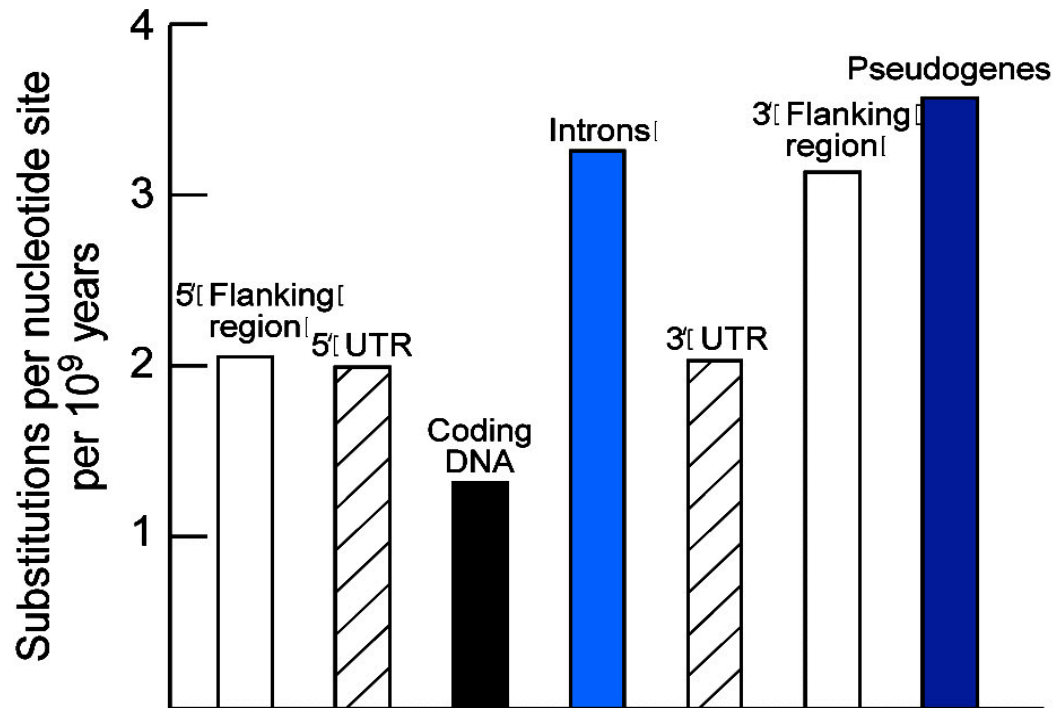


FIGURA 6.15

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

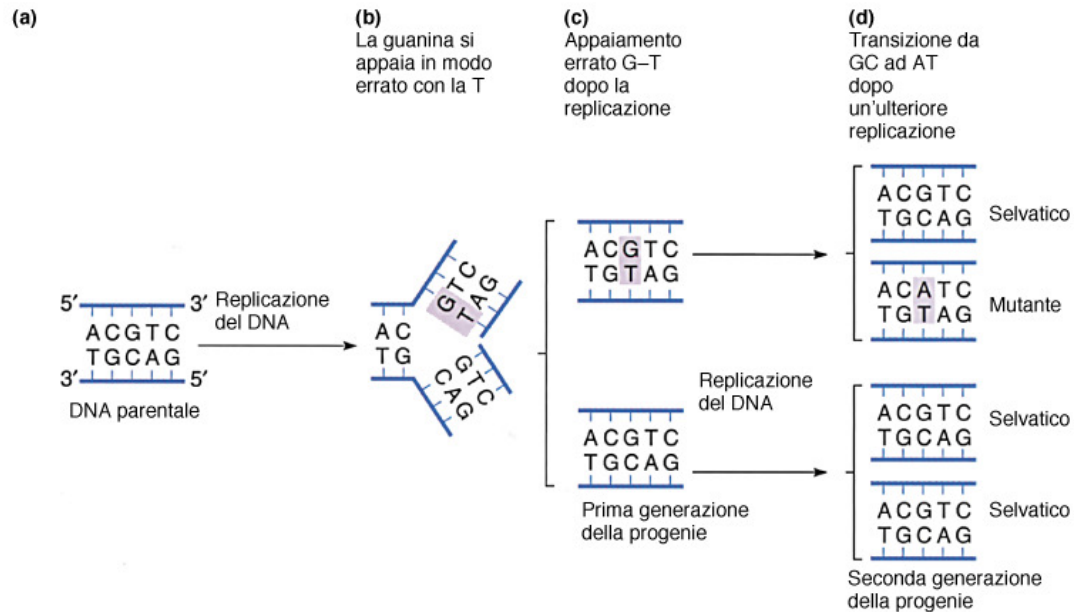
BASI MOLECOLARI DELLE MUTAZIONI SPONTANEE:

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.



Effetti delle mutazioni puntiformi nella regione codificante di un gene.

Le sostituzioni di basi possono essere raggruppate in 3 classi in base alla capacità codificante:

- **MUTAZIONI SINONIME** (silenti) non modificano la sequenza del prodotto genico. Sono le mutazioni più frequenti
- **MUTAZIONI MISSENSO** modificano la sequenza del prodotto genico; possono avere un effetto negativo, un effetto positivo oppure non avere alcun effetto:

conservative -> cambiamento di un aa con uno chimicamente simile

non conservative -> cambiamento di un aa con uno chimicamente diverso

- **MUTAZIONI NON SENSO** sostituzione di un codone che specifica per un aa con un codone di terminazione. Mutazioni rare

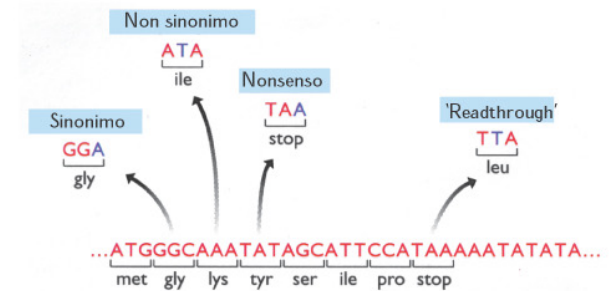
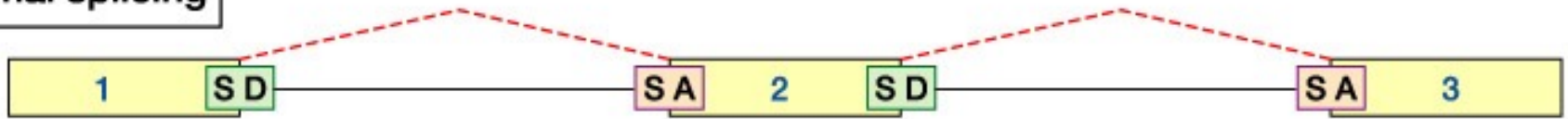


Figura 14.11 Effetti delle mutazioni puntiformi nella regione codificante di un gene.

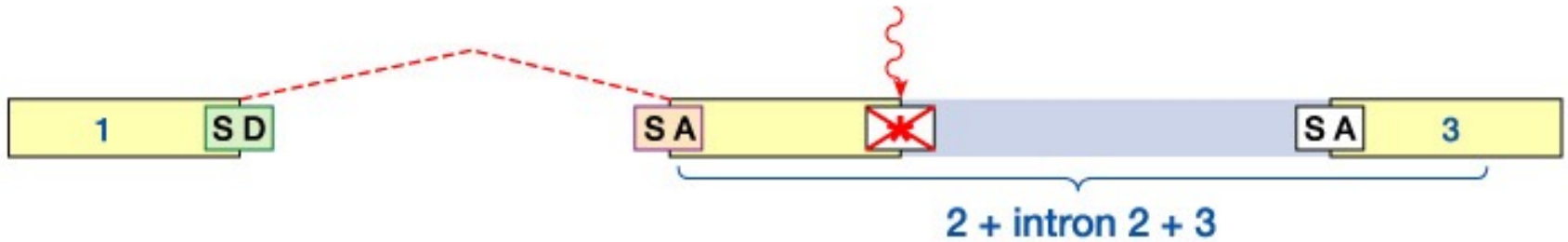
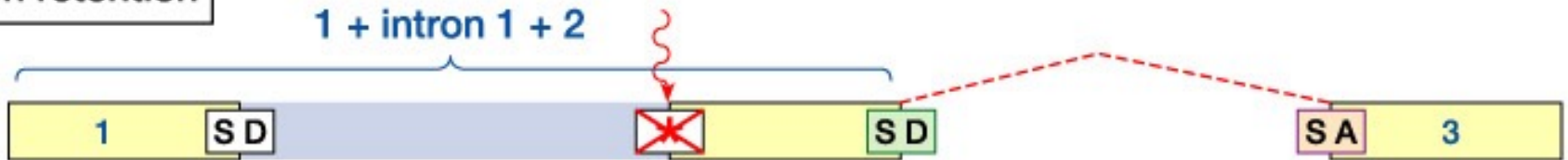
(A)

Mutazioni nel sito di splicing

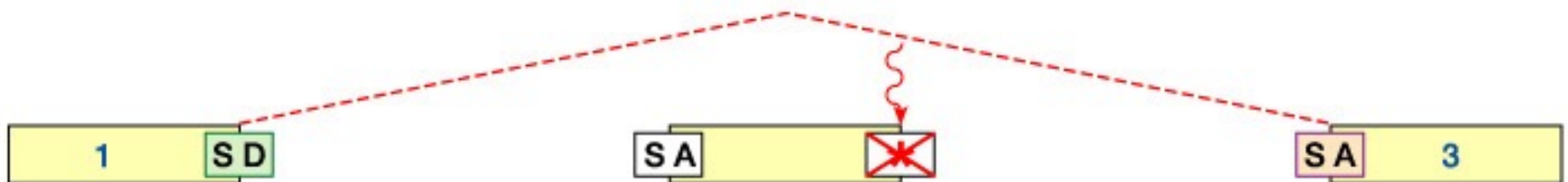
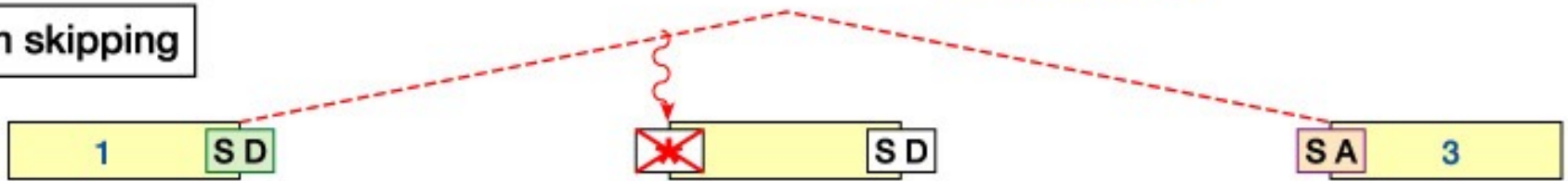
Normal splicing



Intron retention



Exon skipping



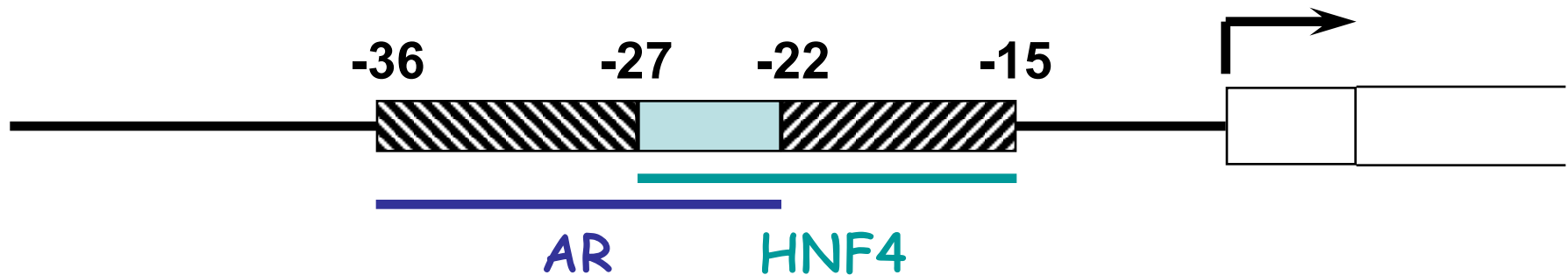
Mutazioni nei siti di regolazione

Il gene del fattore IX

- localizzato sul cromosoma X
- la regione trascritta è >32,700 bp, con 8 esoni

Il promotore del gene del fattore IX

- ci sono due siti di legame sovrapposti: per AR e per HNF4



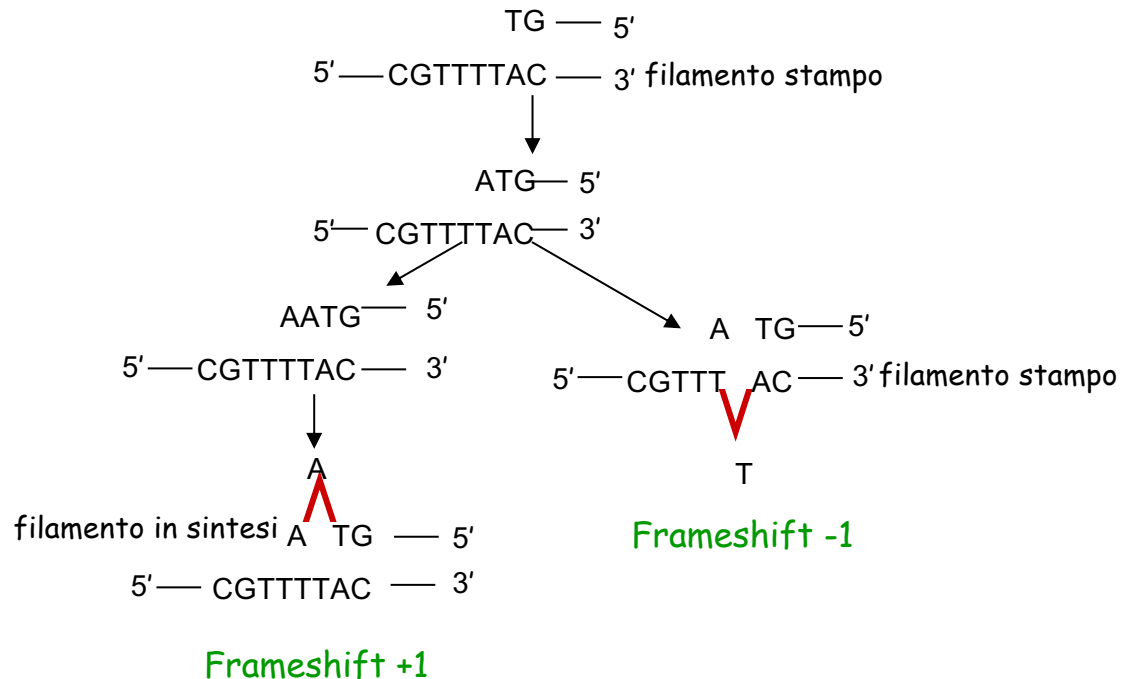
- AR = androgen receptor
 - fattore di trascrizione appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari per "zinc finger"
 - lega l'androgeno
 - i livelli di androgeno aumentano alla pubertà
- HNF4 = hepatocyte nuclear factor 4
 - fattore di trascrizione appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari per "zinc finger"
 - HNF4 è espresso precocemente nello sviluppo e nel fegato adulto

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.



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) _n |
| •Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) | codificante | (CAG) _n |
| •Machado-Joseph's disease | codificante | (CAG) _n |
| •Kennedy's disease (SBMA) | codificante | (CAG) _n |
| •Dentatorubral-pallidoluysian | codificante | (CAG) _n |
| <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) _n |
| •Myotonic dystrophy | 3' UTR | (CTG) _n |

Brevi inserzioni o delezioni, trovate in alcuni geni malattia

GENE

CFTR
TYR
HEXA

CFTR
CFTR
APC
 β HB
HPRT

α 1 AT
 β HB
 β HB

MALATTIA

brevi ripetizioni:

fibrosi cistica
albinismo
morbo di Tay-Sachs

sequenze rip. dirette:

fibrosi cistica
fibrosi cistica
poliposi familiare del colon
 β talassemia
deficienza di HPRT

palindromi:

deficienza di α 1 antitripsina
 β talassemia
 β talassemia

SEQUENZA

GGATATATATatTCAAGA
GAACCCCCcAAGGCTCC
CGTATATCtatcCTTAGG

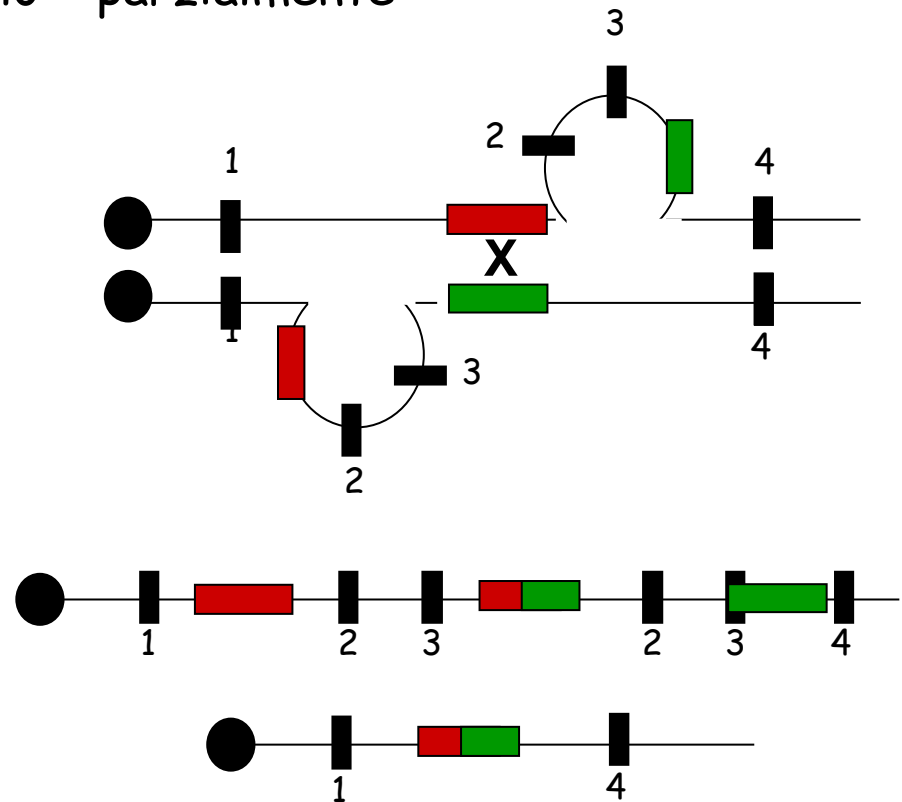
ATCTcttTGGTGTTTCC
AATAtaGATACAGAAG
AATAGatagTCTTCCTT
ggcaaccctaagGTGAAGGCT
GAAGTgttGGATATAA

GCTGACCtcTCCGGGGTC
CCCAGAGGTTctttgagtcCTTTGGGG
TAGTGATggcctgGCTCACCT

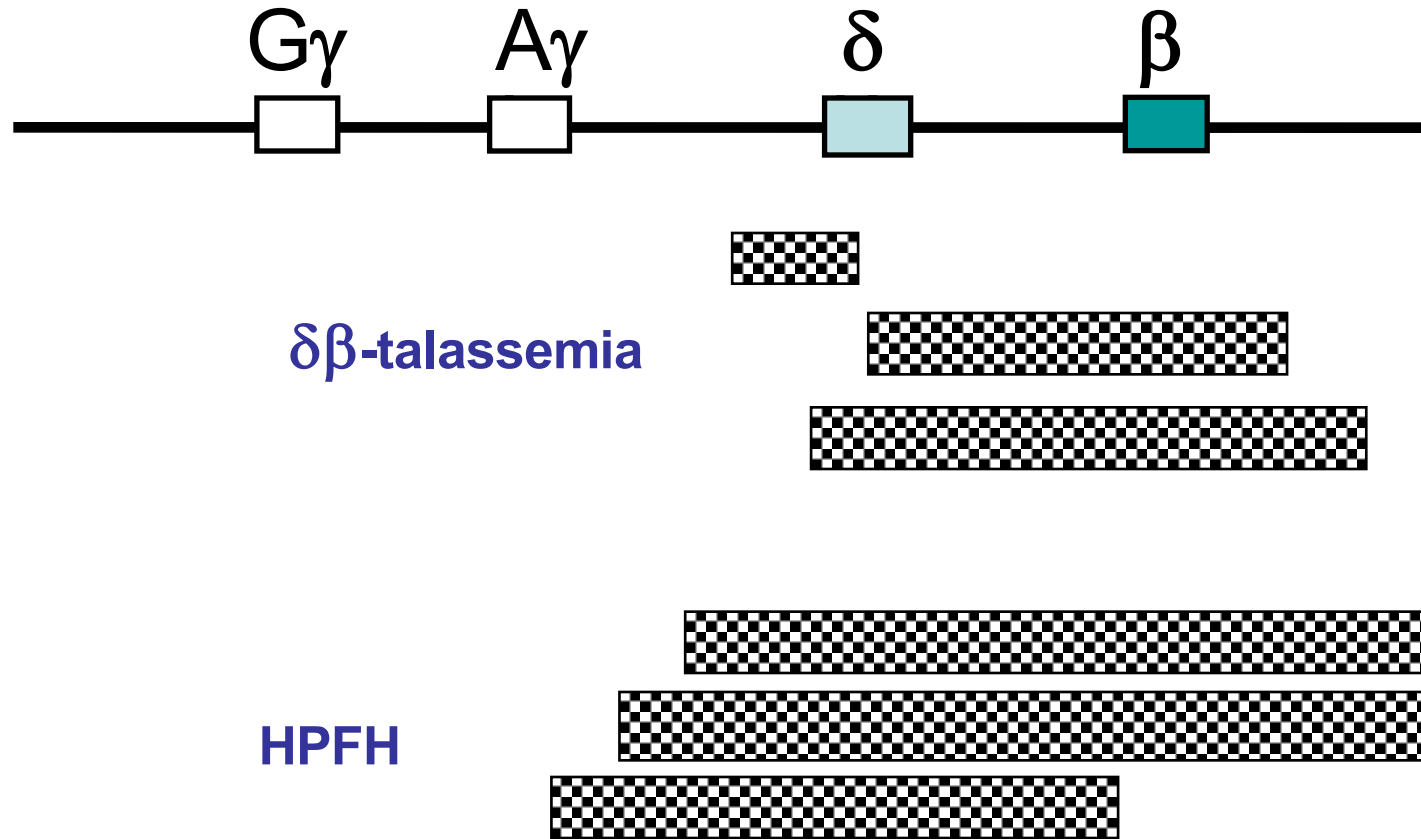
BASI MOLECOLARI DELLE MUTAZIONI SPONTANEE:

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).



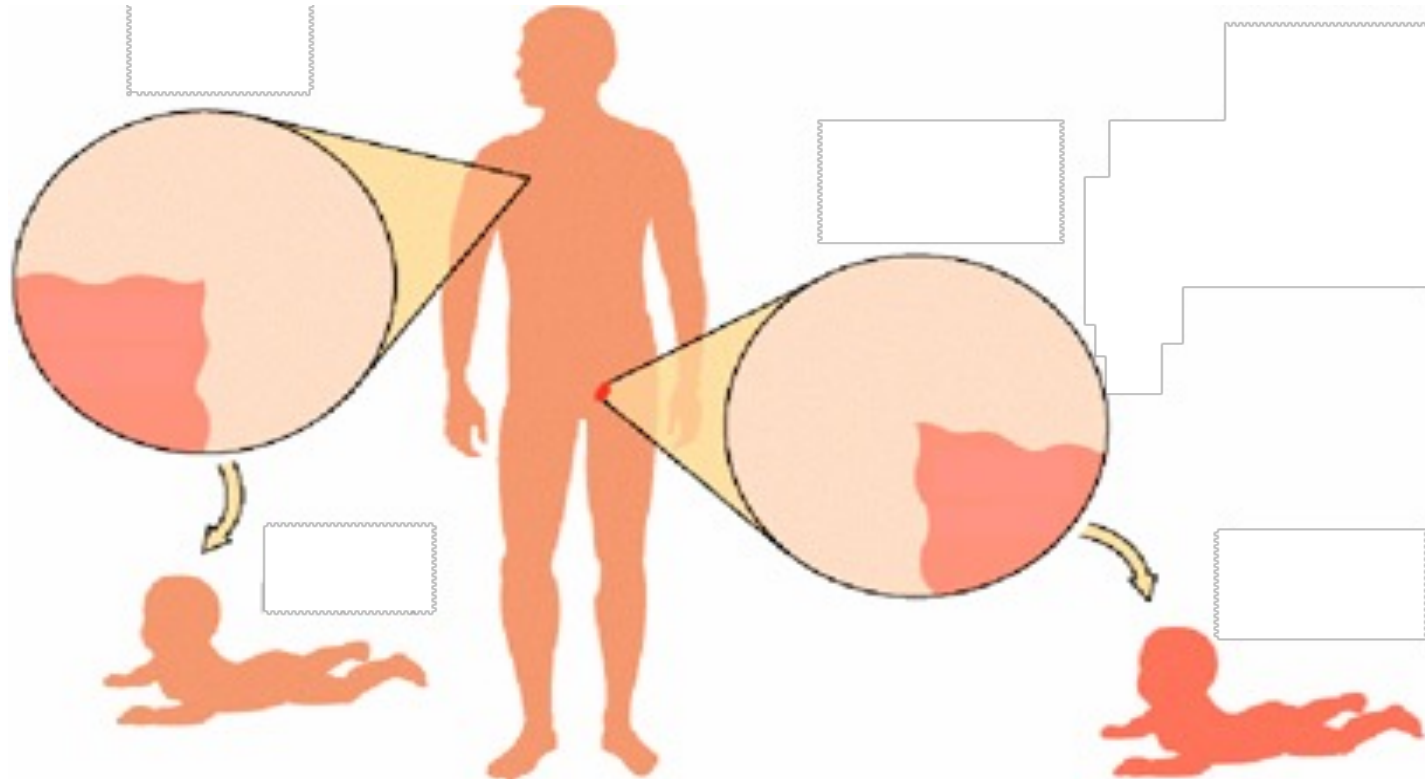
Grandi delezioni



(esempi di grandi delezioni con fenotipo limitato)

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

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

-**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

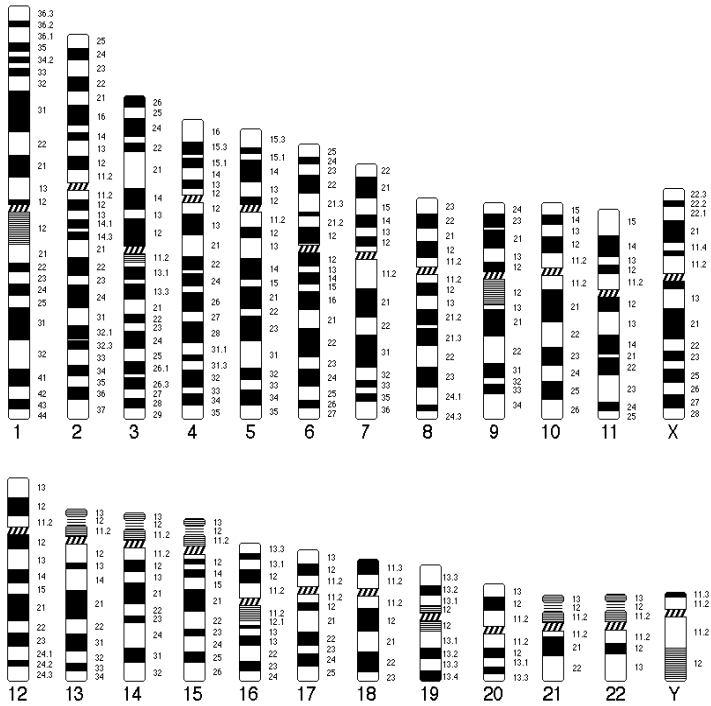
ISCN, International System for human Cytogenetic Nomenclature)

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

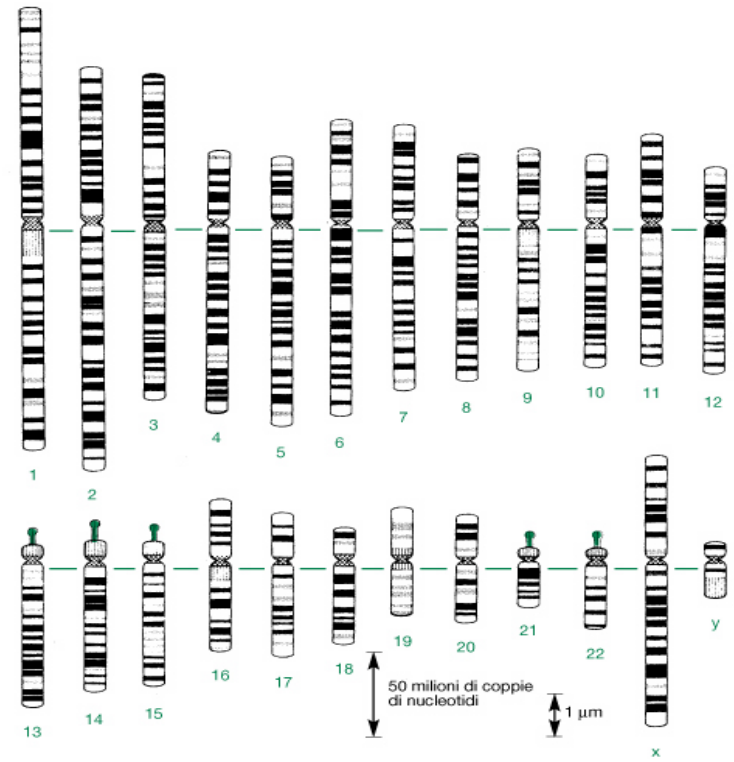
CARIOGRAMMA → rappresentazione 'ordinata' del completo assetto cromosomico mitotico di un individuo, mostrato come coppie di cromosomi omologhi

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)



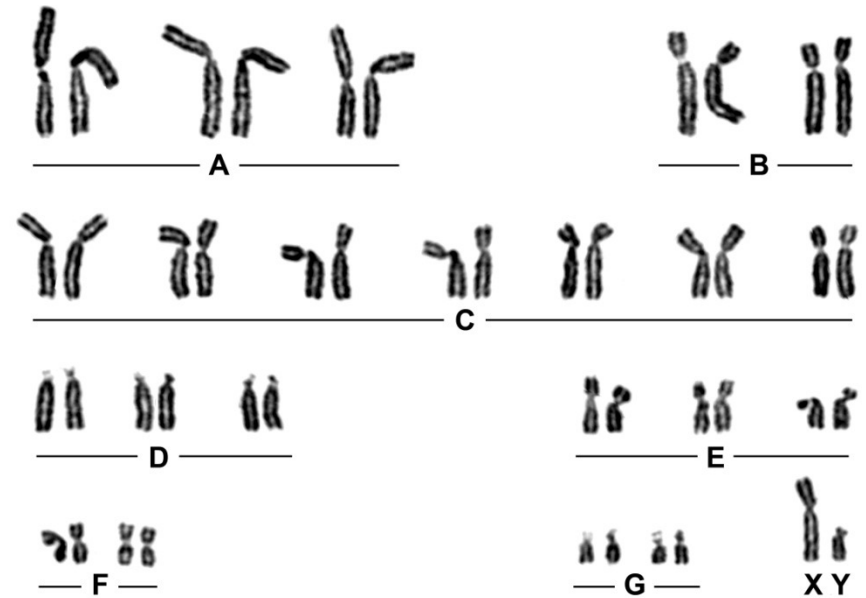
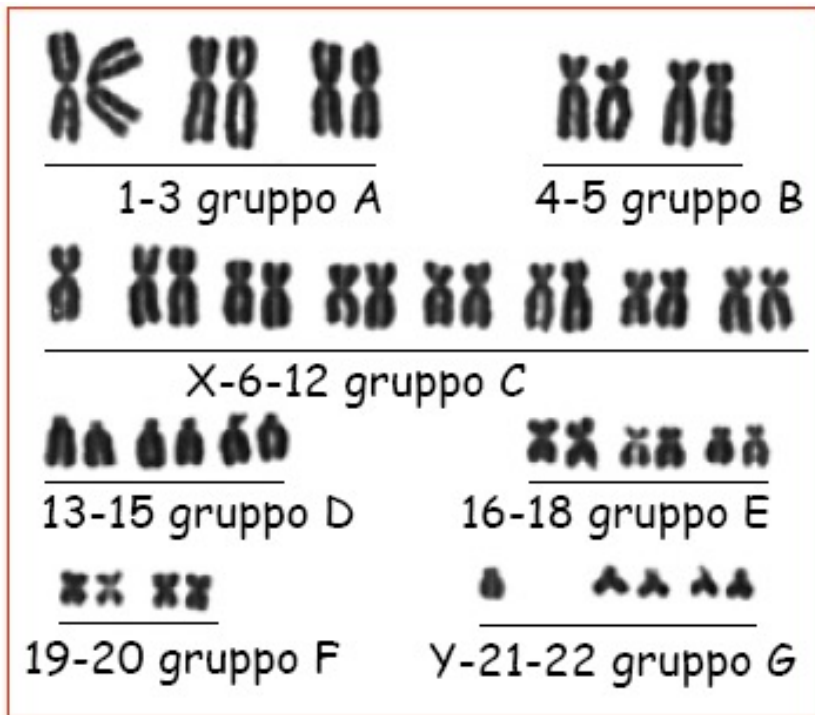
(b)

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:

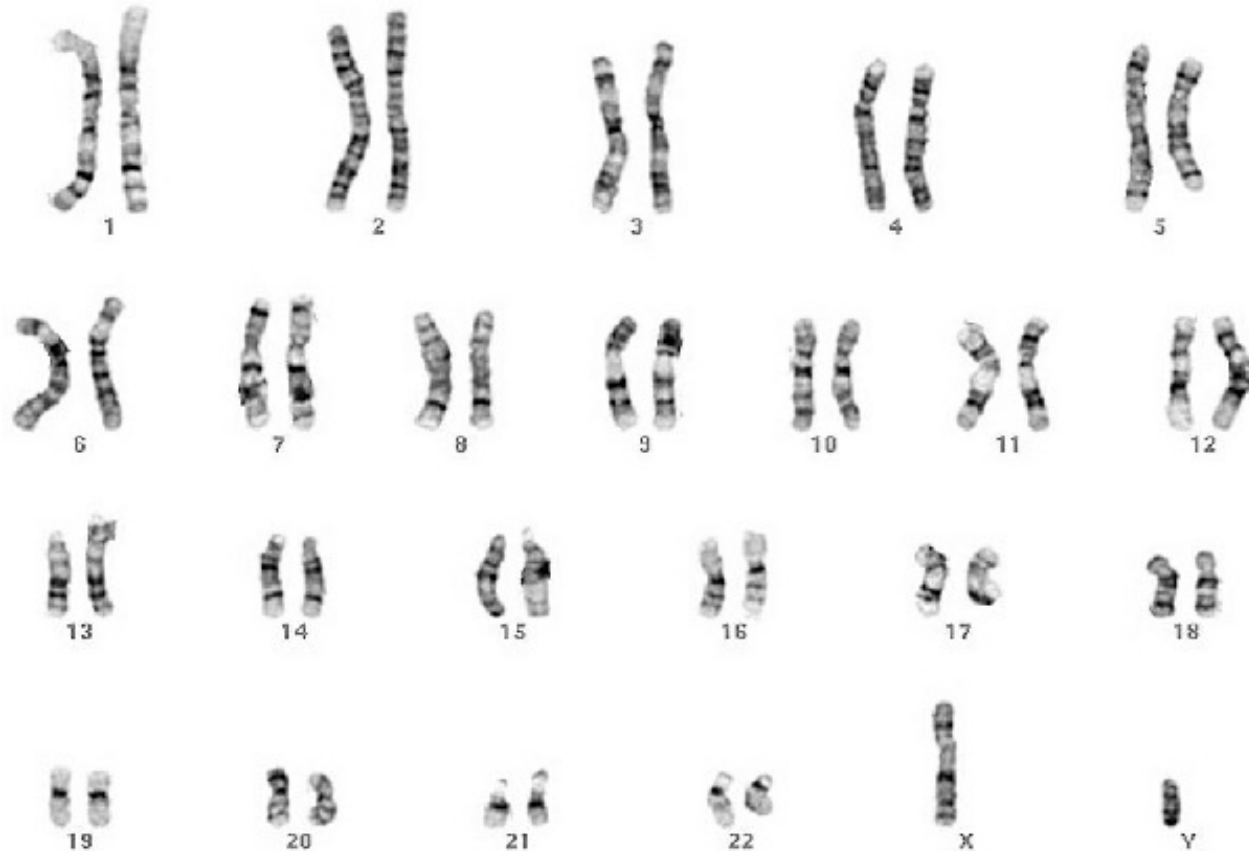
- ricche in GC
- si condensano tardi ma replicano precocemente
- ricche in geni
- povere in LINE, ricche in Alu

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)

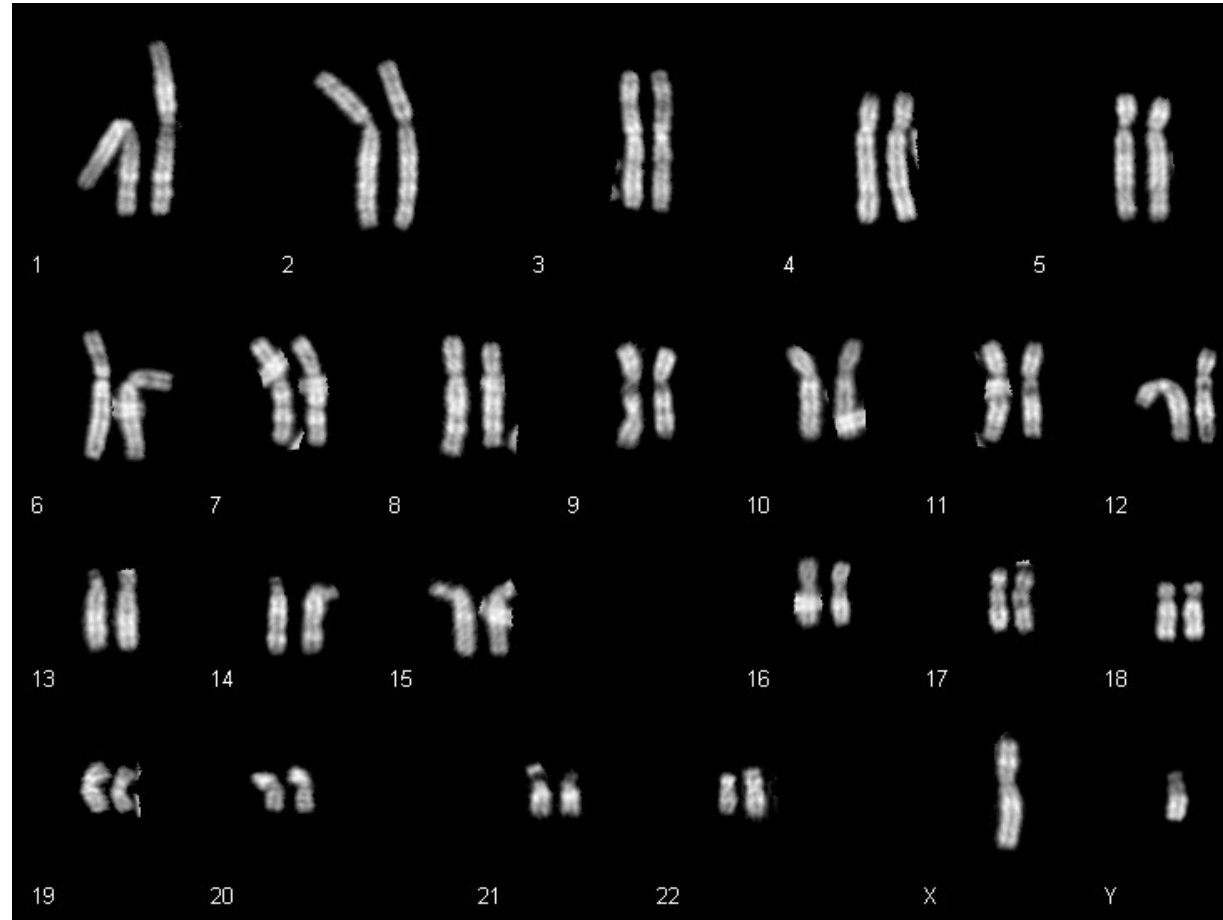
Visione in fluorescenza

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).

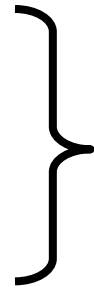
Non: ricche in GC.



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

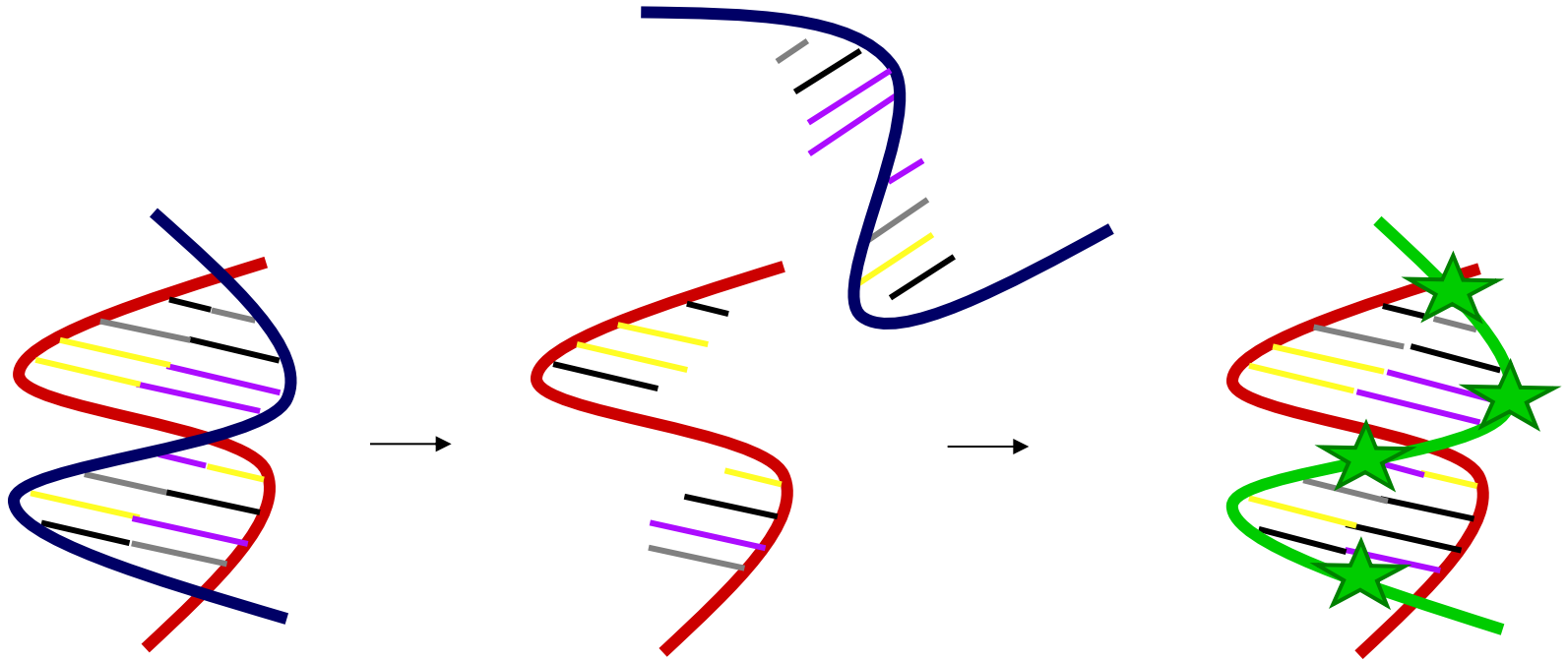
FISH → Fluorescent In Situ Hybridization

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

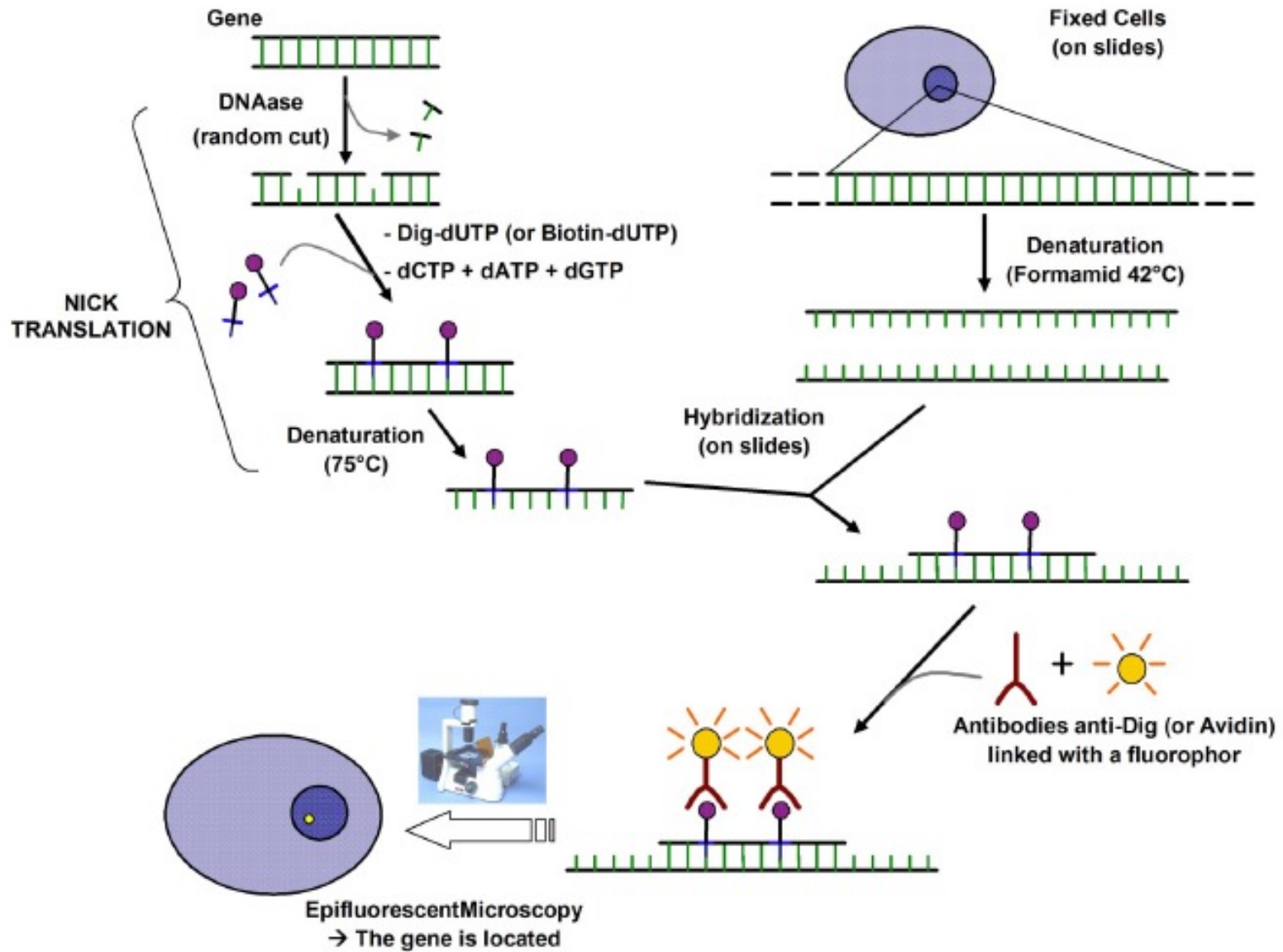
Cariotipo Convenzionale (CC)

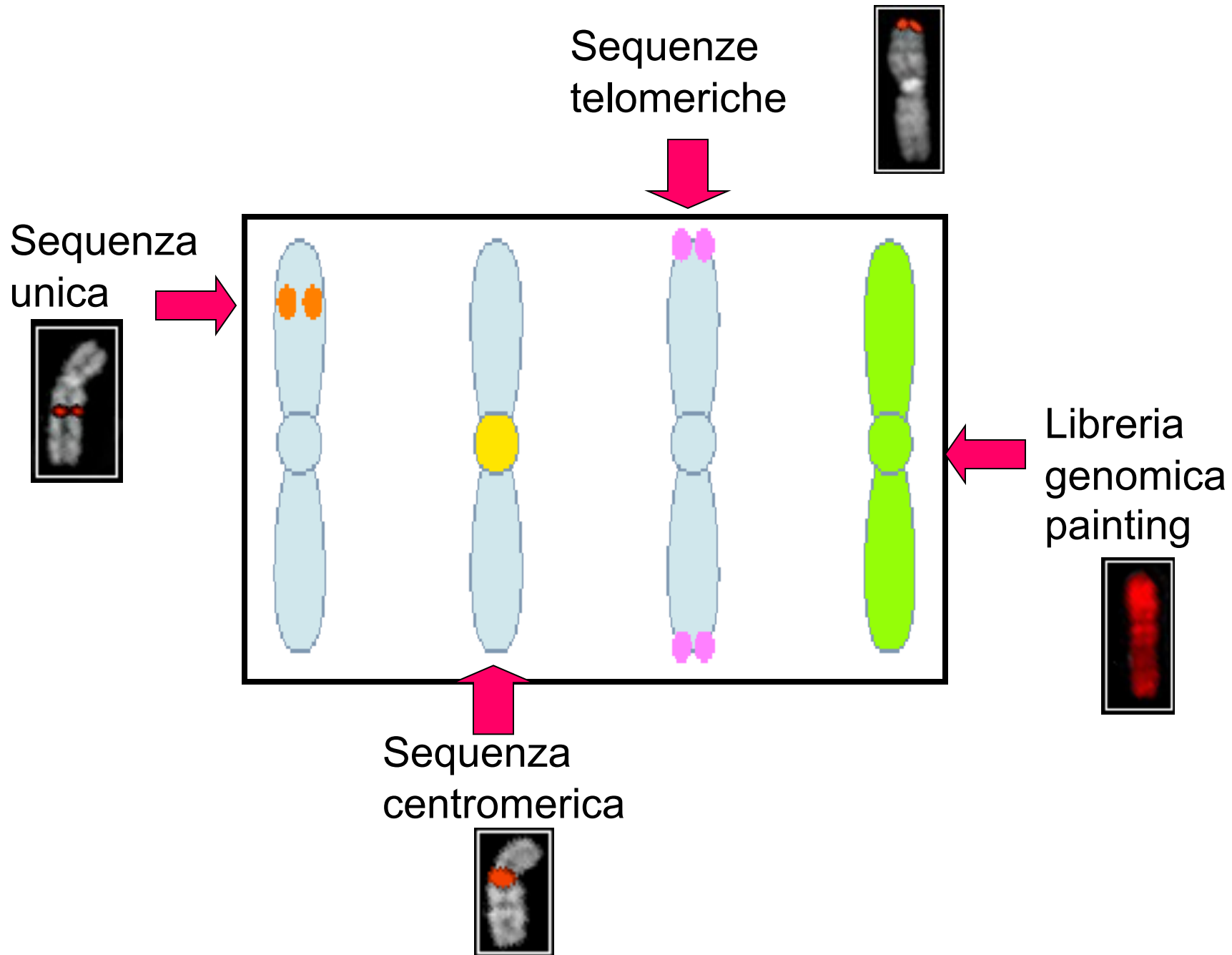


Ibridazione in Situ (FISH)



FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



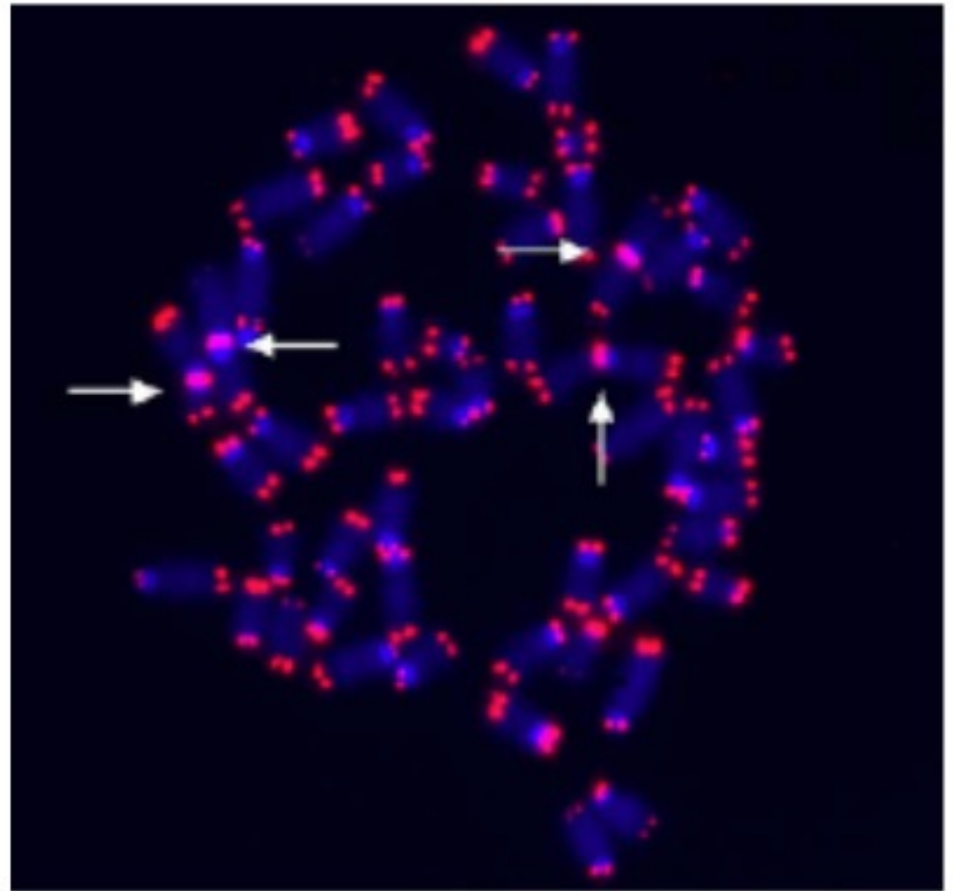


FISH METAFASICA

- **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

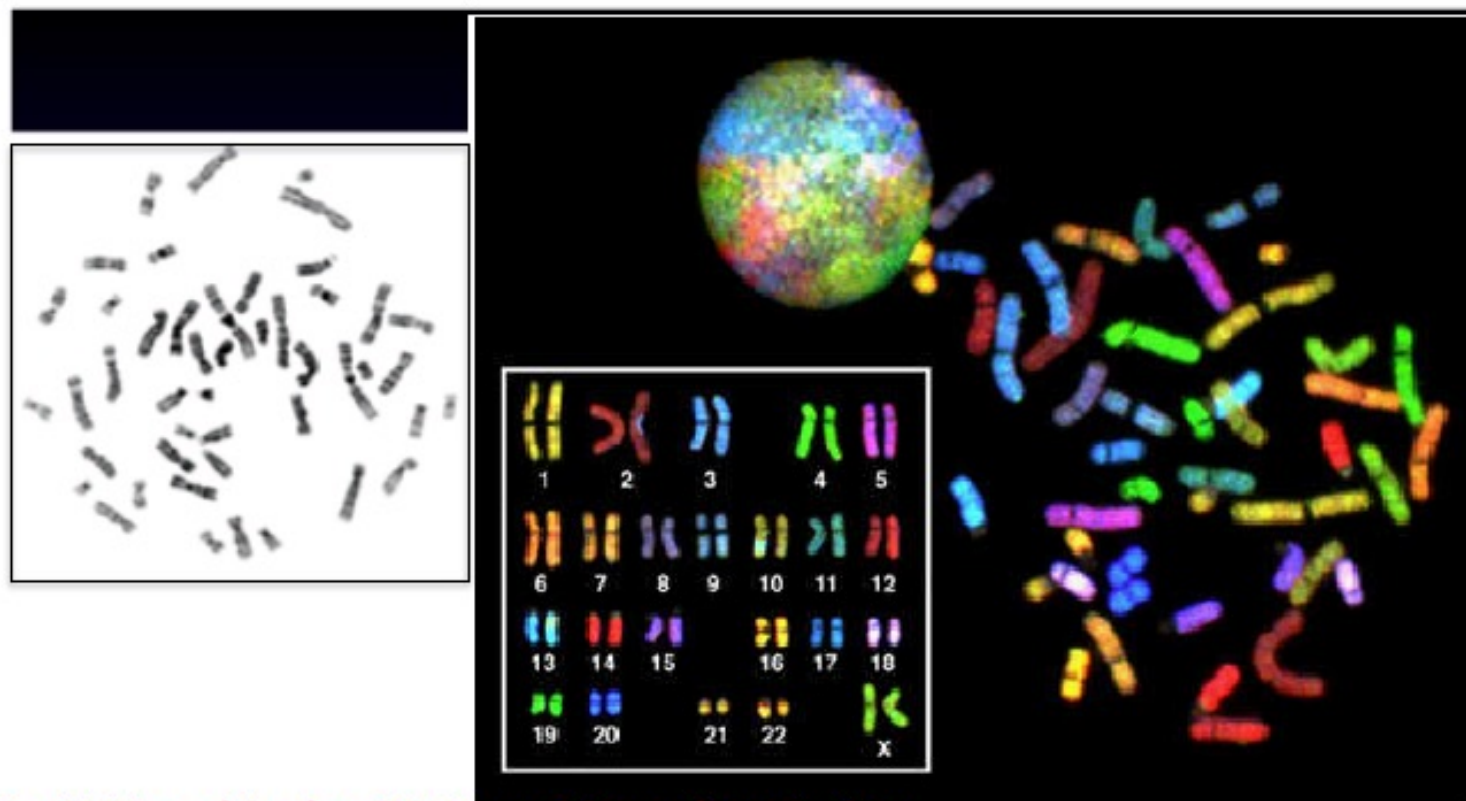


FISH: cromosomi umani marcati con sonde di DNA centromerico cromosoma-specifiche.



FISH: *Mus musculus*, telomeri marcati con sonde di DNA pantelomeriche di topo.

- **M-FISH (Multiplex-FISH)** : uso di 24 sonde painting in fluorescenza per tutti i cromosomi, utile per sensibilità nei cariotipi complessi



M-FISH e SKY: multicolor FISH con 24 sonde painting

Speicher et al 1996; ; Schrock et al1996);

La FISH classica usa cinque differenti fluorofori e la lettura del cariotipo avviene eccitando separatamente le singole lunghezze d'onda.

CGH: Comparative **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

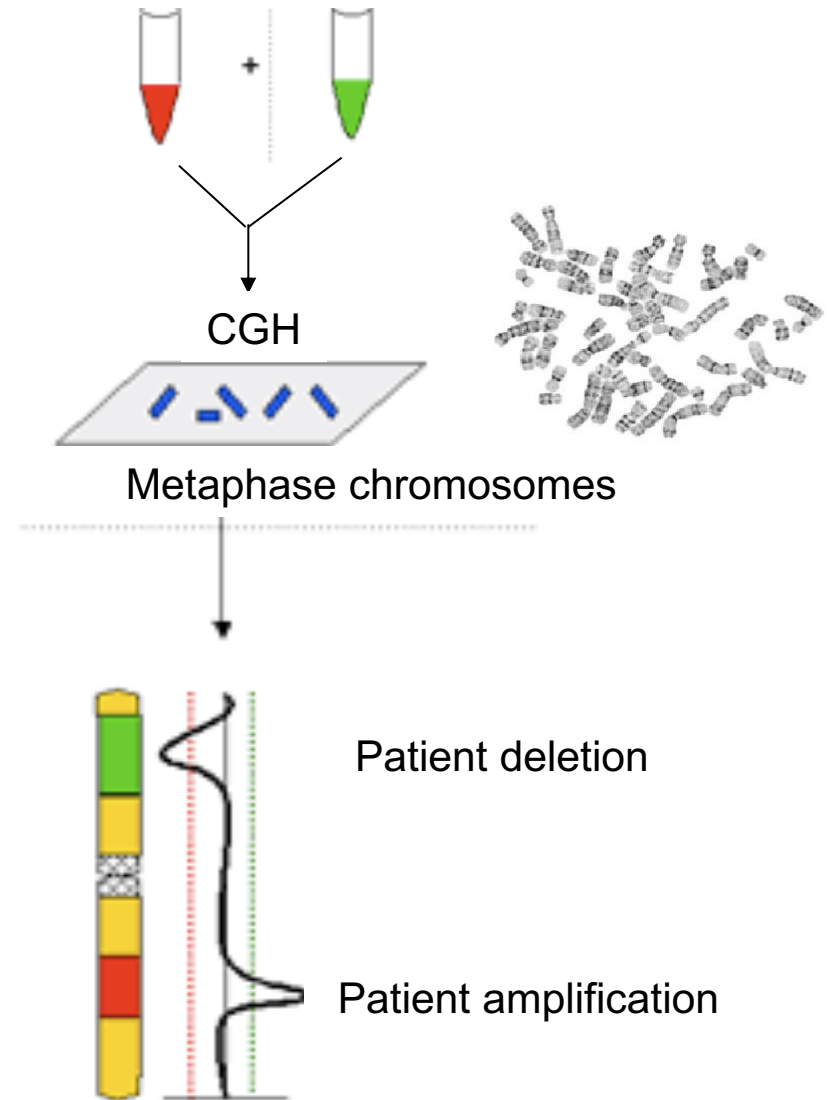
CGH

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**

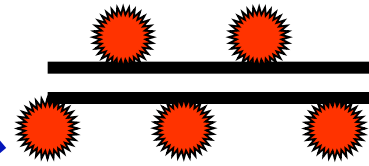
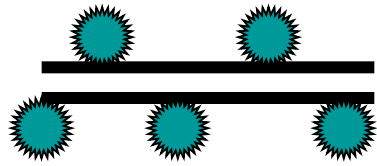
Patients DNA

Reference DNA



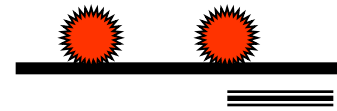
DNA di riferimento (normale)

DNA da testare



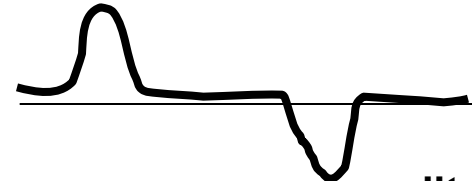
denaturazione

cot-1 DNA



ibridazione

amplificazione

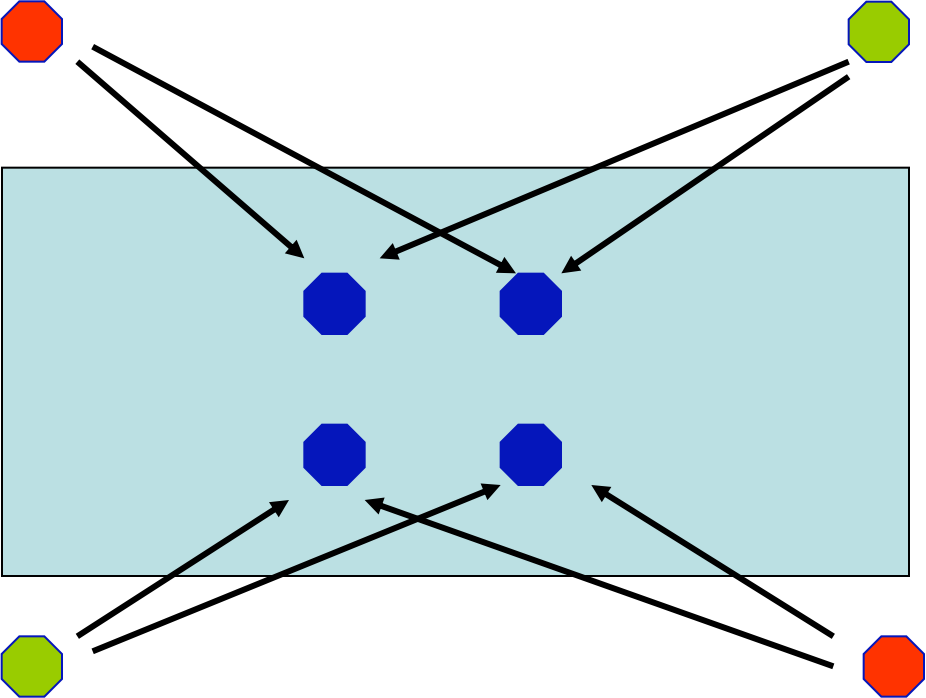


metafasi normali

perdita

DNA da testare

DNA normale



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



DNA test marcato Cy3 (rosso)



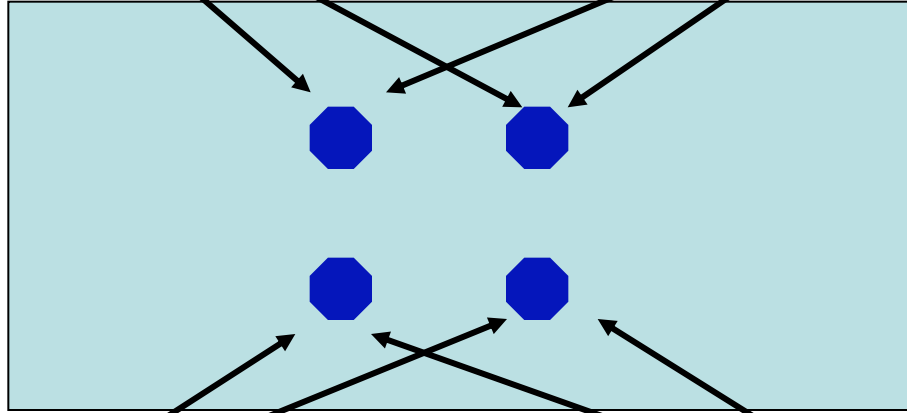
DNA normale marcato Cy5 (verde)

} e viceversa

DNA test



DNA normale

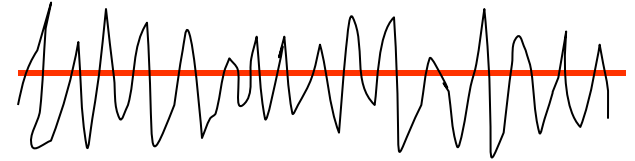
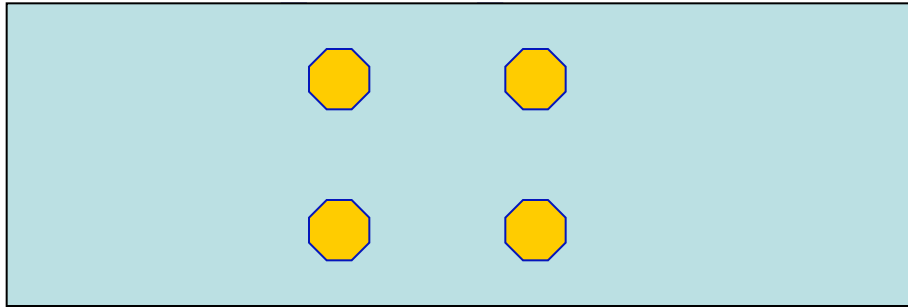


DNA test normale

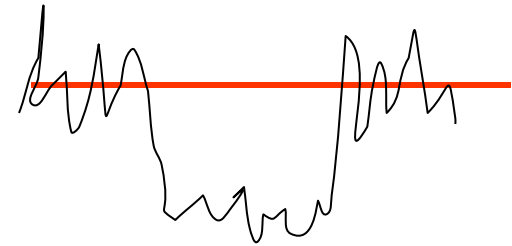
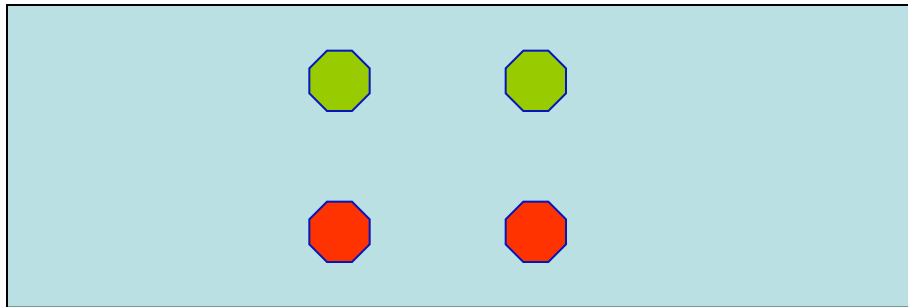
DNA test delecto



DNA test normale



DNA test delecto



Conventional CGH nella diagnosi di tumori

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

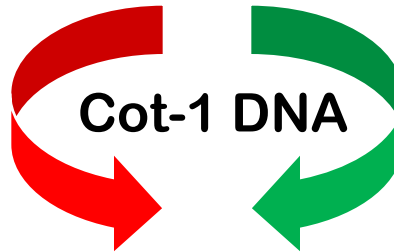
Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D.

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

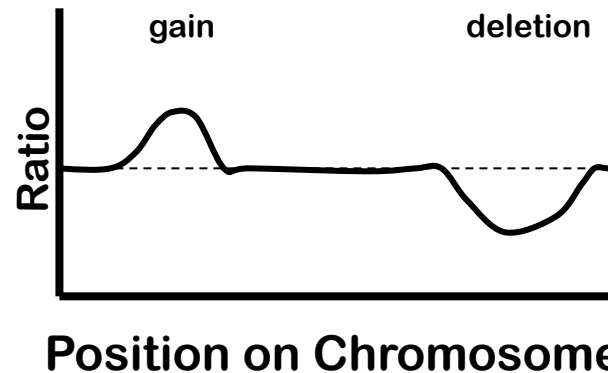
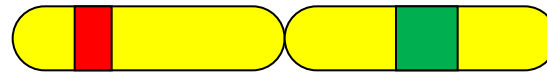
PMID: 1359641 [PubMed - indexed for MEDLINE]

[Related citations](#)

**Test Genomic DNA
(Tumor DNA)**

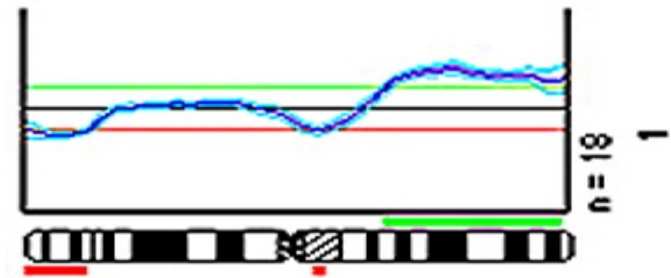
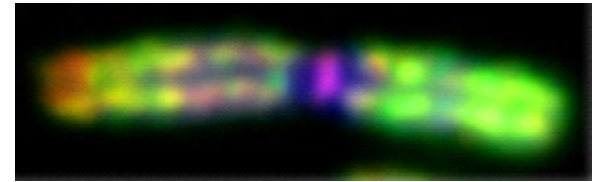
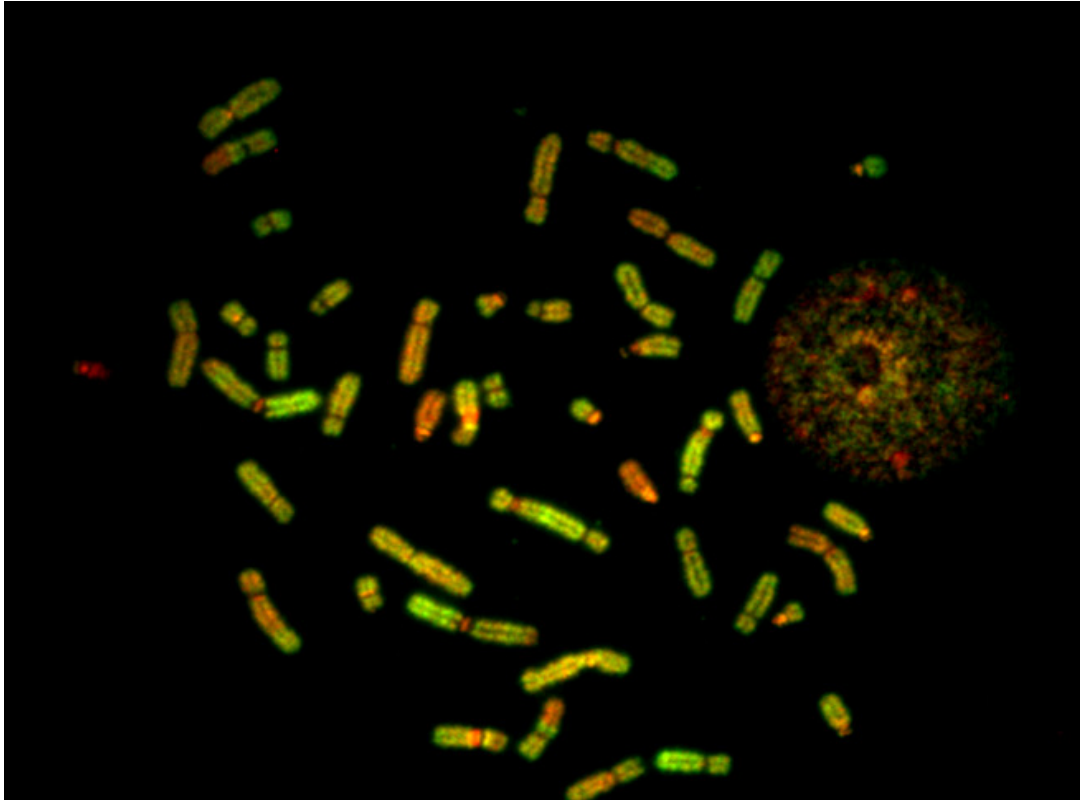


**Reference
Genomic DNA**



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.

Conventional CGH

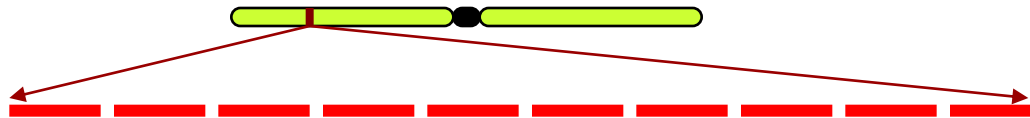


CGH HIGH RESOLUTION

**RISOLUZIONE SOTTO LA DIMENSIONE DELLA
MEGABASE (10^6 coppie di basi)**

CGH On Microarrays

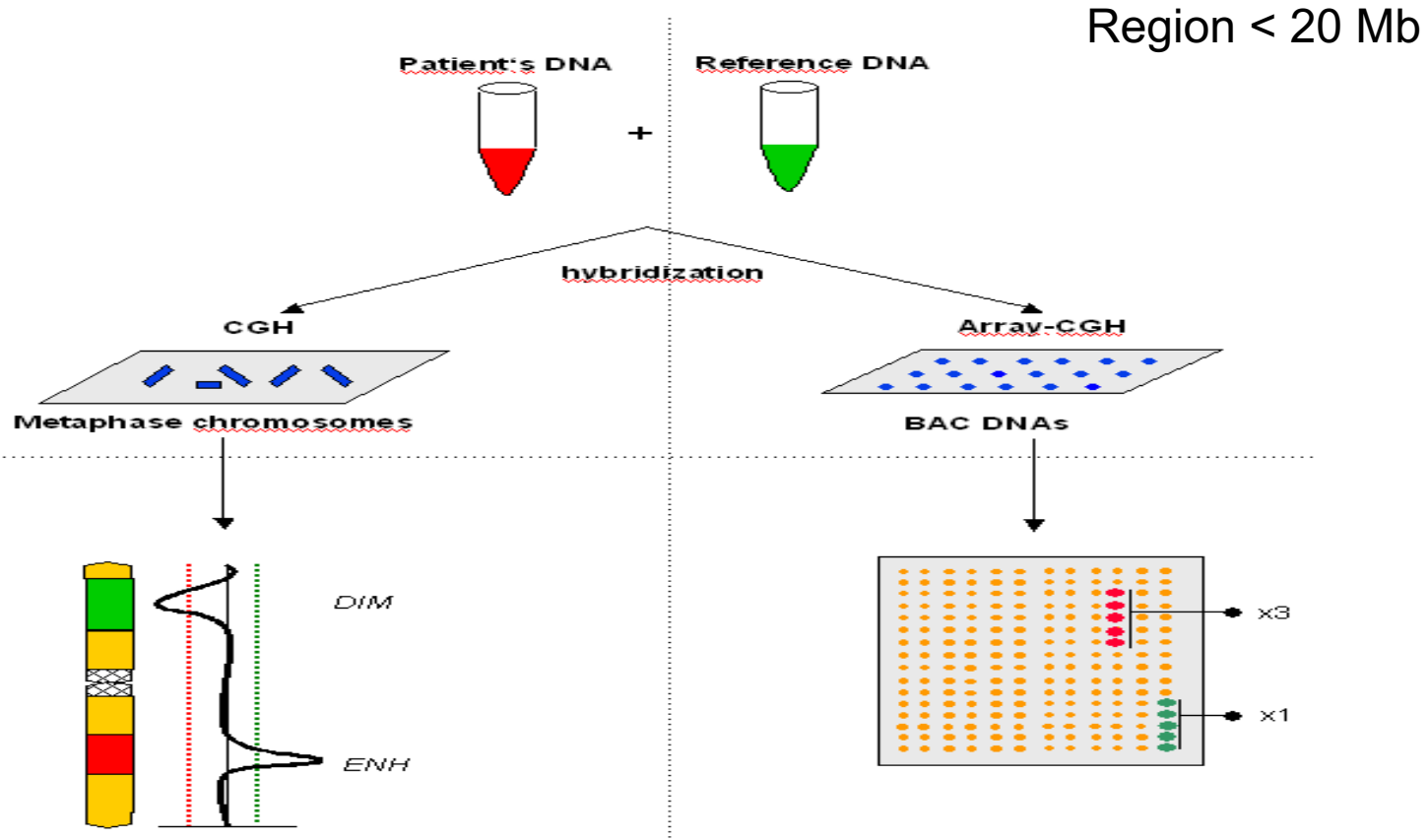
- Resolution of metaphase CGH ~ 3-5 Mb
- Improve resolution by replacing metaphase chromosomes as targets for CGH with spatially separated DNA clones spotted at high density onto glass slides



- Resolution will be dependent on clone size and density

CGH and array CGH

- DNA from a tumor sample and reference sample are labelled differently, the mix is hybridized to normal metaphase chromosomes for CGH or a slide containing thousands of probes for aCGH.
- The color ratio is used to evaluate regions of DNA gain or loss in the subject sample.
- aCGH gives a higher resolution level than CGH



ANOMALIE CROMOSOMICHE

Si indicano tutte le alterazioni che riguardano il NUMERO o la STRUTTURA dei cromosomi

Incidenza: 0,9% dei nati vivi

Responsabili di almeno il 50% di aborti spontanei e sono un'importante causa di malformazioni

Almeno il 10% di tutti i prodotti del concepimento dell'uomo ha un'alterazione cromosomica.

Si stima che 1 neonato su 170 presenti un'anomalia cromosomica

MUTAZIONI CROMOSOMICHE = cambiamenti che producono un'alterazione visibile dei cromosomi

- **alterazioni del numero**

(poliploidie, monosomie, trisomie)

- **alterazioni della struttura**

(inversioni, delezioni, duplicazioni, traslocazioni)

Anomalie Cromosomiche

- **numeriche**

- trisomie (cromosoma aggiuntivo)
- monosomie (perdita di un cromosoma)
- poliploidie (multipli di 23 crom. aggiuntivi)
- ESAC (cromos. anomalo sovranumerario)

Anomalie cromosomiche di numero
Cambiamenti nel numero normale di cromosomi

46

2n

Poliploidie

Triploidie 3n
Tetraploidie 4n
ecc

Aneuploidie

Perdita o guadagno di uno
specifico cromosoma

Trisomia 21: 47, +21
Monosomia X: 45, X

Mixoploidie

Mosaico

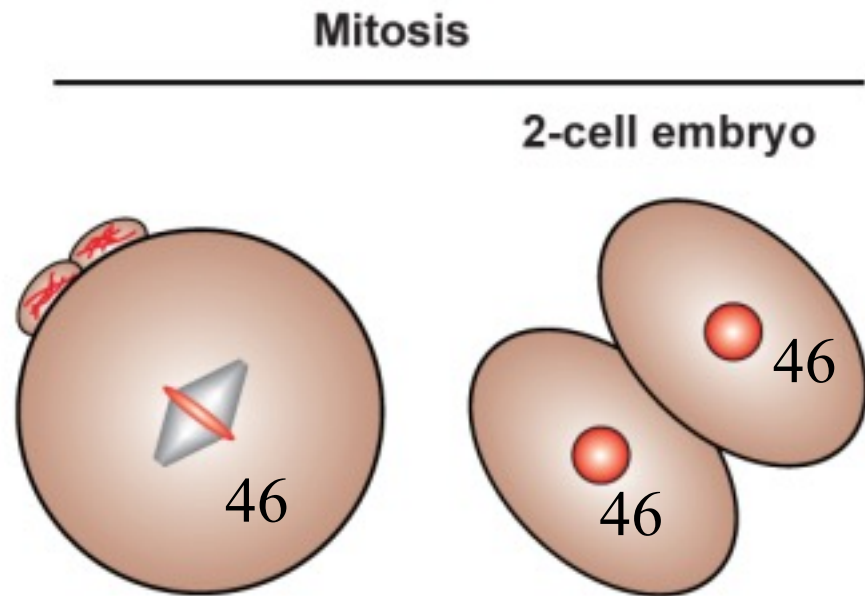
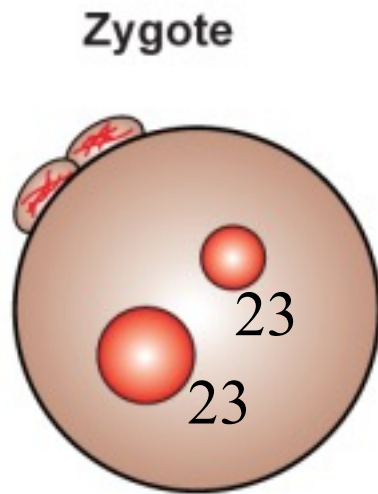
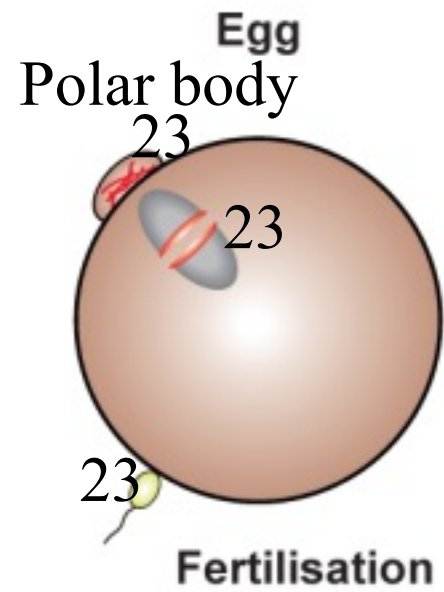
Linee cellulari
diverse di un
singolo zigote

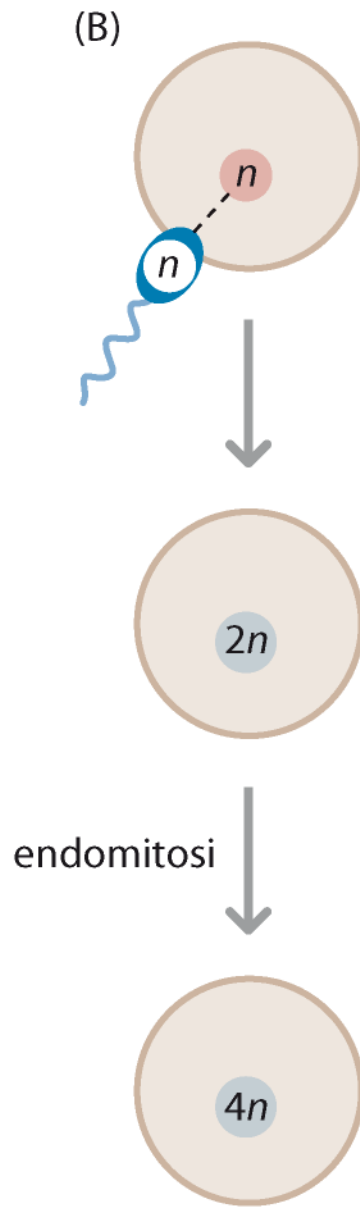
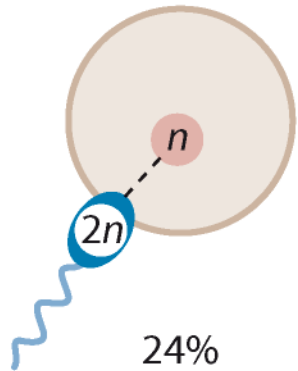
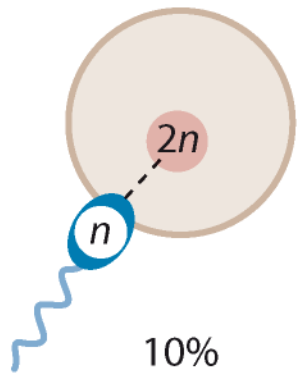
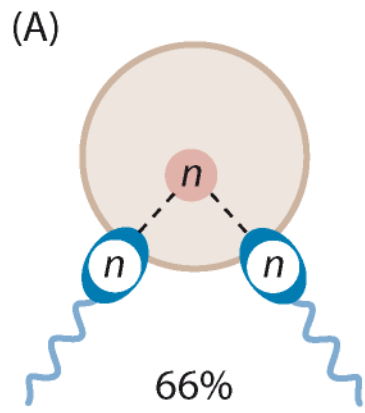
Chimera

Linee cellulari
diverse provenienti
da zigoti diversi in
un solo individuo

Mosaico poliploide
2n/3n

Mosaico aneuploide
46/47
46/45

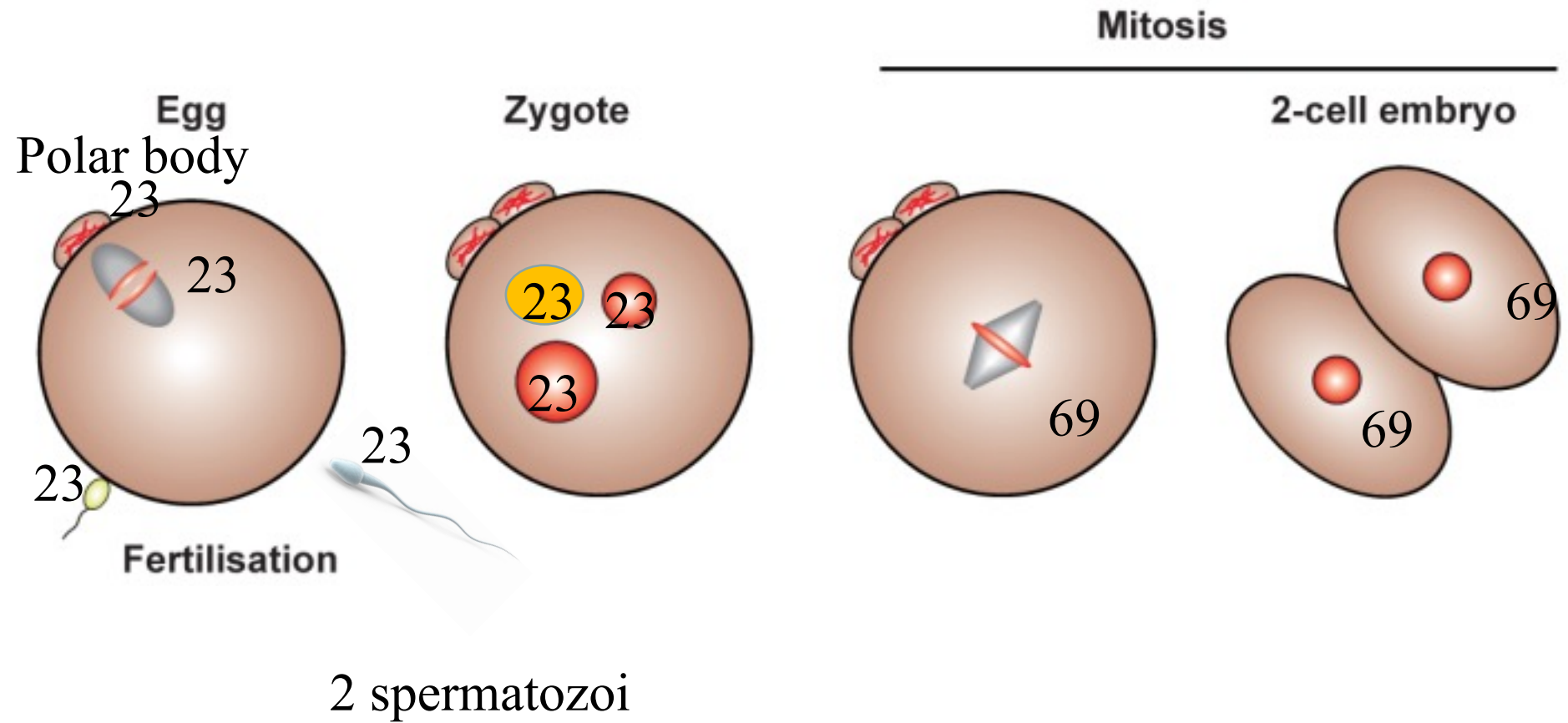




Origine delle
poliploidie

Triploidie

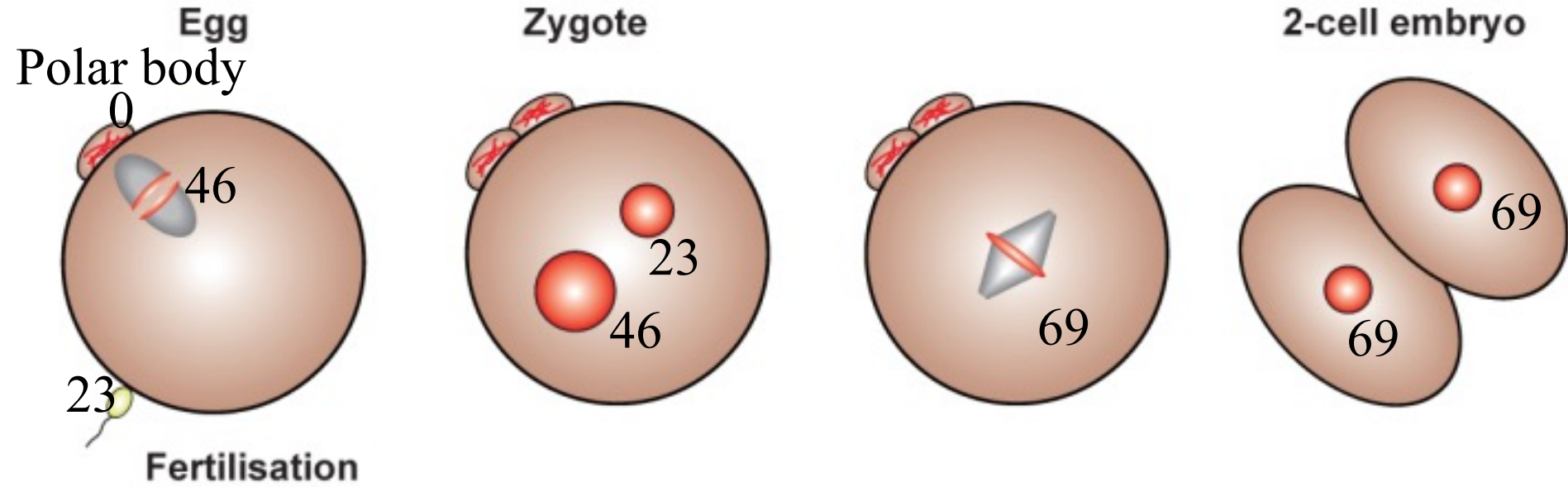
Caso 1



Caso 2

Segregazione aberrante nelle II meiosi

Mitosis

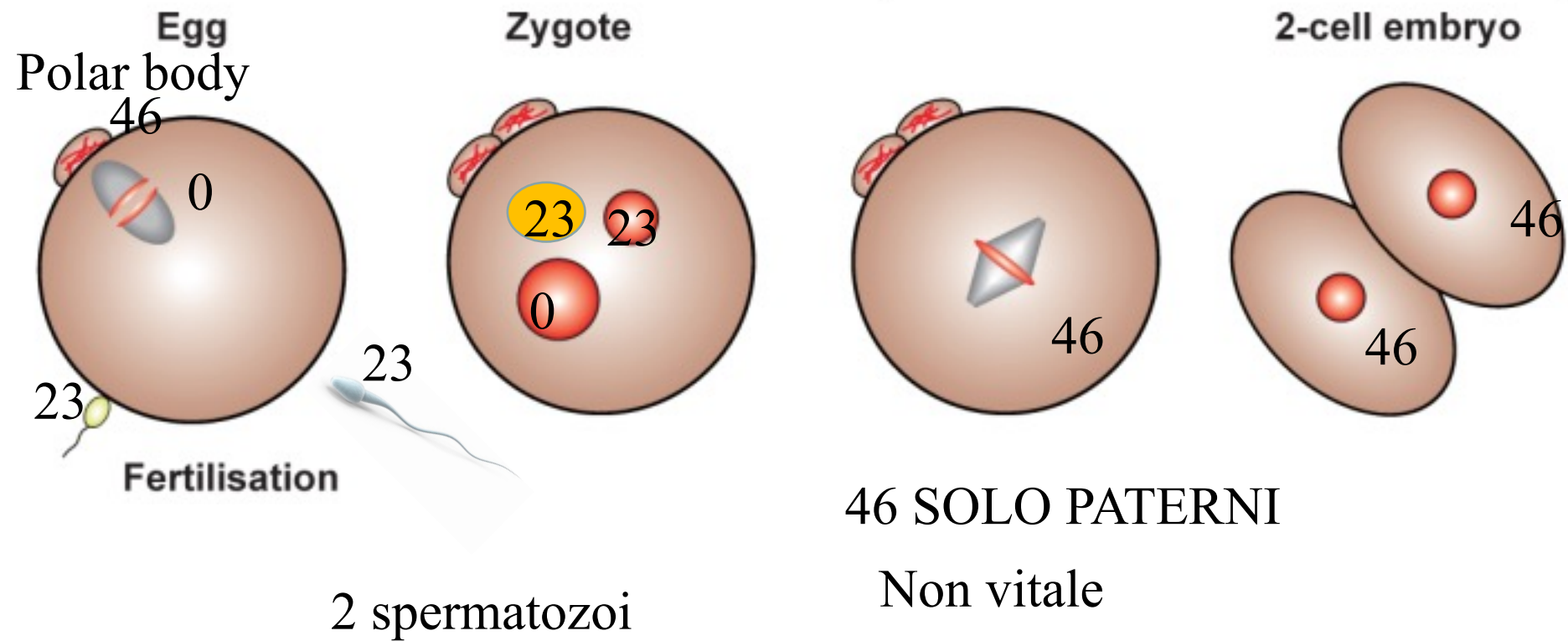


Diploidia uniparentale

Caso 1

Segregazione aberrante nelle II meiosi

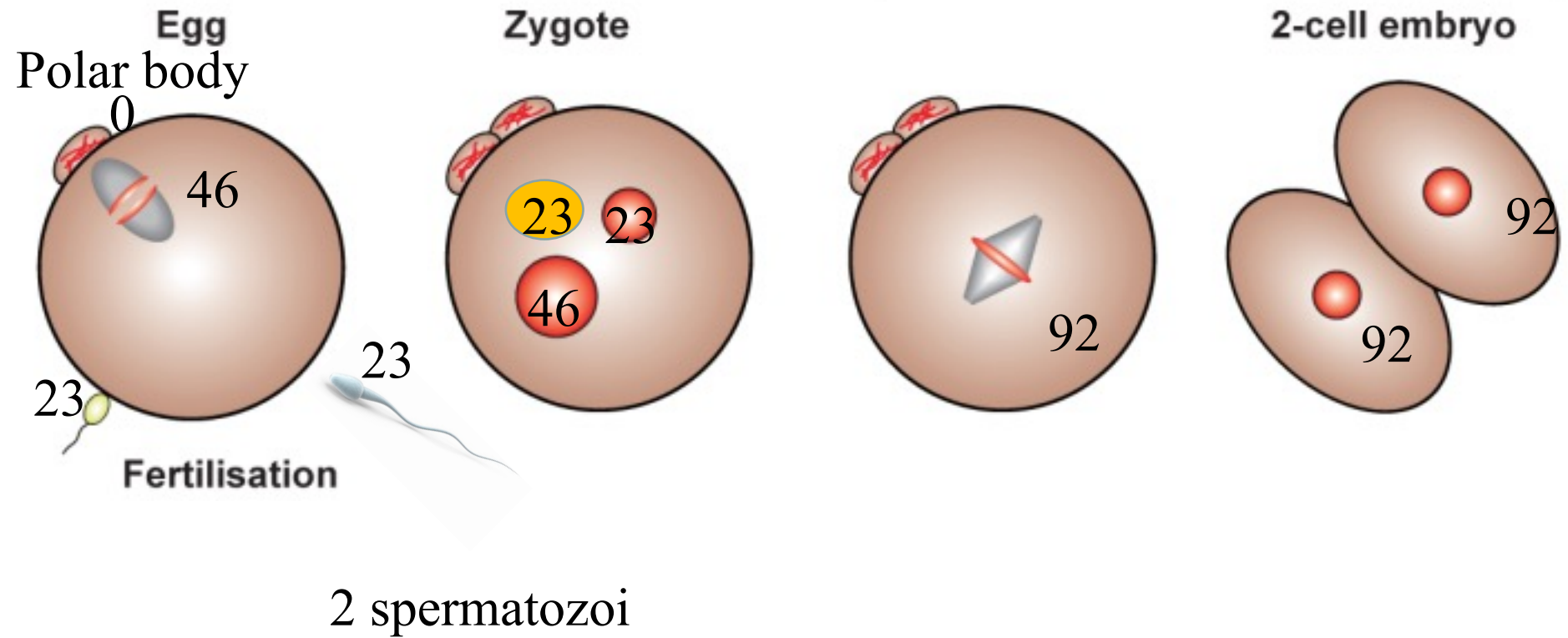
Mitosis



TETRAPLOIDIE

Segregazione aberrante nelle II meiosi

Mitosis



Monosomie e trisomie

46, XX cariotipo normale femminile

46, XY cariotipo normale maschile

Anomalie di numero 45, X
 47, XX +21
 47, XXX

- lo sbilancio di interi cromosomi risulta quasi sempre non vitale

- in molti organismi la non-disgiunzione meiotica è un evento raro

saccaromices cerevisiae <1/10 000

drosophila melanogaster femm. 1/1700

per crom.X 1/6000

- nei mammiferi la frequenza di non-disgiunzione è più alta, nel topo(trisomie e monosomie) non supera 1-2% in uova fecondate

L'uomo rappresenta una eccezione

- **il 10-30% delle cellule uovo fecondate ha un numero errato di cromosomi che ritroviamo in:**

nato morto

aborto spontaneo

morte endouterina

- **il meccanismo che sta alla base del fenomeno è un errore meiotico**

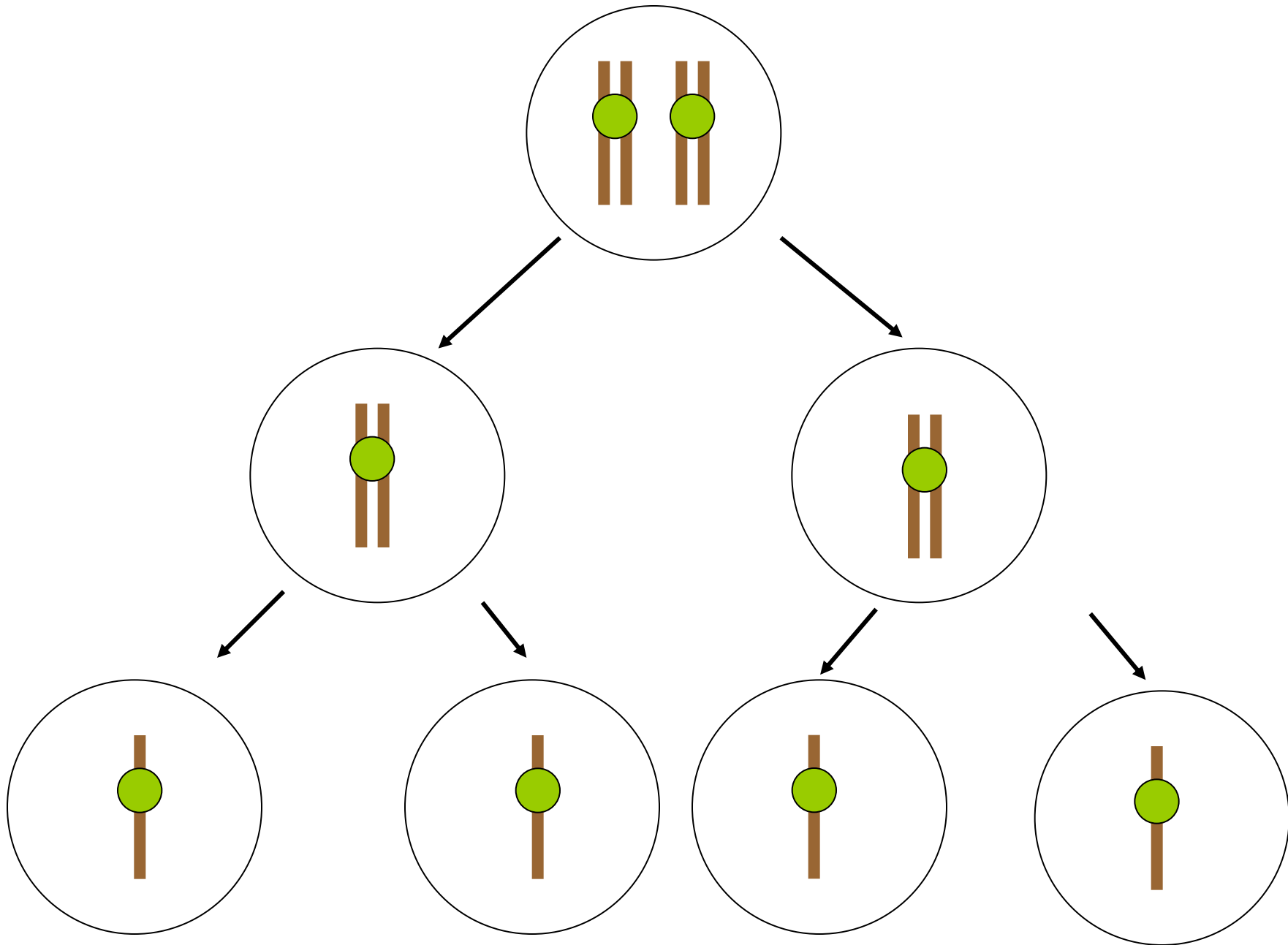
Come si originano monosomie e trisomie ?

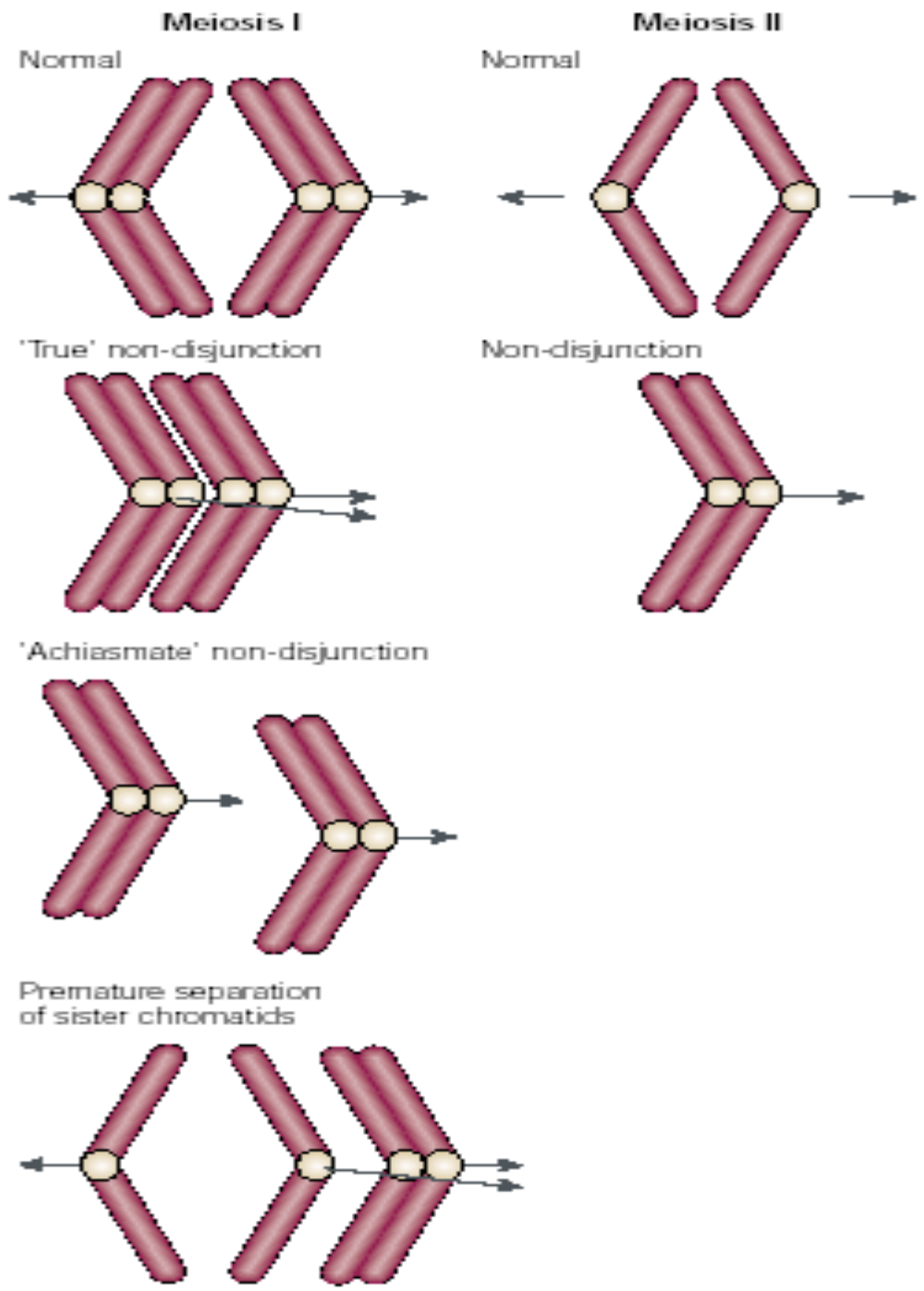
➤ Unione di un gamete normale o euploide (cioè con 23 cromosomi) con un gamete anormale o aneuploide (cioè con 22 o con 24 cromosomi)

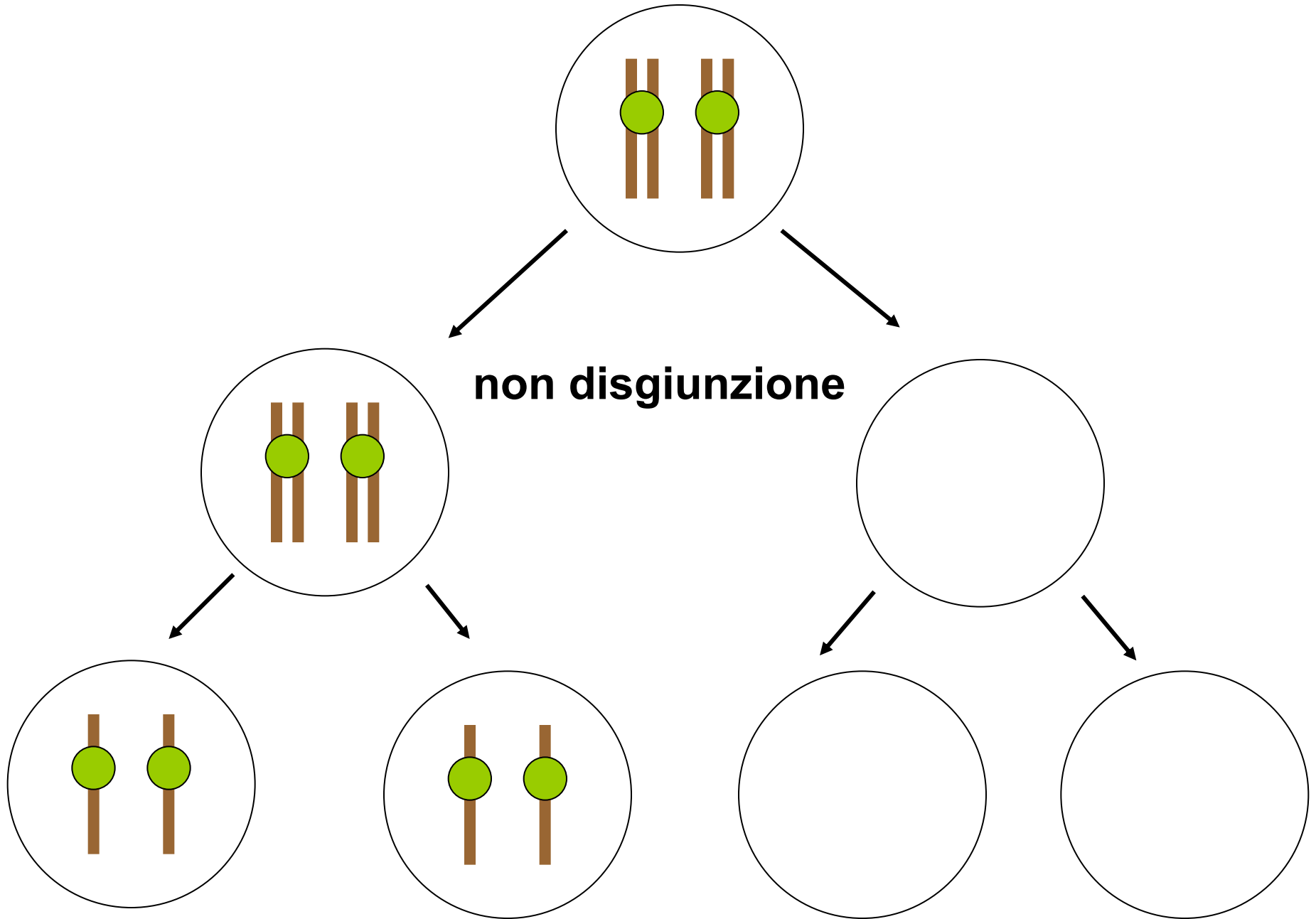
Gameti con 22 cromosomi vengono chiamati
NULLISOMICI

Gameti con 24 cromosomi vengono chiamati DISOMICI

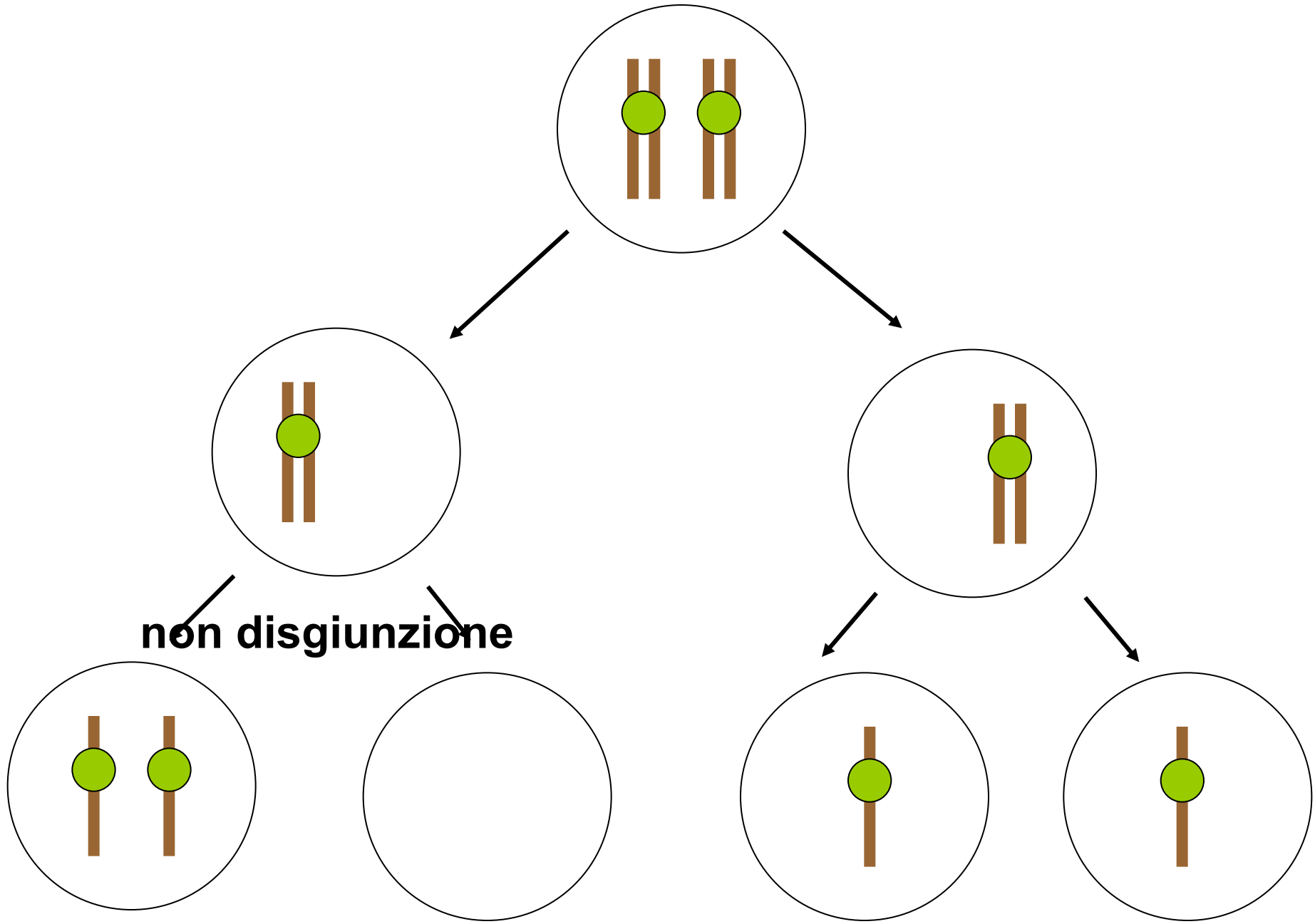
➤ Non disgiunzione mitotica in una fase precoce dello sviluppo embrionale (spesso mosaici)



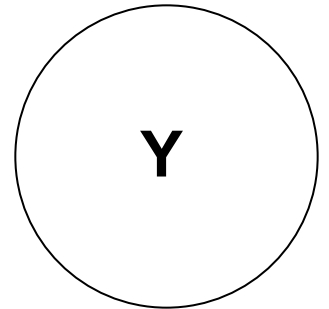
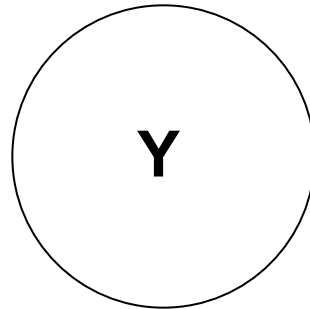
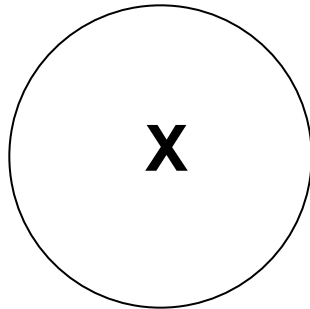
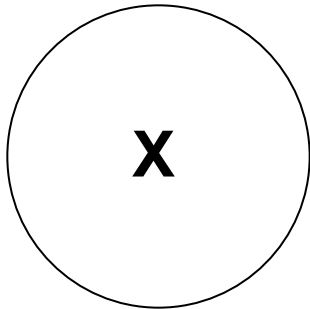
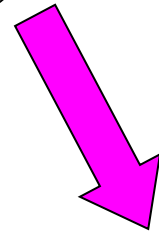
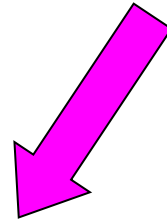
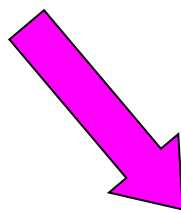
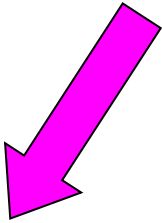
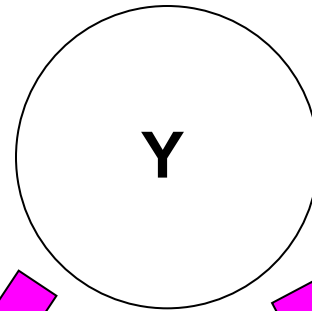
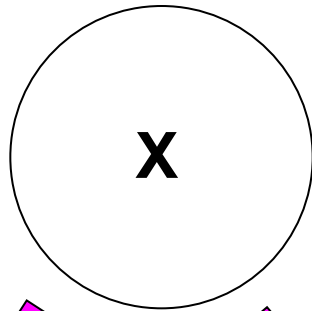
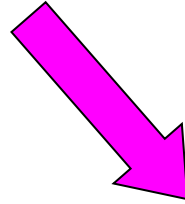
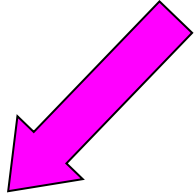
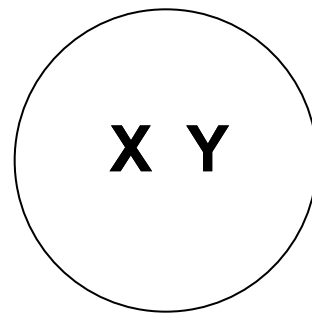


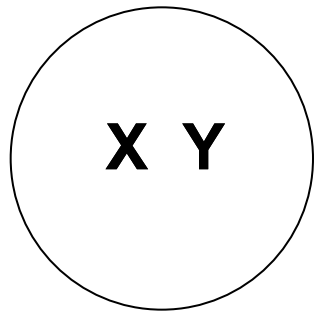


non disgiunzione

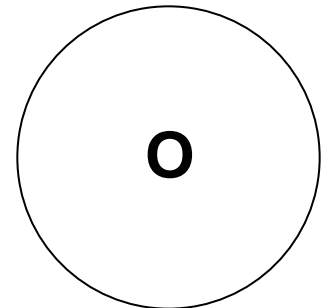
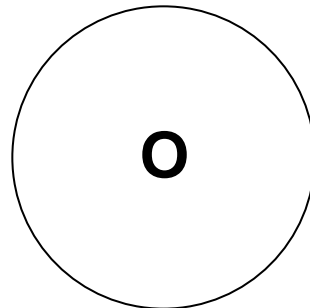
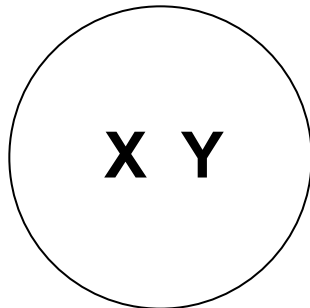
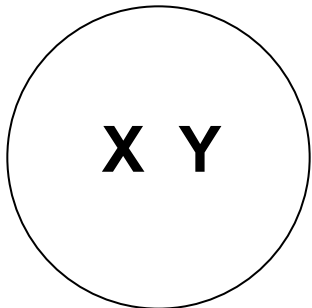
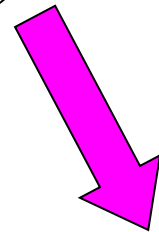
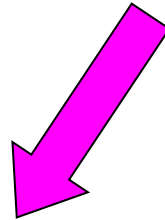
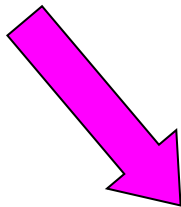
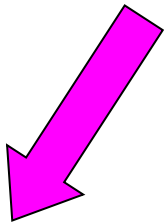
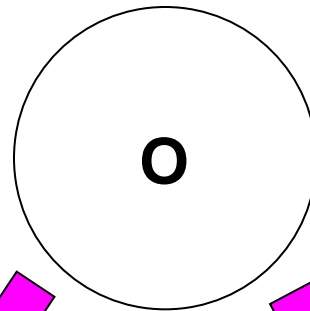
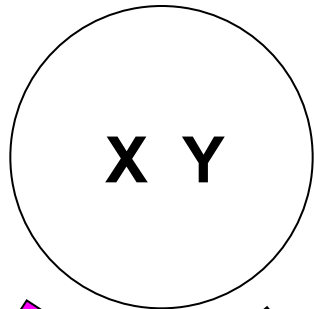
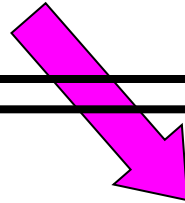
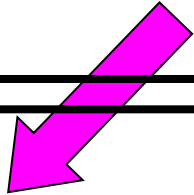


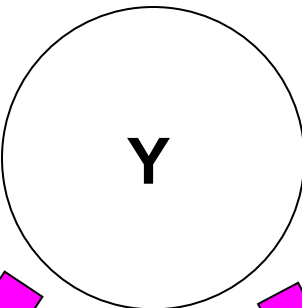
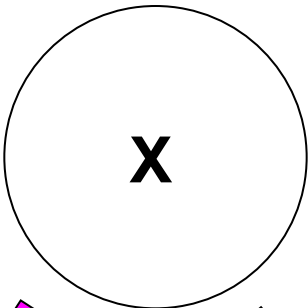
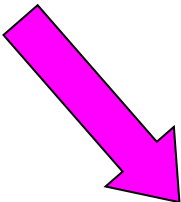
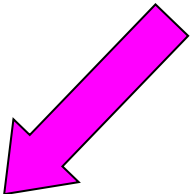
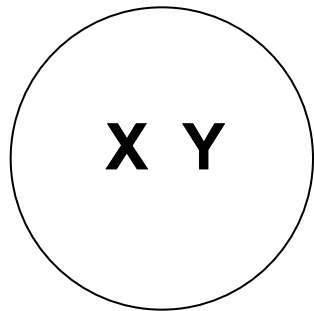
**meiosi maschile
normale**



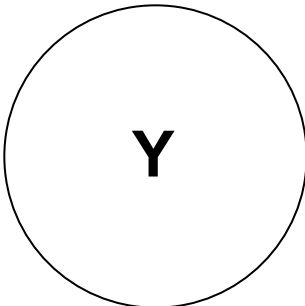
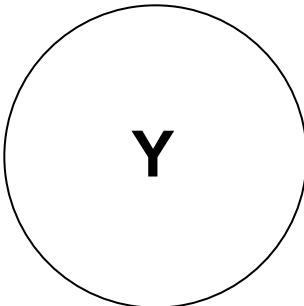
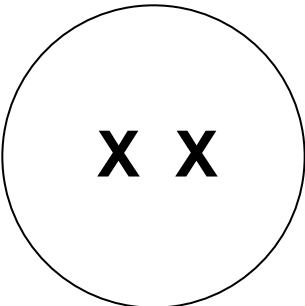
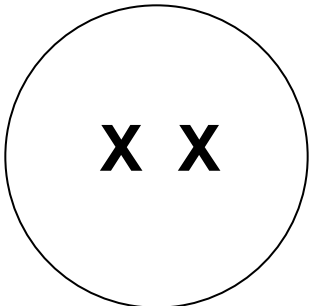
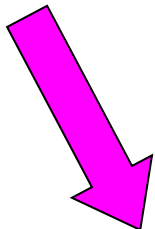
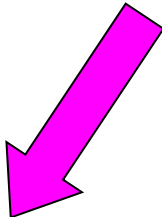
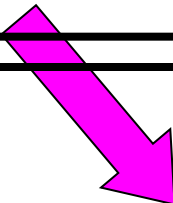
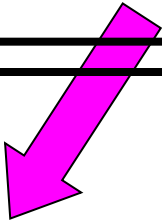


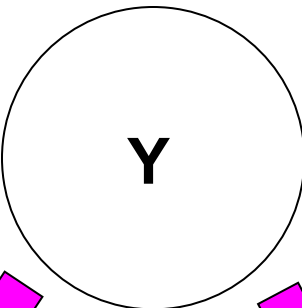
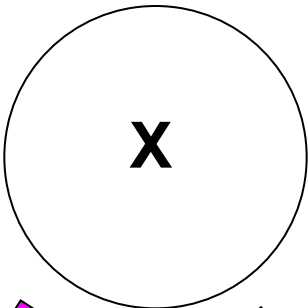
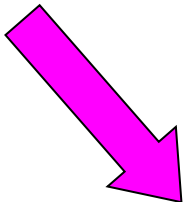
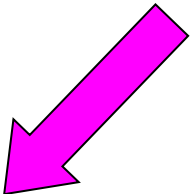
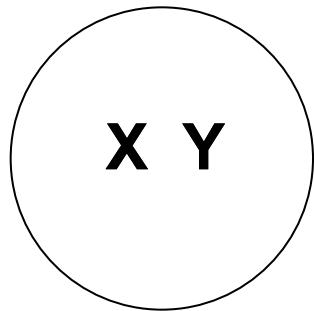
N D



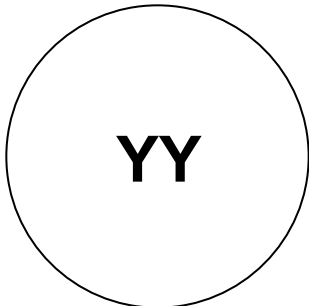
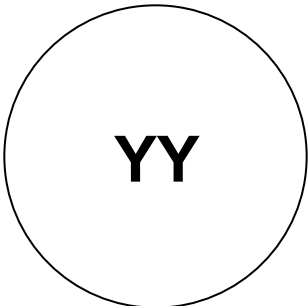
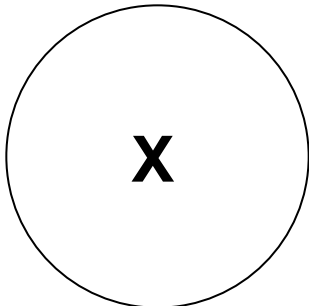
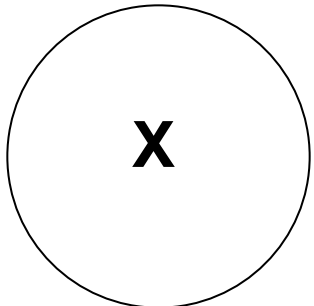
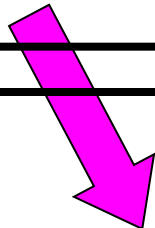
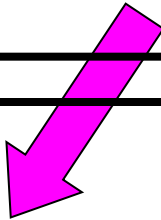
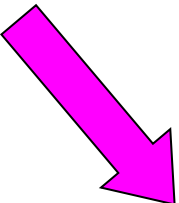
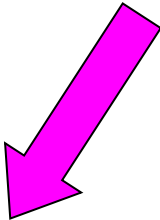


N D





N D



Aneuploidie dei cromosomi autosomici

Le monosomie sono incompatibili con la vita, si riscontrano raramente anche negli aborti spontanei
→ feti monosomici vengono abortiti in fasi estremamente precoci (prima ancora che la gravidanza venga riconosciuta)

Le trisomie sono rare alla nascita e relativamente frequenti negli aborti spontanei

Table 2 | **The origin of human trisomy**

| Trisomy | No. of cases | Origin (%) | | | | |
|---------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|----------------------|
| | | Paternal MI | Paternal MII | Maternal MI | Maternal MII | Post-zygotic mitosis |
| 2 | 18 | 28 | – | 54 | 13 | 6 |
| 7 | 14 | – | – | 17 | 26 | 57 |
| 15 | 34 | – | 15 | 76 | 9 | – |
| 16 | 104 | – | – | 100 | – | – |
| 18 | 143 | – | – | 33 | 56 | 11 |
| 21 | 642 | 3 | 5 | 65 | 23 | 3 |
| 22 | 38 | 3 | – | 94 | 3 | – |
| XXY | 142 | 46 | – | 38 | 14 | 3 |
| XXX | 50 | – | 6 | 60 | 16 | 18 |

Le uniche trisomie autosomiche compatibili con uno sviluppo completo sono quelle a carico dei cromosomi 13, 18 e 21

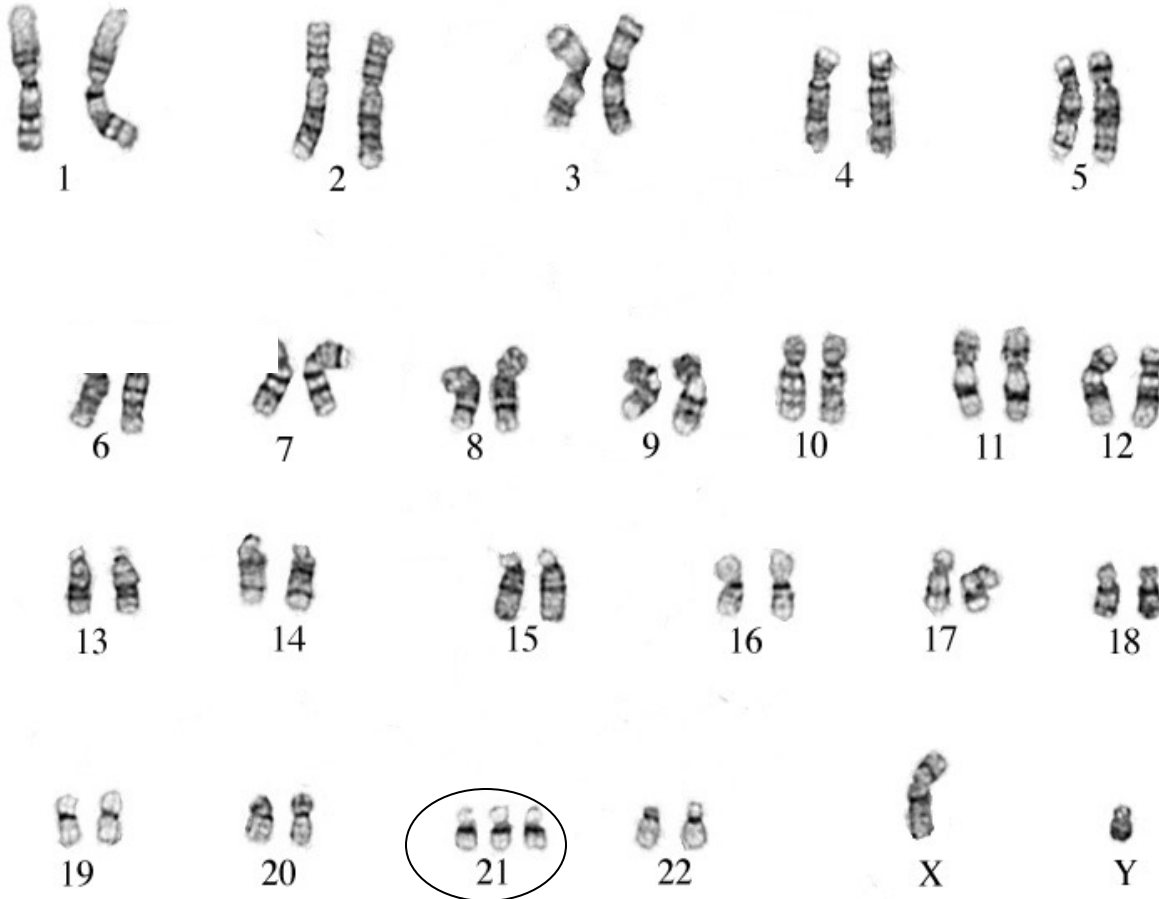
| Tabella 13.4 | | Confronti e differenze tra le trisomie 13, 18, e 21 |
|-------------------------|-------------------------------|---|
| Tipo di trisomia | Incidenza alla nascita | Percentuale di concepimenti che sopravvivono un anno dopo la nascita |
| 13 (Patau) | 1/12.500–1/21.700 | <5% |
| 18 (Edward) | 1/6000–1/10.000 | <5% |
| 21 (Down) | 1/800–1/826 | 85% |

Sindrome di Down

- La più comune aberrazione cromosomica e la più frequente forma di ritardo mentale della specie umana.
- Incidenza: 1/750 nati vivi
- La frequenza aumenta con l'aumentare dell'età della madre: (da 1/2.500 nei nati da madri < 20 anni a 1/50-100 nei nati da madri > 40 anni)

Down Syndrome

ZWK99024 KEY



1 in 1,250 births

**47 chromosomes
XY or XX**

**#21 Trisomy
Nondisjunction**

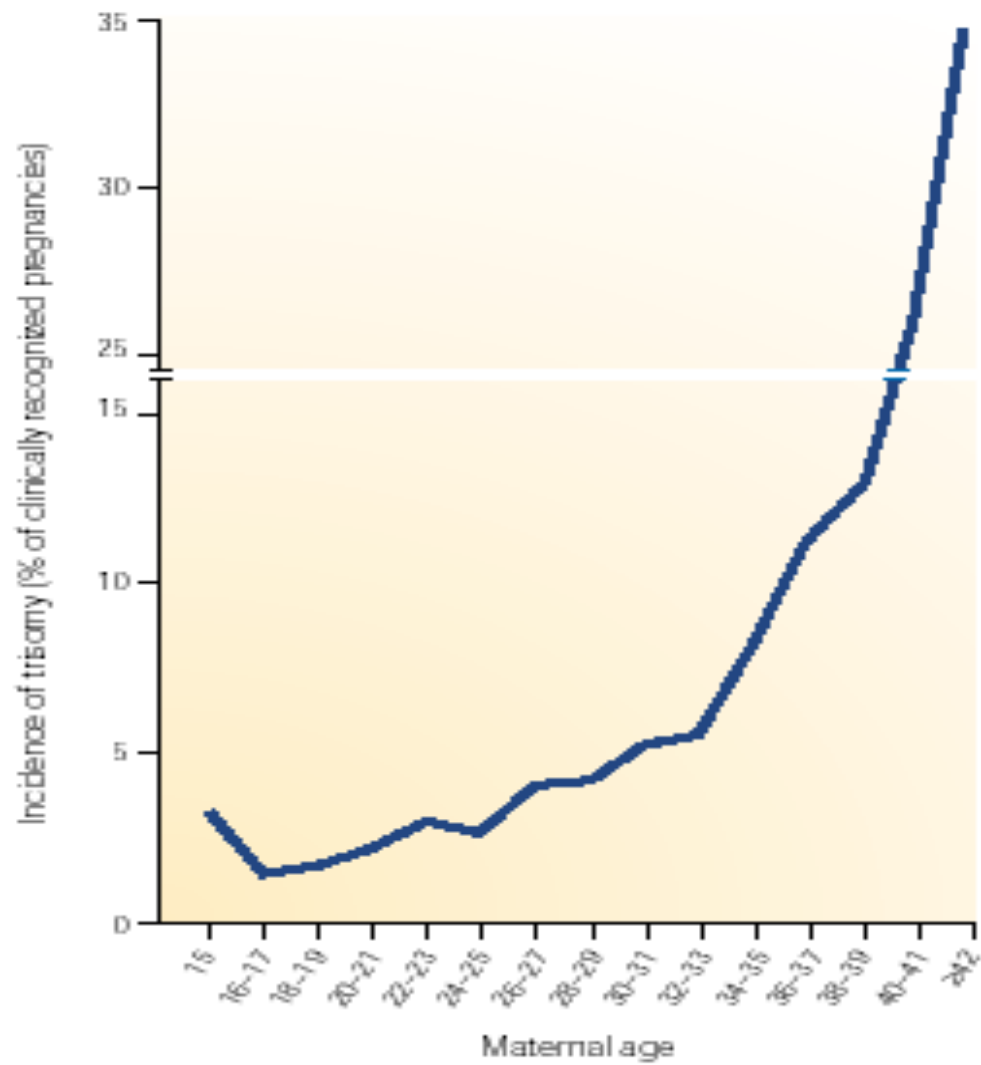


Figure 6 | **Maternal age and trisomy.** This shows ..

Sindrome di Down

CAUSE GENETICHE:

Nel 95% dei casi è dovuta a una non-disgiunzione cromosomica di un cromosoma 21 durante la gametogenesi (meiosi) che è quasi sempre quella materna (47, +21).

Sindrome di Down

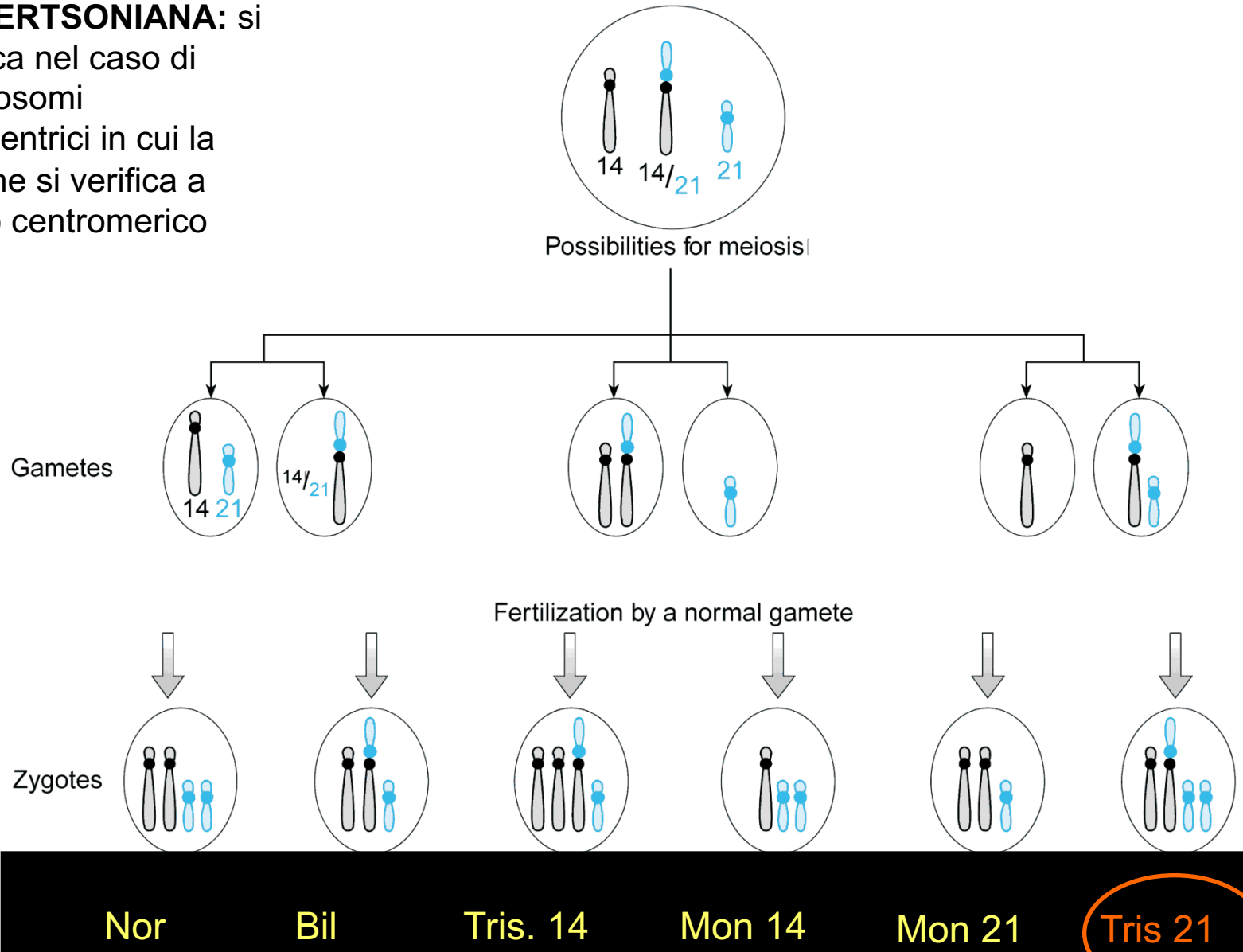
CAUSE GENETICHE:

Nel 95% dei casi è dovuta a una non-disgiunzione cromosomica di un cromosoma 21 durante la gametogenesi (meiosi) che è quasi sempre quella materna (47, +21).

Nel 4% dei casi è legata ad una traslocazione robertsoniana del cromosoma 21, che viene ad attaccarsi ad un altro cromosoma acrocentrico, per cui la conta totale dei cromosomi di questi pazienti è di 46, ma la massa cromatinica del cromosoma 21 è rappresentata per 3 volte. Spesso si verifica de novo ma può anche essere trasmessa da uno dei genitori nel quale è presente una traslocazione bilanciata.

Traslocazioni Robertsoniane

TRASLOCAZIONE ROBERTSONIANA: si verifica nel caso di cromosomi acrocentrici in cui la fusione si verifica a livello centromerico



Sindrome di Down

Infine, l'1% circa dei pazienti ha un mosaicismismo cromosomico per non-disgiunzione mitotica post-zigotica, con la presenza, quindi, di una linea cellulare a cariotipo normale e una con trisomia 21.

Questi ultimi pazienti possono manifestare un quadro clinico con segni più sfumati.

Il rischio di ricorrenza per una coppia che abbia già avuto un figlio affetto è solo dell'1% e tale percentuale aumenta in caso di traslocazione bilanciata in uno dei due genitori.

**caratteristiche fisiche che inducono il
sospetto di sindrome di Down o tris 21:**

ipotonia

viso rotondo e piatto

taglio palpebrale obliquo

orecchie piccole

nuca piatta

....

Sindrome di Down

- Il riconoscimento della sindrome non è tanto legato alla presenza di uno dei segni sopra riportati, ma alla presenza della combinazione, diversa da caso a caso, di molti di essi.
- Presi singolarmente, infatti, i diversi segni si riscontrano anche nella popolazione generale

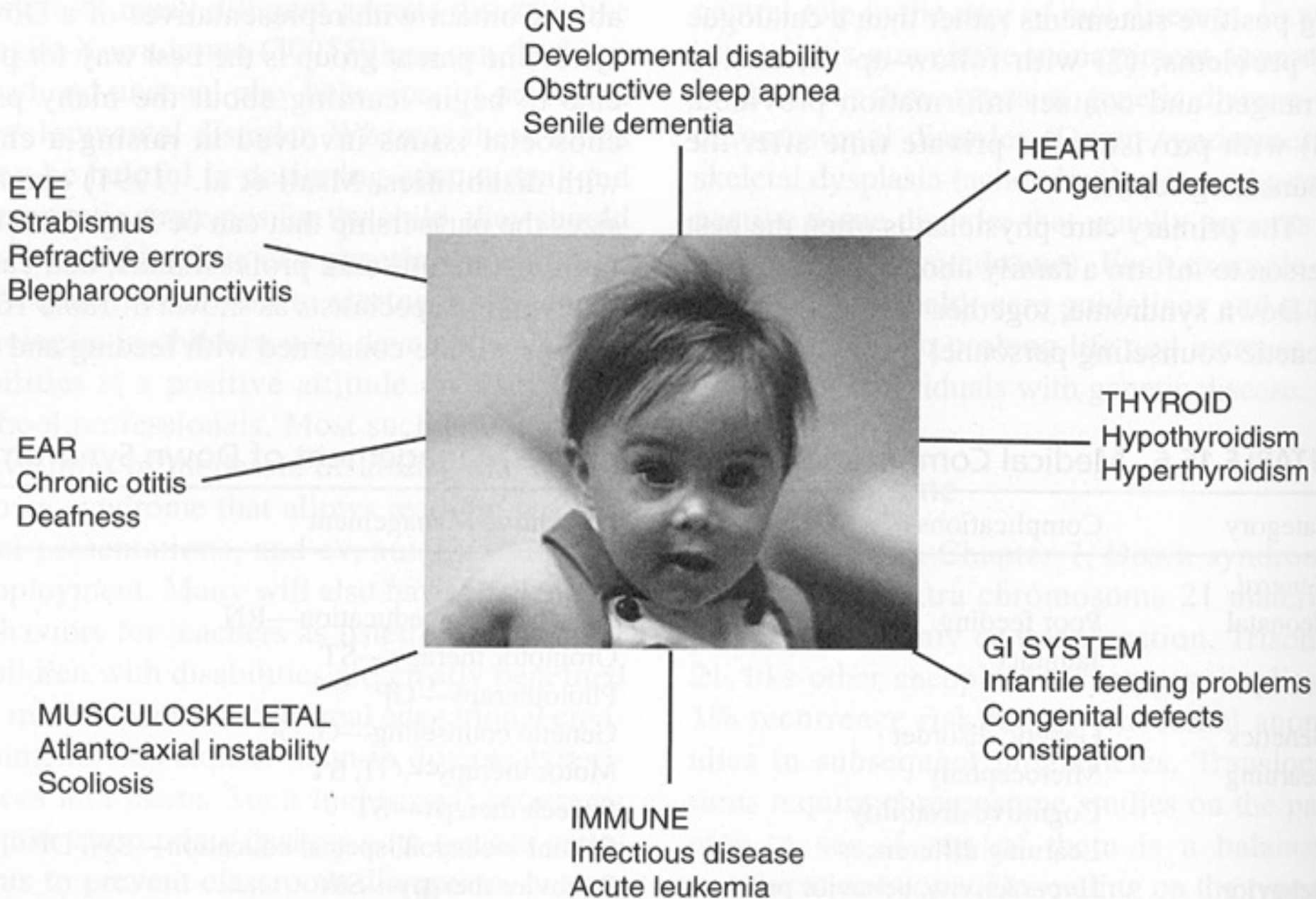


Figure 16.3. Potential complications of Down syndrome.

Sindrome di Down

L'indagine citogenetica è l'unico esame che permette di porre una diagnosi di certezza. Viene eseguita dopo la nascita su una coltura di linfociti del sangue periferico o in epoca prenatale, nel primo o nel secondo trimestre di gravidanza, su colture di cellule derivate dai villi coriali o dal liquido amniotico. Un'amniocentesi è infatti indicata nelle donne in stato di gravidanza di età superiore ai 35 anni.

La Sindrome di Down può essere diagnosticata :

- 12°-13° SG → **VILLOCENTESI**
(prelievo di cellule da cui si svilupperà la placenta, i villi coriali appunto)


- 16°-18° SG → **AMNIOCENTESI**
(prelievo di con una siringa di una piccola quantità del liquido amniotico, che avvolge il feto all'interno dell'utero)

Proposte a donne ad **ALTO RISCHIO**:

- Età superiore a 35 anni
- Precedente figlio con S. di Down

Donne < 35 anni:

- **Test sierologico “TRIPLE TEST” (15°-17°SG)**
 - ↓ **alfa-fetoproteina**
 - ↓ **estriolo libero**
 - ↑ **beta HCG**

 - **Ecografia fetale:**
 - plica nucale**
 - femore corto**
 - anomalie cardiache o gastrointestinali**
- 

Problemi di salute nelle persone Down

- Anomalie cardiache congenite (30-50%)
- Atresia o stenosi duodenale congenita
- Cataratta congenita (15%)
- Malattie polmonari croniche (30%)
- Epilessia (37%)
- Elevata incidenza di patologie autoimmuni.
- Elevata incidenza di leucemia mieloide acuta.
- Grado variabile di ritardo mentale.
- Ritardo di crescita.
- Deficit sensoriali acquisiti (50%): udito, vista
- Osteoporosi con conseguente frattura delle ossa lunghe (50%)
- Demenza presenile tipo Alzheimer (42%)

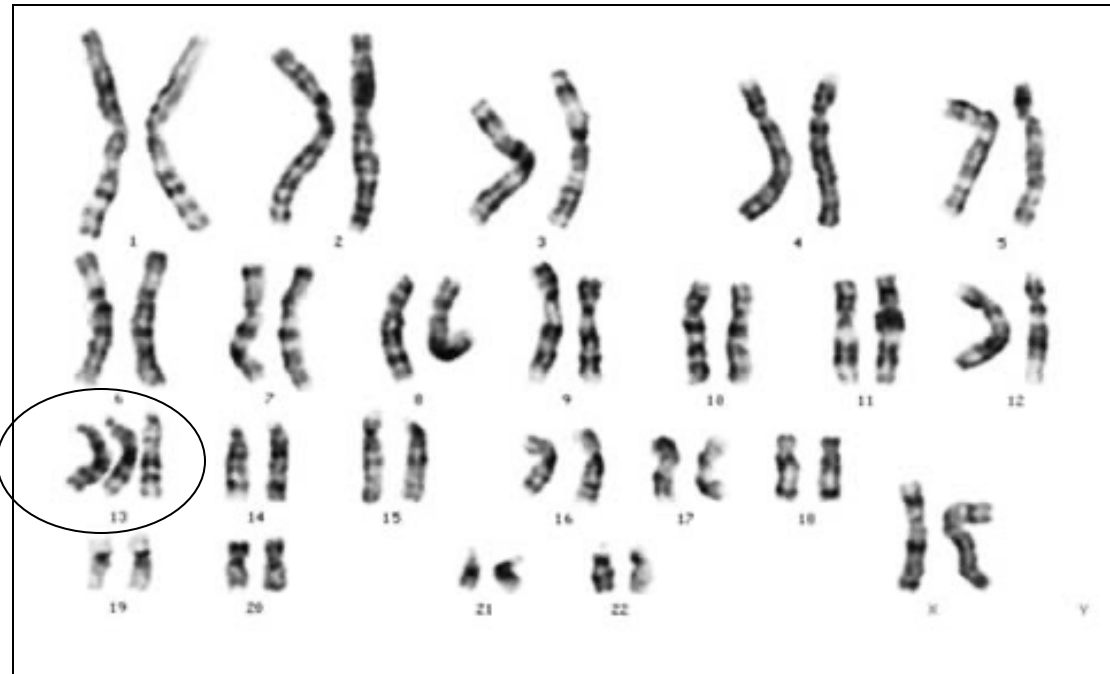
Patau's Trisomy Syndrome

1 in 14,000 births

47 chromosomes
XY or XX

47, +13

#13 Trisomy
Nondisjunction



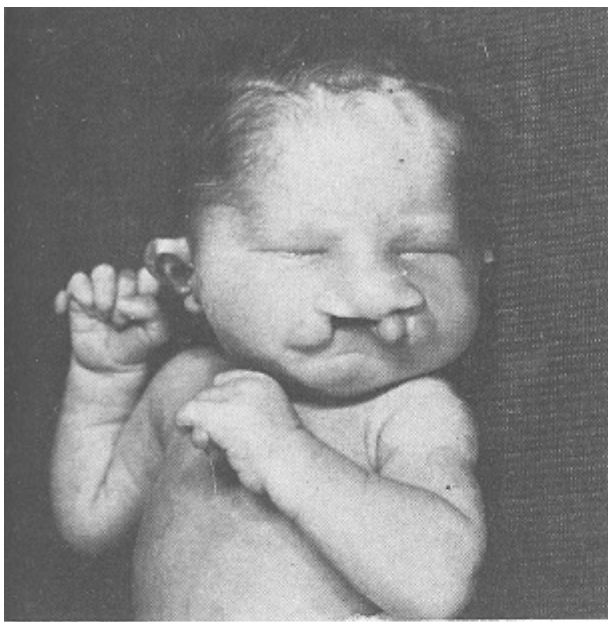
Caratteristiche fisiche che fanno sospettare la sindrome di Patau o tris 13:

gola di lupo

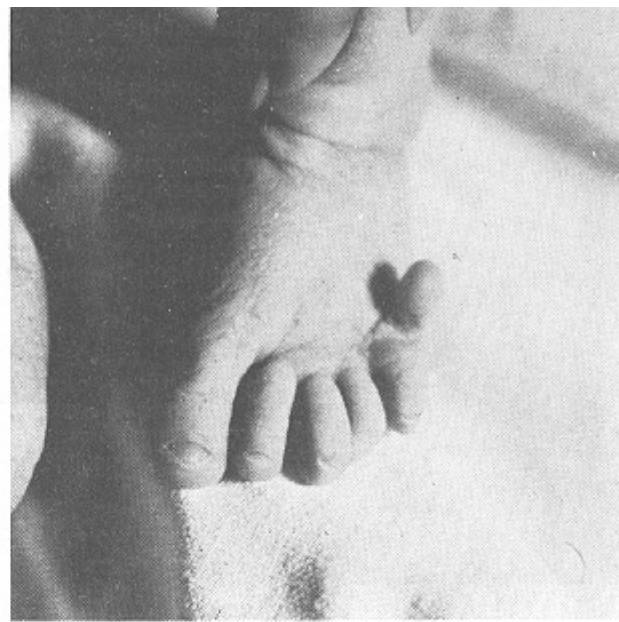
microftalmia

esadattilia

morte precoce



13.3



oloprosencefalia



13.4



Fig. 13.3
Collection personnelle.
Fig. 13.4

Edward's Trisomy Syndrome

1 in 4,400 births

47 chromosomes

XX=80%

XY=20%

#18 Trisomy

Nondisjunction



caratteristiche fisiche che fanno sospettare
la sindrome di Edwards o tris 18:

orecchie faunesche

micrognazia

accavallamento delle dita

piede torto

ipotrofia importante

morte precoce

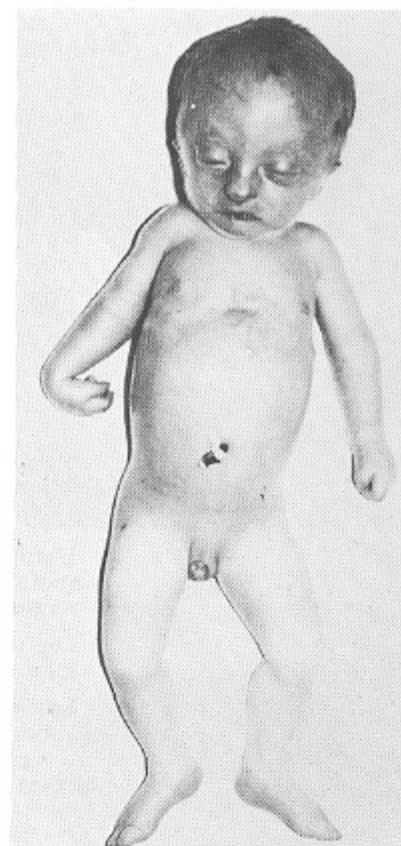
Edw

Small head
Mentally retarded
Internal organ
abnormalities
90% die before
5 months of age





1



18.2

18.3



Aneuploidie dei cromosomi sessuali

Jacob's Syndrome

1 in 1,800 births

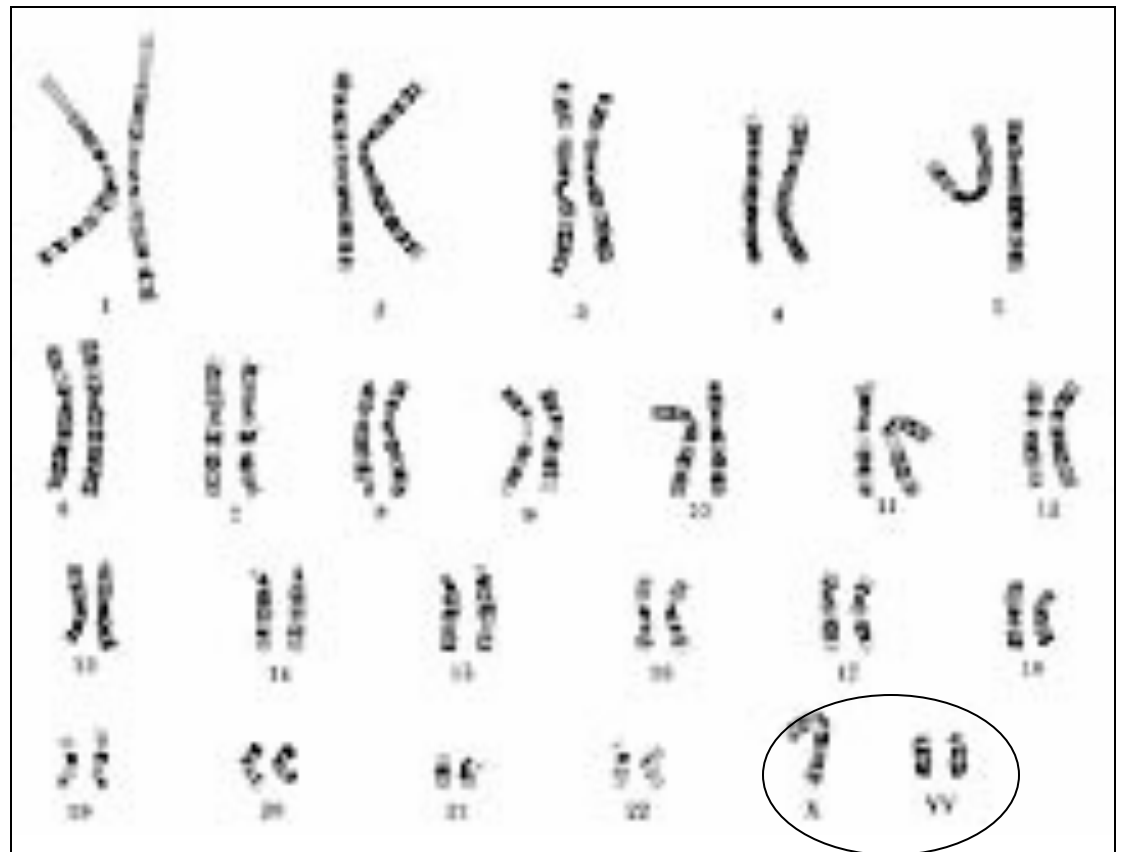
47 chromosomes

XYY only

47XYY

#23 Trisomy

Nondisjunction



Jacob's Syndrome

XYY

Normal physically

Normal mentally

Increase in testosterone

Perhaps more aggressive

Normal lifespan

Fertile

Sindrome di Klinefelter

- In un numero inferiore di casi si riscontra un mosaicismo (47XXY/46XY oppure 47XXY/46 XX) o una delle seguenti varianti: 48XXXY, 48XXYY e 49XXXXY
- La compromissione dello sviluppo e mentale aumenta con l'aumentare del numero degli extra X: ogni extra X riduce il QI di 15-16 punti

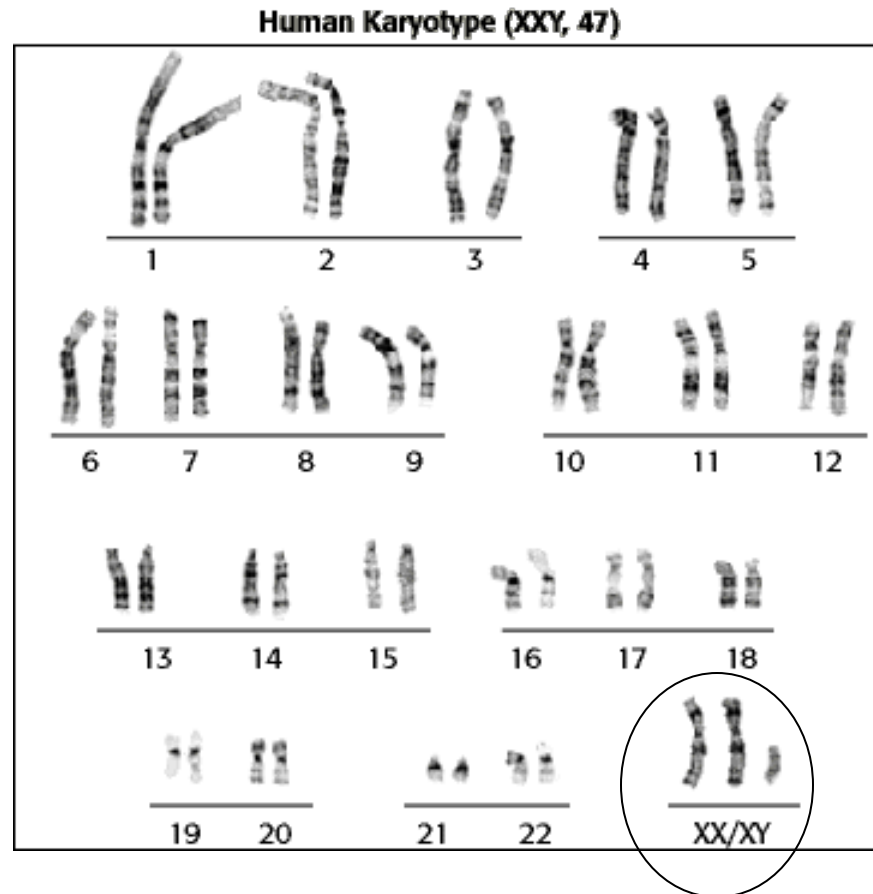
Klinefelter's Syndrome

1 in 1,100 births

47 chromosomes
XXY only

47, XXY

#23 Trisomy
Nondisjunction



Sindrome di Klinefelter

- La malattia si associa ad un'età materna avanzata
- L'esame microscopico dei testicoli mostra ialinizzazione e atrofia dei tubuli seminiferi, con scomparsa dell'epitelio germinale ed iperplasia delle cellule interstiziali.

Sindrome di Klinefelter

- **CLINICA:**
- Fenotipo maschile, con caratteri eunucoidi: alta statura e alto rapporto arti/tronco (gli androgeni stimolano la saldatura cartilaginea che, pertanto, avviene in ritardo)
- Spesso ritardo psichico
- Ginecomastia nell'80% dei casi
- Scarso sviluppo dei caratteri sessuali secondari: peluria scarsa, pene piccolo e testicoli duri e di dimensioni ridotte (5-6 mm)
- Potenza sessuale e libido spesso diminuite
- Distribuzione dell'adipe di tipo femminile
- Sono riscontrabili, inoltre, alterazioni ossee, alterazioni cutanee, solco palmare unico, prollasso della mitrale, taurodontismo e intolleranza al glucosio che spesso sfocia in un franco diabete mellito

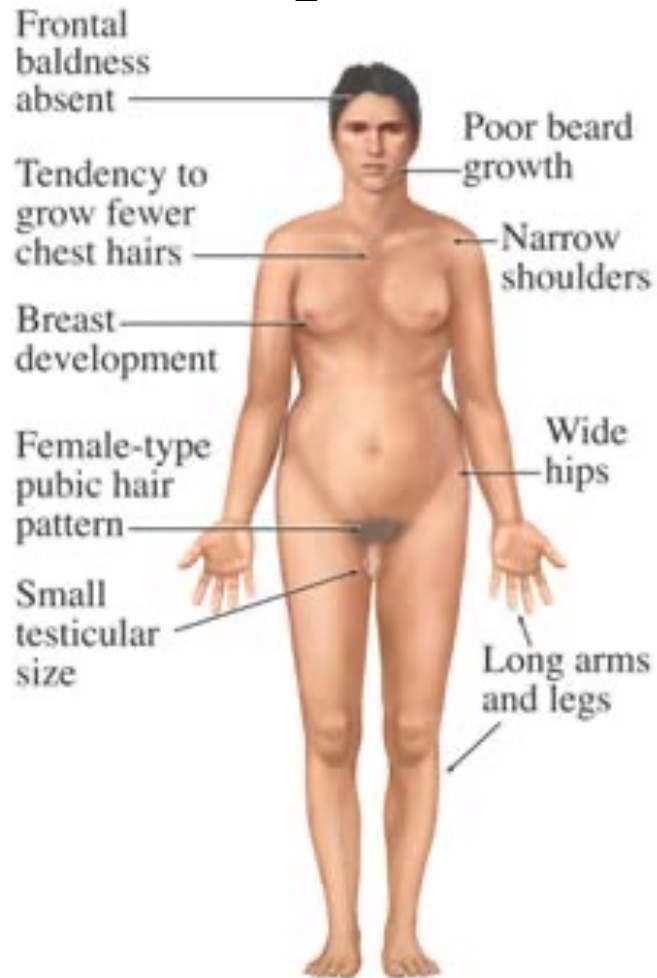
Nei casi di mosaicismo si riscontrano quadri monosintomatici

Nell'infanzia gli aspetti più spesso presenti sono:

- Ritardo nell'acquisizione del linguaggio
- Difficoltà di apprendimento e scolastiche
- Rapida crescita nella 3^a infanzia e, a volte, obesità del tronco
- Problemi comportamentali
- Ritardo puberale

Klinefelter's Syndrome

- XXY, male



Klinefelter's Syndrome

- Scarce beard
- Longer fingers and arms
- Sterile
- Delicate skin
- Low mental ability
- Normal lifespan



Sindrome di Klinefelter

Esami di laboratorio:

1. Alla pubertà i livelli di FSH ed LH sono particolarmente elevati (soprattutto l'FSH con aumentata responsività al GnRH)
2. Aumento dell'SHBG
3. Testosterone basso o ai limiti inferiori della norma
4. Aumento degli estrogeni circolanti

La diagnosi di certezza richiede l'esame del cariotipo

Sindrome di Klinefelter

TERAPIA:

La terapia è sostitutiva e va iniziata alla pubertà, mimando la maturazione normale.

Si somministra:

- Testosterone enantato: una iniezione i.m. ogni 4 settimane, partendo da 50 mg e aumentando gradualmente la dose ogni 6 mesi, fino ad una posologia adulta di 200 mg ogni 2-3 settimane.

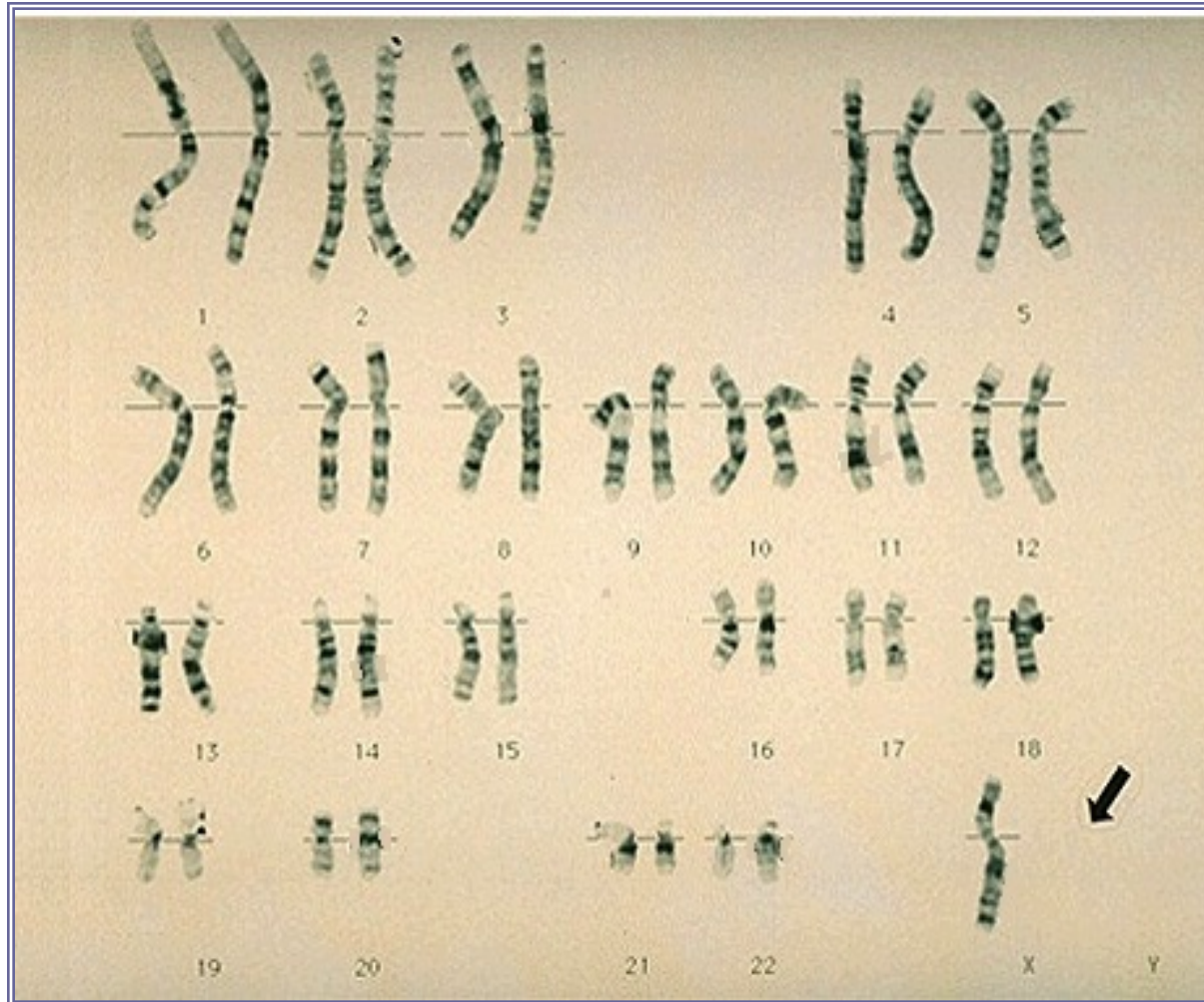
La terapia sostitutiva di mantenimento può essere espletata anche per via transdermica

La ginecomastia va corretta chirurgicamente

Sindrome di Turner

- Nel 50% dei casi è dovuta ad una monosomia del cromosoma X (45,X0) e nel 60% dei casi manca quello di origine paterna
- In circa il 30% dei casi si tratta di un mosaicismo (45 X0/46 XX o 45 X0/47 XXX o, più di rado, 45 X0/46XY)
- Altri mosaicismi sono rappresentati da un isocromosoma o da un cromosoma ad anello
- Alcuni soggetti con S. di Turner, pur avendo due cromosomi X, mostrano una mancanza parziale di uno dei due
- Quando manca il braccio corto (p) non è colpita la funzione ovarica, mentre è presente la bassa statura (gene SHOX)
- Se, invece, è presente una delezione del braccio lungo (q) di uno dei due cromosomi X, nella banda q13-q27, si manifesta un mancato sviluppo ovarico

Cariotipo: 45,X (~1/2.500 neonati femmine)

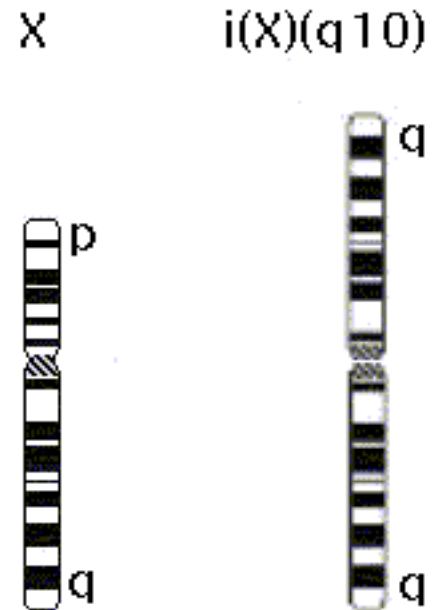


Cariotipi associati alla sindrome di Turner

45,X

46,X,i(Xq)

45,X/46,XX



L'isocromosoma Xq è sempre inattivo.

L'associazione i(Xq)/sindrome di Turner suggerisce che la sindrome è dovuta a aploinsufficienza di geni localizzati in Xp

Sindrome di Turner

CLINICA:

Ipostaturalismo

Principalmente legato all'insufficienza del gene PHOG/SHOX, sito nella regione pseudoautosomale del braccio corto dei cromosomi X ed Y

Alla nascita le bambine mostrano un peso inferiore alla media e un deficit di crescita staturale. La velocità di crescita può essere normale nelle prime fasi della vita, per poi ridursi drasticamente verso i 6-8 anni. L'altezza finale risulta in media attorno a 142-143 cm e sempre inferiore a 150 cm

Amenorrea primaria

Assente sviluppo dei caratteri sessuali secondari e infantilismo sessuale alla pubertà

Gonadi rudimentali sotto forma di banderelle fibrose in assenza, sin dalla nascita, di cellule germinali e di produzione di ormoni steroidei

Collo corto e palmato (PTERIGIO)

Impianto basso delle orecchie

Alterazioni dentarie

Gomito valgo

Linfedema delle mani e dei piedi (n epoca neonatale può costituire l'unico elemento per cui sospettare una S. di Turner e regredisce spontaneamente nel tempo. È dovuto allo scarso sviluppo delle vie linfatiche durante tutta la vita fetale.)

Alterazioni scheletriche

Ritardo mentale nell'11-17% dei casi

Turners Syndrome

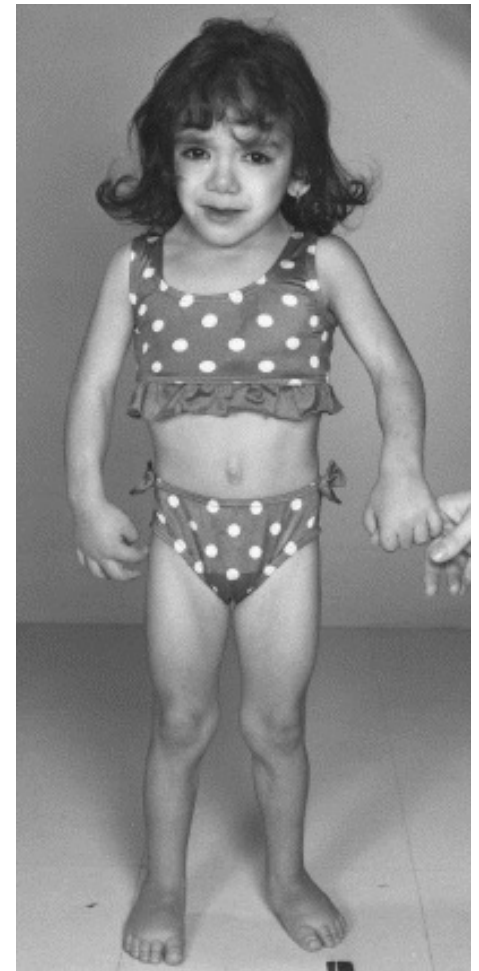
96-98% do not survive to birth

No menstruation

No breast development

No hips

Broad shoulders and neck



Sindrome di Turner

Poiché i soggetti con S. di Turner hanno un solo cromosoma X, pur avendo un fenotipo femminile, presentano la stessa probabilità dei maschi di essere affetti da malattie legate al sesso, come l'Emofilia A e B o la Distrofia muscolare di Duchenne

Sindrome di Turner

DIAGNOSI:

- Esami di laboratorio:
 - a) elevati livelli di gonadotropine (FSH ed LH)
 - b) Estrogeni bassi o indosabili
- All'ecografia pelvica le ovaie appaiono come benderelle fibrose
- Rx mano: età ossea ritardata
- La diagnosi di conferma si basa sull'**ANALISI CROMOSOMICA**

Sindrome di Turner

TERAPIA:

Comprende inizialmente la terapia della bassa statura e successivamente, a partire dal 12°-13° anno di età, la terapia dell'ipogonadismo

TERAPIA DELLA BASSA STATURA:

- Ormone somatotropo ricombinante umano (hGh) per via s.c. alla dose di 0,045 – 0,050 mg/Kg/die

Il trattamento va iniziato precocemente, prima che la statura scenda al di sotto del 3°-10° centile, in genere intorno a 2-5 anni. Va continuato sino a quando l'incremento dell'altezza tende ad attenuarsi (<2cm/anno) e/o l'età ossea è > 15 anni

Sindrome di Turner

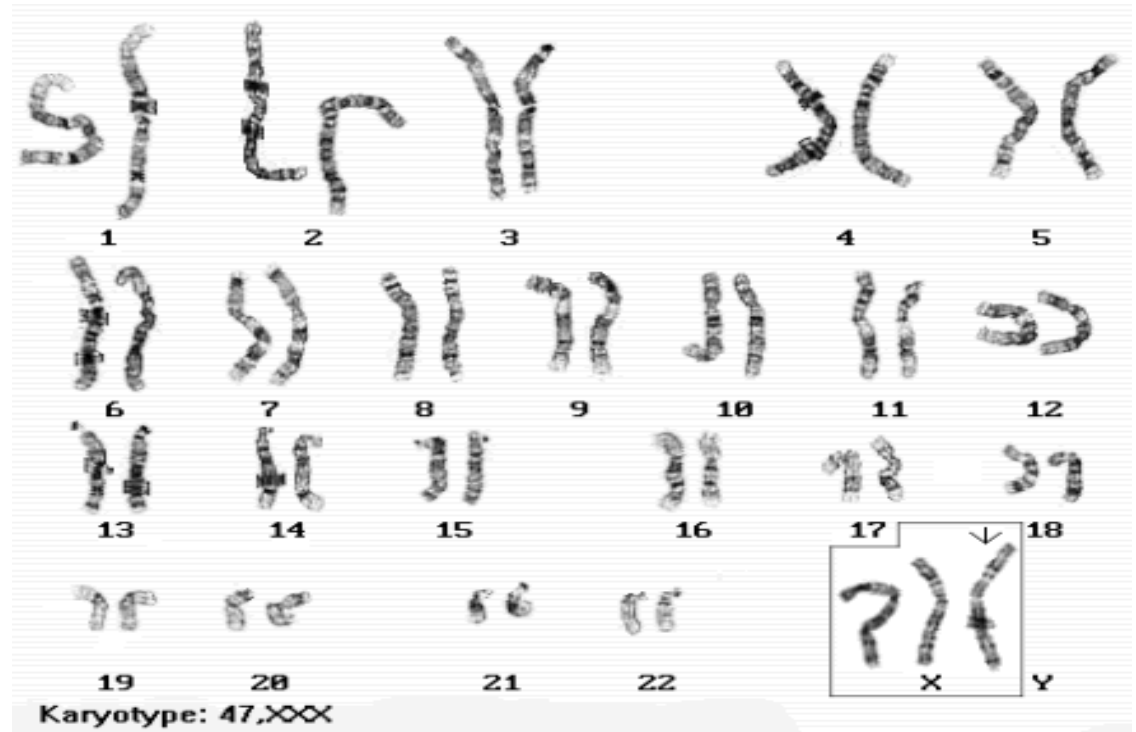
TERAPIA DELL'IPOGONADISMO:

sostitutivo estroprogestinico

Stimola l'induzione dei caratteri sessuali secondari e la comparsa delle mestruazioni, ma non può ovviare alla sterilità. Non va iniziata prima del 12°-13° anno di età al fine di evitare l'effetto negativo sull'accrescimento causato dalla saldatura delle cartilagini epifisarie.

Trisomy X

- [47 XXX](#)
[symptoms](#)
- 1/1000
- healthy and fertile - cannot be distinguished from normal female except by karyotype



ANOMALIE CROMOSOMICHE DI STRUTTURA

necessitano di rotture dei cromosomi

una rottura su un cromosoma

**delezione terminale
inversione paracentrica**

due rotture su un cromosoma

**delezione interstiziale
inversione para- o pericentrica
cromosoma ad anello**

due rotture su cromosomi diversi

**traslocazione reciproca
traslocazione centrica**

**tre rotture di cui 2 almeno
sullo stesso cromosoma**

traslocazione con inserzione

Fratture cromatidiche, cromosomiche e “gap”

Nella maggior parte dei casi le FRATTURE CROMOSOMICHE che si verificano nei vari periodi della divisione cellulare sono riparate spontaneamente, con enzimi specifici, senza che si verifichi alcuna anomalia. Quando è interessato un solo cromatide si parla di **fratture cromatidiche**, mentre quando sono coinvolti ambedue i cromatidi nello stesso punto si parla di **fratture cromosomiche**. Queste ultime comportano la separazione di un tratto di cromosoma.

Fratture cromatidiche, cromosomiche e “gap”

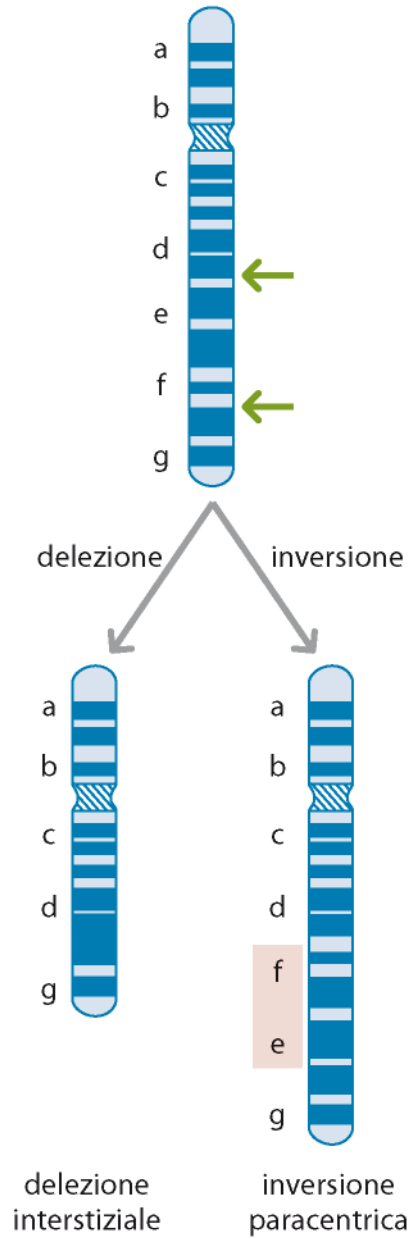
Per **GAP** si intende invece l'**attenuazione** della colorazione di un tratto di cromosoma, che appare discontinuo, anche se mantiene la normale posizione in asse: le alterazioni fenotipiche sono dovute a un'alterazione della struttura del DNA, in corrispondenza del gap. Le due regioni adiacenti sono funzionalmente separate, anche se in effetti sono unite da una sottile, alterata struttura di DNA.

Fratture cromatidiche, cromosomiche e “gap”

- L'interesse clinico delle fratture e dei gap sta nel fatto che possono in tal modo perdersi regioni cromosomiche essenziali. Inoltre i cromosomi fratturati hanno la tendenza a unirsi rapidamente con altri, dando origine a traslocazioni, isocromosomi e cromosomi ad anello.

Rotture dei cromosomi e conseguenze

(A) due rotture nello stesso braccio



(B) due rotture in bracci diversi

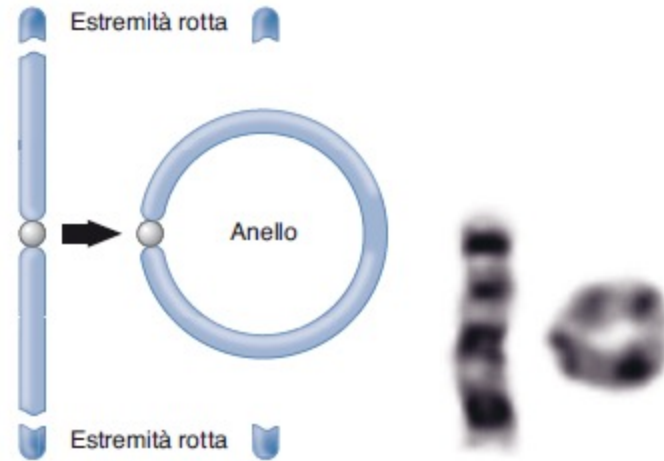
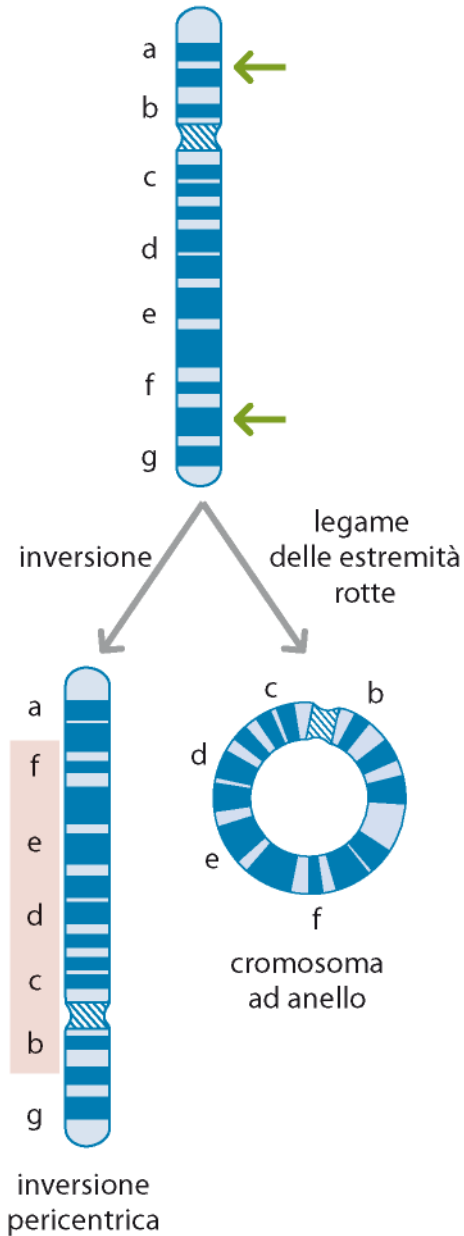
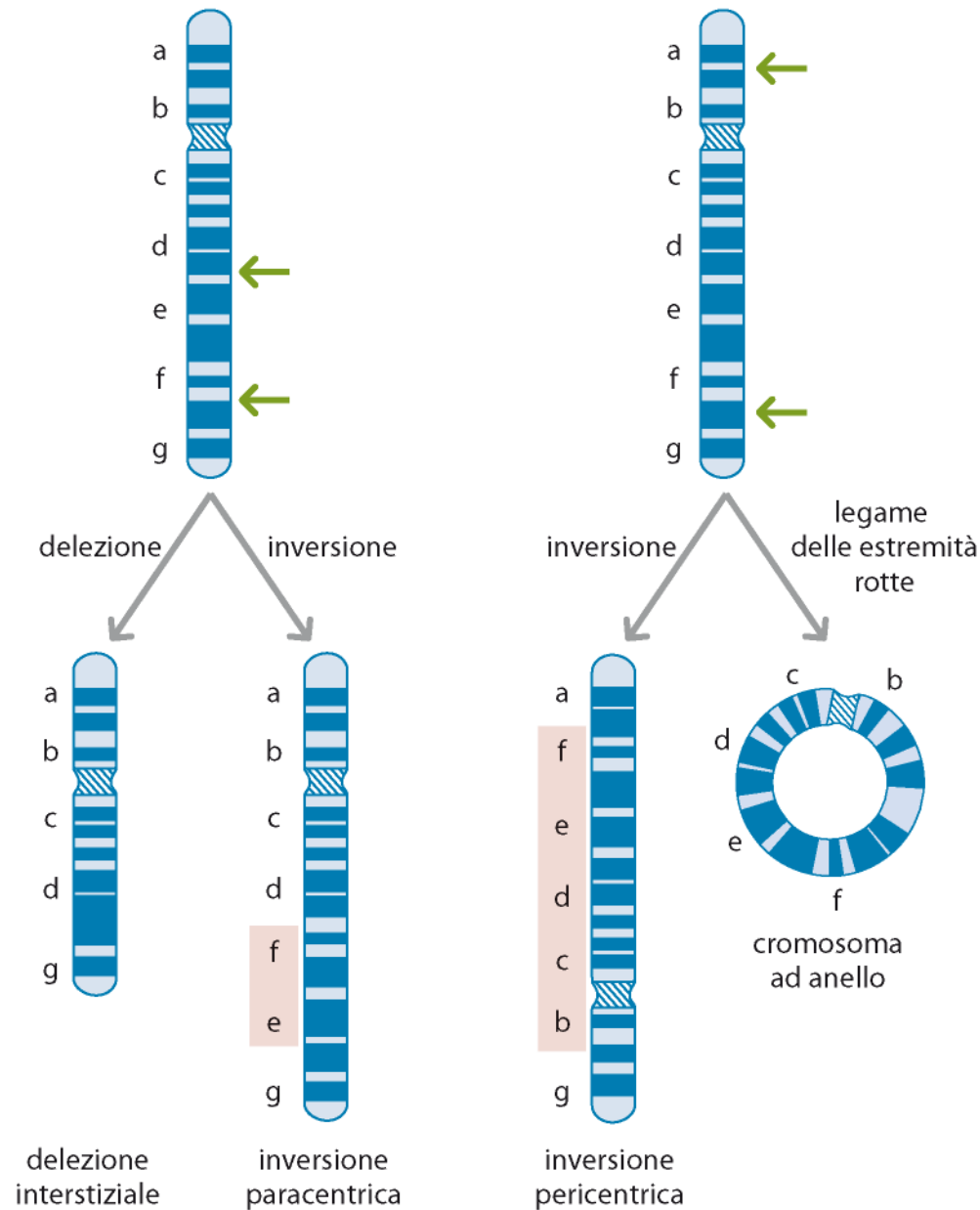


Figura 13.23 Un cromosoma ad anello.

Un cromosoma ad anello può formarsi se le estremità di un cromosoma (telomeri) si rompono e lasciano estremità coesive. In questo modo dei geni possono essere persi o spezzati, portando alla comparsa di sintomi. Il cromosoma 20 ad anello, per esempio, provoca crisi epilettiche.

(A) due rotture nello stesso braccio

(B) due rotture in bracci diversi



Due rotture sullo stesso cromosoma possono originare cromosomi con:

- ✓ Delezione interstiziale o doppia terminale
- ✓ Inversione (paracentrica o pericentrica)
- ✓ Ad anello

La formazione di ISOCROMOSOMI

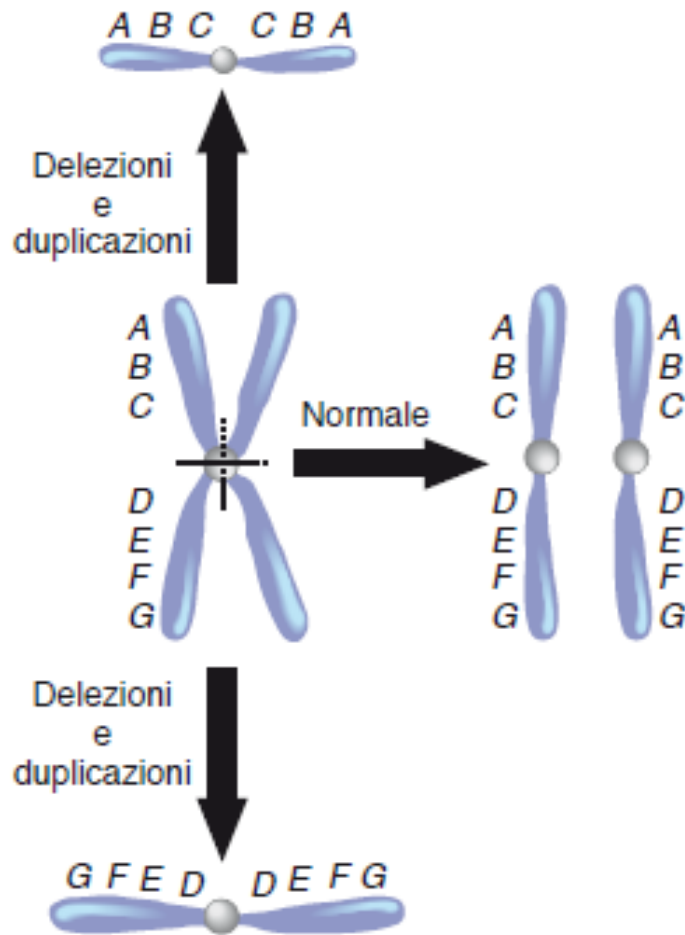


Figura 13.22 Gli isocromosomi hanno bracci identici. Si formano quando i cromatidi si dividono sul piano sbagliato (in questa figura, orizzontalmente invece che verticalmente).



a. Sequenza di geni normale



b. Sequenza di geni deleta



c. Sequenza di geni duplicata



d. Sequenza di geni invertita

I principali tipi di anomalie di struttura dei cromosomi

Conseguenze fenotipiche:

per le delezioni e le duplicazioni dipendono dalla quantità e funzione dei geni coinvolti, per le inversioni dipendono dalla integrità o meno di geni importanti

se le anomalie strutturali necessitano di rotture allora diventa di fondamentale importanza in quale tipo di sequenza di DNA avviene l'evento rottura

per semplicità il DNA può essere suddiviso in almeno tre tipi di sequenze :

sequenze non codificanti non trascritte

sequenze codificanti trascritte

sequenze di regolazione trascritte e no

**La conseguenza di una rottura singola può essere
la perdita del frammento acentrico produttore**

una **delezione terminale**

**conseguenza è l'aploinsufficienza e/o l'espressione
di alleli recessivi**

Sindromi da delezione terminale:

cromosomiche

s.Wolf-Hirschorn

4p-

s. del pianto del gatto

5p-

genomiche

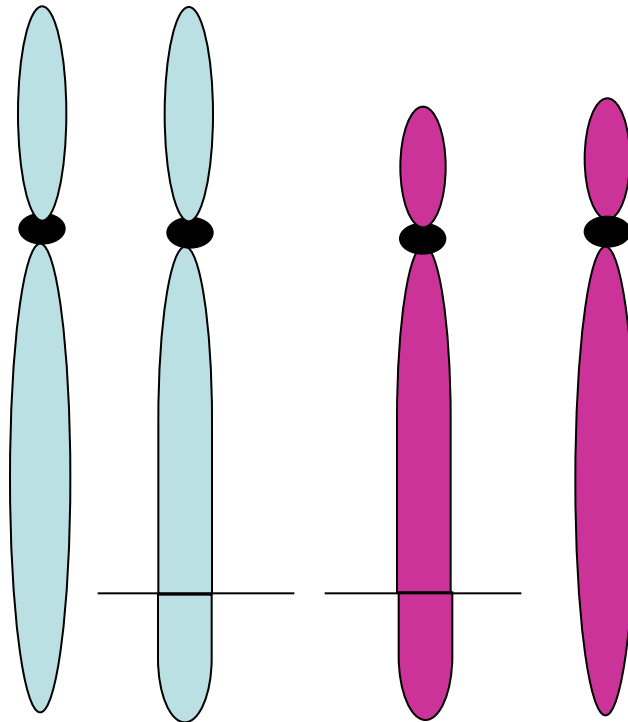
α -talassemia e ritardo mentale

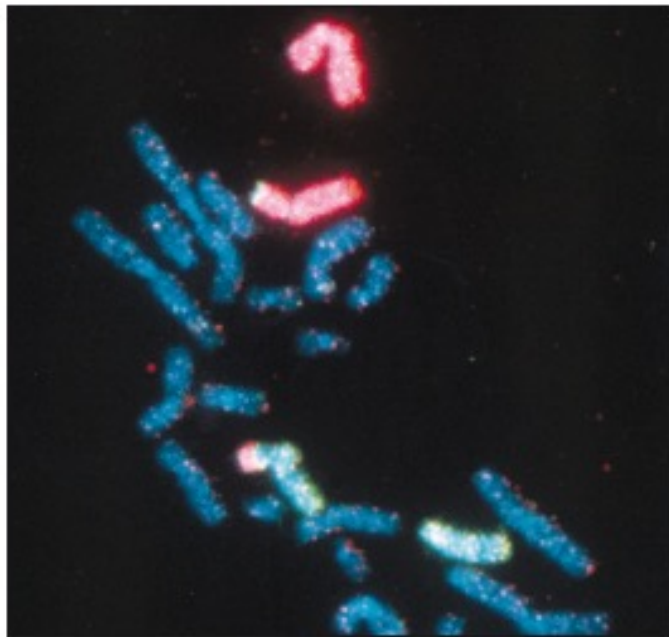
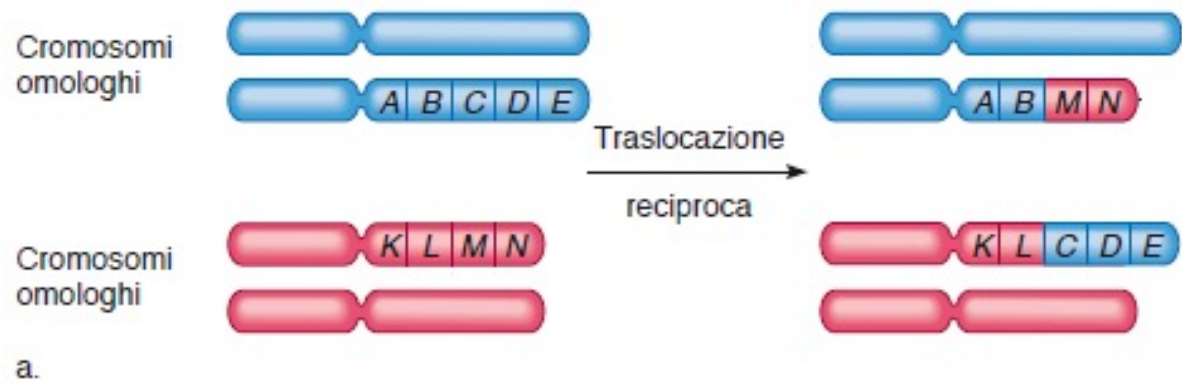
16pter-

regioni sub-telomeriche

TRASLOCAZIONE RECIPROCA

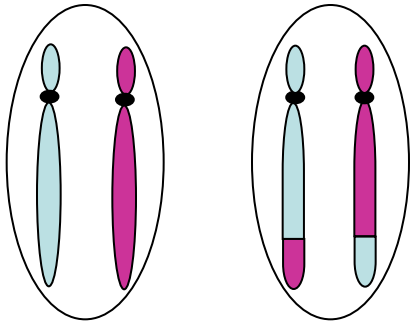
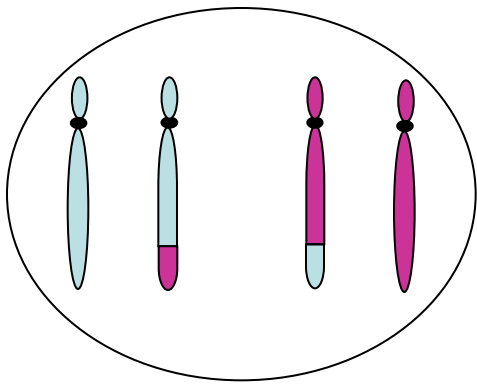
Cromosomi NON omologhi vanno incontro a rottura e riunione e si scambiano un segmento cromosomico



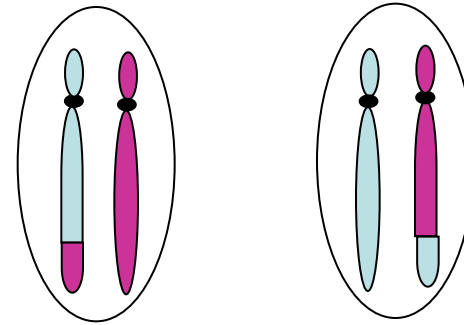


portatore di traslocazione reciproca bilanciata
produce 4 tipi di gameti:

2 bilanciati e 2 sbilanciati

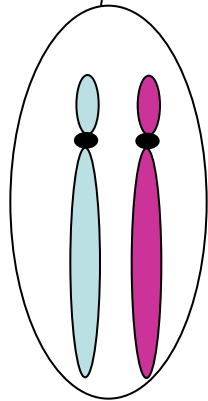


gameti bilanciati



gameti sbilanciati

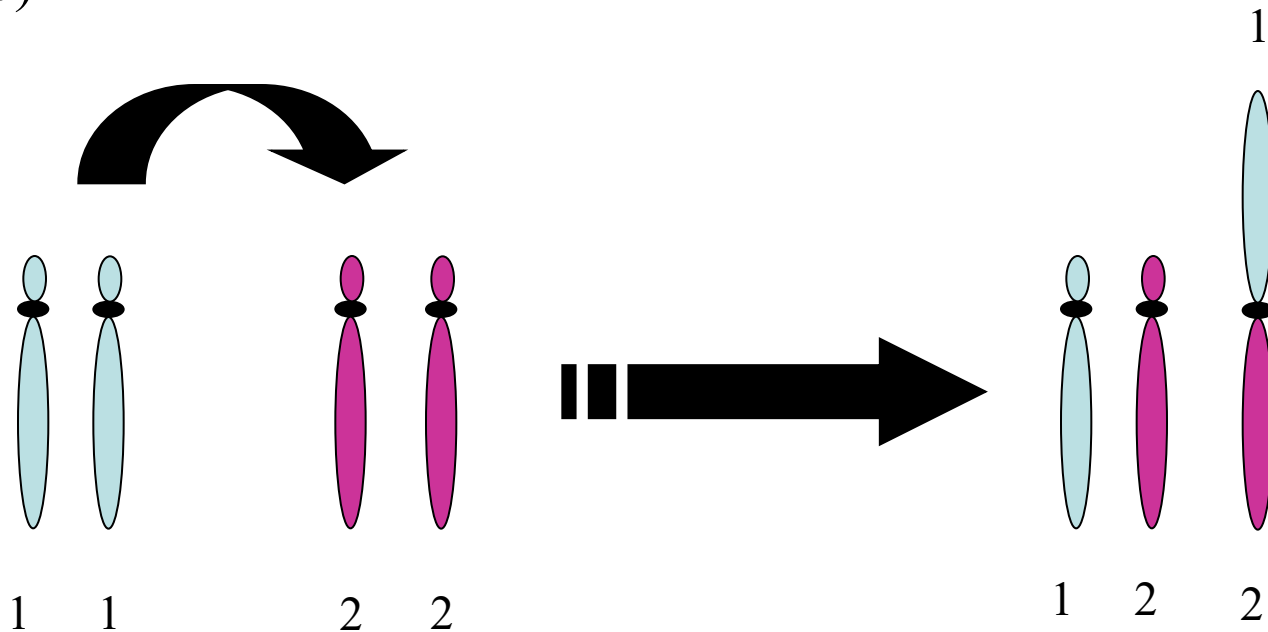
+



**Zigoti normali o con
traslocazione
bilanciata o con
monosomia e
trisomia parziali**

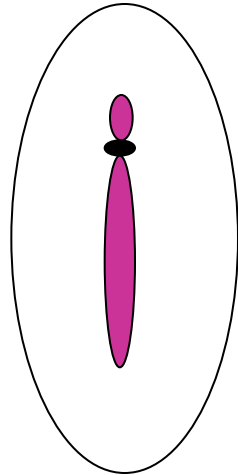
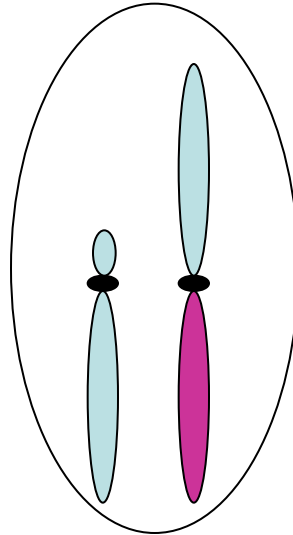
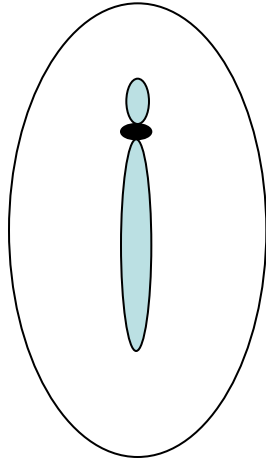
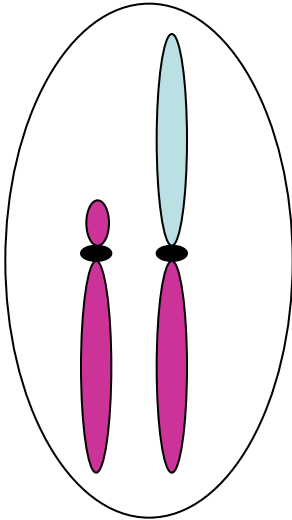
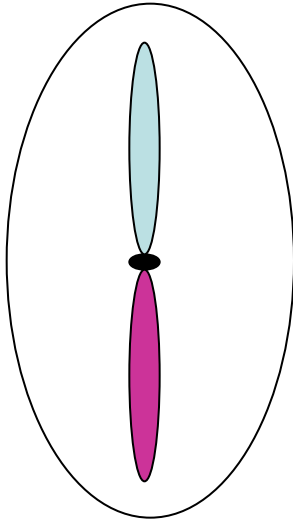
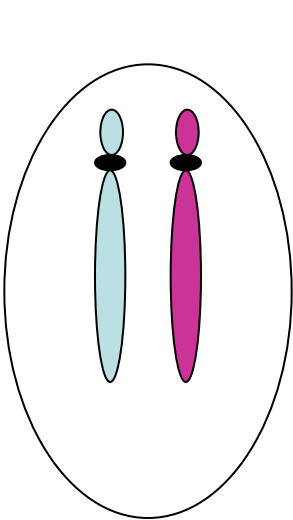
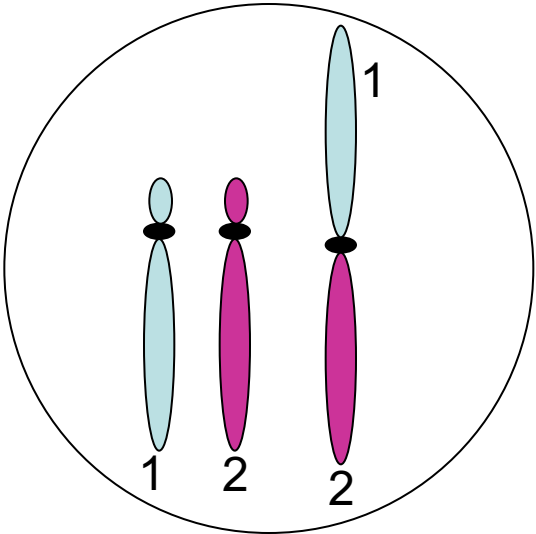
TRASLOCAZIONE ROBERTSONIANA

Fusione centrica tra due cromosomi acrocentrici che danno così origine ad un cromosoma metacentrico (se i due cromosomi che si fondono hanno uguali dimensioni) o submetacentrico (i due cromosomi che si fondono hanno dimensioni diverse). Il cromosoma che si viene a originare in tal modo è indicato con la sigla der (= derivato)



Portatore di traslocazione robertsoniana bilanciata – Produce 6 tipi di gameti:

2 bilanciati e 4 sbilanciati



gameti bilanciati

gameti sbilanciati

Le traslocazioni robertsoniane sono

- **associate a sterilità maschile**
- **causa di aborto spontaneo e**
sindromi note **Down tris 21**
Patau tris 13