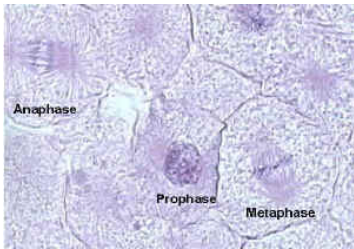
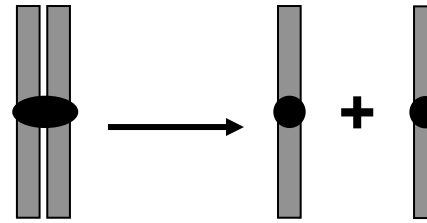


Cromosomi visibili



M
Mitosis

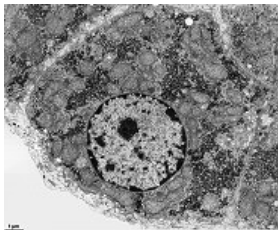


46 cromosomi
In ogni cellula

G2
Gap 2

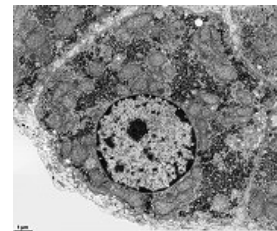
G1
Gap 1

G0
Resting

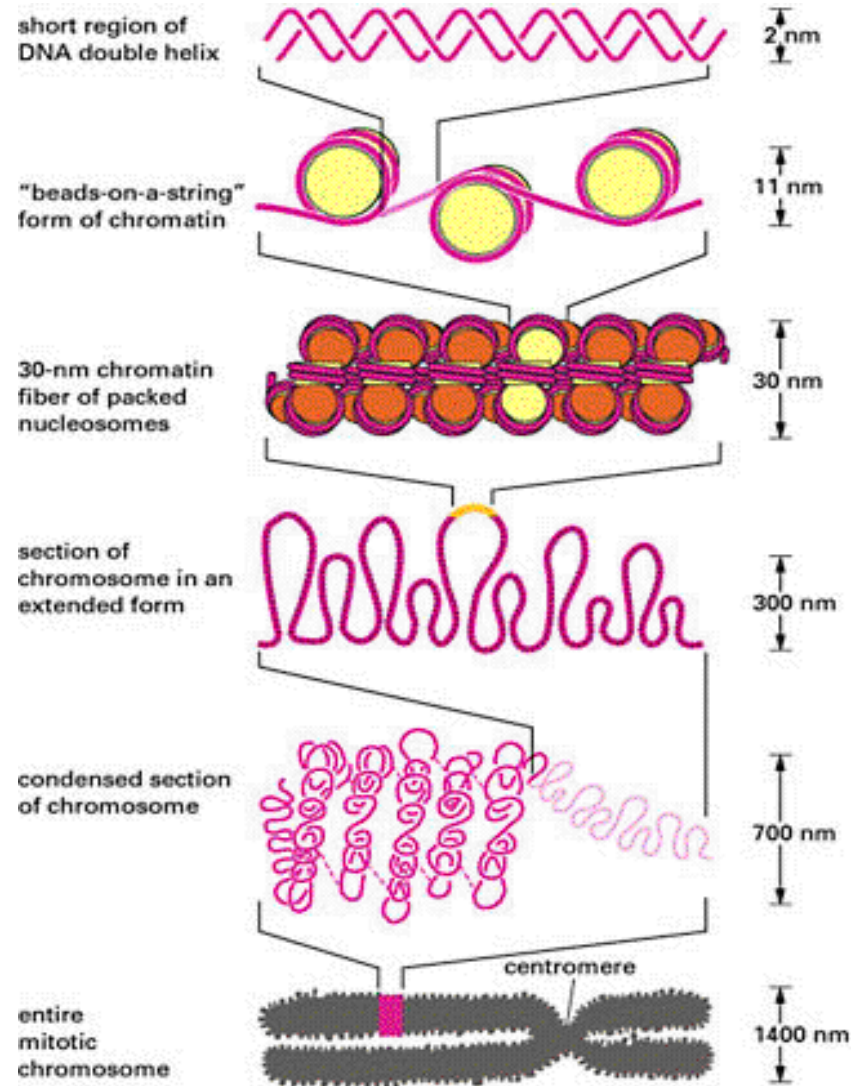
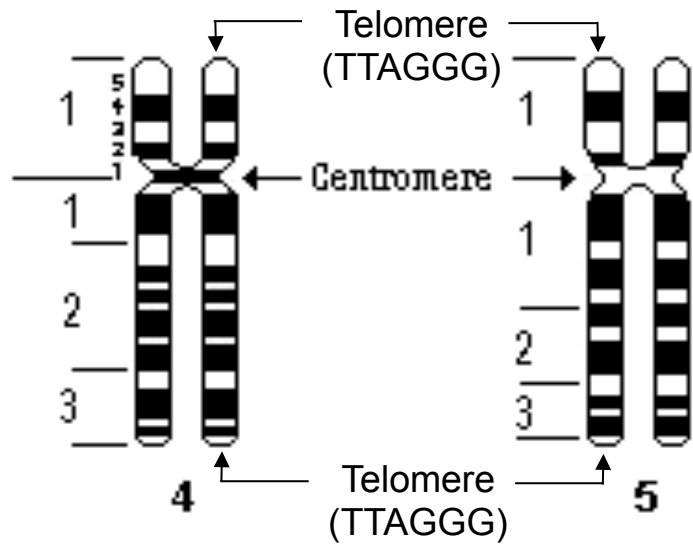
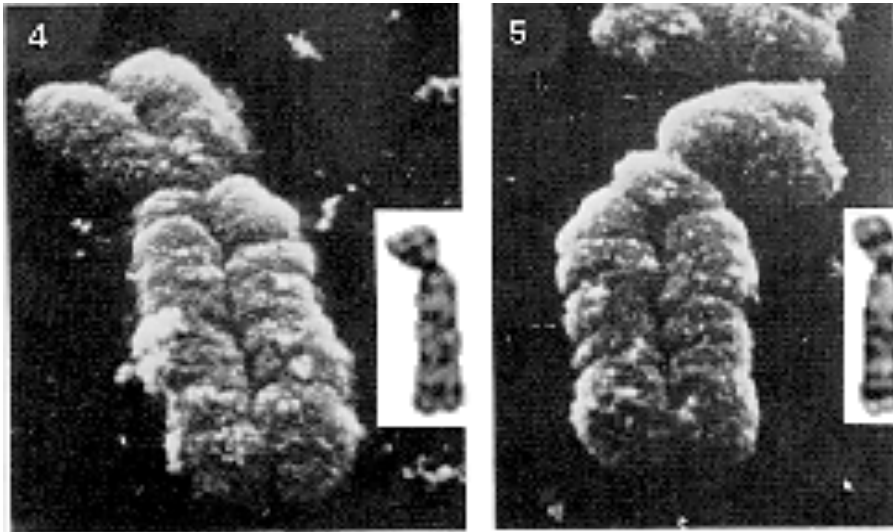


Contenuto di DNA: 4C

S
Synthesis



Contenuto di DNA: 2C



NET RESULT: EACH DNA MOLECULE HAS BEEN PACKAGED INTO A MITOTIC CHROMOSOME THAT IS 50,000x SHORTER THAN ITS EXTENDED LENGTH

Classificazione dei cromosomi: posizione del centromero

METACENTRICO



SUBMETACENTRICO

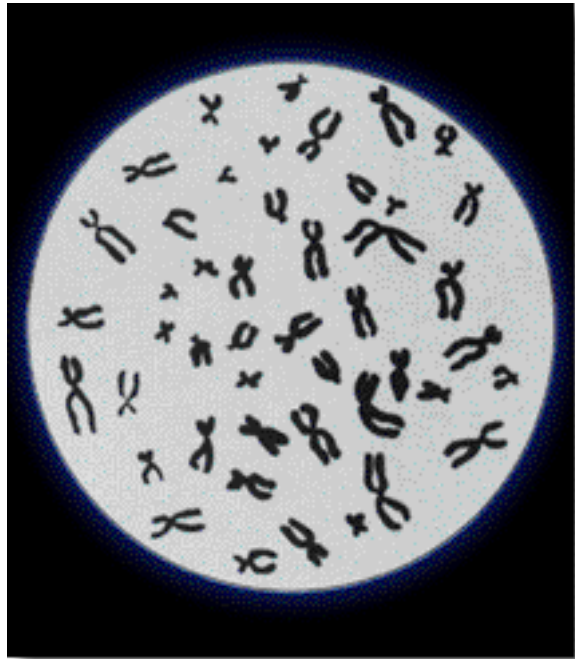


ACROCENTRICO



Sui bracci corti dei cromosomi acrocentrici
13, 14, 15, 21, 22 si localizzano i geni ribosomiali.
Queste regioni si presentano come satelliti separati
da filamenti sottili dal restante cromosoma
(Costrizioni secondarie)

ANALISI DEL CARIOTIPO: numero e struttura dei cromosomi



Coltivazione cellule - da sangue (linfociti), midollo osseo, trofoblasto, liquido amniotico, fibroblasti - per incrementarne il numero

Prelievo sangue periferico in eparina, allestimento della coltura in terreno contenente PHA (fitoemoagglutinina), un mitogeno che stimola i linfociti T

Blocco divisione cellulare in metafase con colchicina (o colcemide) (impediscono la formazione del fuso mitotico)

Lisi cellulare e colorazioni specifiche (diversi pattern di bandeggio)

BANDEGGI CROMOSOMICI

BANDE G: Digestione con tripsina prima della colorazione Giemsa che evidenzia bande scure (bande G) prevalentemente ricche in AT e bande chiare (bande G negative)

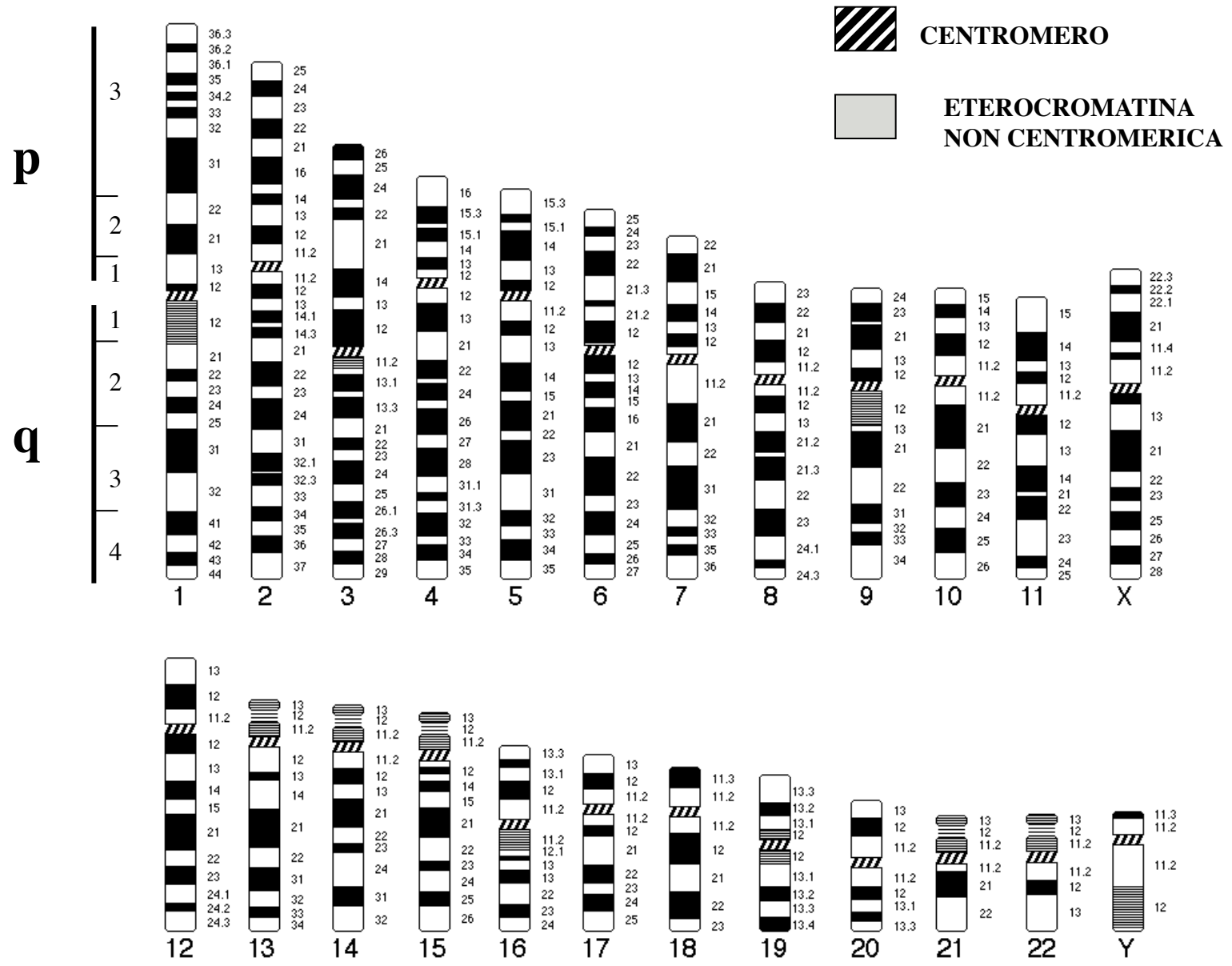
BANDE Q: sono uguali alle bande G. Si ottengono utilizzando un colorante fluorescente che si lega preferenzialmente a DNA ricco in AT come la Quinacrina.

BANDE R: pattern “Rreverse” del bandeggio G. I cromosomi sono denaturati con il calore prima della colorazione Giemsa

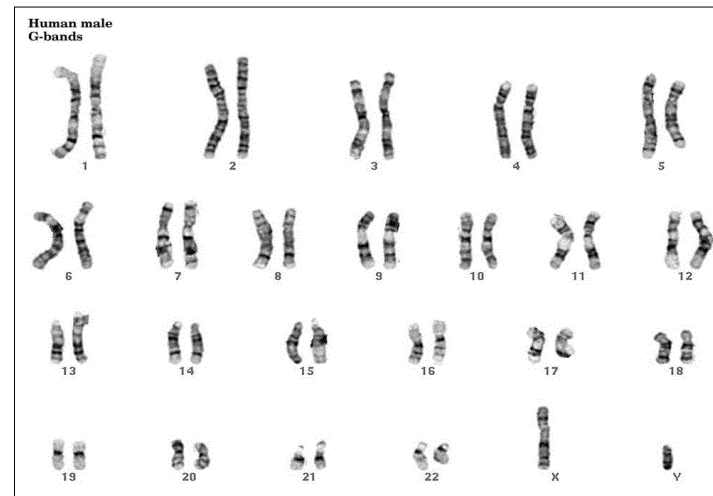
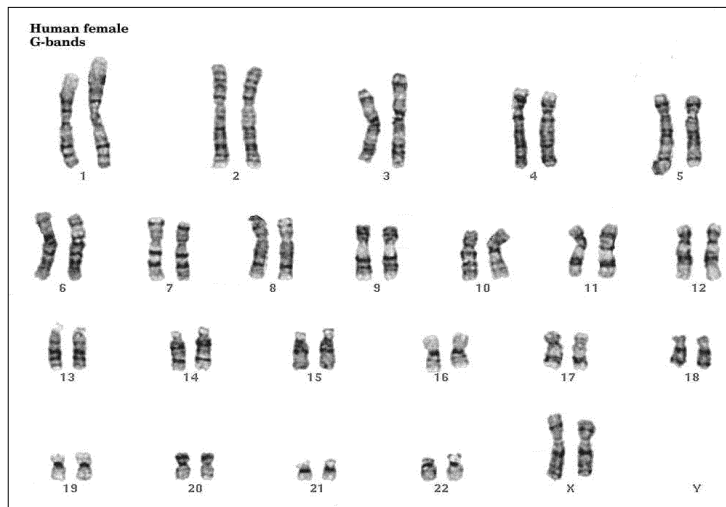
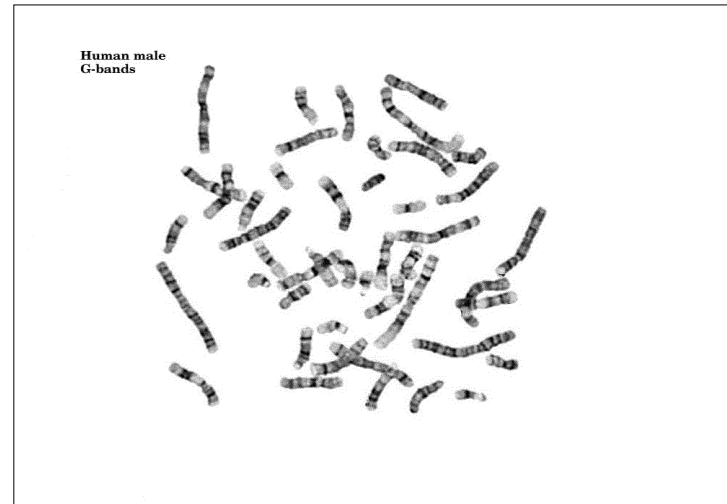
BANDE C: Constitutive heterochromatin (regioni attorno al centromero e Yq). I cromosomi sono denaturati in una soluzione satura di idrossido di bario della colorazione Giemsa

Caratteristiche delle bande cromosomiche

	Bande Q/G	Bande R	Bande C
Localizzazione	Bracci	Bracci	Regioni pericentriche Yq
Sequenza DNA	Regioni ripetute Alcune specifiche	Specifiche (ricche di geni)	Regioni ripetute
Basi nel DNA	Ricche in AT, alcune in CG	Ricche in CG	Ricche in AT
Tipo di cromatina	Eterocromatina dispersa	Eucromatina	Eterocromatina costitutiva
Stato in interfase	Condensato	Espanso	Condensato
Replica del DNA	Fase S medio- tardiva	Fase S precoce	Fase S tardiva
Attività trascrizionale	Bassa	Elevata	Assente



CARIOGRAMMA: cromosomi ordinati



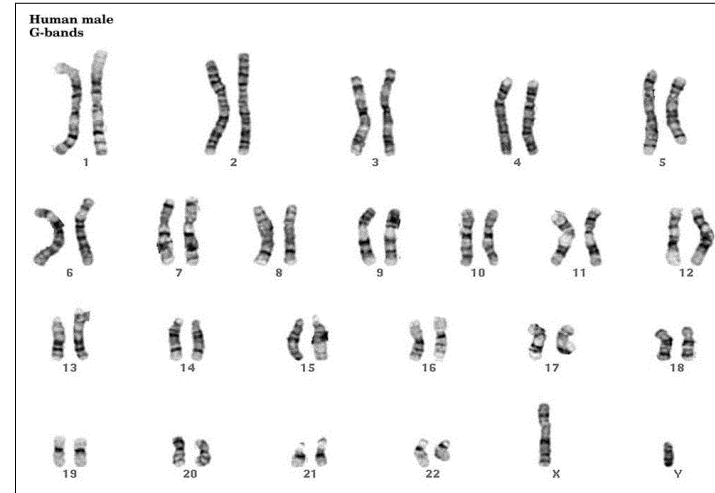
46,XX

CARIOTIPO

46,XY

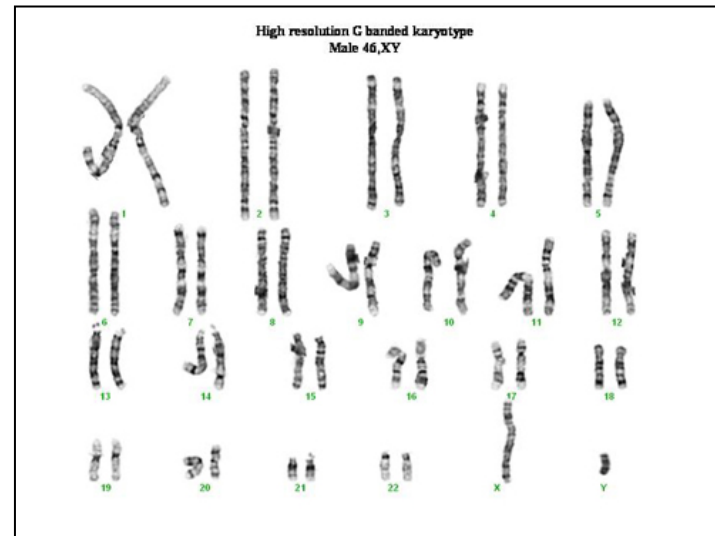
Numero bande → Grado di condensazione

Metafase (450 bande)



BANDE AD ALTA RISOLUZIONE

Prometaphase (550-850 bande)



ETEROMORFISMI CROMOSOMICI

Differenze morfologiche in alcune regioni cromosomiche
senza implicazioni cliniche

Regioni eterocromatiche pericentriche (cromosomi 1, 9 e 16)

Braccio lungo del cromosoma Y (**Yq**)

Regioni satelliti dei cromosomi acrocentrici

Siti fragili: un centinaio di siti dove si localizzano costrizioni secondarie a livello delle quali il cromosoma è più soggetto a rotture (induzione con afidicolina, inibitore dell'alpha polimerasi)

Telomeri

ANOMALIE CROMOSOMICHE

- **ANOMALIE COSTITUZIONALI**: presenti in cellule di tutto il corpo. Anomalie nello spermatozoo o cellula uovo, oppure fecondazione anomala o evento anomalo nello zigote
- **ANOMALIE SOMATICHE** (o acquisite): presenti in un gruppo di cellule o tessuti. L'individuo è un **MOSAICO**, pur derivando tutte le cellule dallo stesso zigote.

Anomalie cromosomiche

Di numero

Poliploidia

- Triploidia
- tetraploidia

Aneuploidia

- trisomia
- Monosomie

Di struttura

- Delezione
- Duplicazione
- Traslocazione
- Inversione

POLIPLOIDIA

Uno o più assetti aploidi in soprannumero

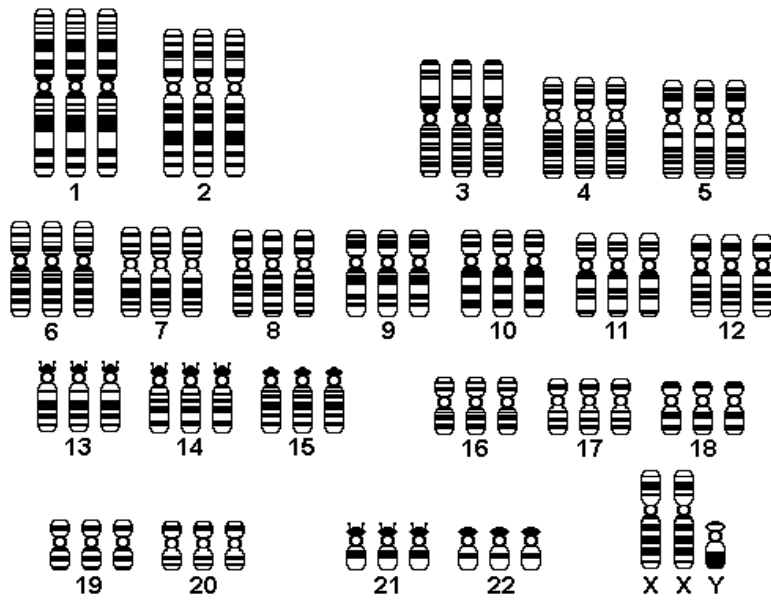
1% degli zigoti

Aborto spontaneo precoce

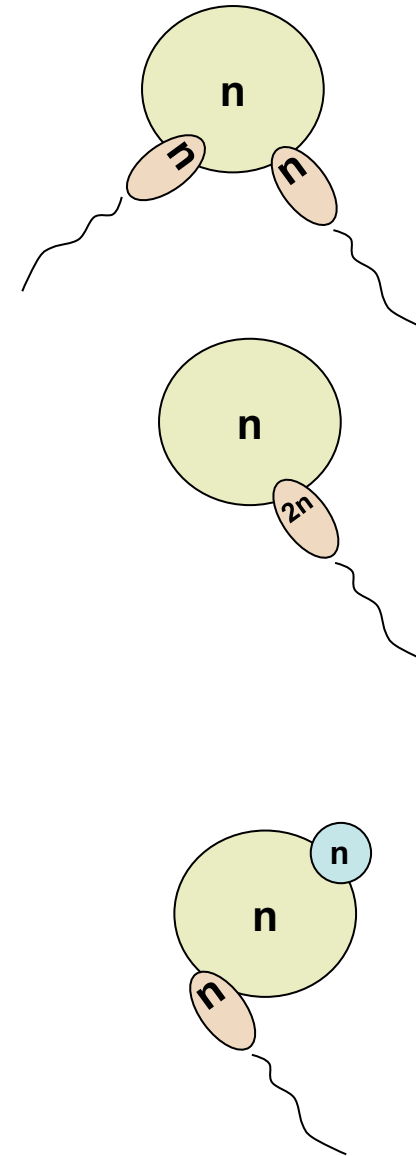
Triploidia alla nascita è eccezionale, sempre letale

Condizione sporadica che non modifica il rischio di ricorrenza nelle successive gravidanze

TRIPLOIDIA



Cause

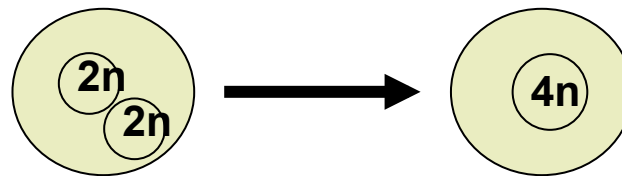


Conseguenze (fenotipo): letale

TETRAPLOIDIA

Replicazione

Cause



**Senza divisione cellulare
(ENDOMITOSI)**

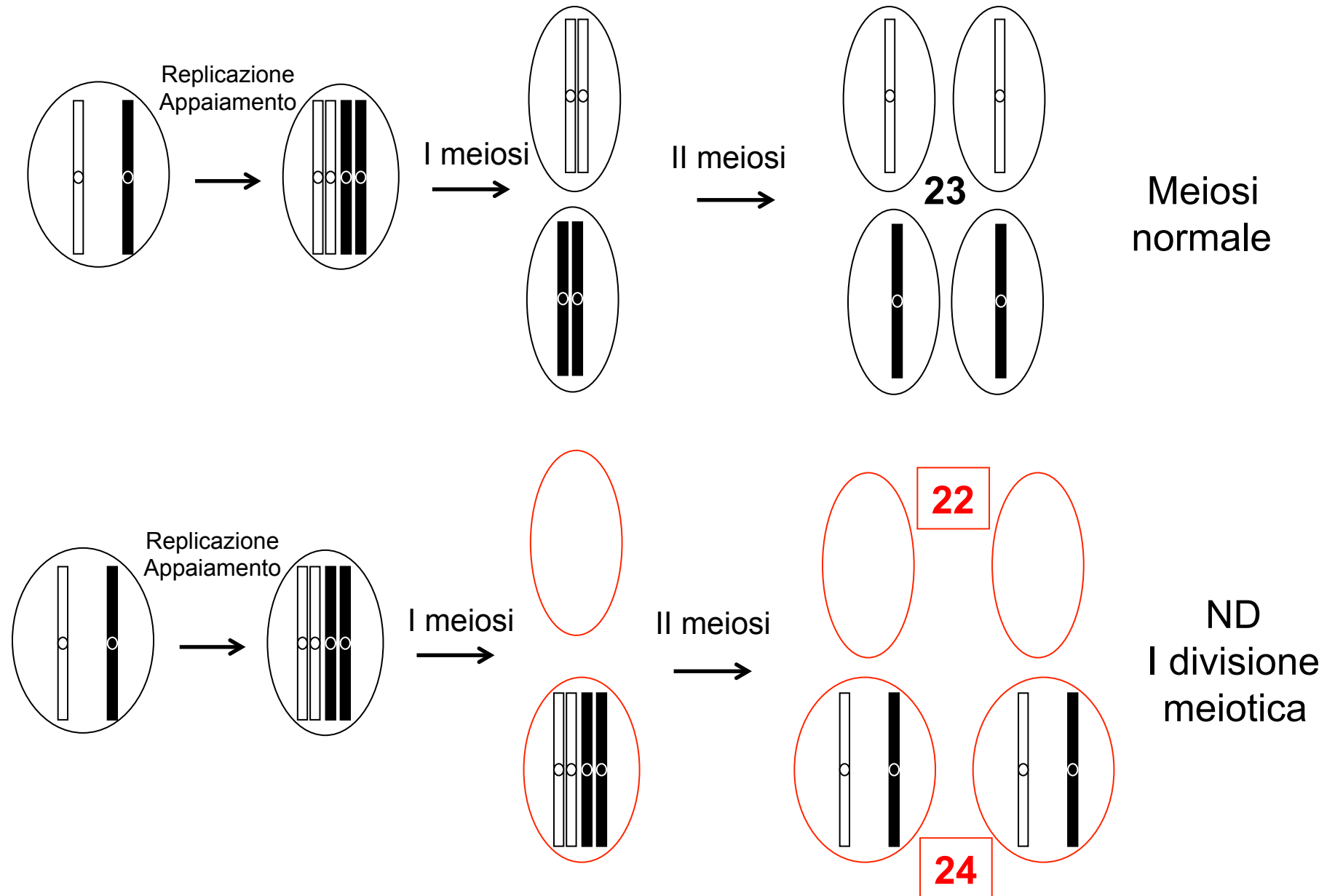
Conseguenze (fenotipo): letale

ANEUPLOIDIA

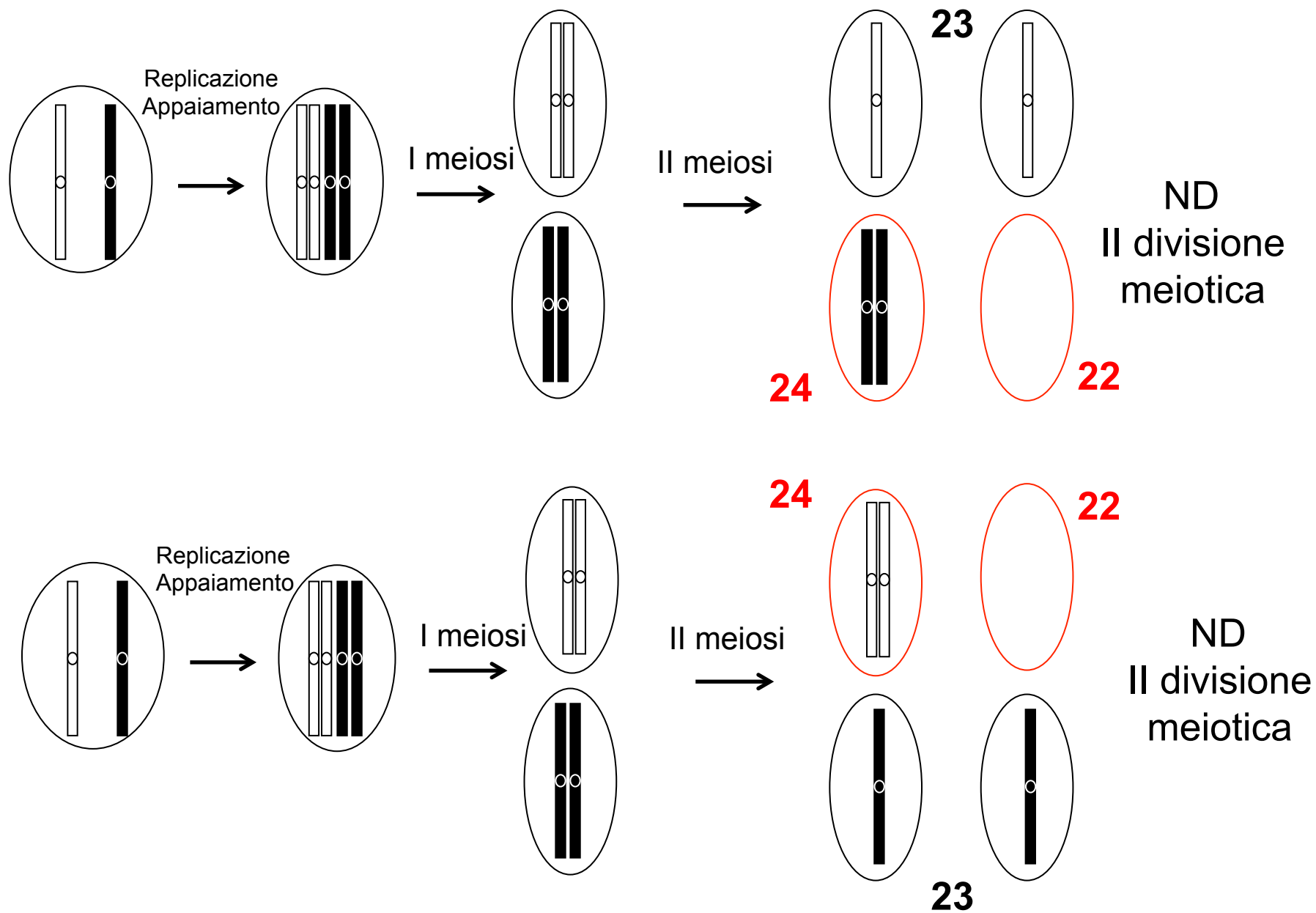
PERDITA O ACQUISIZIONE di alcuni cromosomi

- **NON-DISGIUNZIONE**: incapacità di cromosomi o di cromatidi di separarsi rispettivamente in I e II divisione meiotica.
- **RITARDO ANAFASICO**: ritardata migrazione di un cromosoma durante l'anafase, conseguente perdita del cromosoma.

Non disgiunzione (ND) meiotica



Non disgiunzione (ND) meiotica

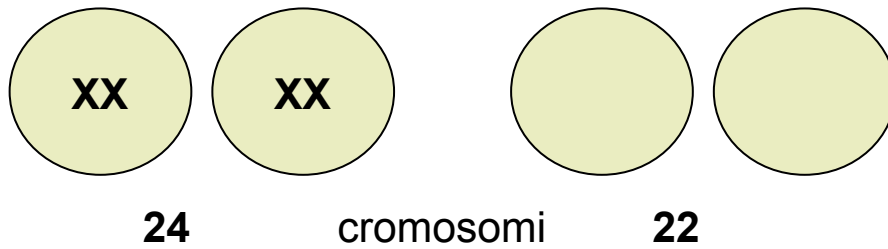


NON DISGIUNZIONE CROMOSOMI SESSUALI

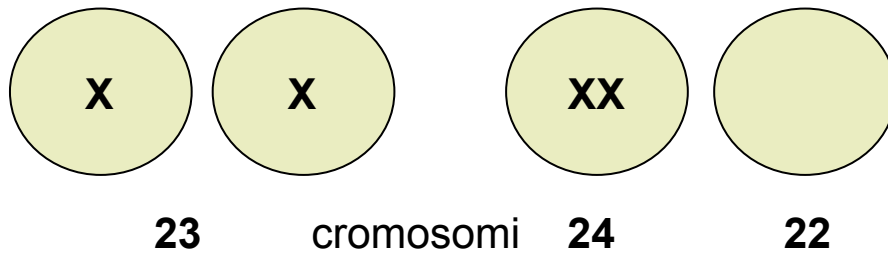
Prodotti oogenesi

Non-disgiunzione

I divisione meiotica



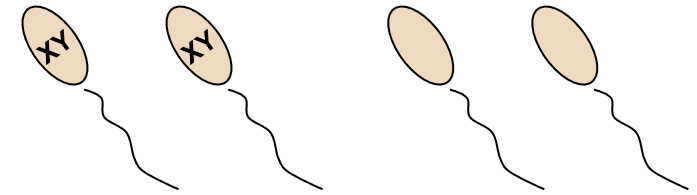
II divisione meiotica



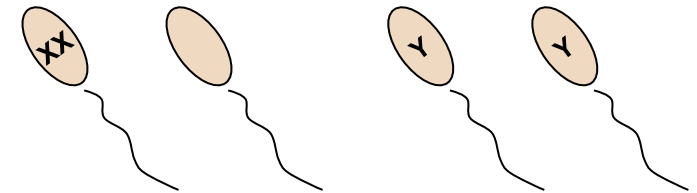
Prodotti spermatogenesi

Non-disgiunzione

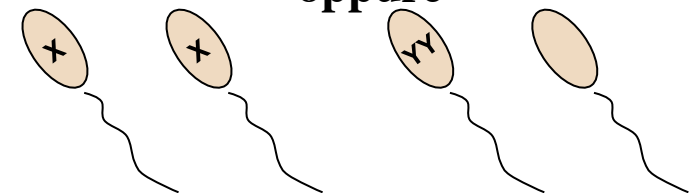
I divisione meiotica



II divisione meiotica



oppure



Rischio di aneuploidia (tutte le aneuploidie) cromosomica in rapporto all'età materna alla nascita

Età	Rischio	Età	Rischio
15	1/1.859	31	1/459
16	1/1.789	32	1/392
17	1/1.712	33	1/332
18	1/1.631	34	1/278
19	1/1.546	35	1/230
20	1/1.456	36	1/172
21	1/1.361	37	1/188
22	1/1.264	38	1/153
23	1/1.167	39	1/97
24	1/1.070	40	1/76
25	1/972	41	1/59
26	1/876	42	1/45
27	1/784	43	1/34
28	1/695	44	1/25
29	1/611	45	1/19
30	1/532	46	1/14

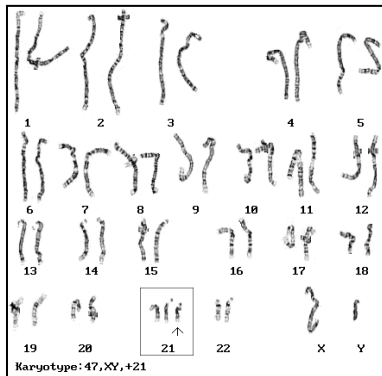
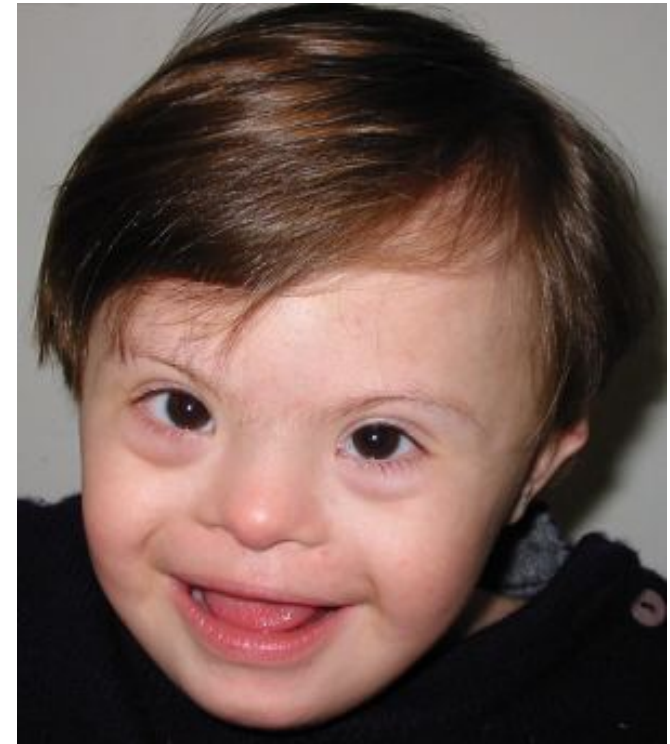
Origine parentale delle aneuploidie

Anomalia	% materna	% paterna
Trisomia 13	85	15
Trisomia 18	90	10
Trisomia 21	95	5
45,X	33	67
47,XXX	95	5
47,XXY	55	45
47,XYY	0	100

SINDROME DI DOWN

Prevalenza alla nascita: 1:700-1.000

- **Ipotonia neonatale**
- **Facies caratteristica**
(viso tondo, naso piccolo, sella piatta, narici anteverse, palpebre oblique verso l'alto, profilo piatto, ecc.)
- **Brachicefalia con occipite piatto**
- **Padiglioni auricolari corti e dismorfici**
- **Collo corto con cute abbondante sulla nuca**
- **Mani corte, solco palmare unico**
- **Aumento distanza tra alluce e II dito del piede**
- **Ritardo mentale**
- **Cardiopatie (50% dei casi)**
- **Malattia di Alzheimer (attorno ai 40 anni)**



SINDROME DI DOWN: cause genetiche

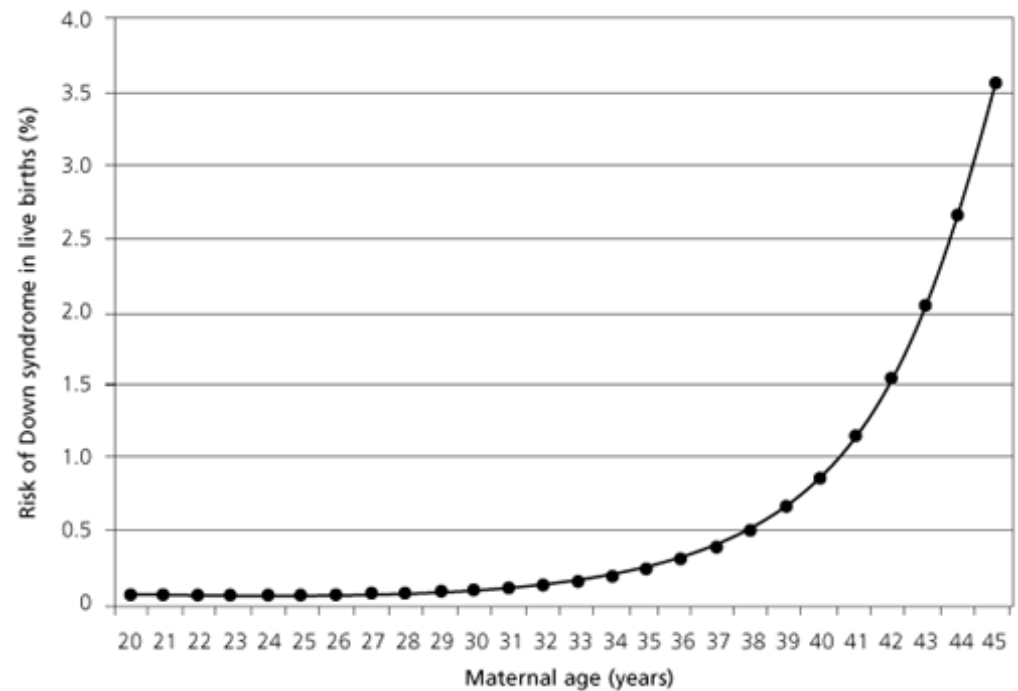
Trisomia dovuta a non-disgiunzione 92-95%			
Meiosi materna 95%		Meiosi paterna 5%	
I 75%	II 25%	I 50%	II 50%

3-5% Trisomia in mosaico

**5% anomalie cromosomiche strutturali:
traslocazione Robertsoniana
duplicazione regione critica del cromosoma 21**

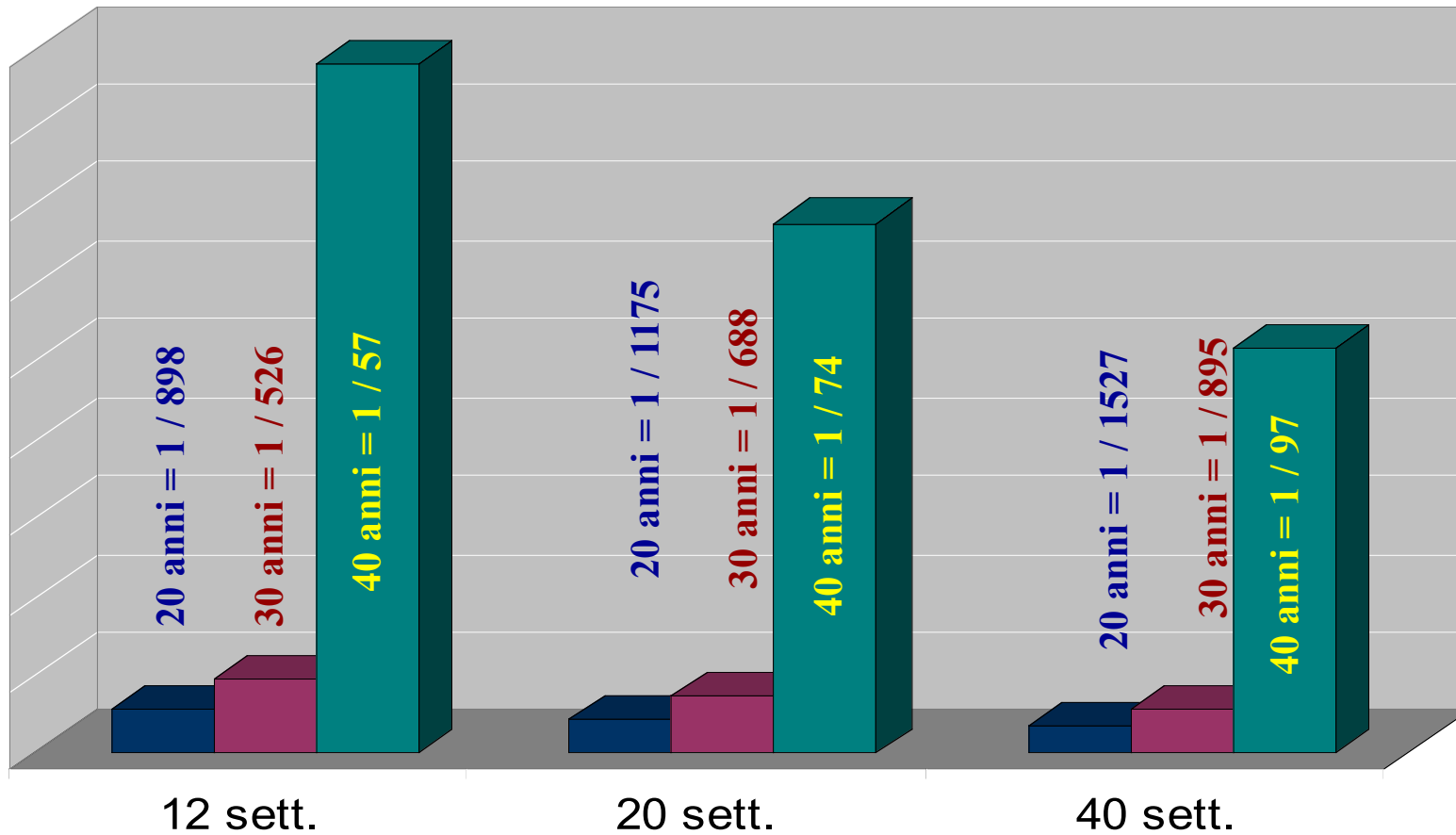
Probabilità di concepire un figlio Down in base all'età materna

Età materna	Indice di probabilità
meno di 19 anni	1 : 2500
20 - 24 anni	1 : 1640
25 - 29 anni	1 : 1150
30 - 34 anni	1 : 700
35 - 39 anni	1 : 230
40 - 44 anni	1 : 60
più di 45 anni	1 : 47



Rischio di trisomia 21

In relazione all'età materna e all'epoca gestazionale



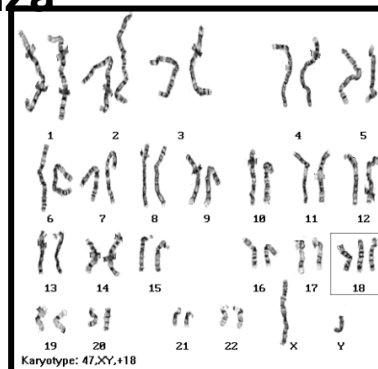
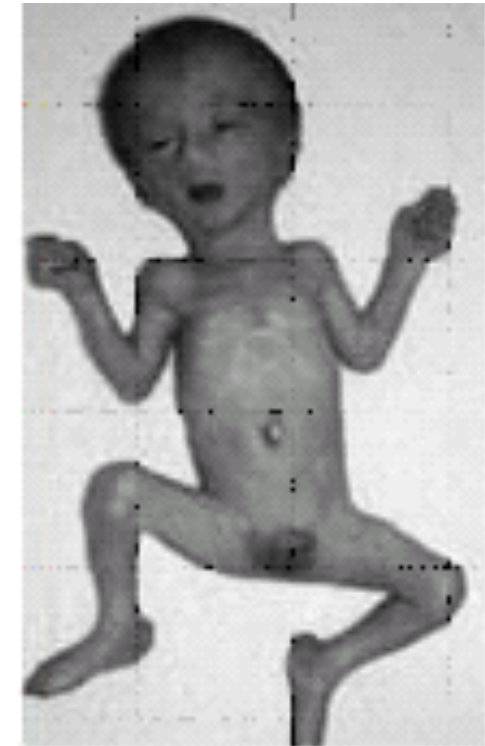
Modificato da Snijders, 1994

Trisomia 18 o sindrome di Edwards

Prevalenza alla nascita: 1:7.700

Femmine:maschi = 5:1

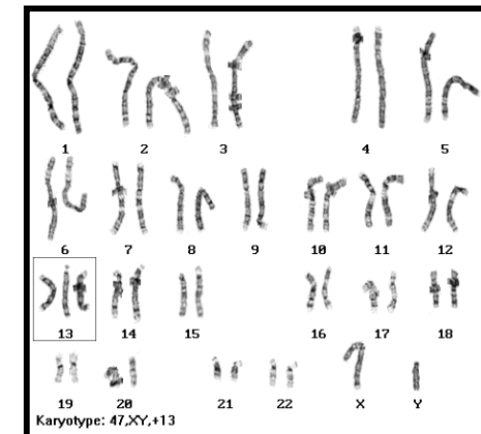
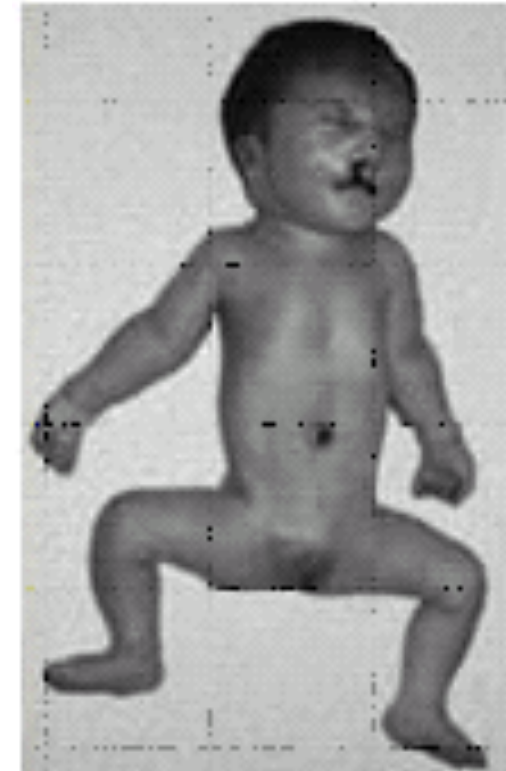
- **Grave ritardo di accrescimento**
- **Facies caratteristica**
(fronte e rime palpebrali strette, naso, bocca, e mento piccoli)
- **Anomalie del cranio, sterno corto, bacino piccolo**
- **Mano chiusa a pugno con flessione delle dita**
- **Piede a “picozza”**
- **Malformazioni sistema nervoso centrale**
- **Labiopalatoschisi**
- **Cardiopatie (>95% dei casi)**
- **Anomalie intestinali e renali**
- **Qualche mese di sopravvivenza**



Trisomia 13 o sindrome di Patau

Prevalenza alla nascita: 1:10.000

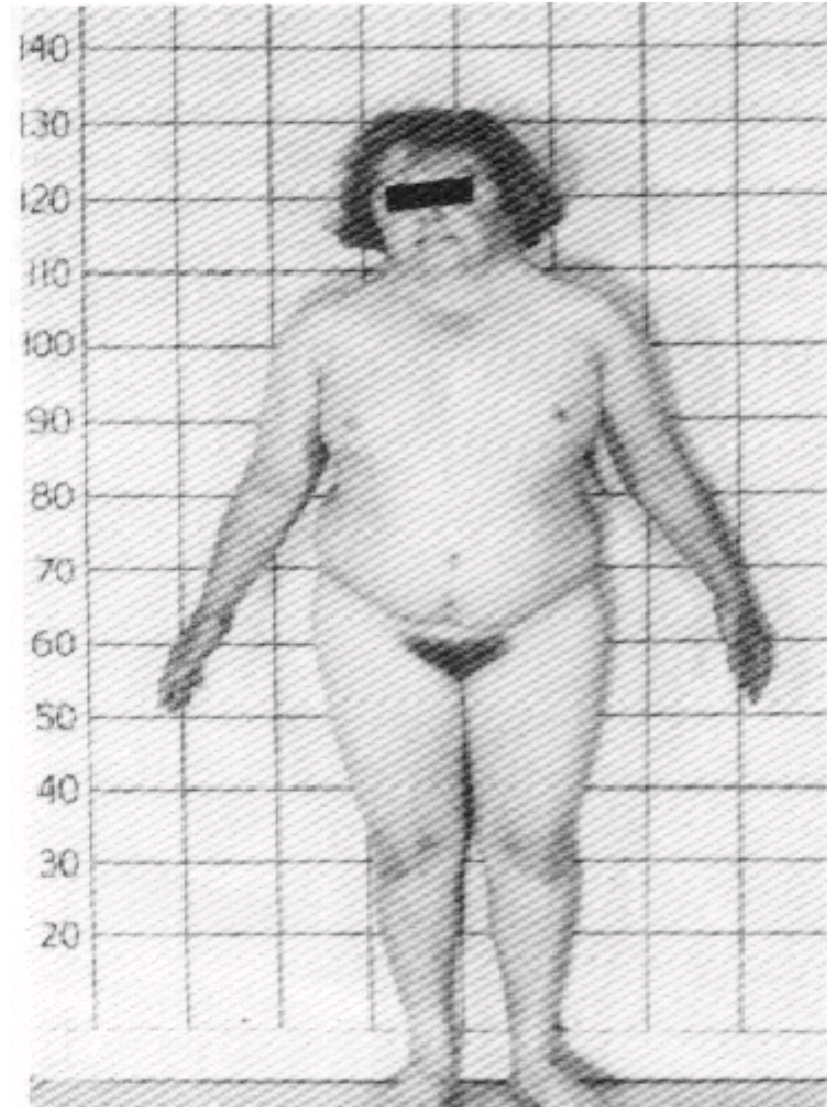
- Schisi facciali e/o del cavo orale
- Microftalmia (occhi piccoli e malformati)
- Polidattilia
- Malformazioni sistema nervoso centrale
- Cardiopatie
- Anomalie intestinali e genitali



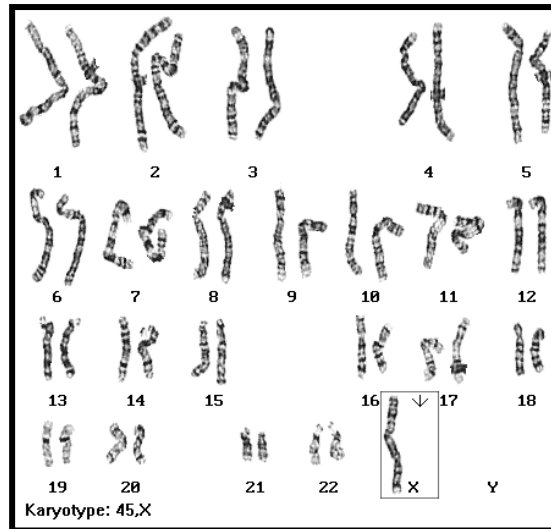
SINDROME DI TURNER

Frequenza alla nascita alla nascita:
1:5.000-10.000

- **Bassa statura**
- **Amenorrea primaria, tessuto ovarico sostituito da connettivo**
- **Facies particolare** (ptosi palpebrale, epicanto)
- **Collo largo, corto con cute abbondante che tende a formare una plica cosiddetta pterigio**
- **Torace largo a "corazza"**
- **Alterazioni scheletriche**
- **Caratteri sessuali secondari iposviluppati**



SINDROME DI TURNER: cause genetiche



45,X

Monosomia X	Mosaico	Anomalie di struttura dell'X
50%	25%	25%

Ritardo anafasico nella spermatogenesi nel 60% dei casi

SINDROME DI KLINEFELTER

10% maschi azoospermici
1% ritardi mentali
hanno la sindrome

Frequenza alla nascita alla nascita: 1:1.000

- **Ipogonadismo**
- **Bassi livelli testosterone**
- **Azospermia costante**
- **Caratteri sessuali secondari poco sviluppati**
- **Ginecomastia (30%)**
- **Statura superiore alla media**
- **Arti relativamente lunghi**
- **Aumentata frequenza scoliosi, osteoporosi e diabete**

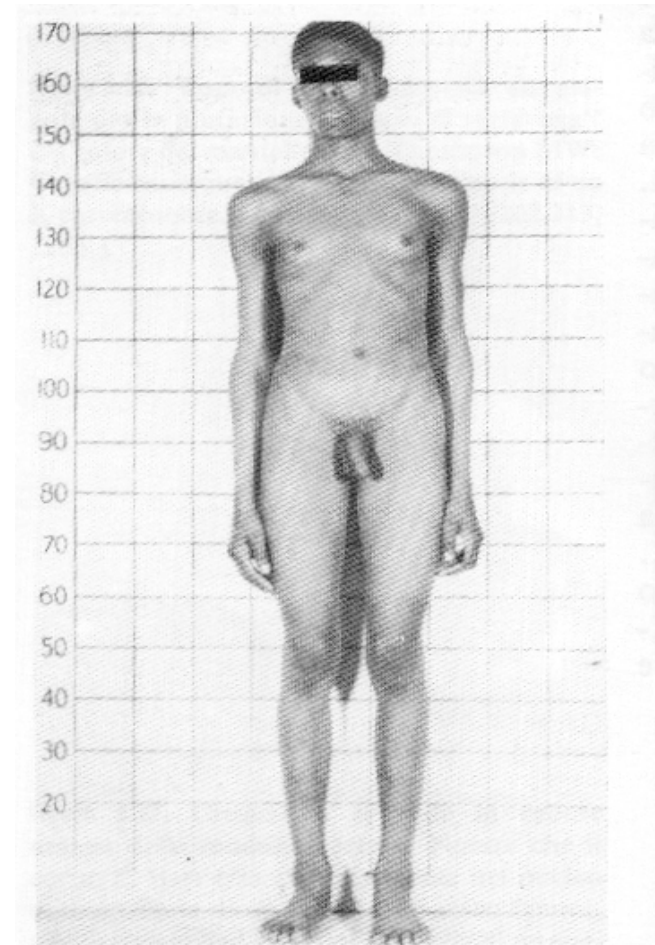
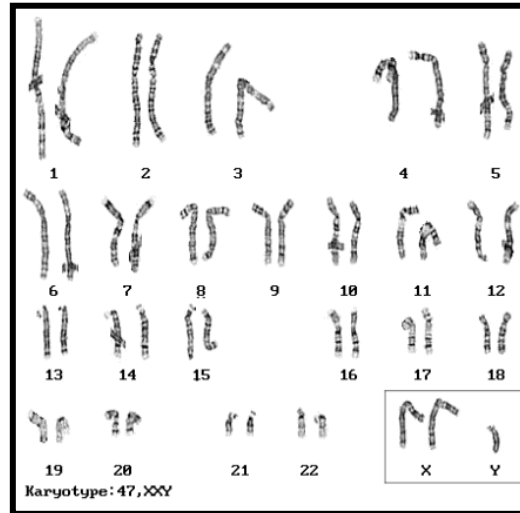


Figura 8.30. La sindrome di Klinefelter. Nota-

SINDROME DI KLINEFELTER: cause genetiche



47, XXY

Non-disgiunzione		Mosaico	
90%		10%	
Meiosi materna		Meiosi paterna	
55%		45%	
I	II	I	
75%	25%	100%	

Probabilità di raggiungere il termine della gravidanza di alcune aneuploidie

Anomalia	% al termine della gravidanza
45,X	0,3
Trisomia 13	2,8
Trisomia 18	5,4
Trisomia 21	22,1
47,XXY	55,3
47,XXX	70,0
47,XYY	100,0

Anomalie cromosomiche

Di numero

Poliploidia

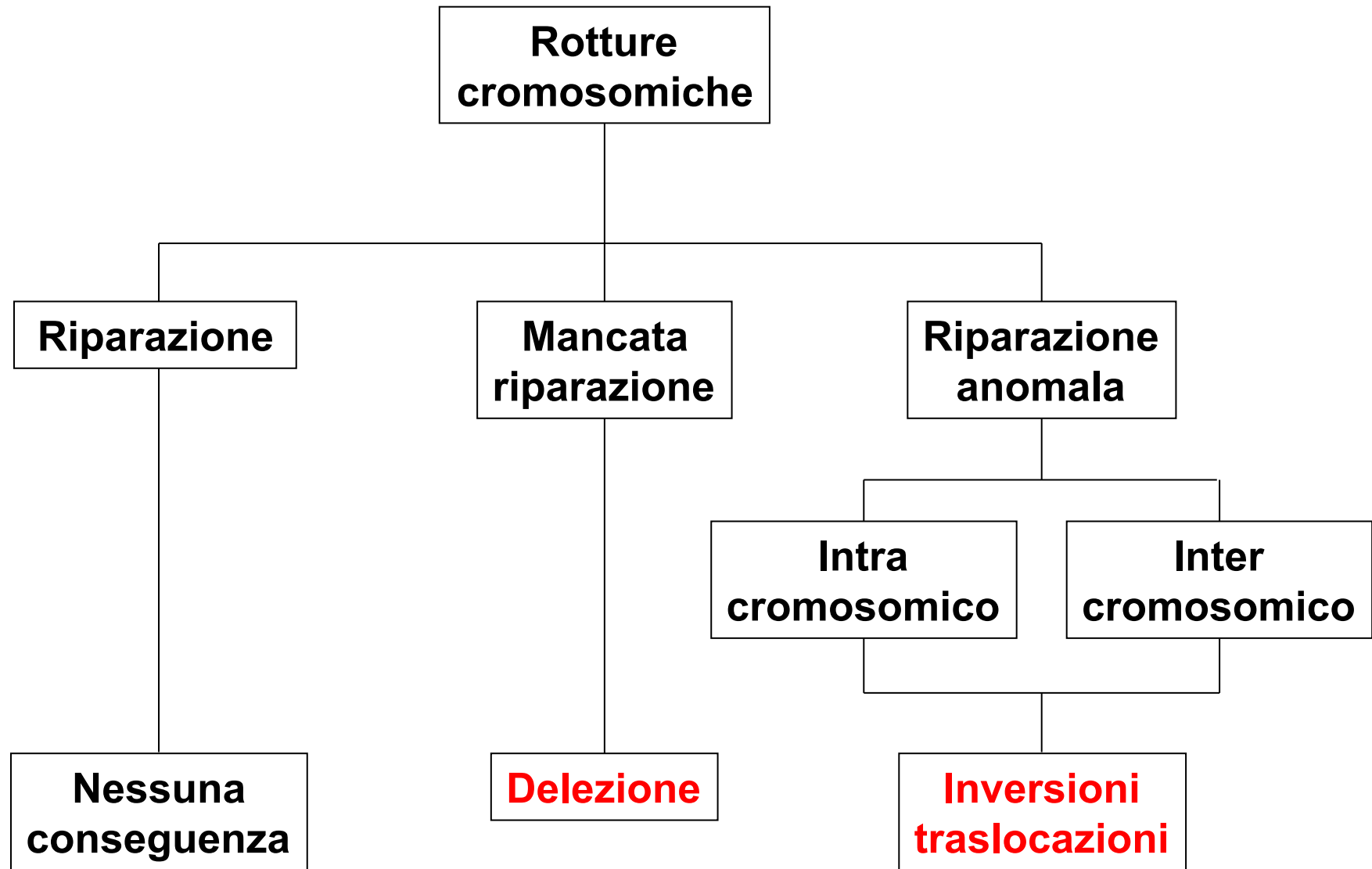
- Triploidia
- Tetraploidia

Aneuploidia

- Trisomia
- Monosomia

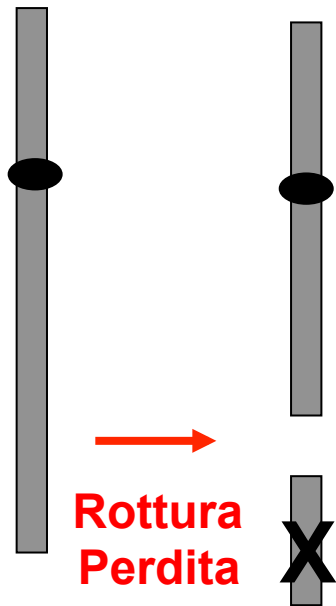
Di struttura

- Delezione
- Duplicazione
- Traslocazione
- Inversione
- Cromosoma anello
- Isocromosoma

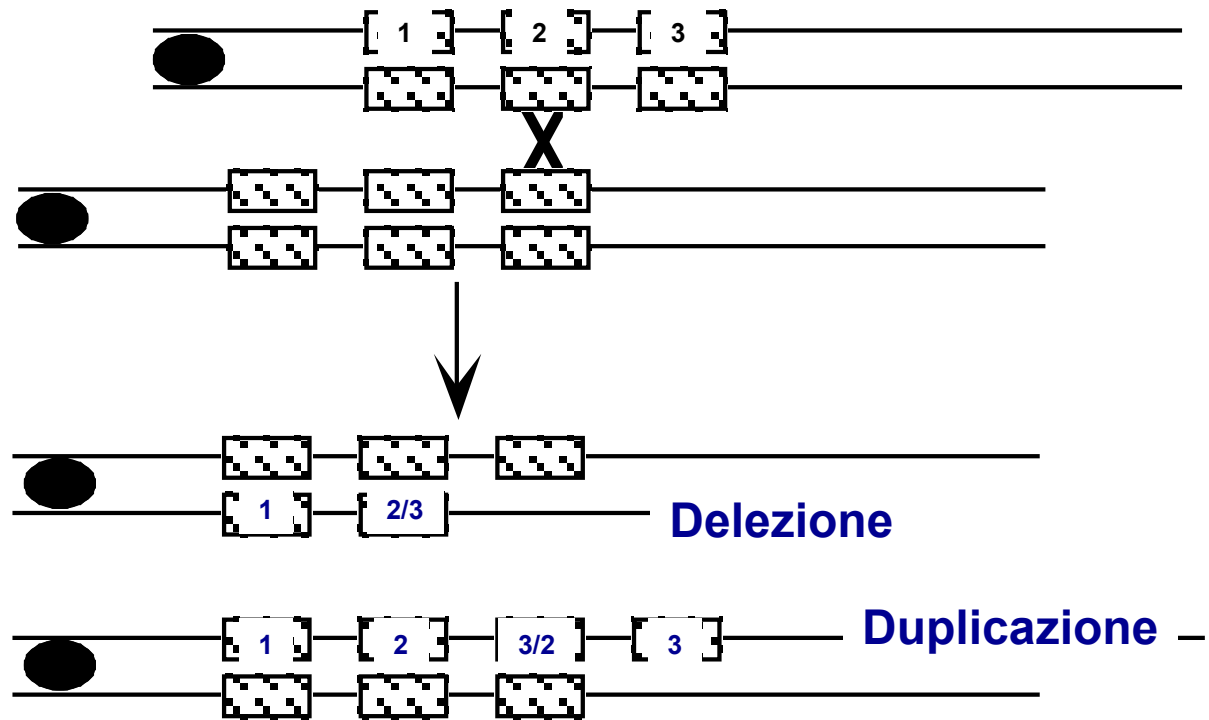


DELEZIONI E DUPLICAZIONI

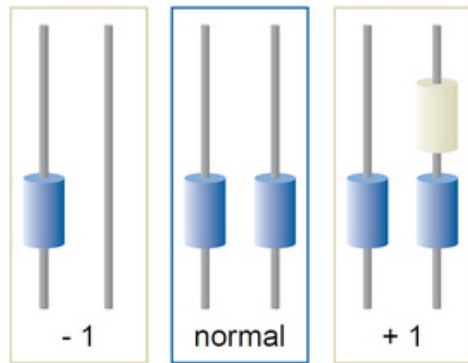
Non allelic homologous recombination (NAHR)



Delezione terminale



Delezione interstiziale / Duplicazione



CNV: copy number variations

Generalmente ci sono due copie di qualsiasi segmento di DNA autosomico, ciascuna ereditata da un genitore.

CNV: più (duplicazioni) o meno (delezioni) copie di quel segmento (da un migliaio a qualche milione di paia di basi). La perdita o l'acquisizione di un numero variabile di copie è stato scoperto confrontando i genomi degli individui tra loro. CNV possono essere **ereditate o eventi de novo**.

CNV sono loci fiancheggiati da **blocchi di sequenze ripetute** (200-400 kb) chiamate low copy repeats (LCR o duplicazioni segmentali) che favoriscono il crossing-over diseguale (non allelic homologous recombination – NAHR)

CNV possono includere regioni codificanti e geni, determinando variazioni nel dosaggio dei geni coinvolti. In alcuni casi le CNV sono associate a malattie.

Sindromi da geni contigui: delezione di più geni con più manifestazioni.

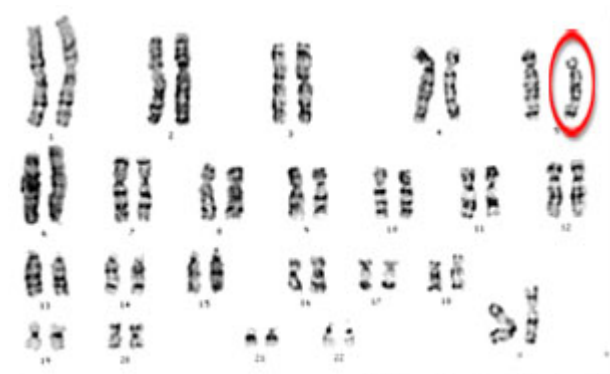
MALATTIA DI CRI DU CHAT – del(5p)

Prevalenza alla nascita: 1:25.000

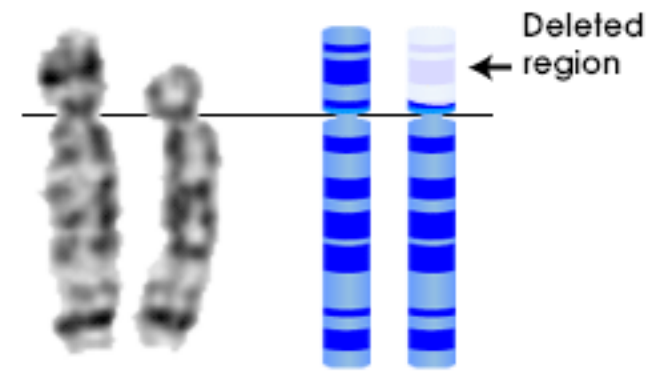
- **Tipico pianto dei pazienti alla nascita**
(miagolio di un gatto)
- **Microcefalia**
(testa piccola e tonda)
- **Ipertelorismo oculare**
(aumento della distanza tra gli occhi)
- **Micrognazia**
(mento piccolo)
- **Padiaglioni auricolari a bassa attaccatura**
- **Grave ritardo mentale**



CdC Support Group
www.cridchat.u-net.com



Tokyo Medical University



Cri-du-chat Chromosome 5 pair

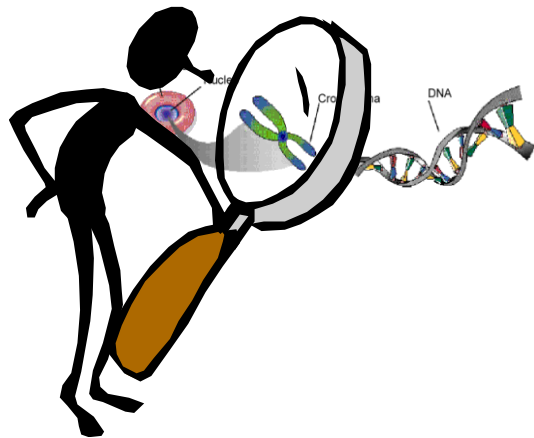
MICRODELEZIONI

- **Sindrome di Williams** del(7q11.23)
- **Sindrome di DiGeorge/velo-cardio-facciale** del(22q11.2)
- **Sindrome trico-rino-falangeale di tipo II** del(8q24.13-q24.32)
- **Sindrome di Prader-Willi** (15q11-q13)
- **Sindrome di Angelman** (15q11-q13)
- **Ritardo mentale** (5-10%): delezione delle regioni subtelomeriche del(1p36), del(2q37), del(9q34.3), del(22q13.3)
- **Sindromi da geni contigui** (quadri clinici che si originano degli effetti dovuti all' emizigosi dei singoli geni localizzati nella regione deleta)

Citogenetica

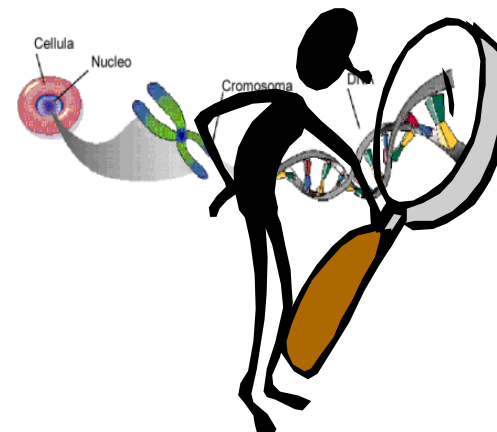
Classica

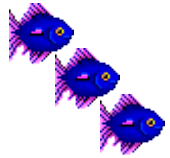
Anomalie cromosomiche
> 5 Mb.



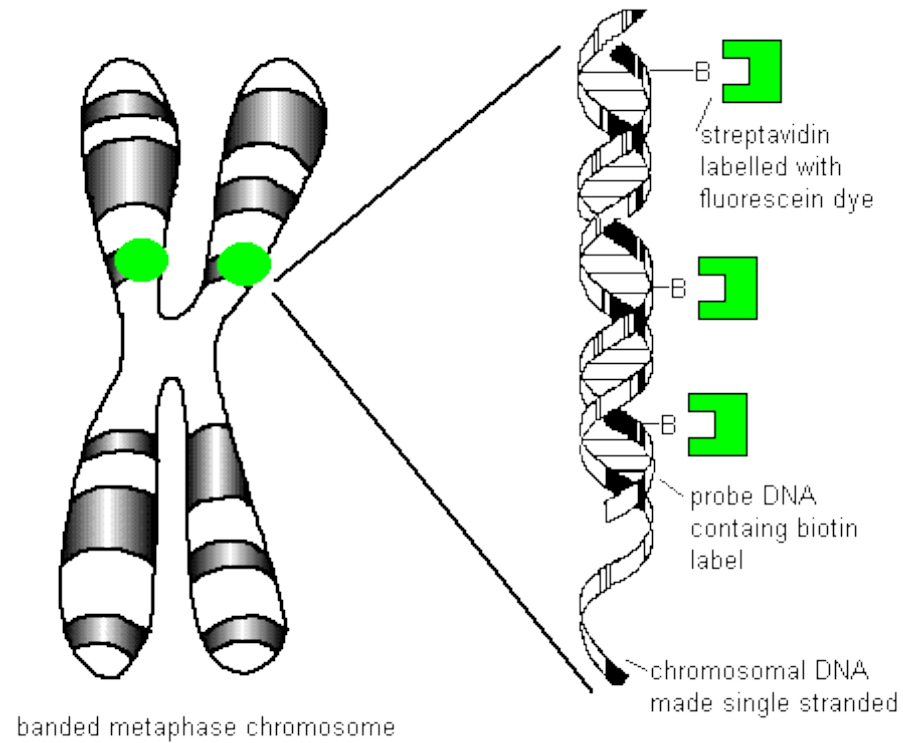
Molecolare

Analisi della struttura
cromosomica con tecniche di
biologia molecolare
Anomalie cromosomiche < 5Mb





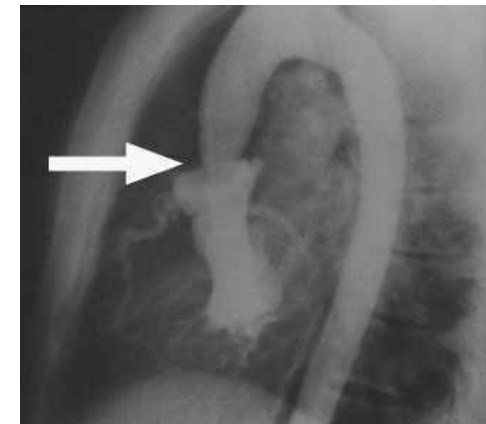
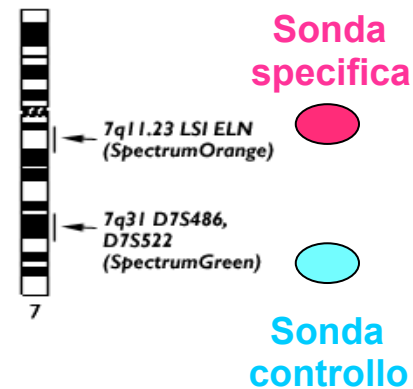
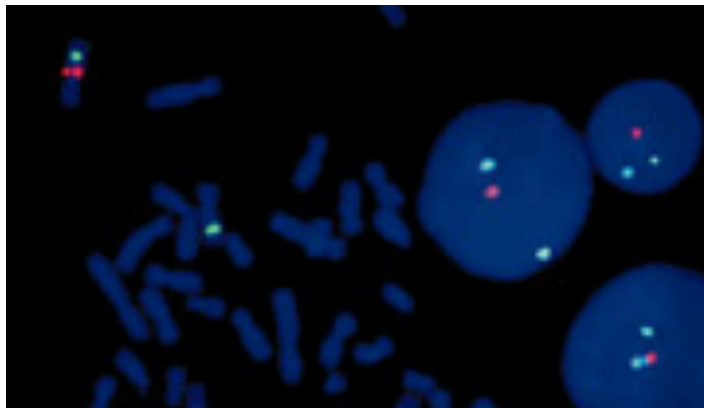
FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)



SINDROME DI WILLIAMS – del(7q11.23)

Frequenza alla nascita: 1:20.000

- **Dismorfismi facciali caratteristici** (fronte ampia, radice del naso infossata, labbra grosse, mento piccolo, filtro lungo)
- **Stenosi sopralvalvolare dell' aorta**
- **Deficit cognitivo**
- **Grave ritardo psicomotorio**



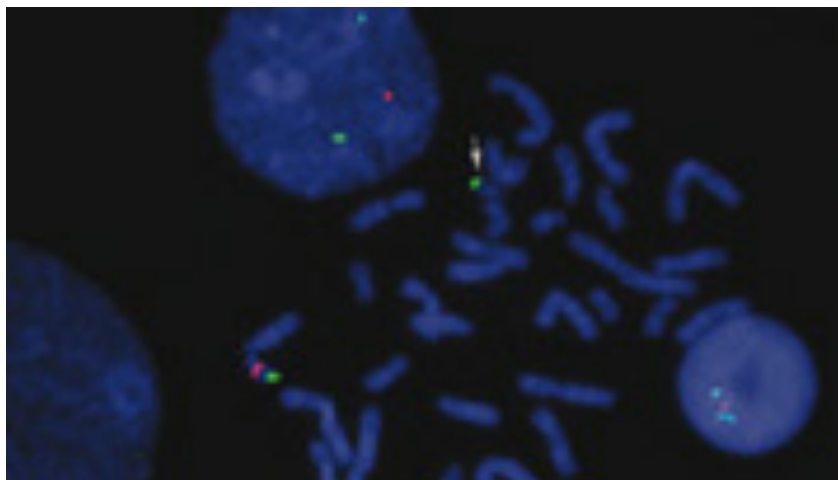
SINDROME DI DiGeorge/velo-cardio-facciale – del(22q11.2)

CATCH22

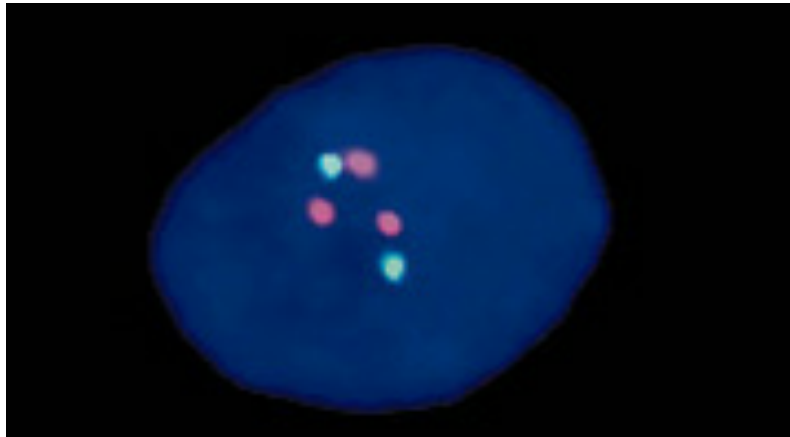
(Cardiac defects, Abnormal facies, Thymic hypo/aplasia, Cleft palate, Hypocalcemia)

Frequenza alla nascita: 1:2.000 - 4.000

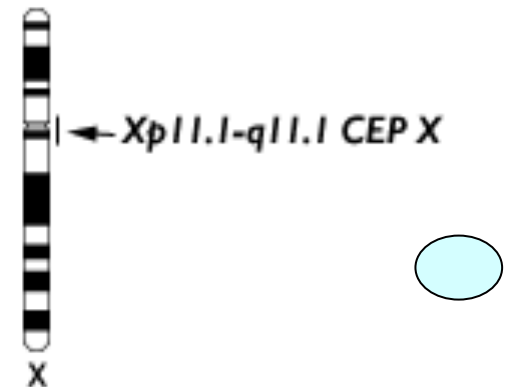
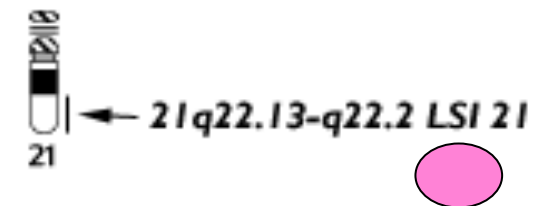
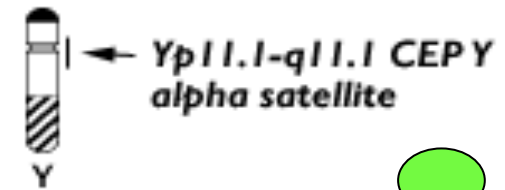
- **Anomalie cranio facciali** (micrognazia, ipertelorismo, filtro corto, palatoschisi, ugola bifida)
- **Ipo-aplasia del timo e delle paratiroidi**
- **Cardiopatía**
- **Ritardo mentale**



DIAGNOSI DI ANEUPLOIDIE

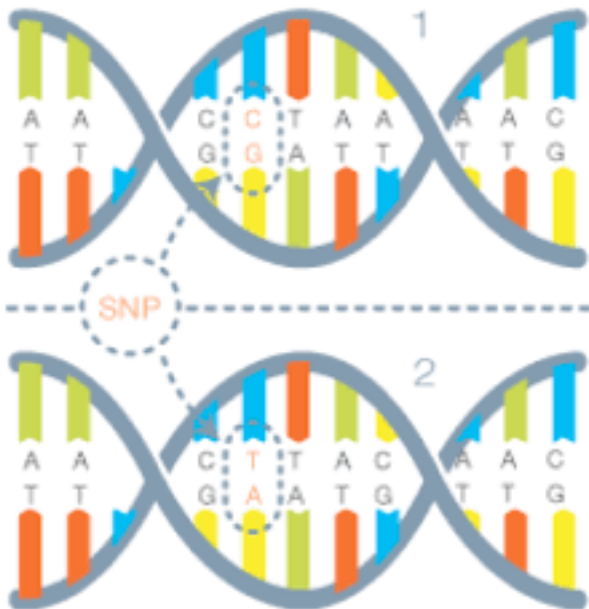


47,XX +21



Metodi per l'analisi delle CNVs

- **CGH** (Comparative Genome Hybridization) array: si basa sull'ibridazione competitiva ad un array con migliaia di **frammenti genomici** noti, di due campioni di DNA, caso e controllo, marcati diversamente.
- **SNP** (single Nucleotide Polymorphism) **array**: comparazione dell'intensità di segnale del campione con il valore medio di intensità di un campione di controllo; una deviazione dell'intensità rispetto al controllo indica una variazione del numero di copie.

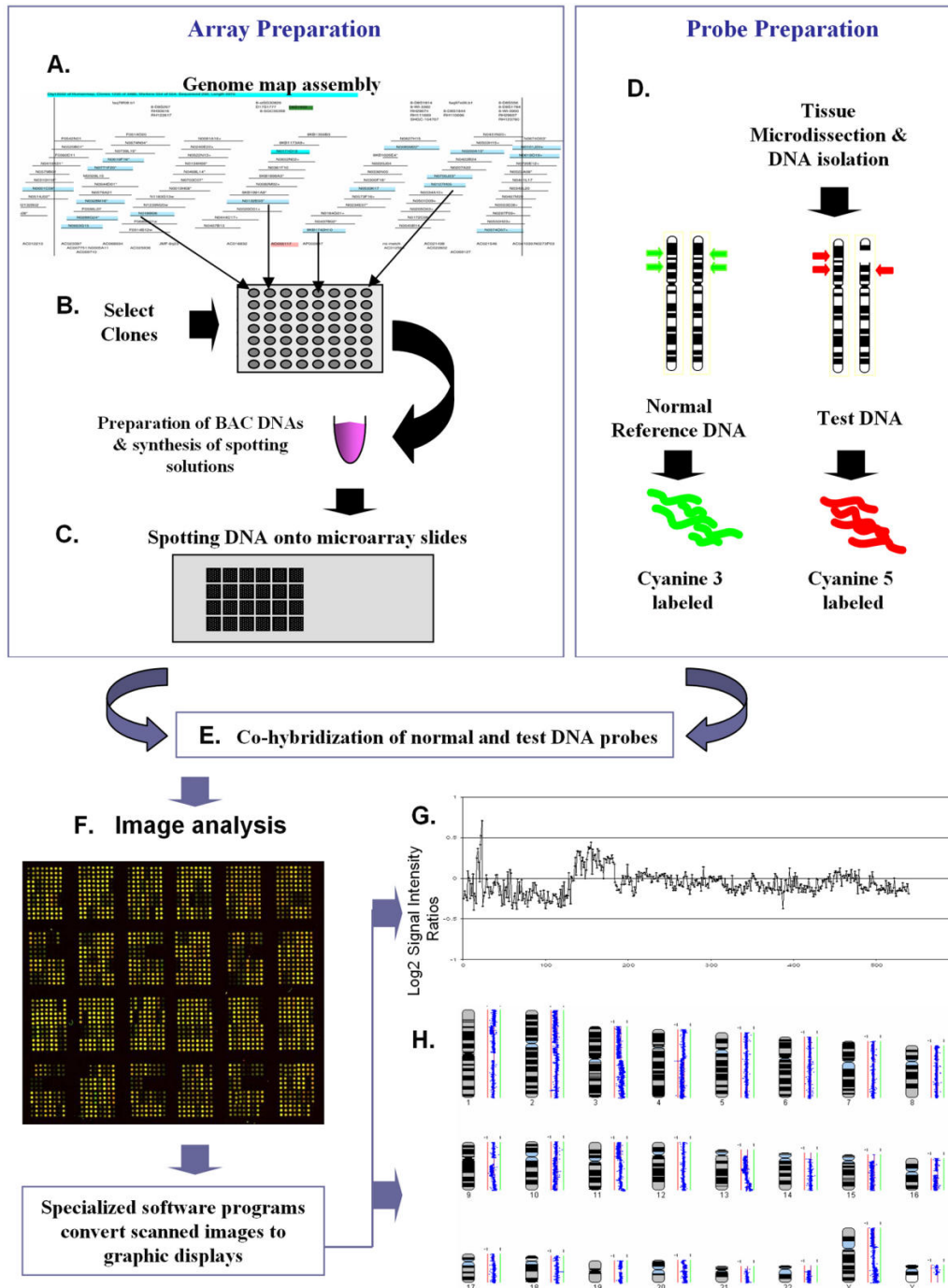


Variazioni comuni nel genoma

Circa uno SNP ogni 300-500 nucleotidi

Circa 10 milioni di SNP nel genoma umano

Generalmente "neutri"



CGH (Comparative Genome Hybridization)

Array-CGH
(hybridization on microarrayed DNA)

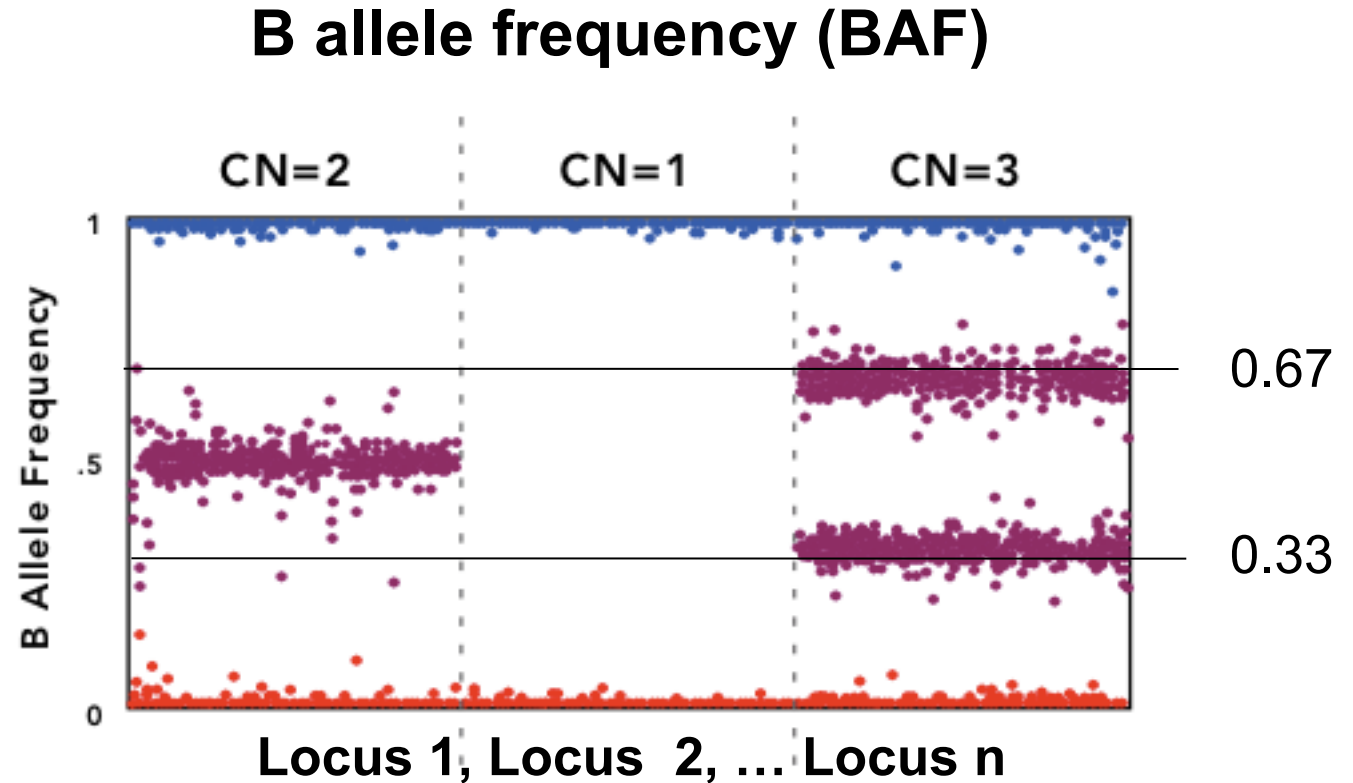
Ottimale per identificare

**Delezioni
Duplicazioni**

SNP array: genotyping of SNP

Allele nomenclature at one locus

T>C (nucleotide)
 A>a
 1>2
 *>#
A>B



CN=2

AA: $0/2 = 0$
 AB: $1/2 = 0,5$
 BB: $2/2 = 1$

CN=1

A: $0/1 = 0$
 B: $1/1 = 1$

CN=3

AAA: $0/3 = 0$
 AAB: $1/3 = 0.33$
 ABB: $2/3 = 0.67$
 BBB: $3/3 = 1$

CN=4

AAAA: $0/4 = 0$
 AAAB: $1/4 = 0.25$
 AABB: $2/4 = 0.5$
 ABBB: $3/4 = 0.75$
 BBBB: $4/4 = 1$

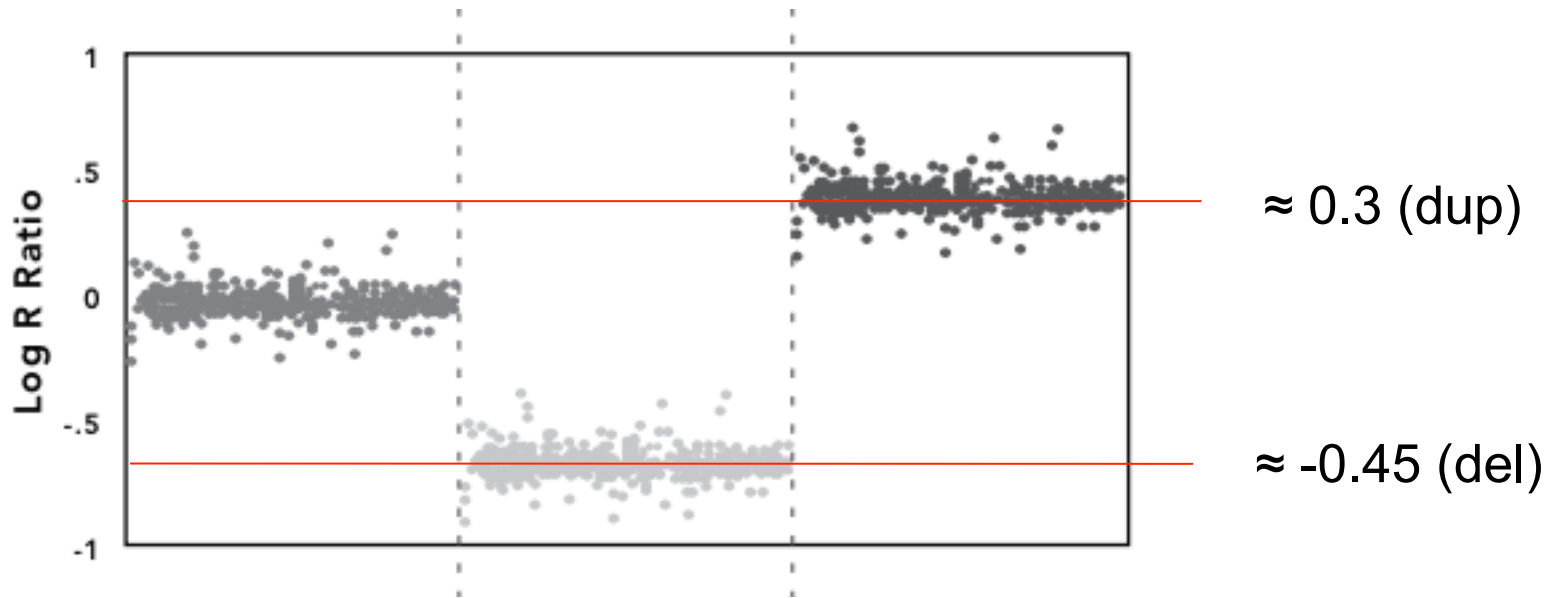
CN = Copy number

Log R ratio (LRR)

Logaritmo del rapporto tra l'intensità osservata rispetto a quella attesa

Deviazione dal valore 0 è indice di CNV:

- 1) Riduzione: delezione
- 2) Aumento: duplicazione o amplificazione



CN=2

$$\text{LRR} = \ln(2/2) = 0$$

CN=1

$$\text{LRR} = \ln(1/2) = -1$$

$$\text{LRR}(m) = -0.45$$

CN=3

$$\text{LRR} = \ln(3/2) = 0.58$$

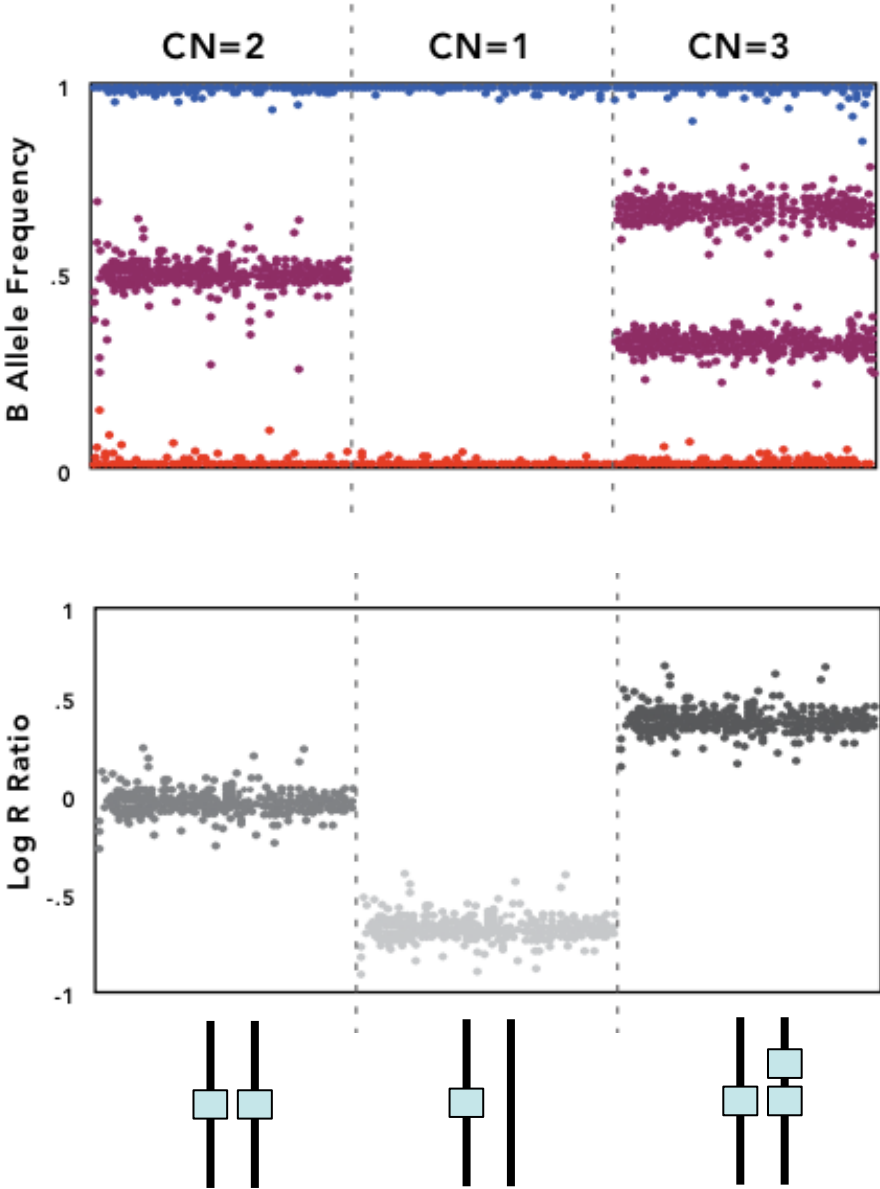
$$\text{LRR}(m) = 0.3$$

CN=4

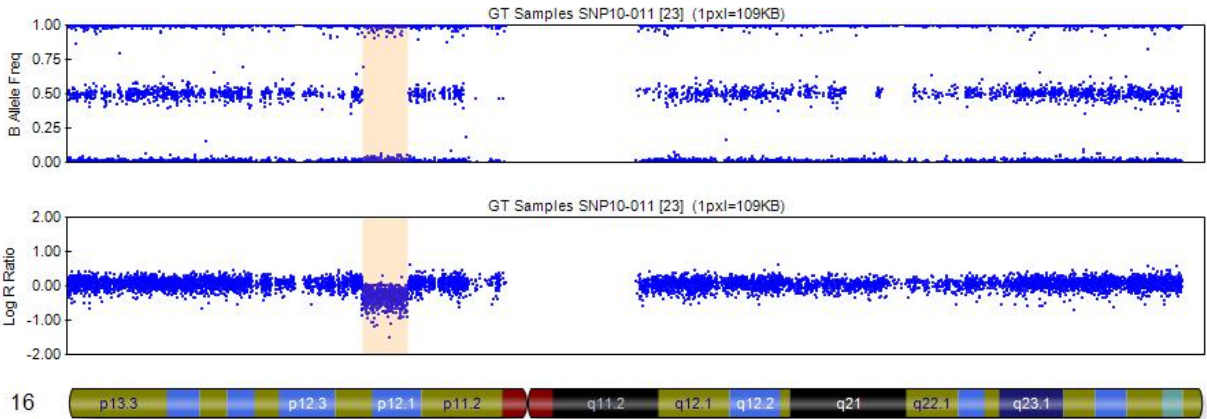
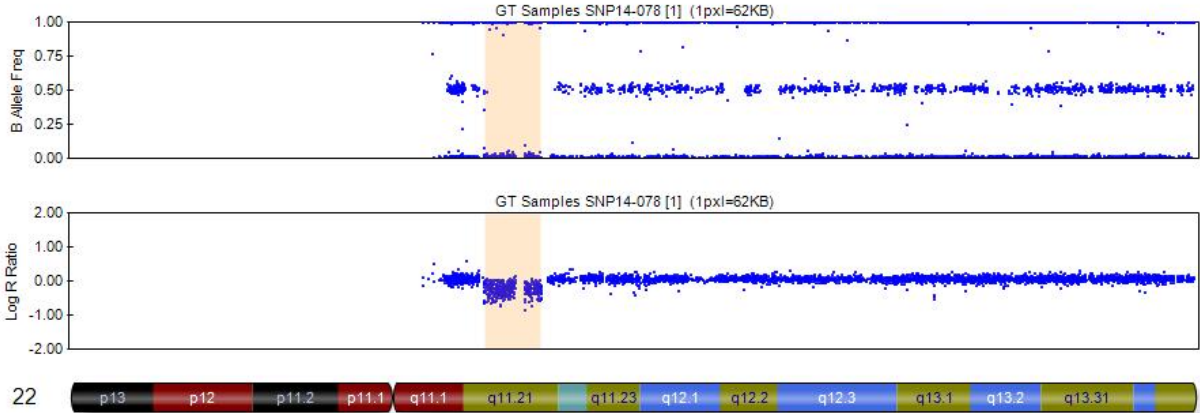
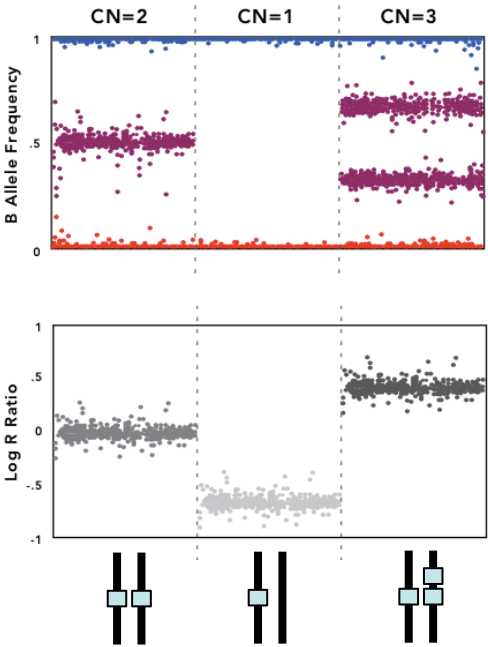
$$\text{LRR} = \ln(4/2) = 1$$

$$\text{LRR}(m) = 0.75$$

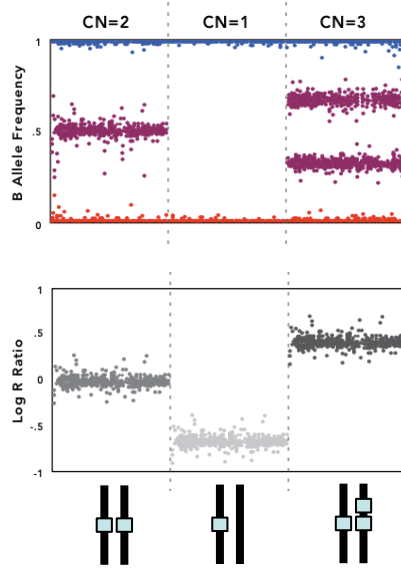
BAF and LRR



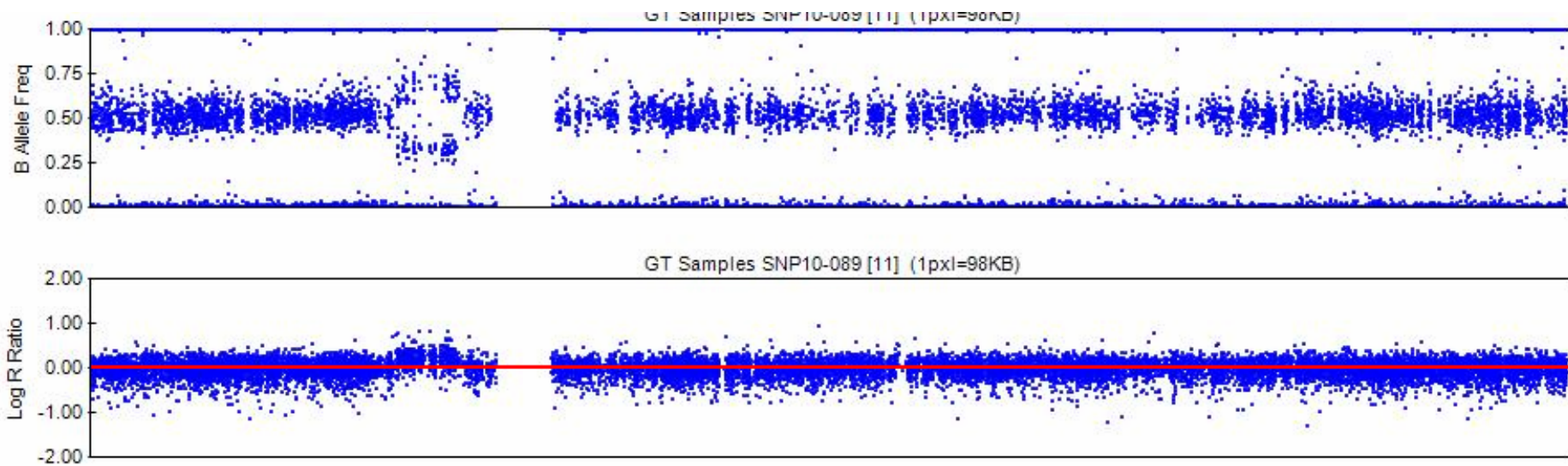
Delezione in q11.21



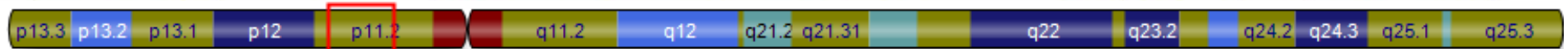
Delezione in p12.2p12.1



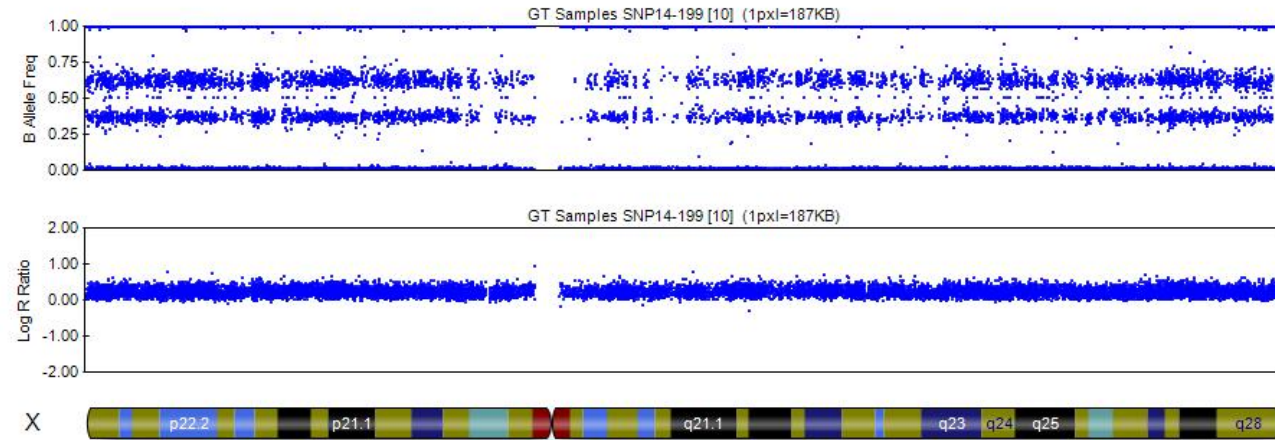
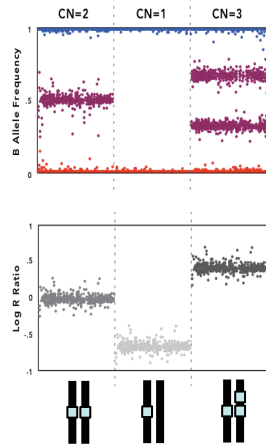
Duplicazione in p11.2



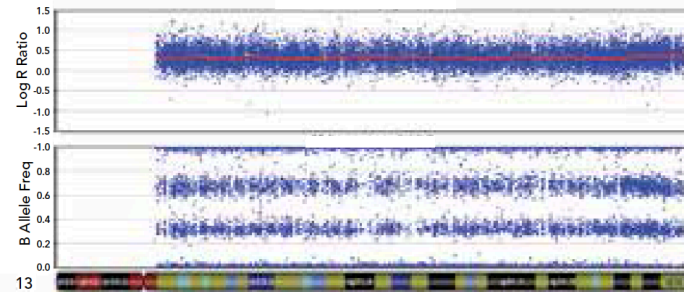
17



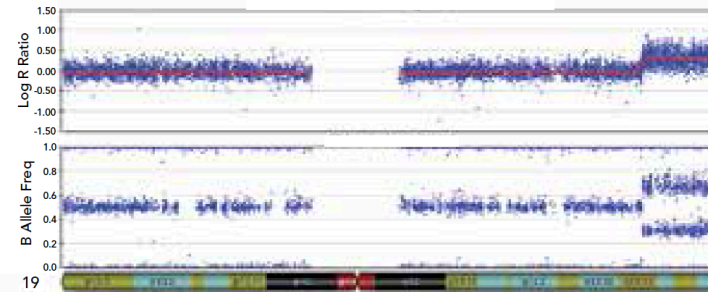
Trisomia X



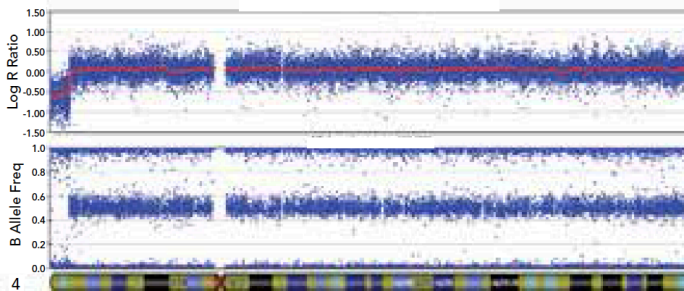
A. Trisomy 13



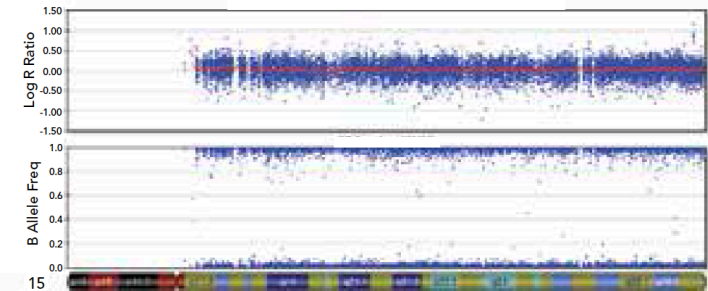
B. Partial Duplication 19q

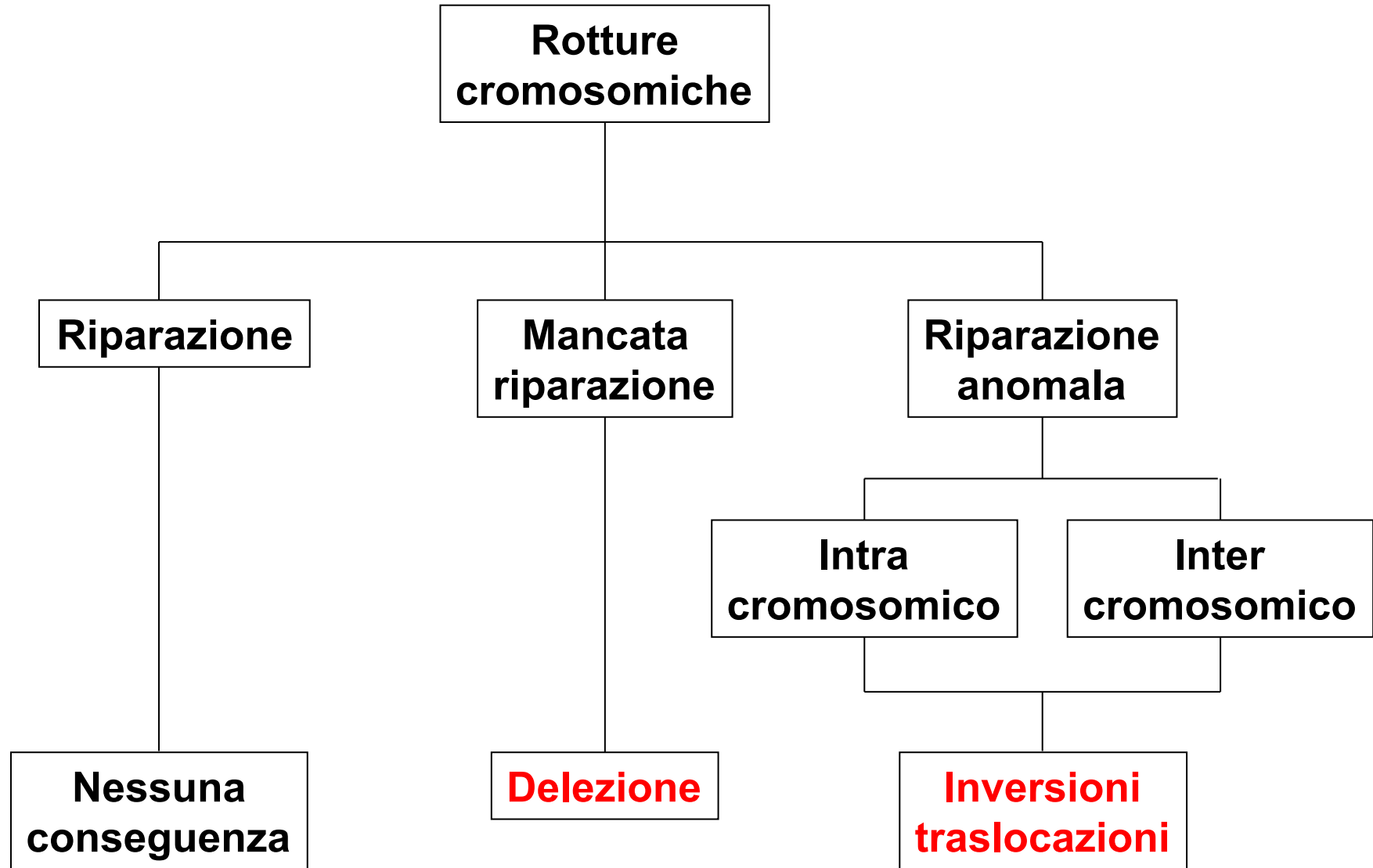


C. Partial Deletion 4p



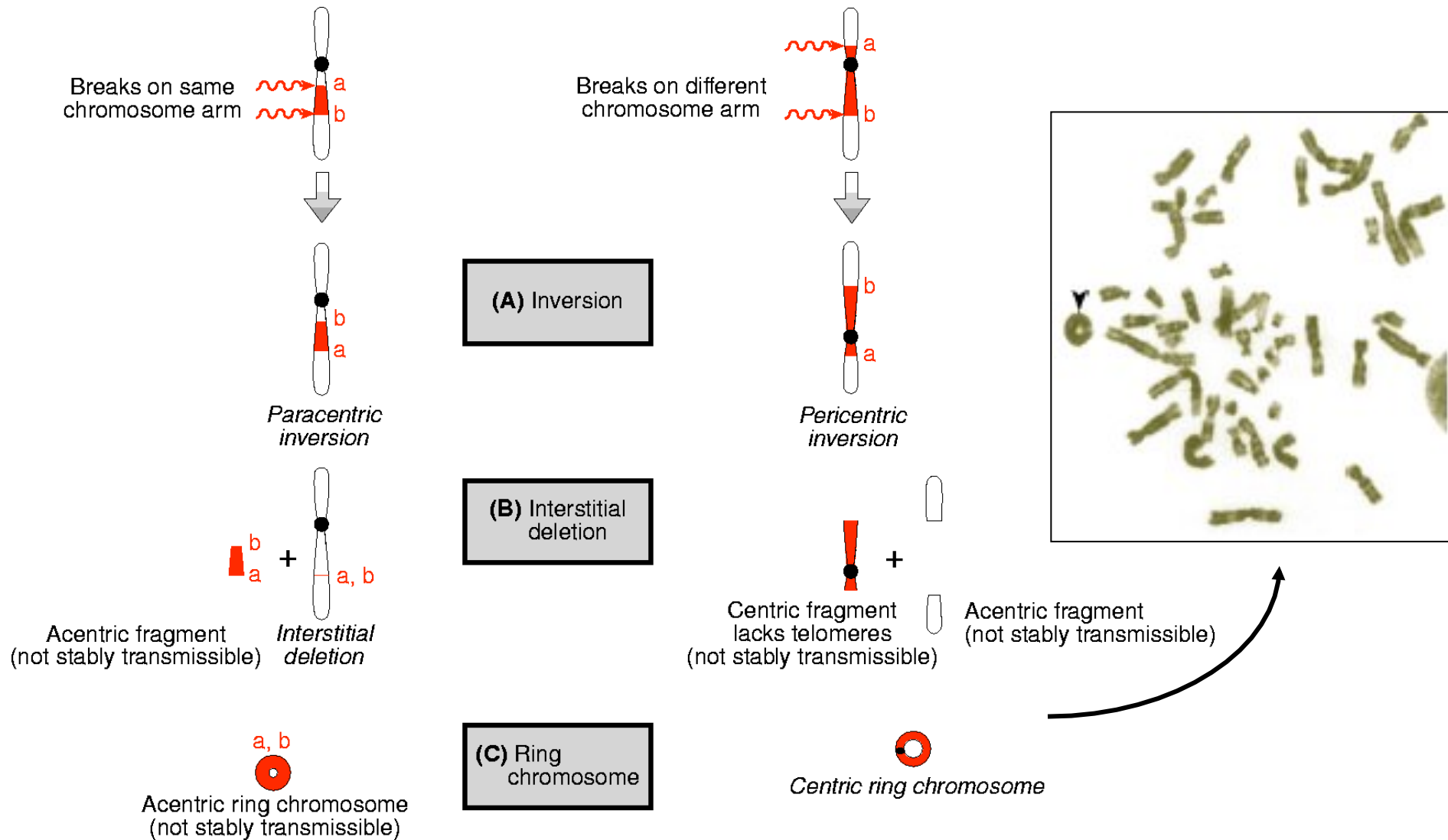
D. UPD of Chromosome 15





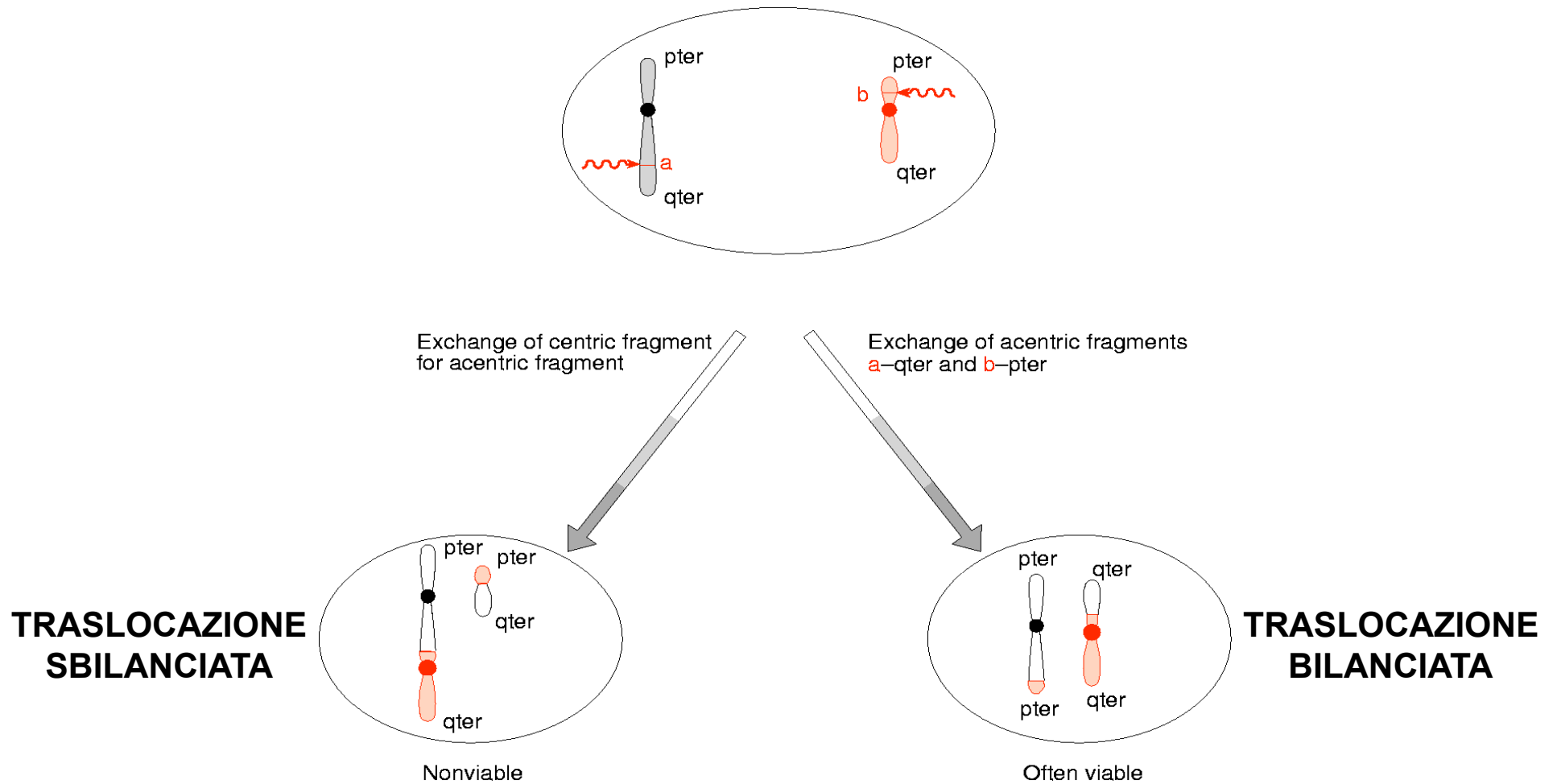
INVERSIONI E CROMOSOMI AD ANELLO

Causa: due rotture cromosomiche,
riparazione con inversione o perdita di materiale



TRASLOCAZIONI CROMOSOMICHE:

Cause: rotture su cromosomi diversi e trasferimento di segmenti tra cromosomi diversi



ALTERAZIONI CROMOSOMICHE BILANCIATE

(senza perdita di materiale genetico)

Inversione

Traslocazione bilanciata

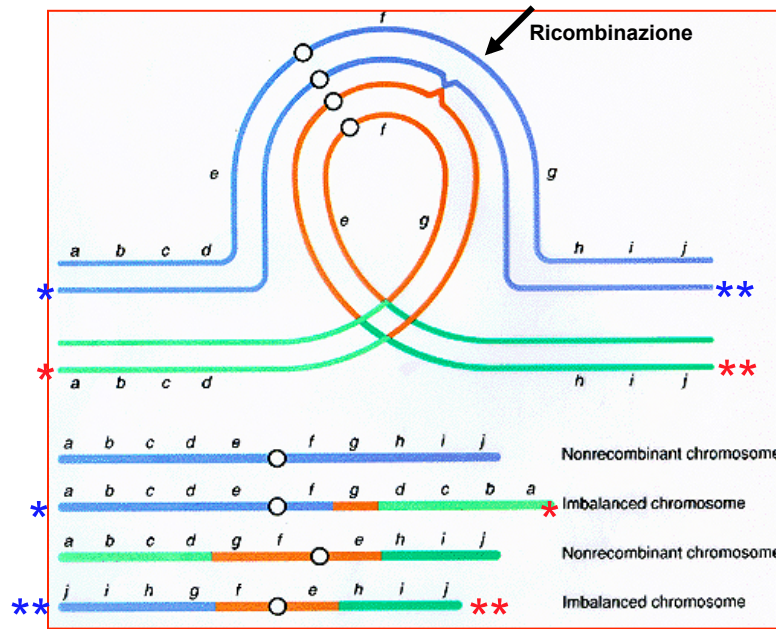
Traslocazione Robertsoniana (fusione centrica)

- **Individui con alterazioni cromosomiche bilanciate sono di solito fenotipicamente sani (a meno che le rotture non distruggano unità funzionali con conseguenze patologiche)**
- **Rischio di produrre gameti sbilanciati**
- **Non rare tra le coppie sterili, o con aborti ripetuti o con handicap tra i figli**

INVERSIONI: PRODUZIONE GAMETI SBILANCIATI

a b c d e f g h i l j

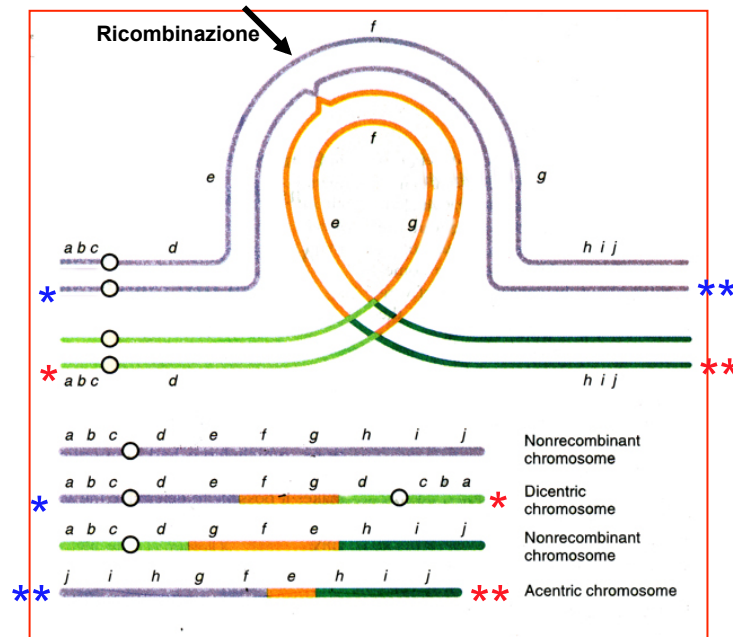
a b c d **g f e** h i l j



Inversione pericentrica

a b c d e f g h i l j

a b c d **g f e** h i l j

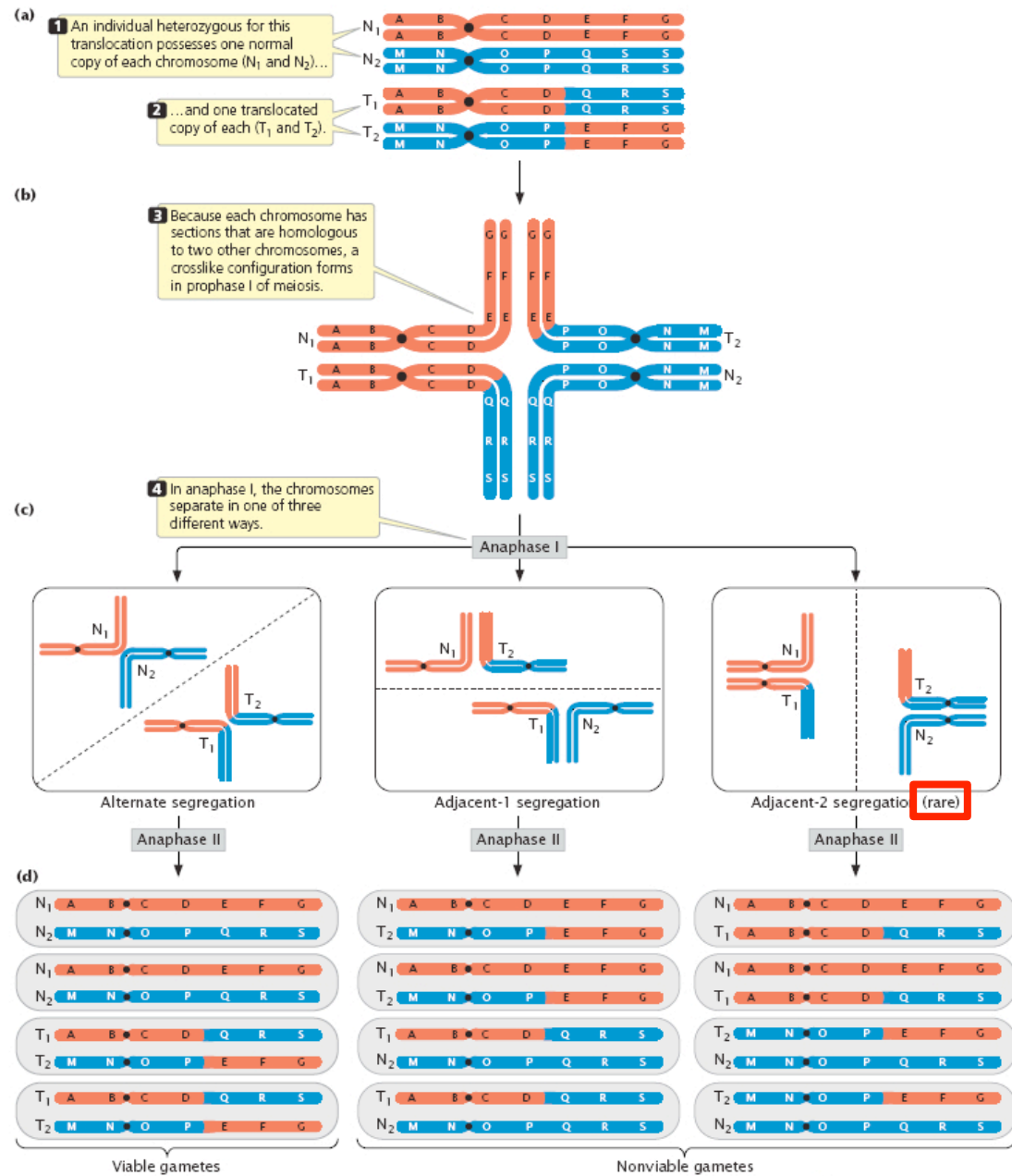


Inversione paracentrica

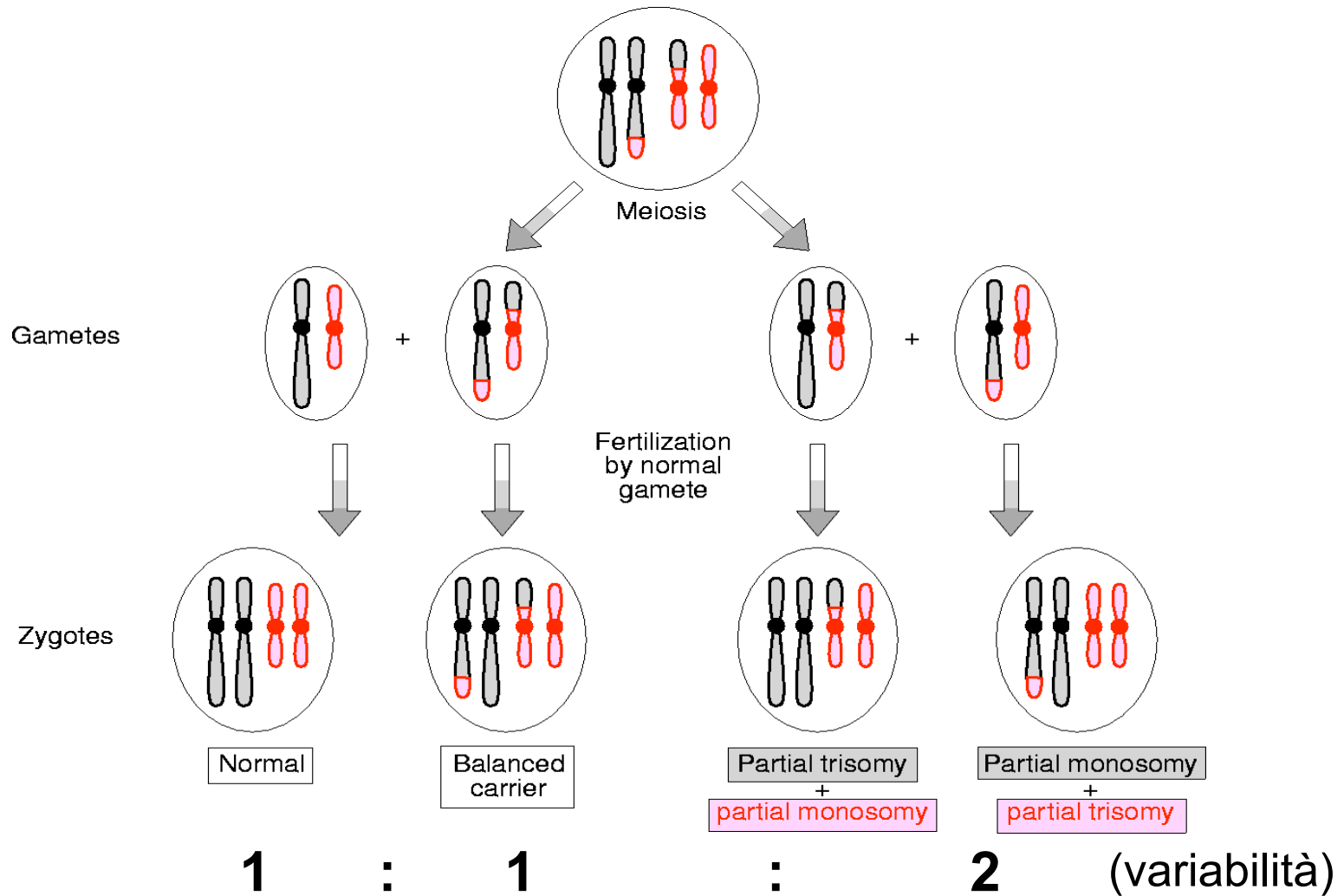
TRASLOCAZIONE RECIPROCA

PRODUZIONE GAMETI SBILANCIATI:

In meiosi, formazione di un quadrivalente durante l'appaiamento dei cromosomi omologhi. Tre possibili separazioni degli omologhi:



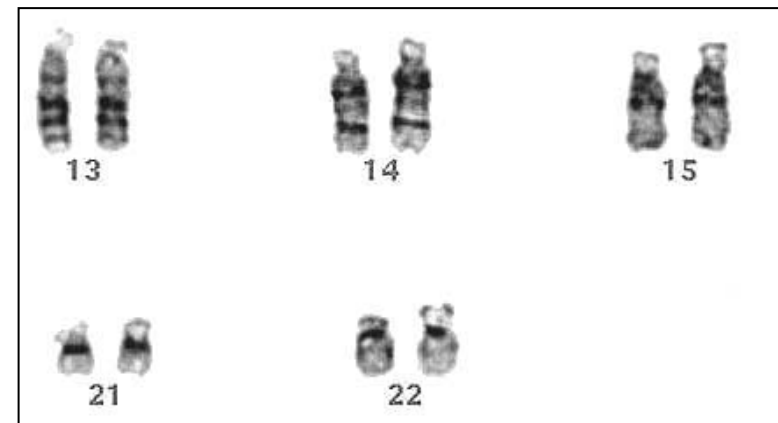
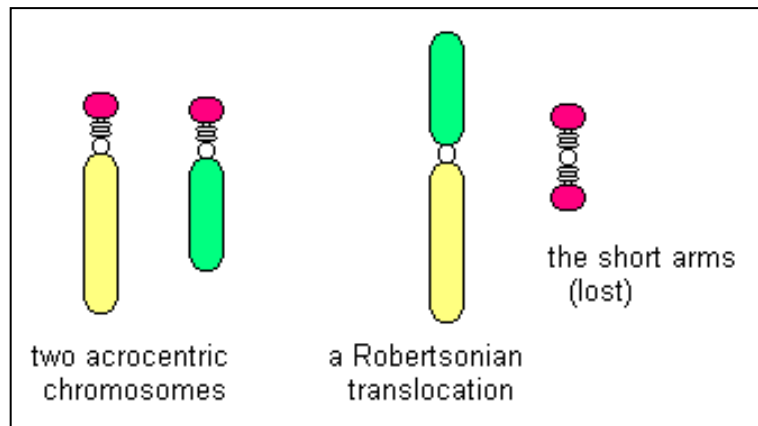
TRASLOCAZIONE RECIPROCA: PRODUZIONE GAMETI SBILANCIATI



Rischio 1-10% di nascita di un figlio con corredo sbilanciato

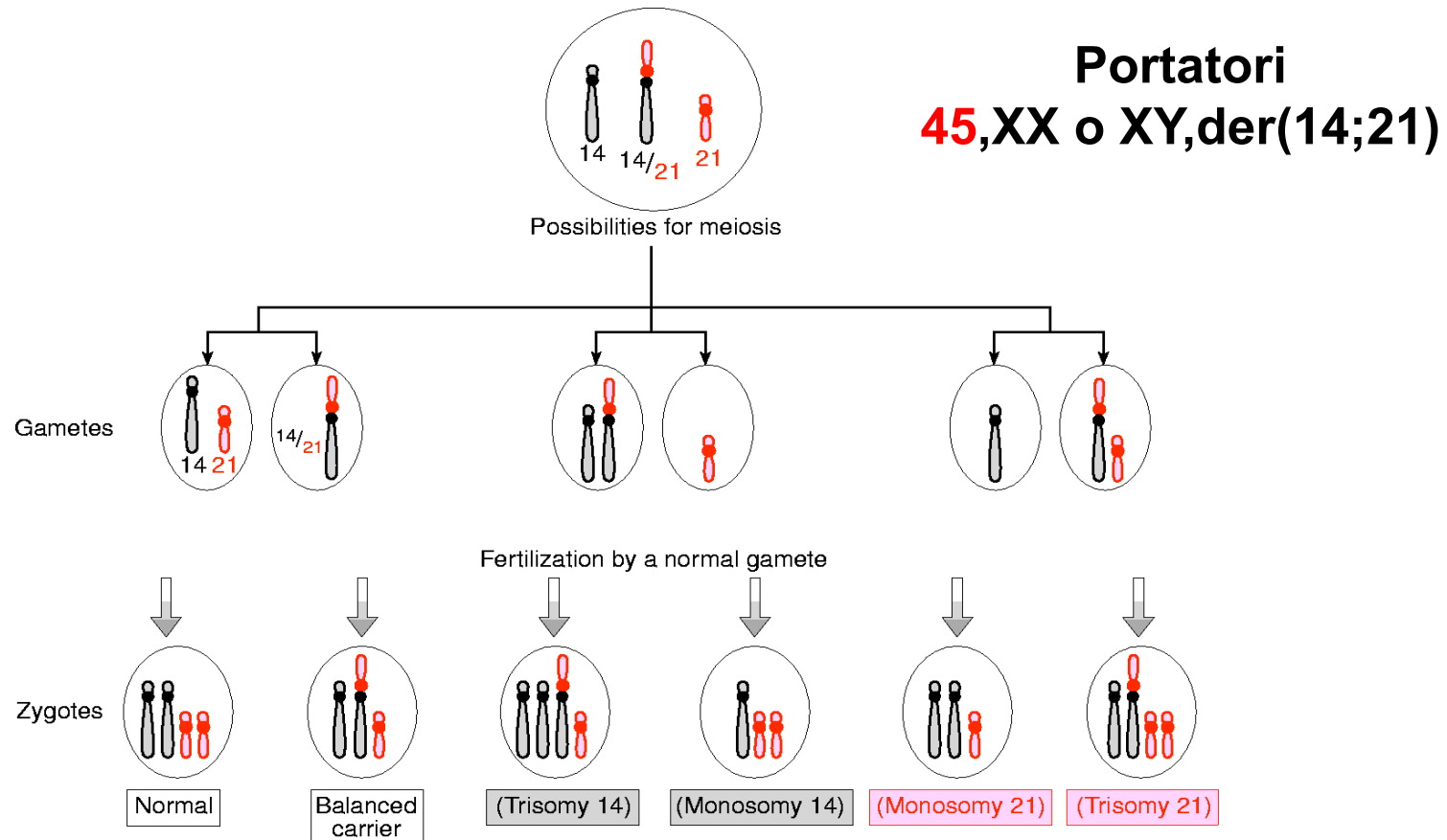
TRASLOCAZIONE ROBERTSONIANA

Fusione di due cromosomi acrocentrici
1:1.000



TRASLOCAZIONE ROBERTSONIANA

PRODUZIONE GAMETI SBILANCIATI



Selezione prezigotica (selezione gameti sbilanciati prima del concepimento e prenatale (aborto spontaneo) **riducono il rischio di nascita dei trisomici**

Sindrome di Down

	Trisomia libera	Mosaico	Traslocazione	Trisomia parziale
Trisomia 21	92 %	3%	4%*	Rari**

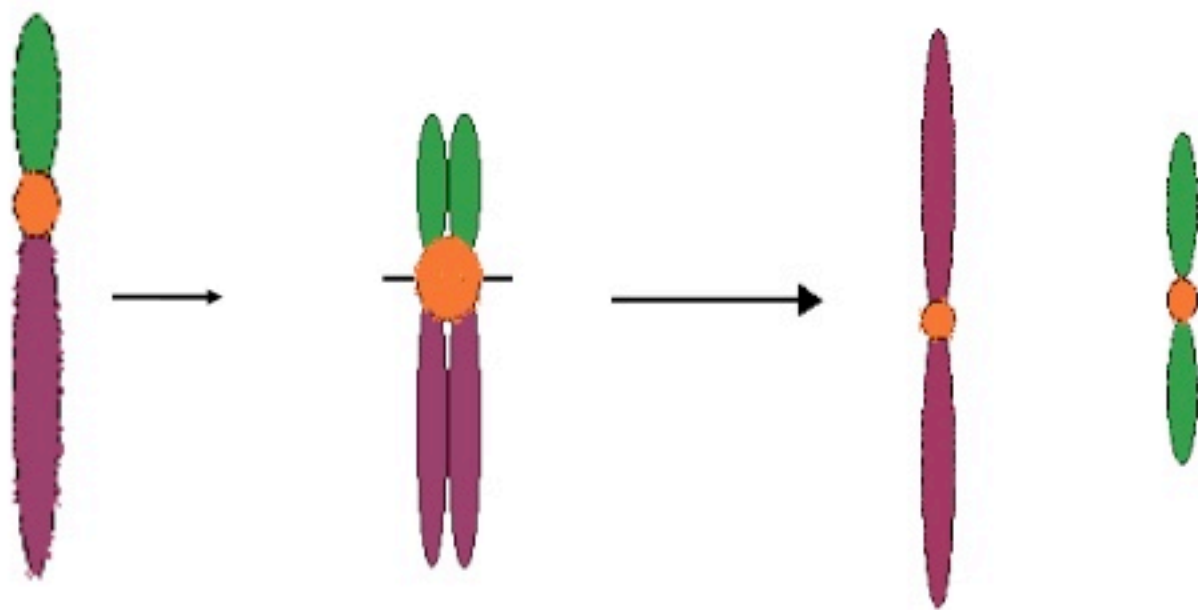
*Traslocazione Robertsoniana

**Duplicazione regione critica del braccio lungo cromosoma 21

14;21 (46,XX o XY, der(14;21)(q10;q10), +21

21;21 (potenziali figli hanno o **sindrome di Down** o monosomia del 21)

Isochromosome (Transverse centromeric division)



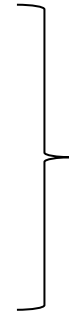
Example:

- Long arm of X- chromosome remains, short arms lost
- Cytogenetic variant of Turner's syndrome

CROMOSOMA X

Anomalie strutturali e inattivazione dell' X

- Delezioni
- Duplicazioni
- Cromosoma ad anello
- Isocromosoma



Cromosoma X alterato

•Traslocazioni X/autosomi

Traslocazioni bilanciate



Cromosoma X normale

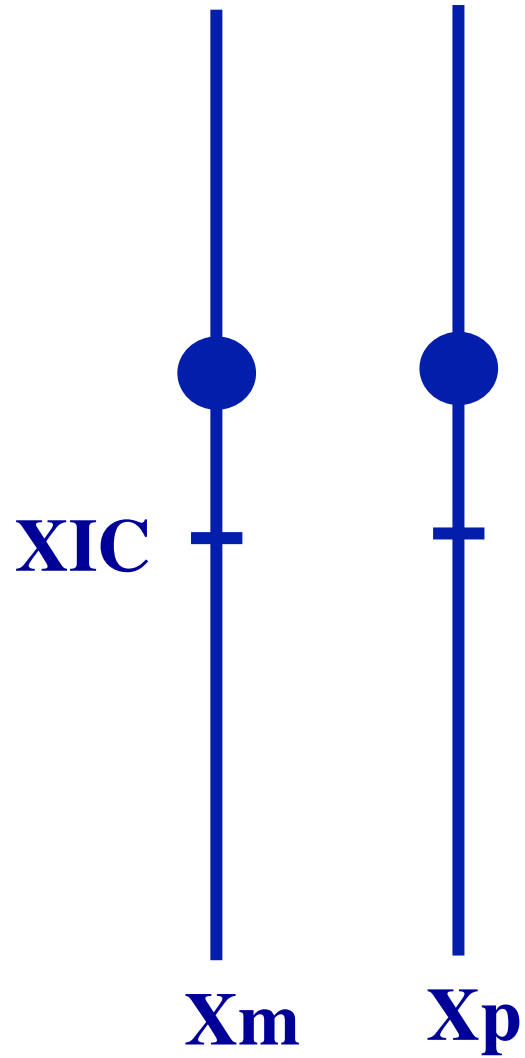
Traslocazioni sbilanciate



Cromosoma X alterato

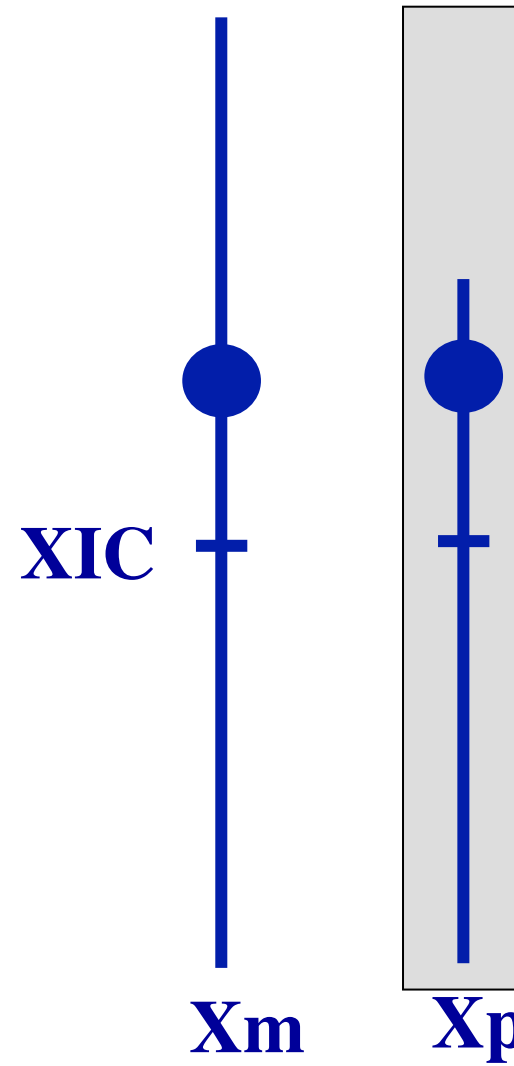
Inattivazione dell' X è sempre casuale. Il vantaggio selettivo delle cellule con materiale genetico bilanciato potrebbe sembrare un'inattivazione non casuale (skewed inactivation)

46,XX



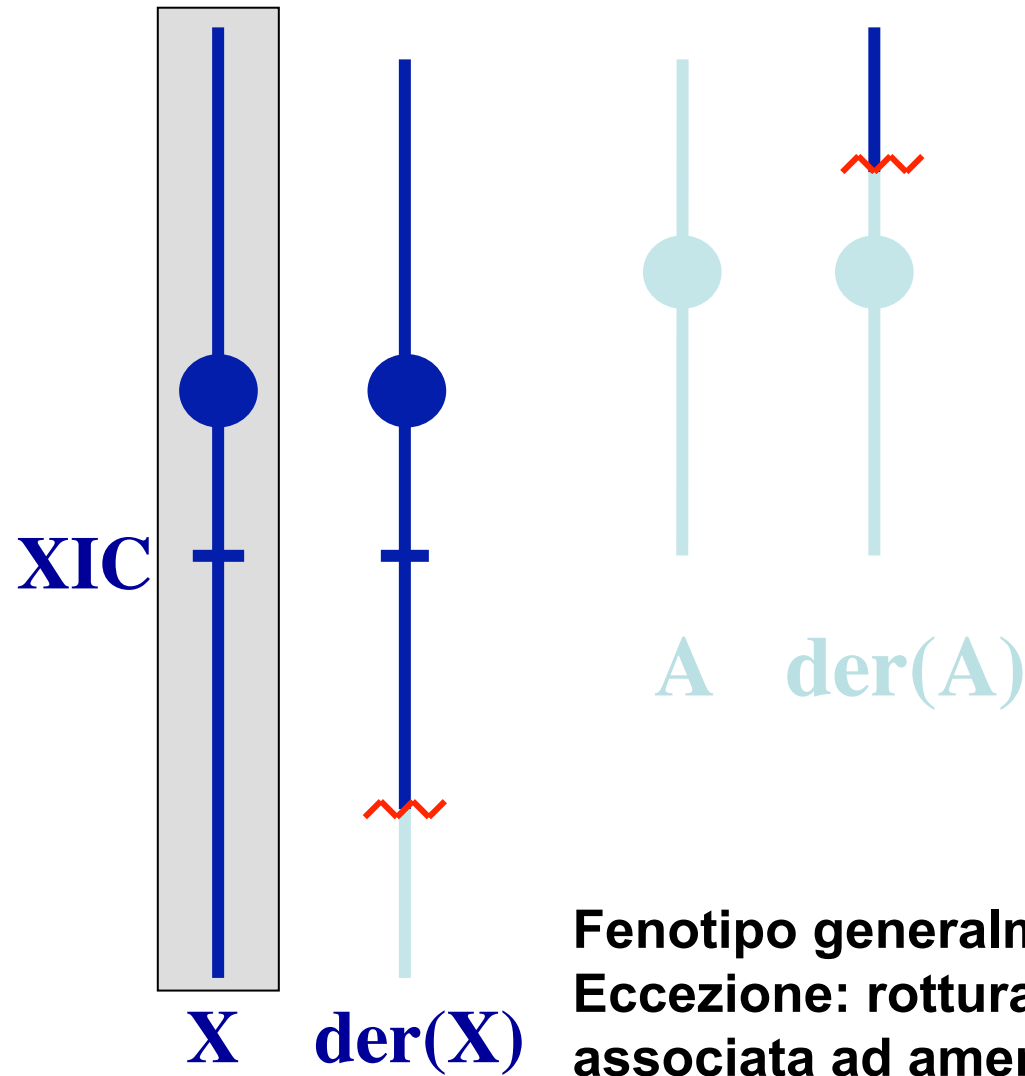
Inattivazione
Casuale

X anomalo



Inattivazione
non casuale

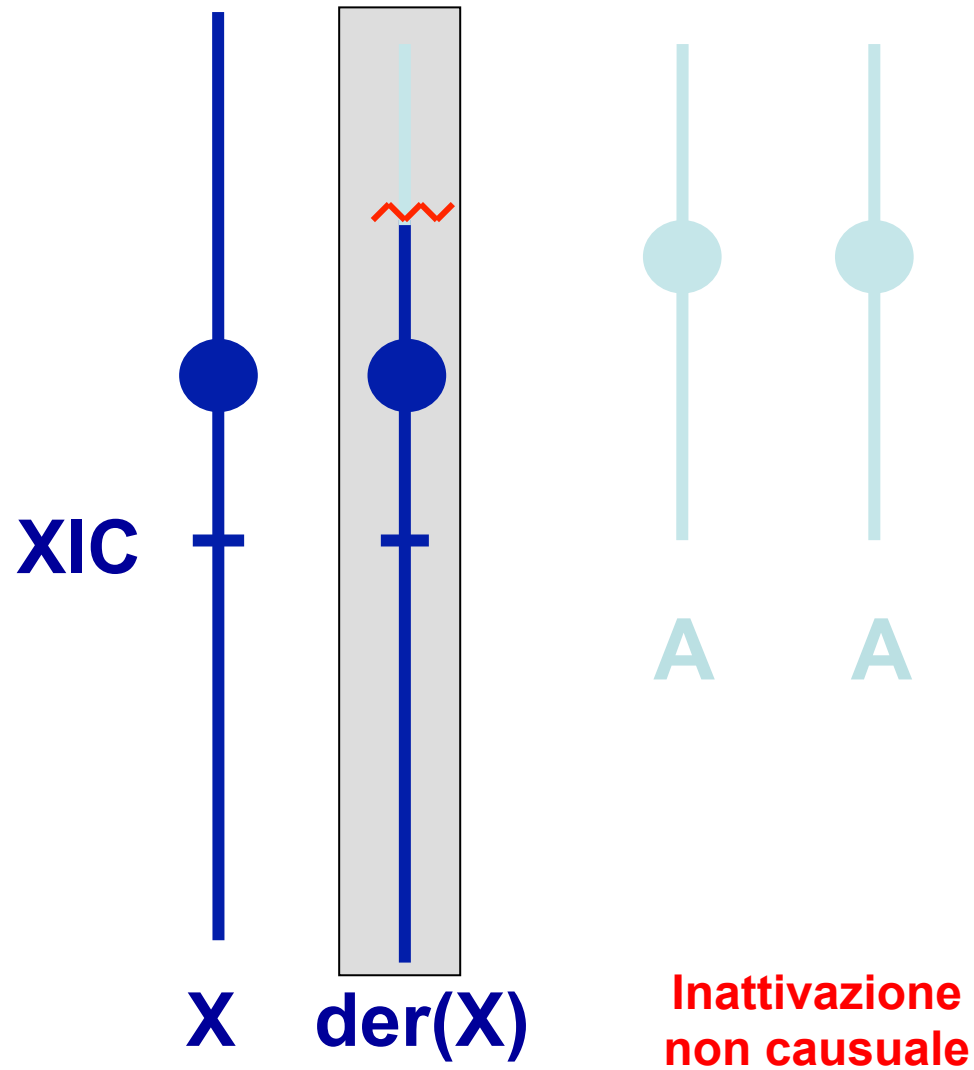
TRASLOCAZIONE BILANCIATA



Inattivazione
non causale

Fenotipo generalmente normale
Eccezione: rottura Xq21-26
associata ad amenorrea primaria

TRANSLOCAZIONE NON BILANCIATA



Alcuni esempi di anomalie cromosomiche strutturali

Cariotipo	Commento
46,XY,t(5;10)(p13;q25)	Traslocazione bilanciata tra i cromosomi 5 e 10 (punti di rottura)
45,XX,der(13;14)(p11;q11)	Traslocazione con fusione centrica dei cromosomi 13 e 14
46,XY,del(5p)	Delezione del braccio corto del cromosoma 5
46,XX,dup(2)(p13->p22)	Duplicazione parziale del braccio corto del cromosoma 2
46,XY,inv(11)(p15;q14)	Inversione pericentrica del cromosoma 11

Outcome	Pregnancies	Spontaneous Abortions		Live Births
		No.	Percent	
Total	10,000	1500	15%	8500
Normal chromosomes	9,200	750	8%	8450
Abnormal Chromosomes	800	750 (vedi diapo seguente)	94%	50
Triploid/tetraploid	170	170	100%	-
45,X	140	139	99%	1
Trisomy 13	112	112	100%	-
Trisomy 18	20	19	95%	1
Trisomy 21	45	35	78%	10
Trisomy, other	209	208	99.5%	1
47,XXY, 47,XXX, 47,XYY	19	4	21%	15
Unbalanced rearrangement	27	23	85%	4
Balanced rearrangement	19	3	16%	16
Other	39	37	95%	2

Metodiche per alterazioni cromosomiche

Metodiche	Alterazioni cromosomiche	
	Sbilanciate	Bilanciate
Cariotipo (limite 5 Mb)	x	x
FISH (mirata)	x	x
CGH array	x	
SNP array	x	
qPCR	x	
Loci polimorfici	x (del)	