

MALATTIE GENETICHE

GENICHE

**MONOFATTORIALI
(Mendeliane)**

Autosomiche

Dominanti
Recessive

X linked

Dominanti
Recessive

**TRASMISSIONE ATIPICA
(Non mendeliane)**

Mitocondriale

Modello “two hits” (genetica del cancro)

Mutazioni dinamiche

Imprinting

MULTIFATTORIALI

CROMOSOMICHE

DI NUMERO

Poliploidie

Aneuploidie

DI STRUTTURA

Delezioni

Inserzioni

Duplicazioni

Traslocazioni

Organizzazione del Genoma Umano

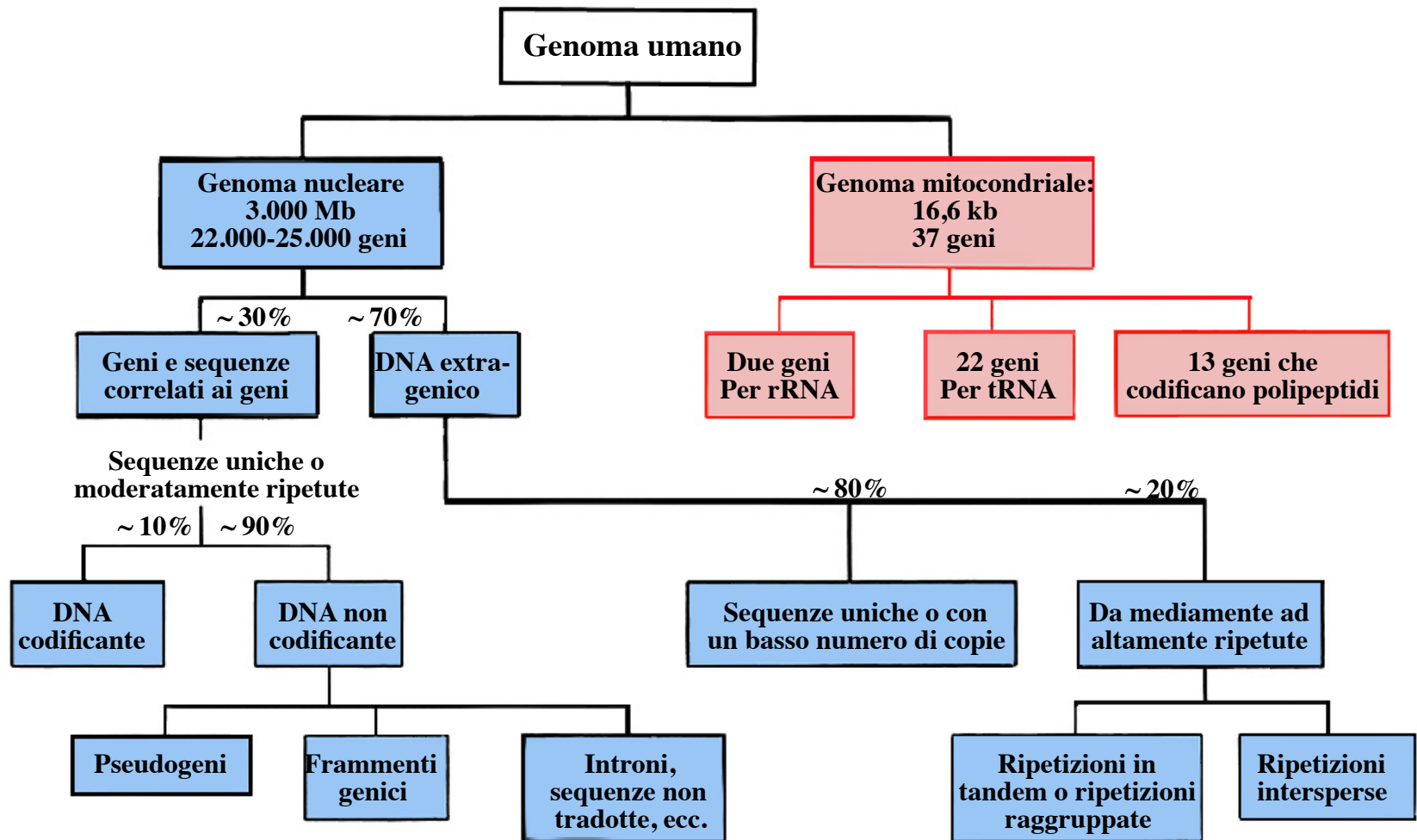


Tabella 7.1: Il genoma nucleare e il genoma mitocondriale nell'uomo

	Genoma nucleare	Genoma mitocondriale
Dimensione	3.300 Mb	16,6 kb
N° di molecole di DNA differenti	23 o 24 (nelle cellule XX o XY rispettivamente), tutte lineari	Una molecola di DNA circolare
N° totale di molecole di DNA per cellula	23 nelle cellule aploidi; 46 nelle cellule diploidi	Numerose migliaia
Proteine associate	Diverse classi di istoni e proteine non istoniche	Per lo più senza proteine
N° di geni	22.000-25.000	37
Densità genica	~ 1/100 kb	1/0,45 kb
DNA ripetitivo	Un'ampia frazione,	Pochissimo
Trascrizione	La maggioranza dei geni viene trascritta individualmente	Vengono trascritti più geni uno di seguito all'altro
Introni	Si trovano nella maggior parte dei geni	Assenti
% di DNA codificante	~ 3%	~ 93%
Utilizzazione dei codoni	Codice universale	Universale variato a 4 codoni
Ricombinazione	Almeno una volta per ciascuna coppia di omologhi alla meiosi	Nessuna
Eredità	Mendeliana per le sequenze sull'X e sugli autosomi; patrilineare per le sequenze sull'Y	Esclusivamente matrilineare

Segregazione

Mitosi e meiosi

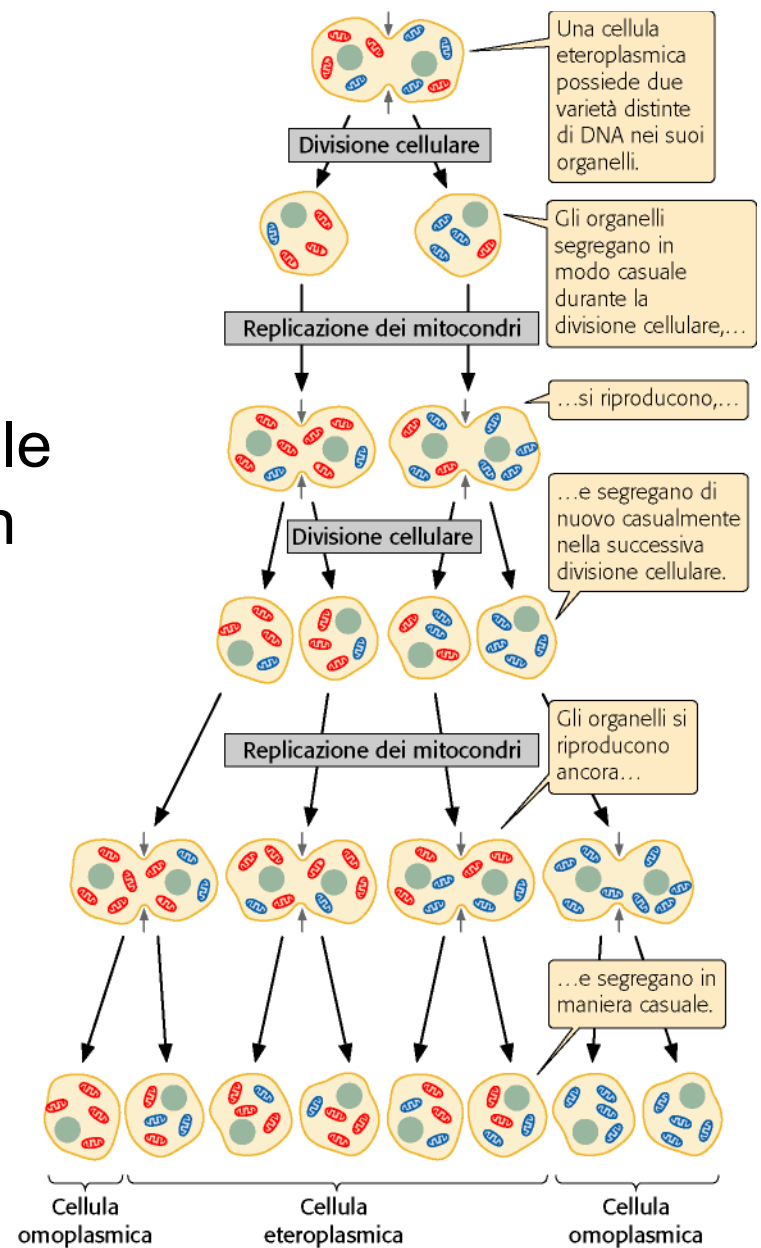
Distribuzione casuale

Tasso mutazione

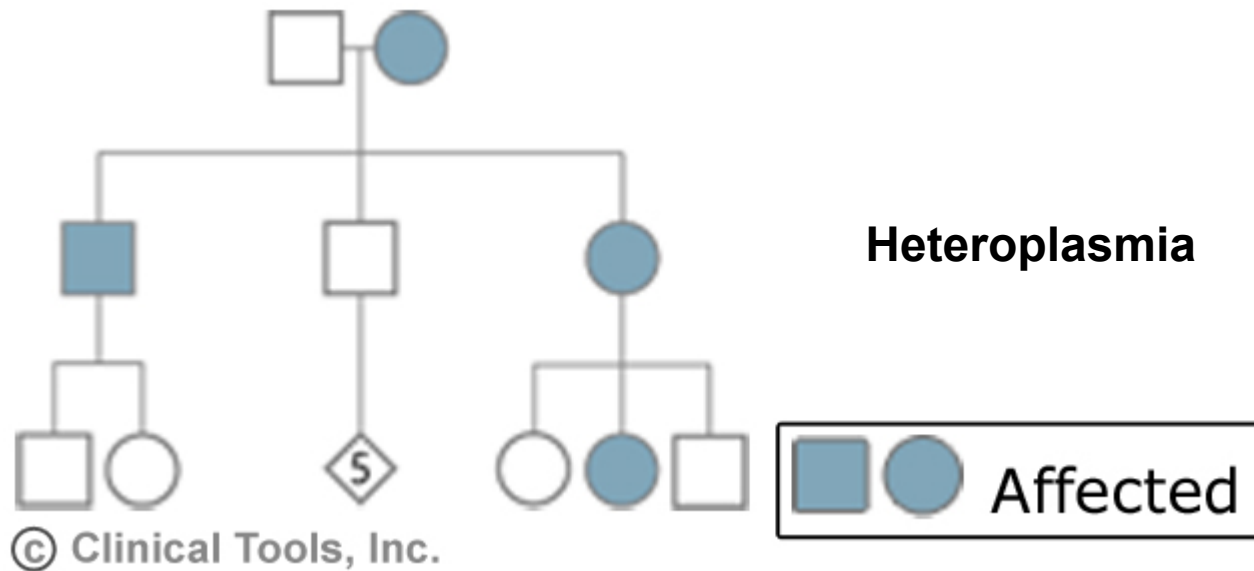
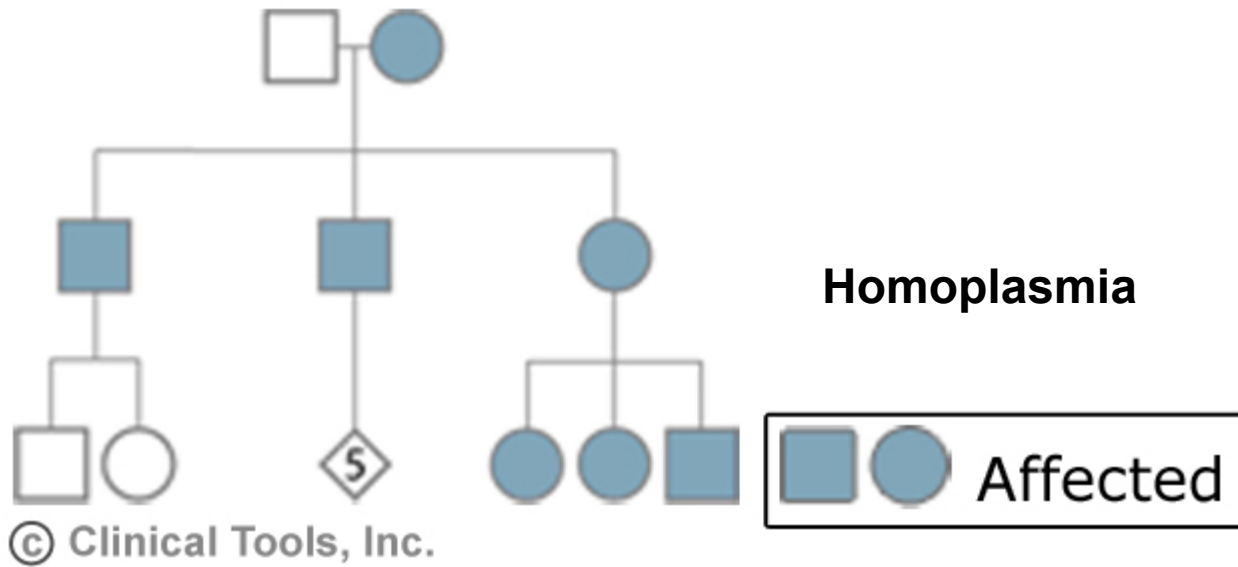
10 volte maggiore

Concetti di

- **Omoplasma:** una varietà (wt o mutata) di DNA mitocondriale
- **Eteroplasma:** DNA mitocondriale presente sia nella forma wt sia in quella mutata
- **Segregazione casuale** dei mitocondri durante la divisione cellulare



Conclusion: Gran parte delle cellule è eteroplasma, anche se, casualmente, alcune possono ricevere un solo tipo di organello (per esempio tutti gli organelli normali o tutti mutanti).



EREDITARIETA' MITOCONDRIALE

Mutazioni nel DNA mitocondriale (mtDNA)

Maschi e femmine sono affetti

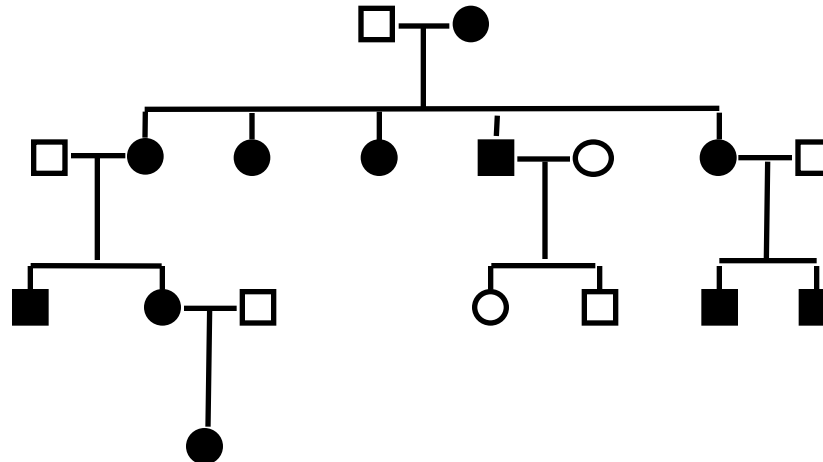
Femmine trasmettono la malattia (i maschi non la trasmettono)

Variabilità nell'espressione dovuta alla quantità di mtDNA mutato

OMOPLASMIA (tutte molecole wild type o tutte mutate di mtDNA tutte uguali)

ETEROPLASMIA (popolazione mista di mtDNA normale e mutato)

EFFETTO SOGLIA: effetto delle mutazioni del mtDNA è determinato dalla relativa proporzione wild type / mutato in un determinato tessuto



Mutazioni dinamiche

STABLE MUTATIONS
from generation to generation

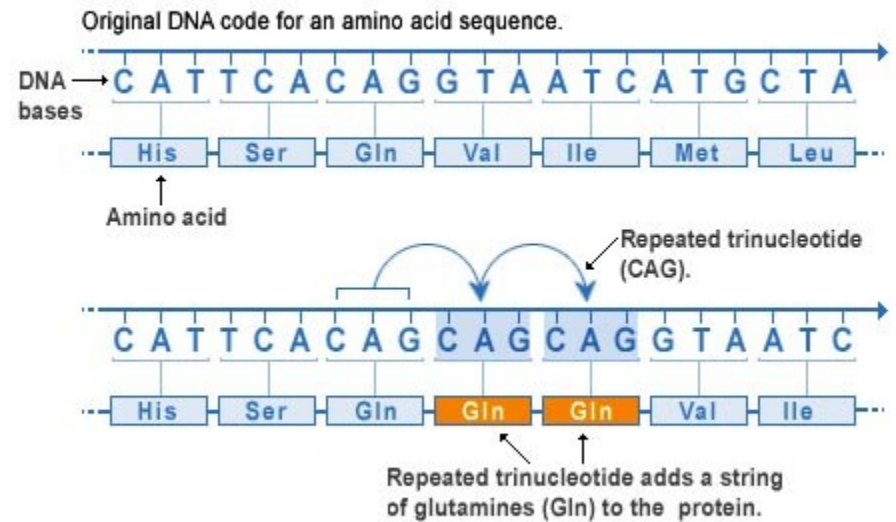


All affected members of a family
share the identical inherited mutation

Unstable expanding repeats
(DYNAMIC MUTATIONS)

Microsatellite: repeated units

Repeat expansion mutation



Unstable - dynamic mutations

Type: Usually trinucleotide, but even 4 (x1), 5 (X2), 6 (x2) or 12 (x1) nt, repeat expansion. It becomes a mutation when the number of triplets is greater than in a normal gene (threshold)

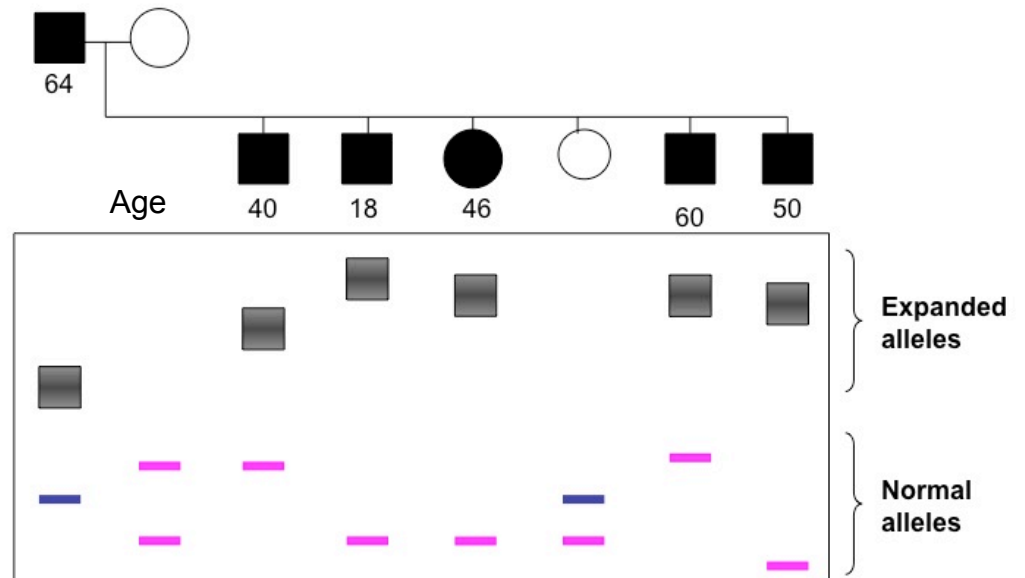
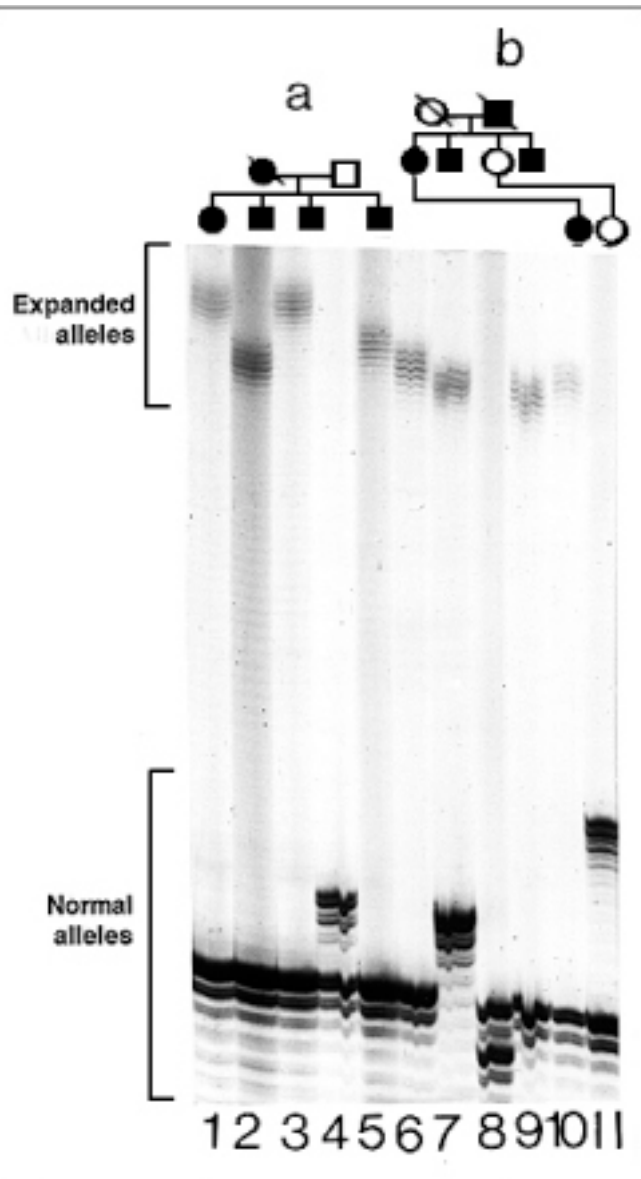
Instability: Beyond the threshold the number of triplets in the disease gene continues to increase (from 20-30 to 3000-5000) as the gene is transmitted

Consequences on gene function: the growing triplet tract alters gene expression and/or function: faulty protein, splicing defects, suppression of expression, defective antisense regulation

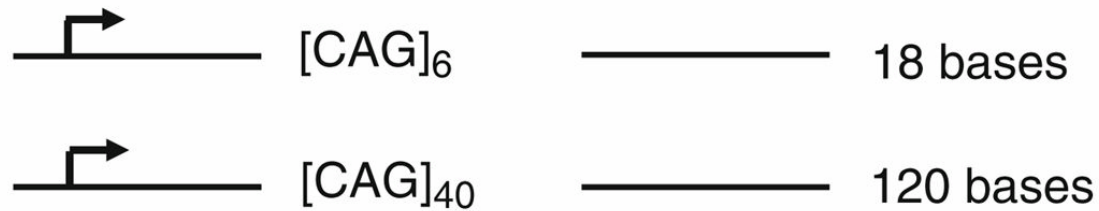
Consequences on phenotype: Severe neuromuscular and neurodegenerative disorders

Expansion and anticipation

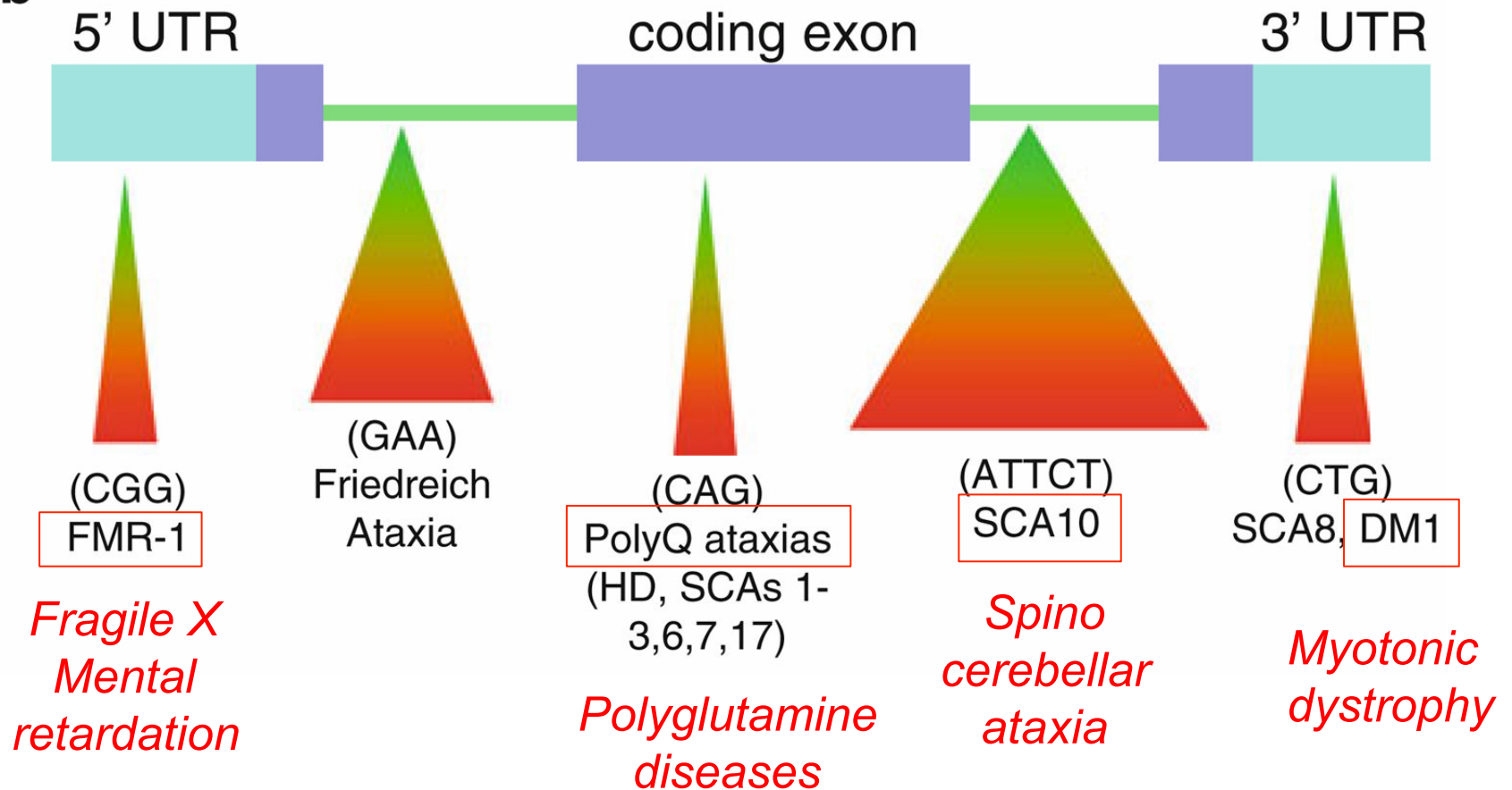
Severity and age of onset correlate with repeat number that tends to expand through generations



a



b



Classification and pathogenic mechanisms

Class A: Outside coding regions. Large expansion in introns, 5'- and 3'-UTR, promoter regions

- Fragile X syndrome
- Myotonic dystrophy
- Friedreich ataxia

Class B: Limited expansion of the instable CAG triplet in coding regions (polyGlutamine/Q)

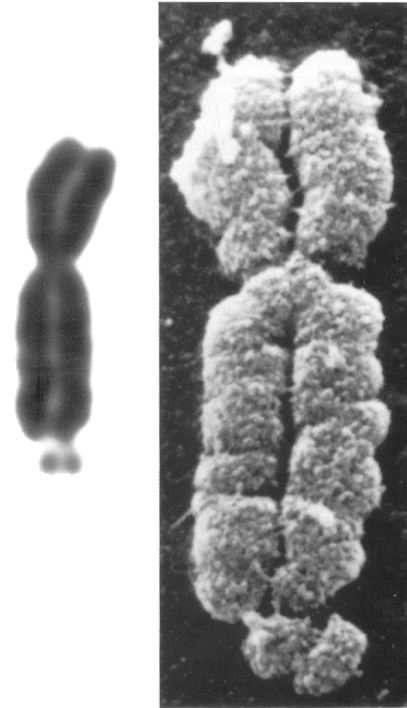
- Huntington's disease
- Spinocerebellar ataxia (different forms)
- Kennedy disease

Class C: limited expansion of relatively stable imperfect (less dynamic) triplets GCN (polyAlanine/A)

- Congenital central hypoventilation syndrome, or Ondine's curse

X FRAGILE

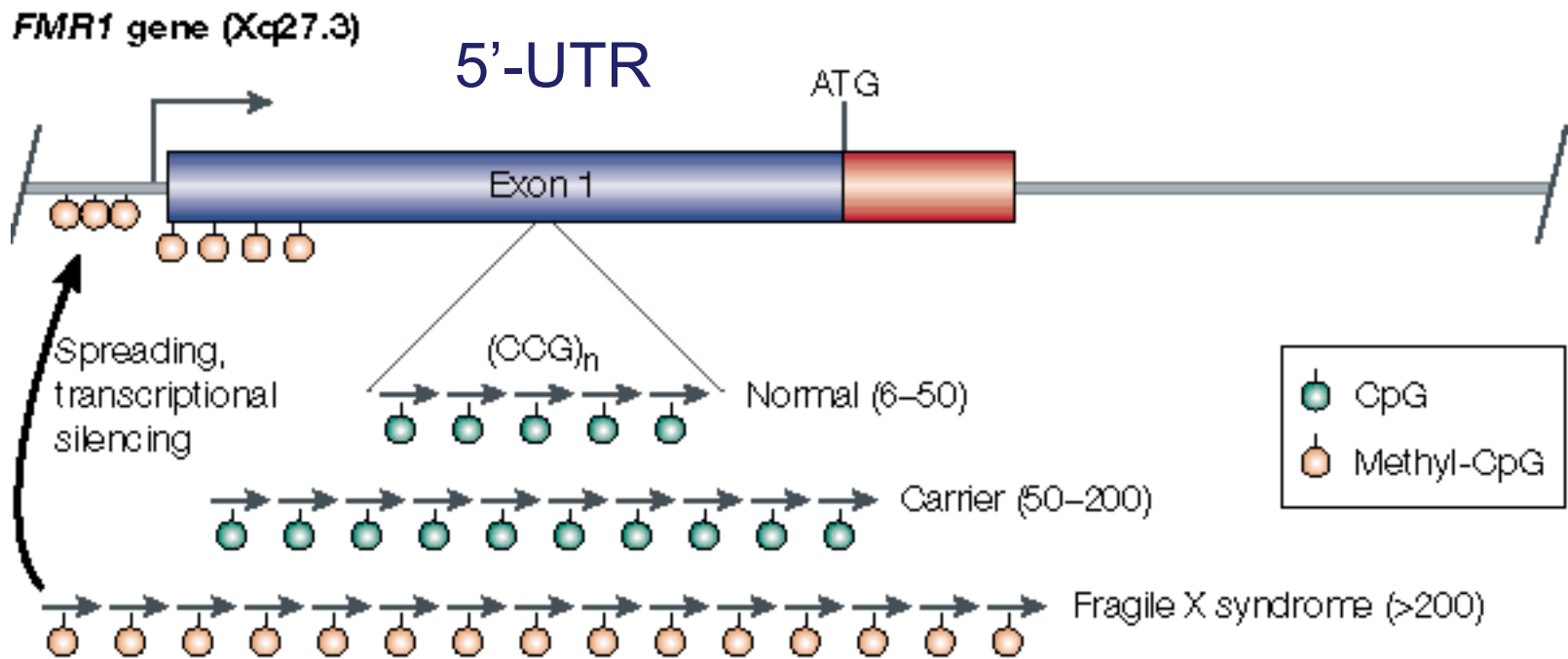
(una delle cause più frequenti di ritardo mentale moderato nei maschi)



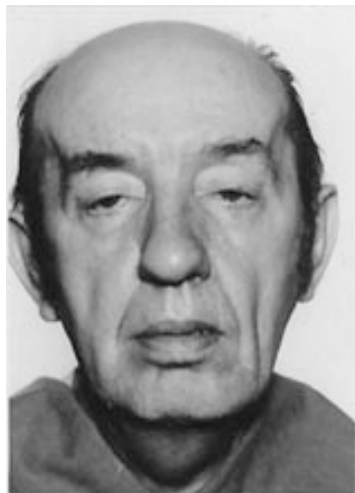
Xq27.3

FMR1 gene

Fragile X syndrome: gene FMR1



Anticipation phenotype in three-generation families with DM1



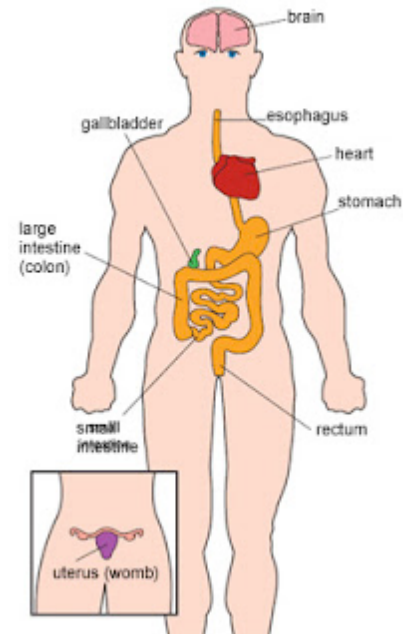
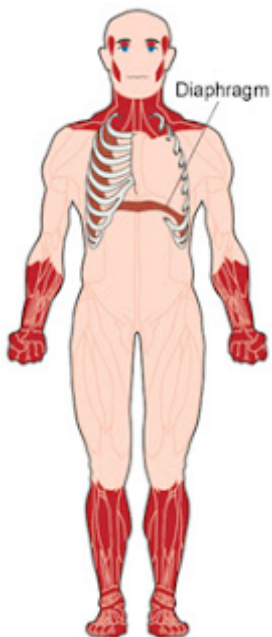
A
**Myotonia
since age 50**



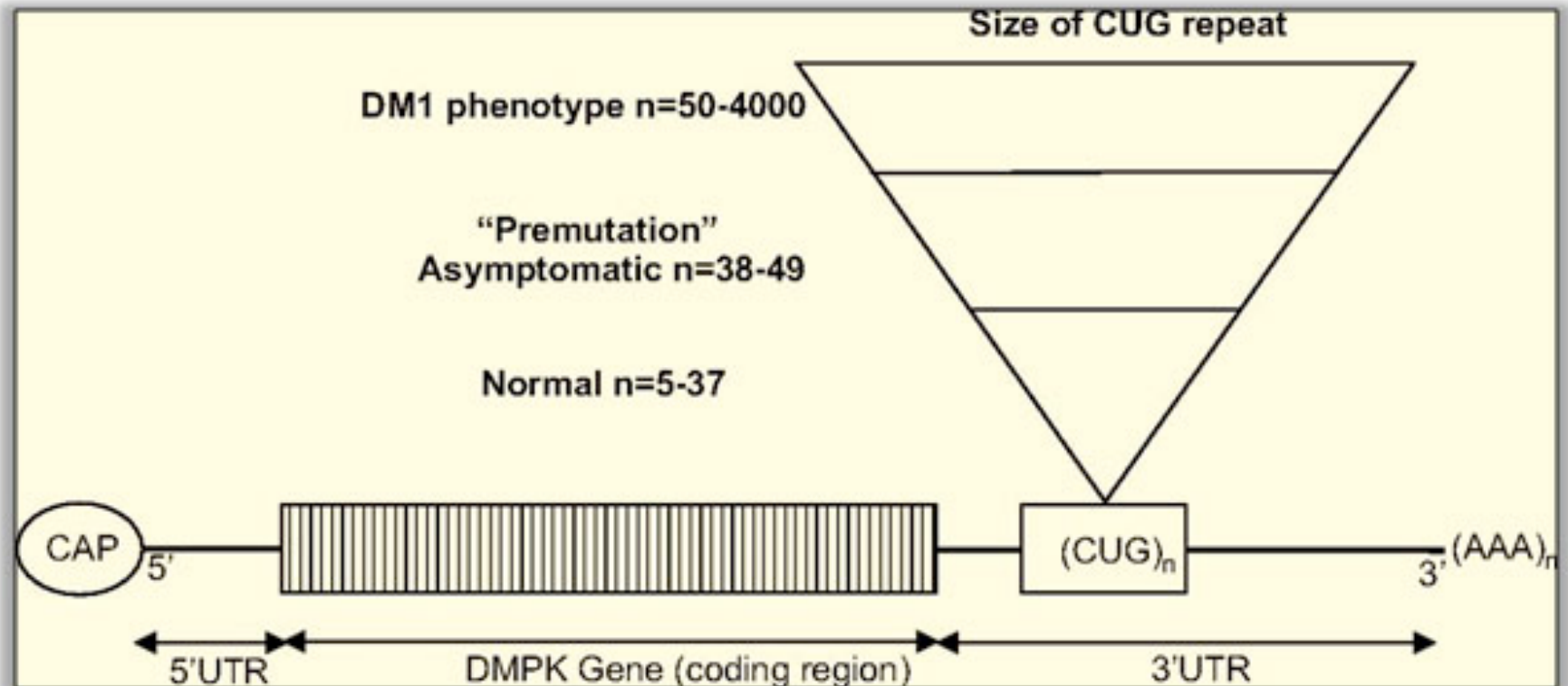
B
**Myotonia
since late teens**



C
**Congenital
myotonic
dystrophy**

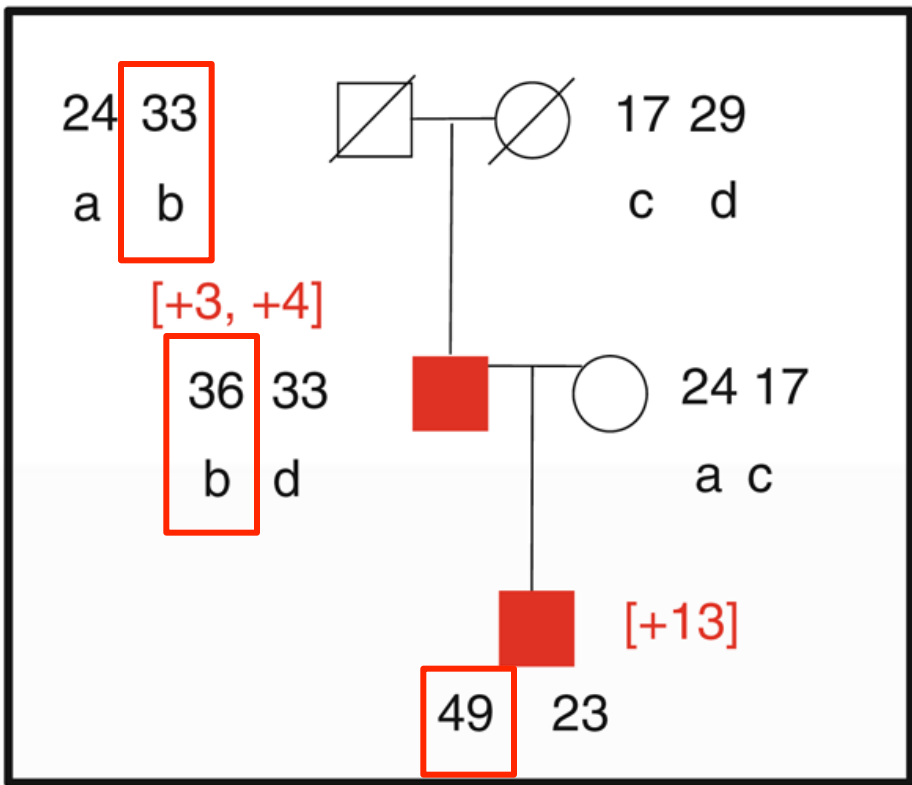
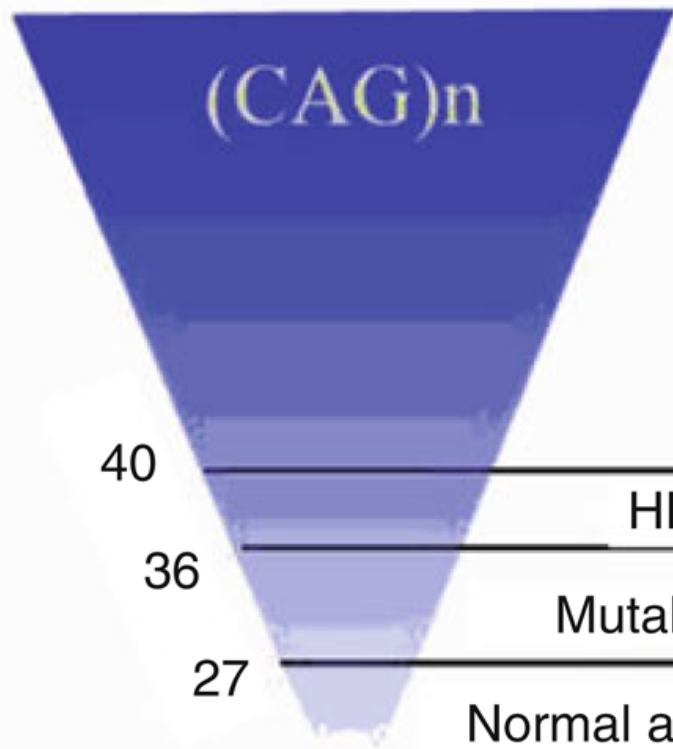


Dystrophic myotonia (DM1): DMPK gene



Neurodegenerative disorder producing motor, cognitive and psychiatric symptoms.

Huntington's Disease



HD Allele (>40)

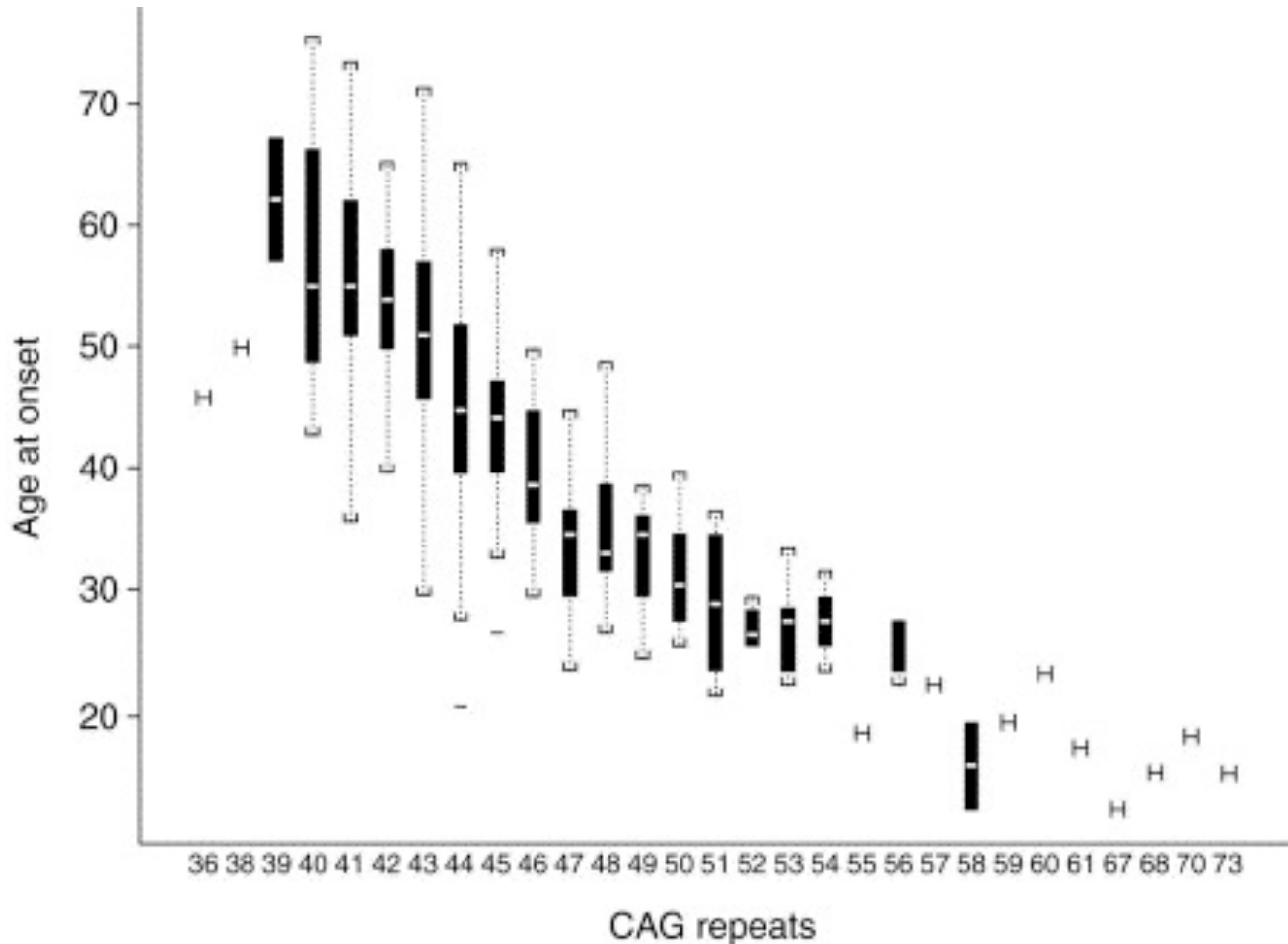
HD Allele with reduced penetrance (36-39)

Mutable normal allele (27-35)

Normal allele (<26)



Relationship between CAG repeat number and age of onset of disease



Esclusione allelica: imprinting

AA

XX

Entrambi gli alleli (geni autosomici)
sono attivi (quasi tutti i loci)

Solo un allele (geni X-linked)
è attivo (quasi tutti i loci)

ESCLUSIONE ALLELICA: casuale

Inattivazione dell' X

Meccanismi sconosciuti

Non casuale:
GENOMIC IMPRINTING (origine parentale)
Può essere anche tessuto specifico

OSSERVAZIONI → IMPRINTING

Osservazioni sperimentali.

Embrioni di topo ottenuti per fusione di pronuclei di origine materna o paterno (diploidia uniparentale) non si sviluppano.

Osservazioni naturali.

Diploidia uniparentale paterna: Non sviluppa l'embrione e l'epitelio trofoblastico può trasformarsi in coriocarcinoma.

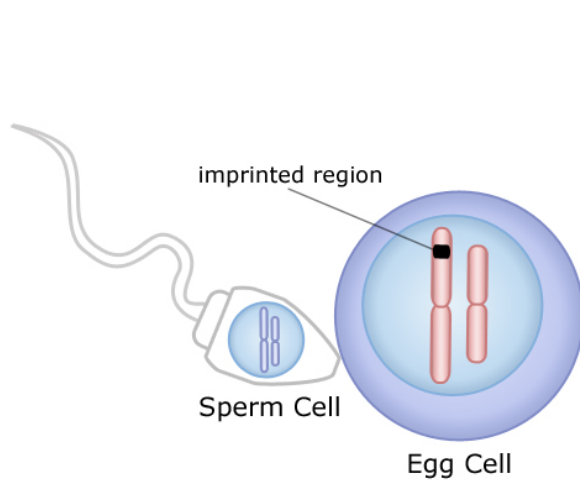
Diploidia uniparentale materna: Massa disorganizzata di tessuti embrionali ("**teratoma ovarico**") senza presenza di annessi extra-embryonari.

Fenotipi di aborti umani triploidi sono diversi se il contributo diploide è materno o paterno.

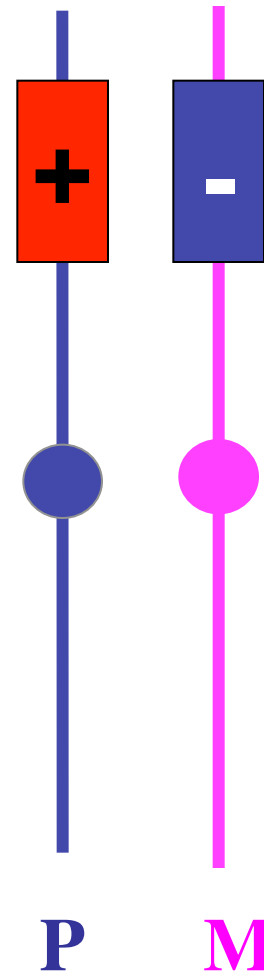
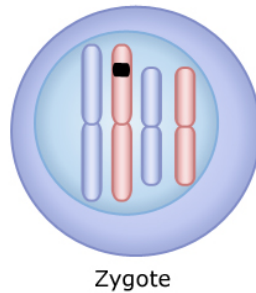
Alcuni caratteri autosomici dominanti si manifestano solo quando ereditati dal padre o dalla madre.

IMPRINTING GENOMICO

Origine parentale dei cromosomi: effetto sull'espressione dei geni

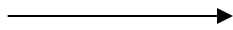


One area of the larger maternally derived chromosome is imprinted so it is turned off in the zygote. Only gene(s) in the corresponding region of the paternally inherited chromosome are active.



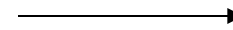
Fecondazione

Gameti

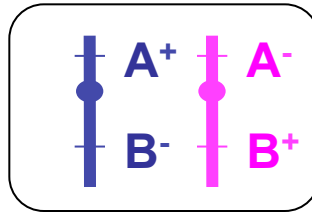
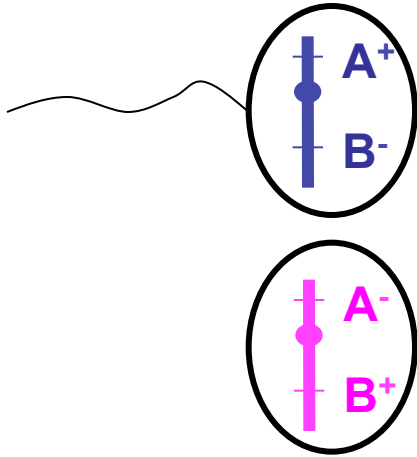


Zigote
Cellule somatiche

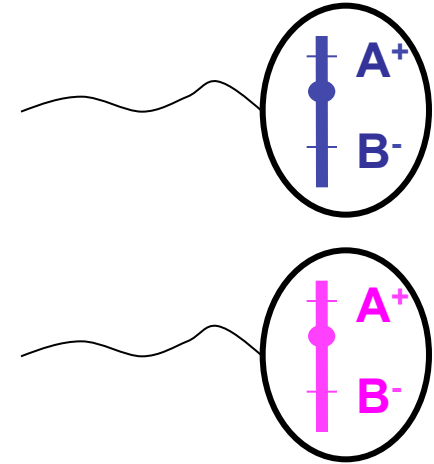
Gametogenesi



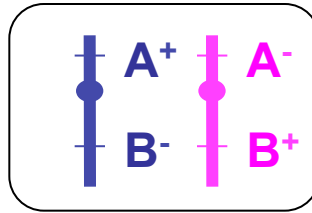
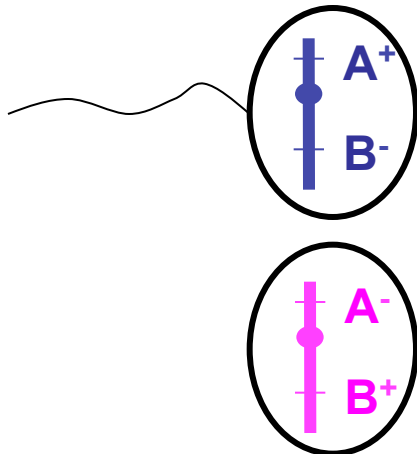
Gameti



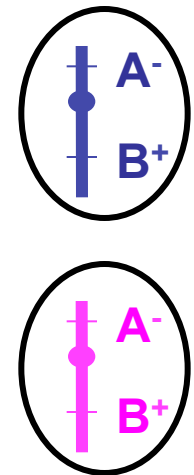
Maschio



*Rimozione vecchio e
definizione nuovo imprinting*

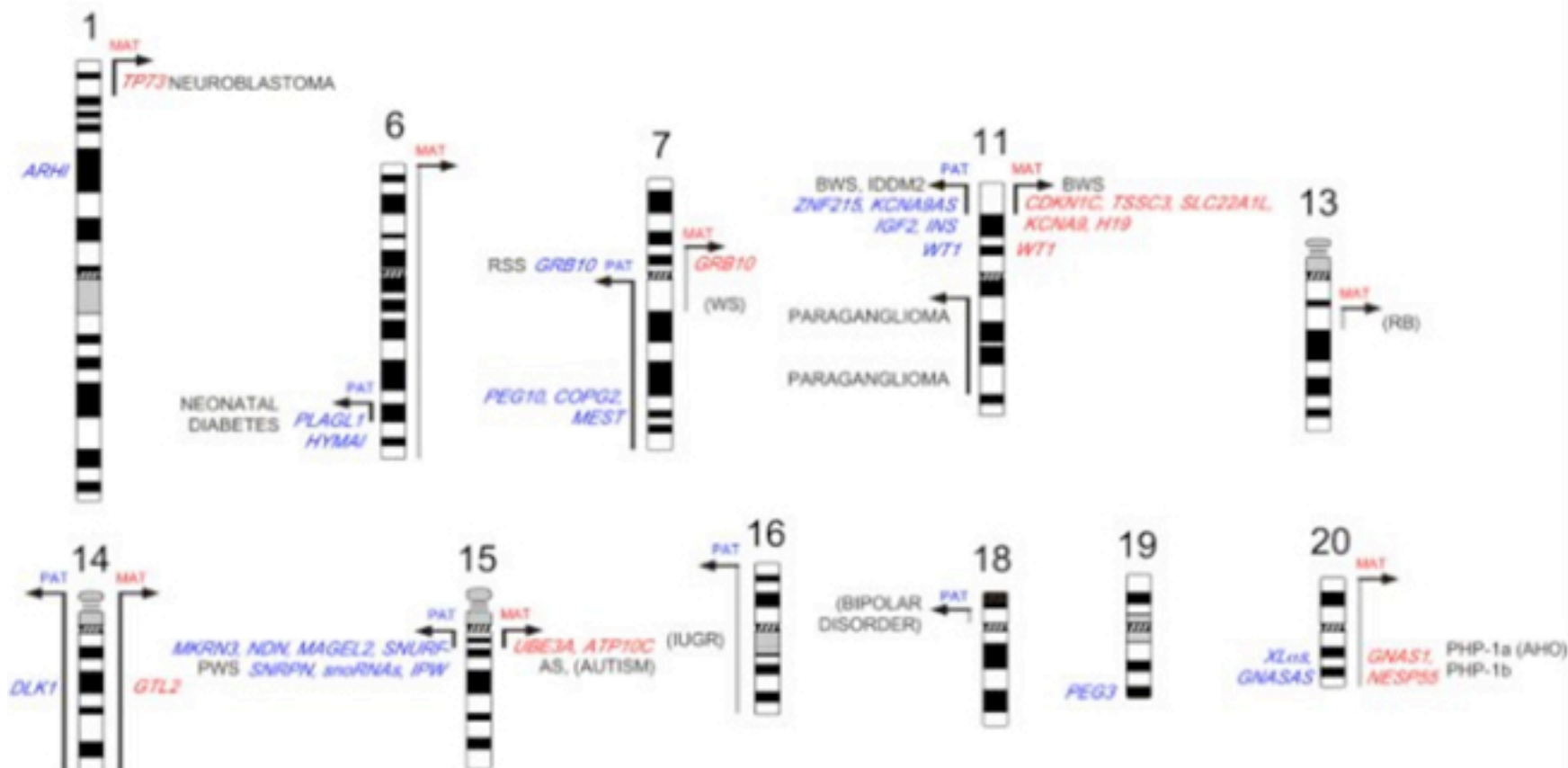


Femmina



Human imprinting map

<http://greallyoffice.aecom.yu.edu/>



RSS: Russell-Silver syndrome
 WS: Williams syndrome
 BWS: Beckwith-Wiedemann syndrome
 IDDM: Insulin-dependent diabetes mellitus
 RB: Retinoblastoma
 PWS: Prader-Willi syndrome
 AS: Angelman syndrome
 IUGR: Intrauterine growth retardation
 PHP: Pseudohypoparathyroidism

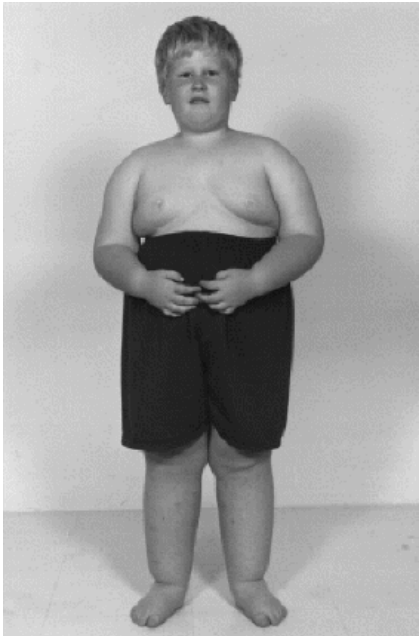
| Imprinted phenotypic effect clear

| Possible imprinted phenotypic effect

PAT ← Evidence for paternally expressed gene(s)

→ MAT Evidence for maternally expressed gene(s)

Prader-Willi syndrome



Obesità
Ritardo mentale
Problemi linguaggio
Mani e piedi piccoli
Ipogonadismo

Angelman syndrome (Happy Puppet)

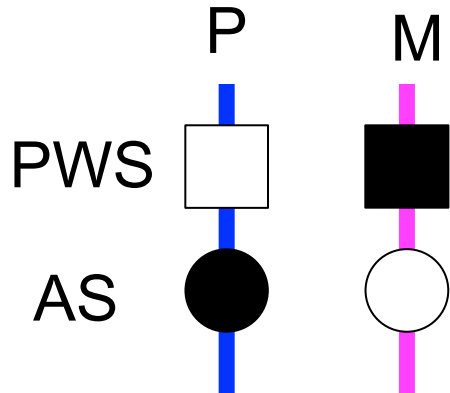


Grave ritardo mentale
Assenza della parola
Lingua protrudente
Atassia e movimenti stereotipati
Crisi epilettiche

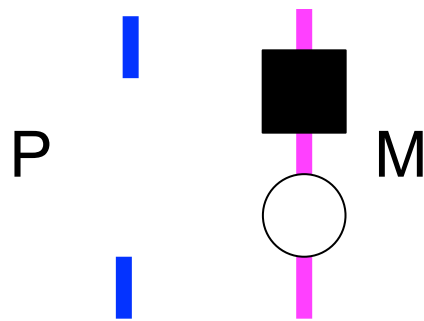
Entrambe le malattie possono essere dovute a:

1. Delezione dell'intera regione cromosomica **15q11-13** (paterna nella PWS, materna nella AS);
2. Disomia uniparentale (UPD) (materna nella PWS, paterna nella AS);
3. Errore di imprinting
4. Solo per la sindrome di Angelman: mutazione nella copia materna del gene AS

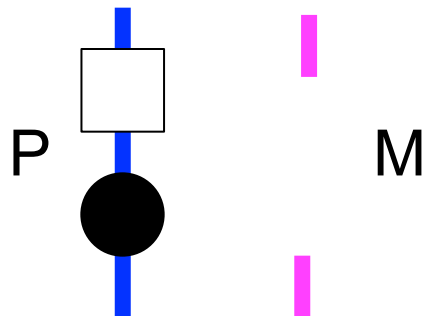
Cause di Prader-Willi/Angelman: **delezione**



Pattern di espressione normale: espresse (simbolo bianco) le regione PWS (quadrato) del cromosoma paterno e AS (cerchio) del cromosoma materno

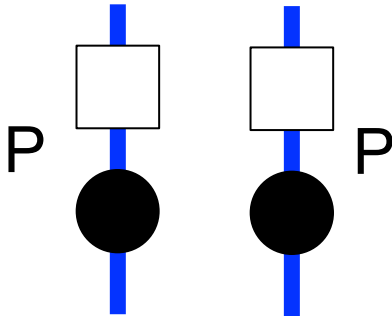


Delezione sul cromosoma paterno
Sindrome di Prader-Willi: manca espressione della regione PWS



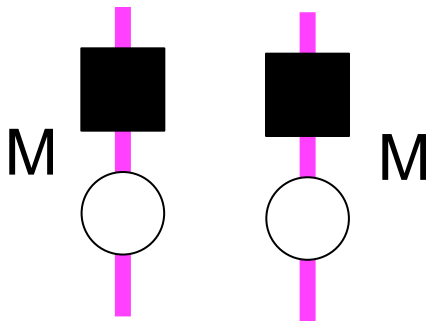
Delezione sul cromosoma materno
Sindrome di Angelman: manca espressione della regione AS

Cause di Prader-Willi/Angelman: **disomia uniparentale (UPD)** (entrambi i cromosomi ereditati da un solo genitore)



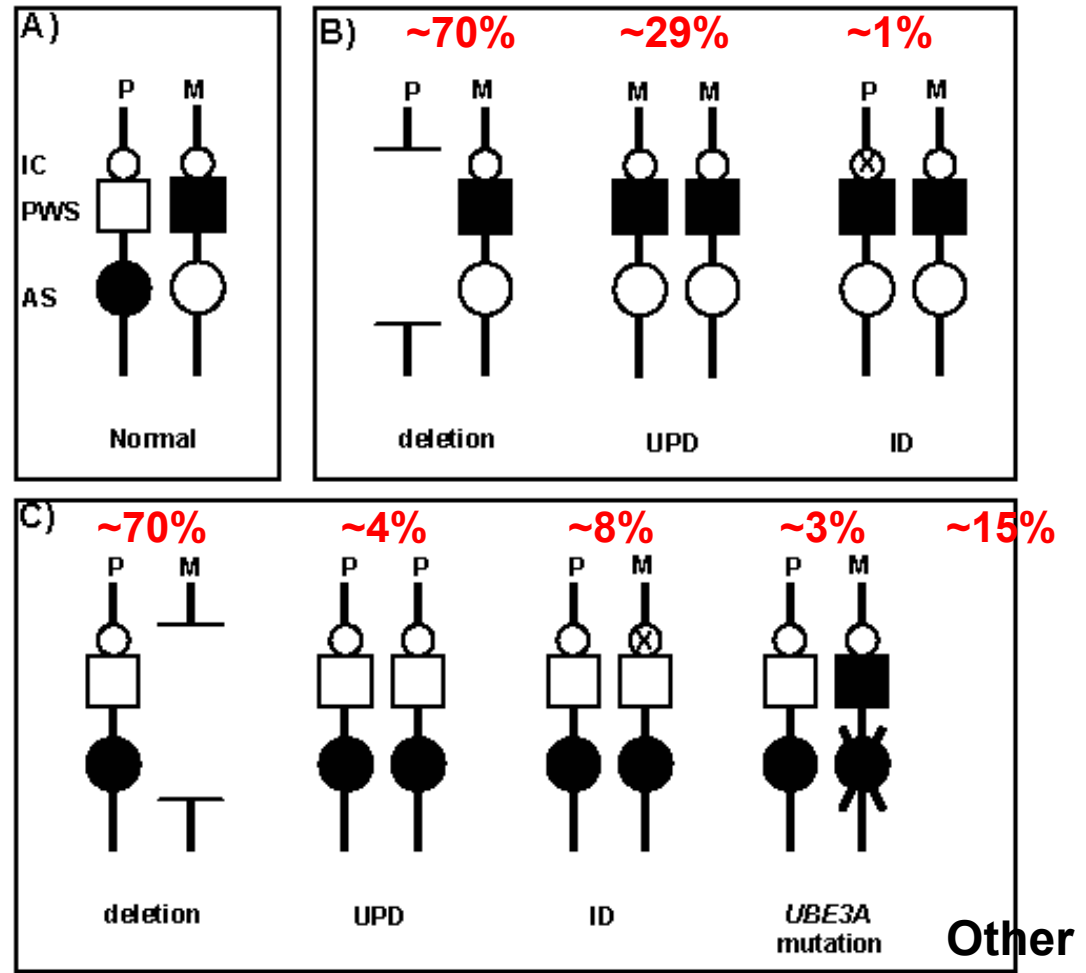
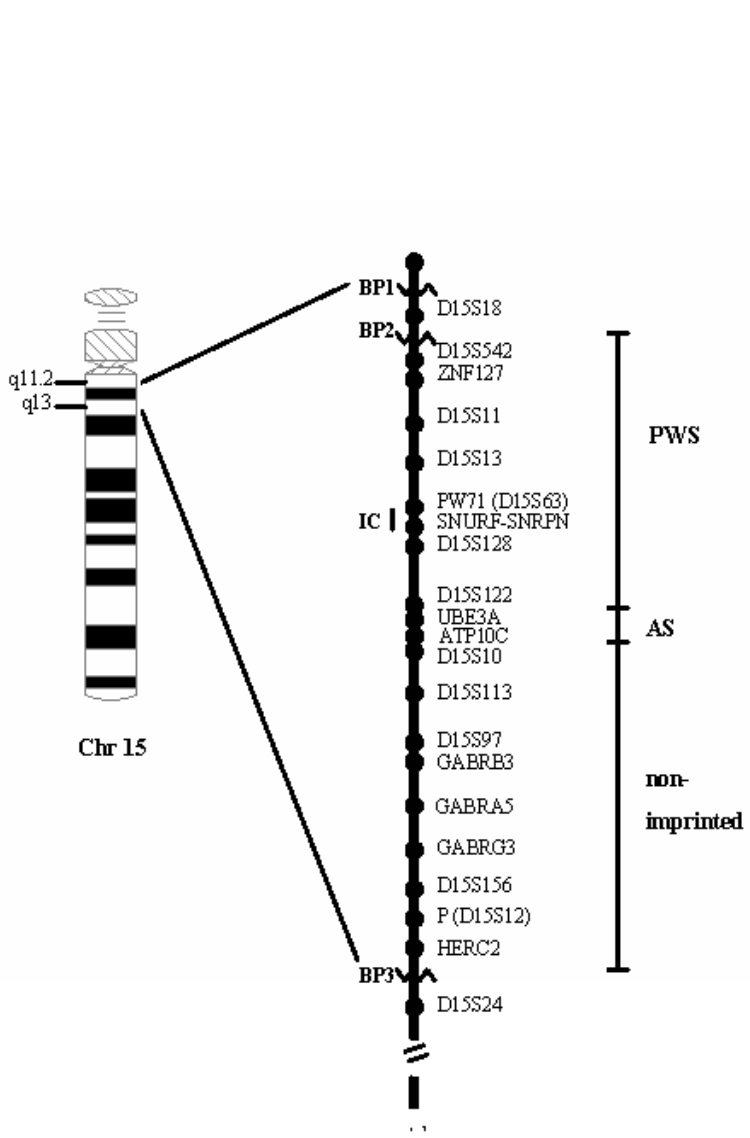
UPD paterna

Sindrome di Angelman: assenza espressione regione AS



UPD materna

Sindrome di Prader-Willi: assenza espressione regione PWS

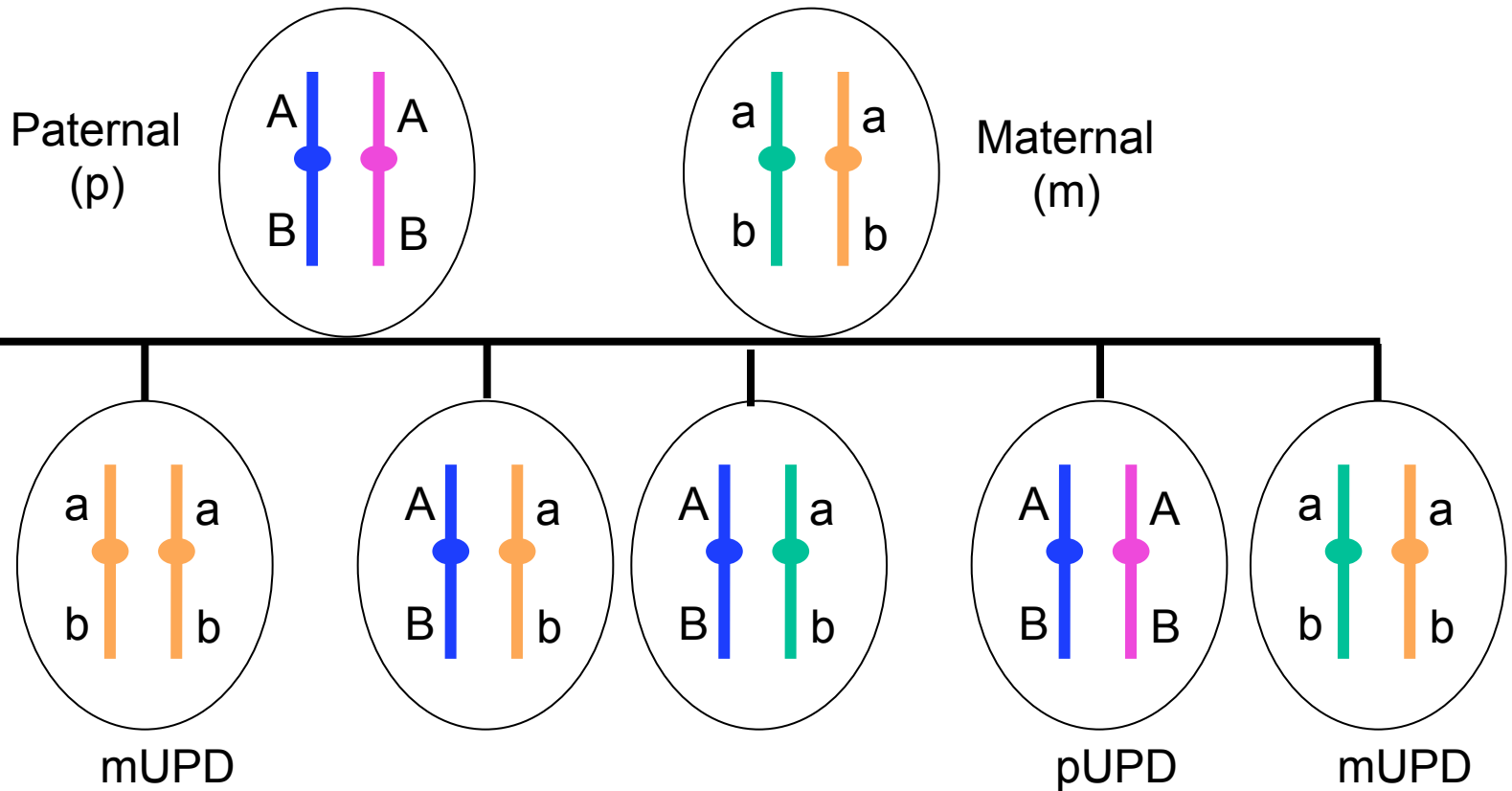


B) PWS
C) AS

ID: imprinting defect
IC: Imprinting center

Uniparental disomy (UPD): definition

- Correct chromosome number
- Both homologs of a specific chromosome (or chromosomal segment) are inherited from the same parent

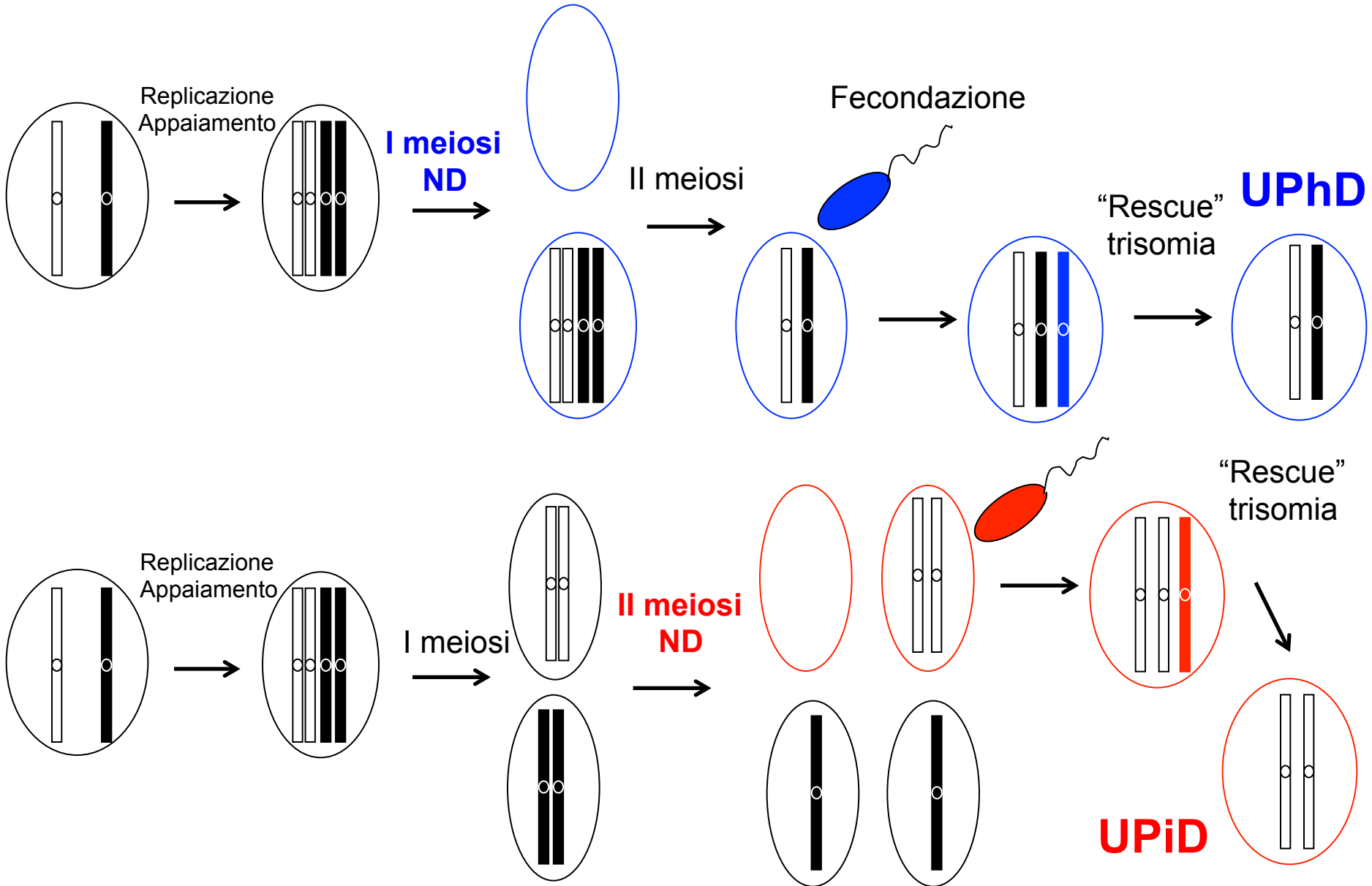


UPiD – Isodisomy
Identical chromosomes

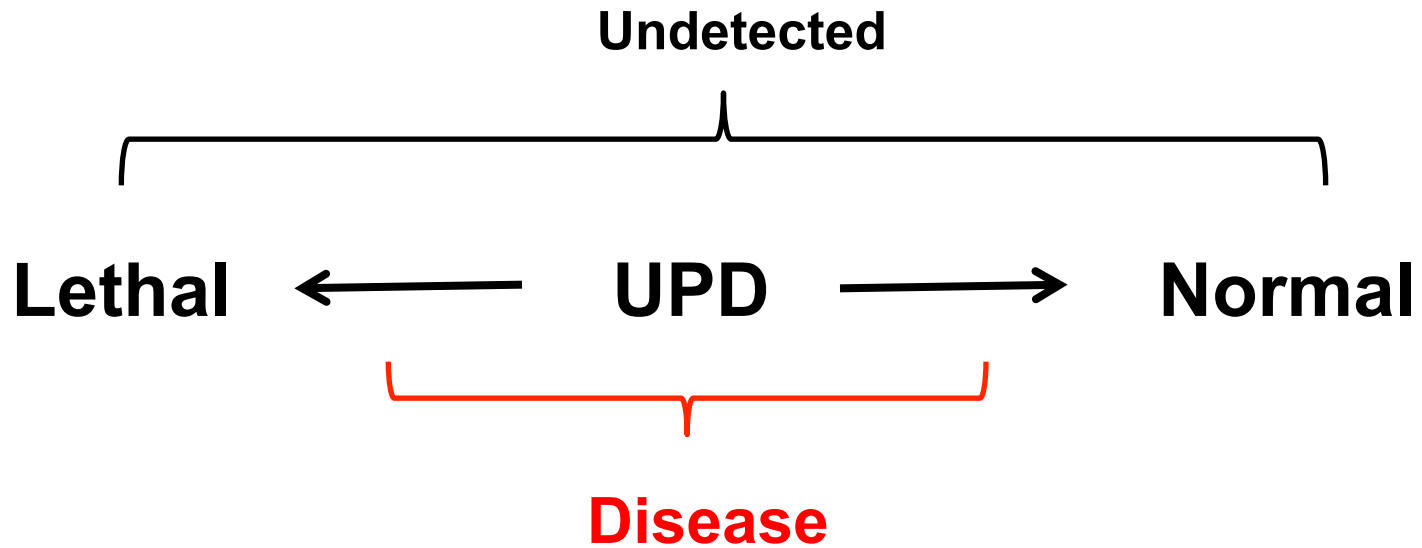
Normal

UPhD – Heterodisomy
Non identical chromosomes

Cause UPD: non disgiunzione in meiosi e “rescue della trisomia”

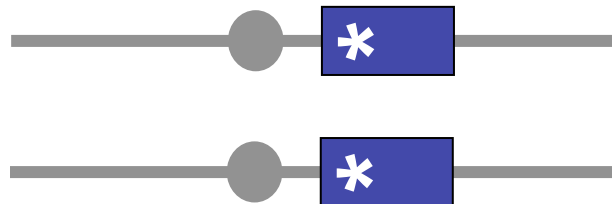


Uniparental disomy (UPD): consequences

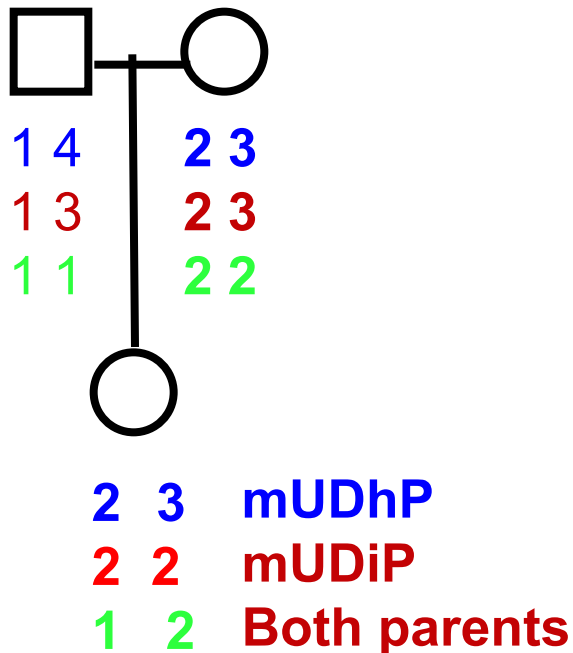
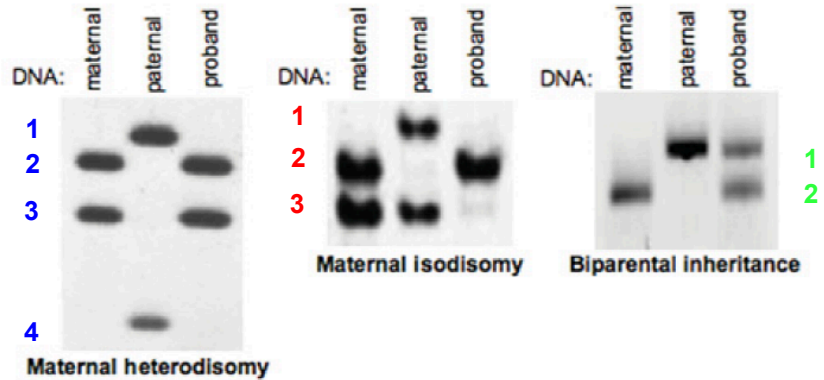


Altered imprinted gene dosage (iso- and hetero-disomy)

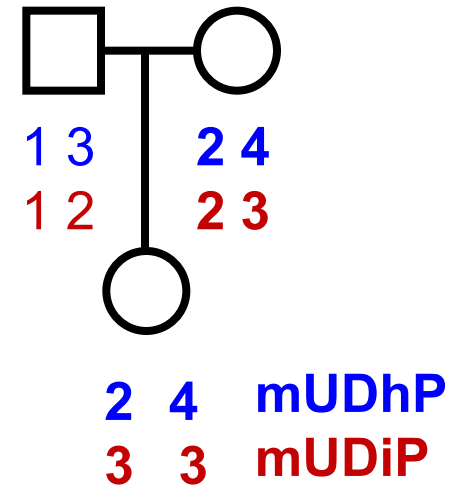
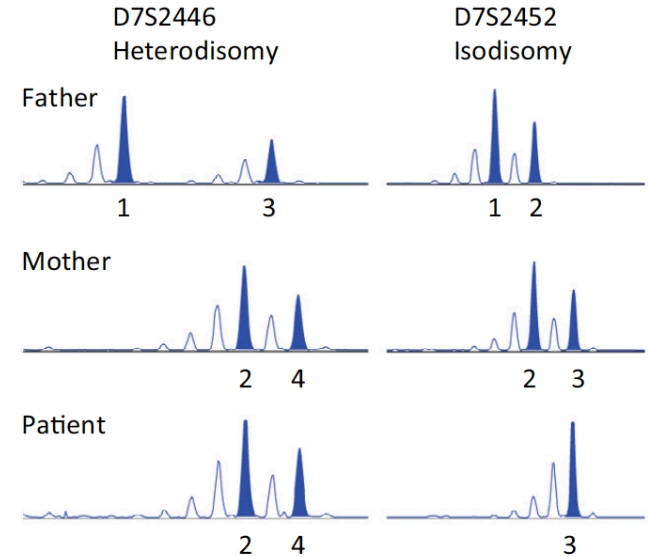
Unmasking mutant (*) recessive mutations (isodisomy)



Uniparental disomy (UPD): identification marker genotyping

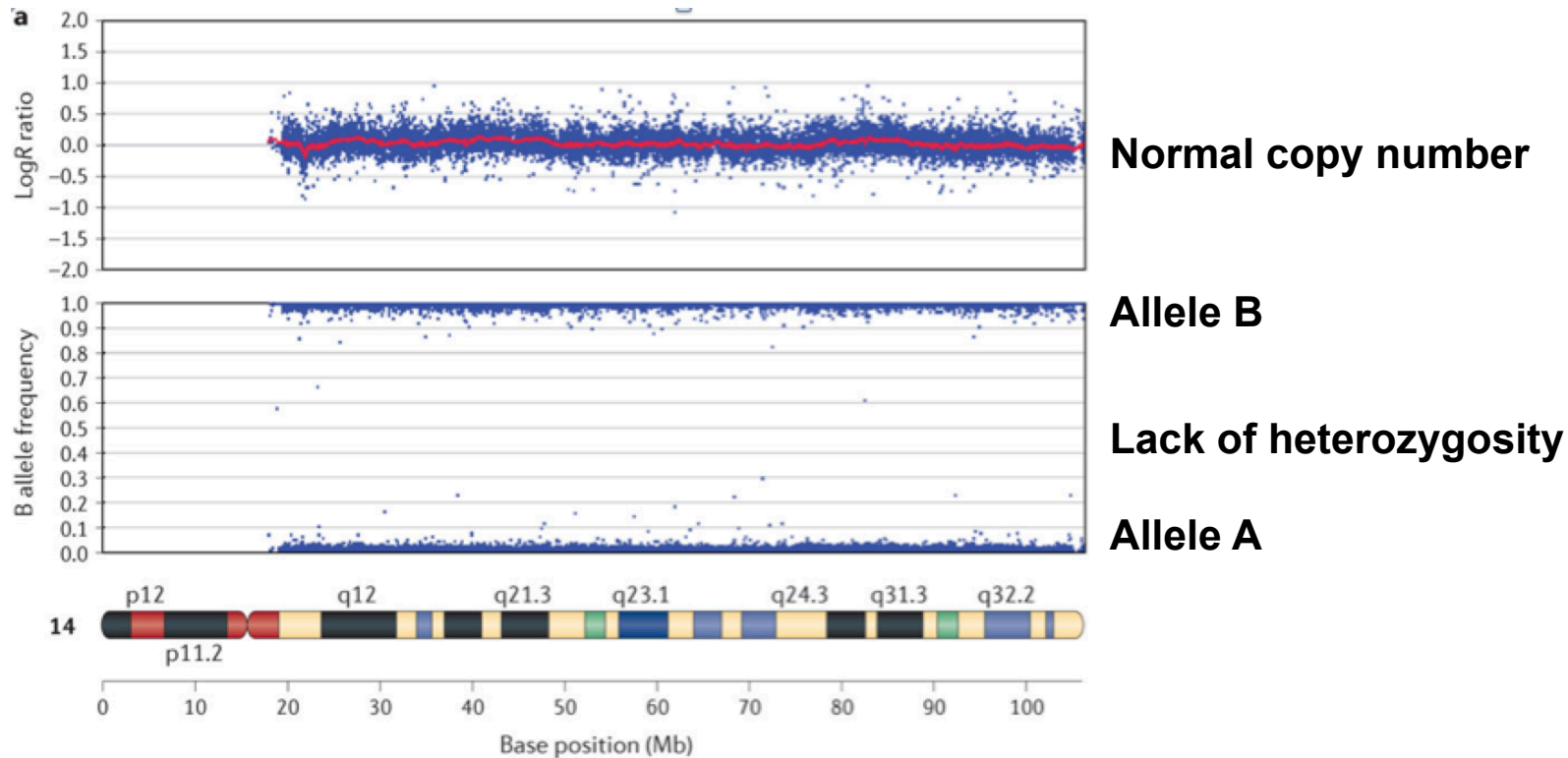


(I) UPD(7)mat: Hetero- and isodisomy



Uniparental disomy (UPD): identification

SNP array



Identification of only isodisomy
Unless parents' DNA is available for comparison

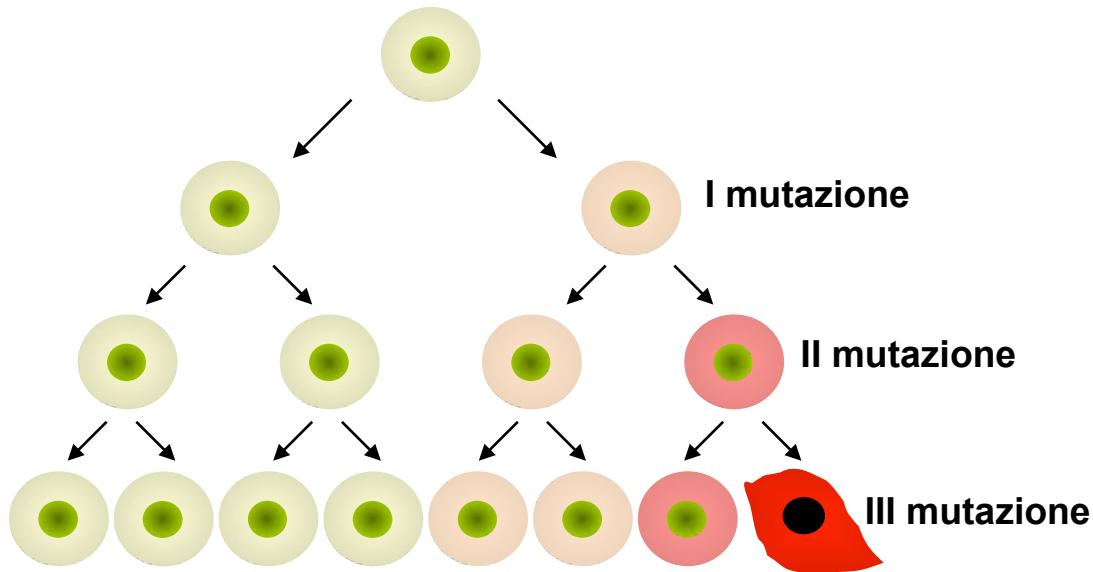
CANCRO: Malattia genetica

(non necessariamente ereditaria)

- **Geni con diverse funzioni**
 - **Controllo del ciclo cellulare**
 - **Inibizione da contatto**
 - **Controllo dell'apoptosi**
 - **Riparazione del DNA**

- **Mutazioni con diversi effetti**
 - **Acquisizione di funzione (“gain of function”)**
 - **Perdita di funzione (“loss of function”)**
 - **Effetto dominante negativo**
 - **Anomalie cromosomiche**
 - **Amplificazione genica**

EVOLUZIONE CLONALE: Accumulo di mutazioni multiple sequenziali di una singola cellula e della sua progenie



How cancer varies over space and time: strategies (thanks to next generation sequencing)

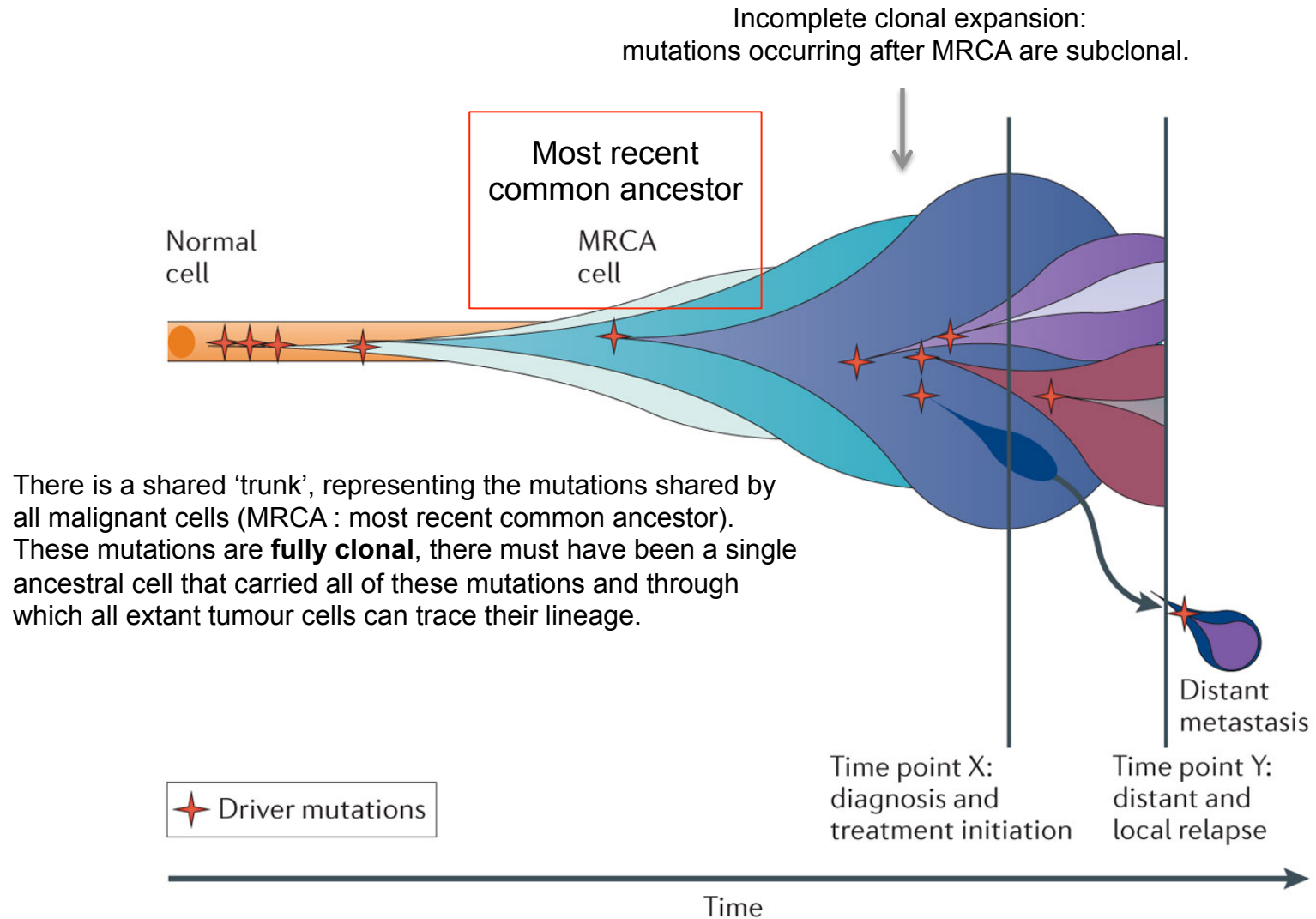
Tumor sampling for sequencing

- Single-cell
- Biopsy specimen (mixed population of cells)

Geographical sampling: multiple samples from an individual cancer obtained at a single point of time

Longitudinal sampling: comparison of samples at different different time points, such as diagnosis, relapse, metastasis

Novel evidence for tumor evolution



Geni di suscettibilità al Cancro

1. Oncogeni (proto-oncogeni)
2. Geni oncosoppressori
3. Geni di risposta al danno al DNA



ONCOGENI

Stimolano la divisione cellulare

**ATTIVAZIONE di oncogeni: “gain of function”
(eccessivamente attivi o nuova attività)**

Effetto DOMINANTE: Mutazioni attivanti

Tumori ereditari (molto rari)

Tumori sporadici (più frequente)

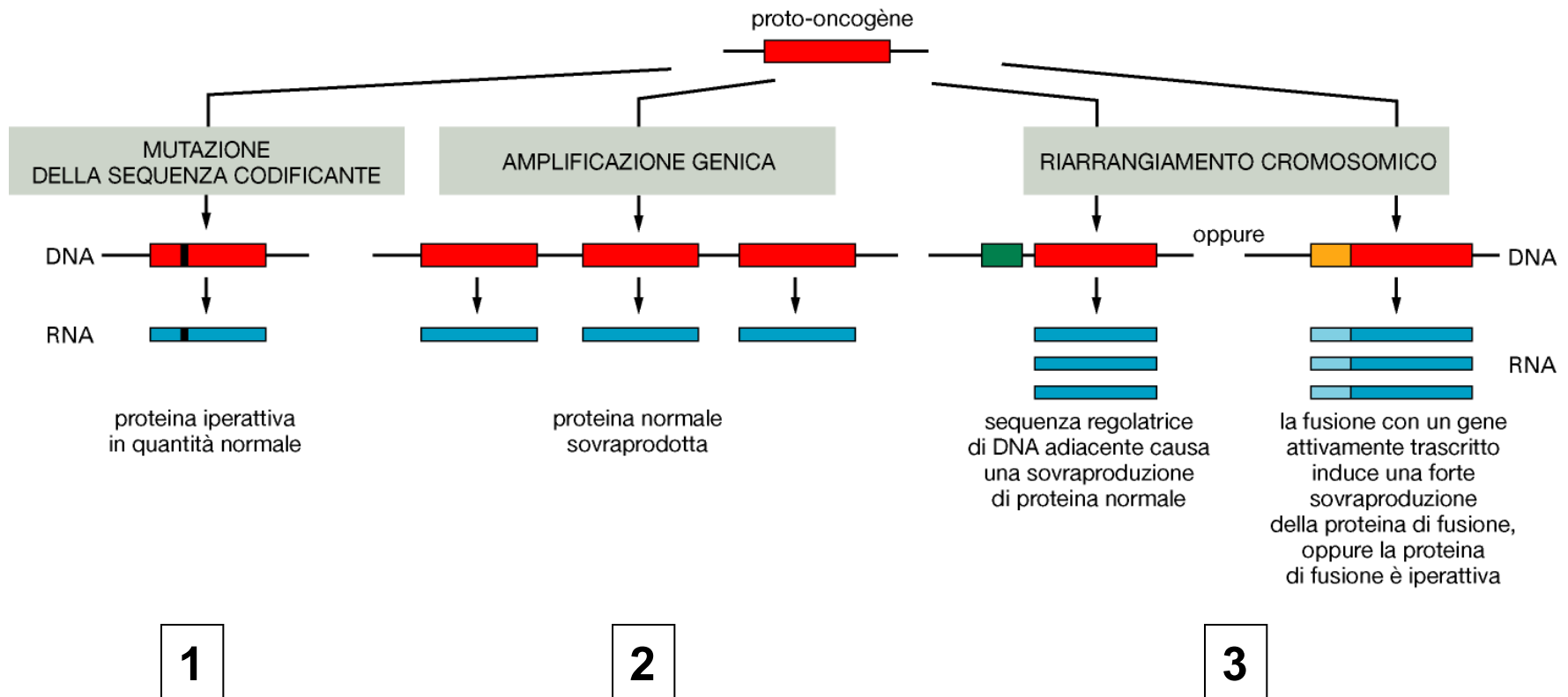
Activaction of oncogenes in hereditary syndromes

Syndrome	Hereditary papillary renal carcinoma (HPCR)
Inheritance	Autosomal dominant with incomplete penetrance
Primary tumor	Renal-cell cancer
Associated cancers and other traits	No
Gene/localization	MET (heterozygous germline mutations) / 7q31
Proposed function of gene product	Transmembrane tyrosine kinase receptor for hepatocyte growth factor
Clonality	Trisomy 7 (duplication of the chromosome bearing MET activated, increasing the gene dose)

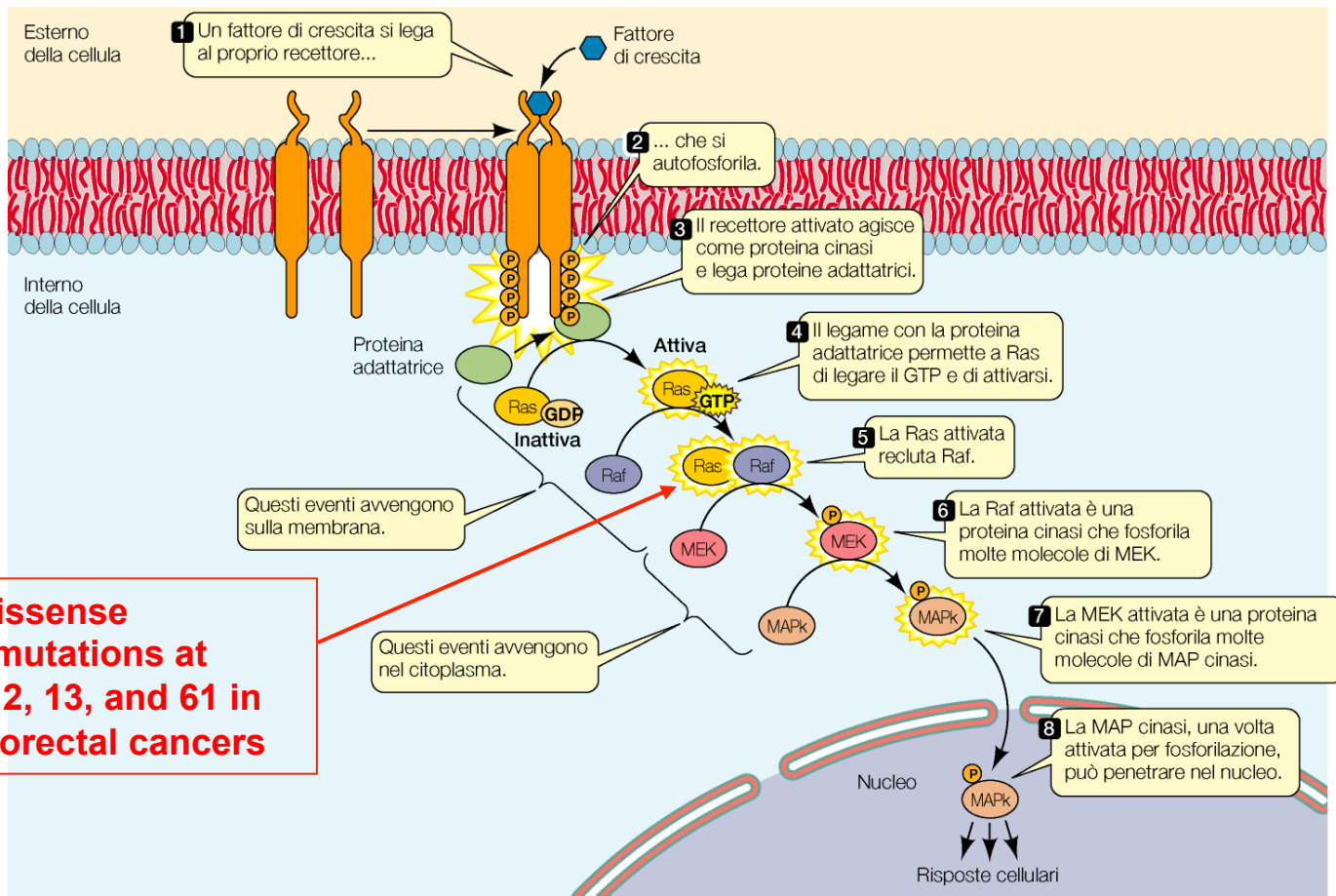
Only a small percentage of papillary renal carcinomas has mutations in the MET gene
(different pathogenesis in hereditary and sporadic cases)

Meccanismi di attivazione di proto-oncogeni

Difetti qualitativi o quantitativi



1) Mutazione nella sequenza codificante attivazione costitutiva di Ras mediante mutazioni missense



Somatic missense activating mutations at positions 12, 13, and 61 in 30-40% colorectal cancers

2) Amplificazione genica

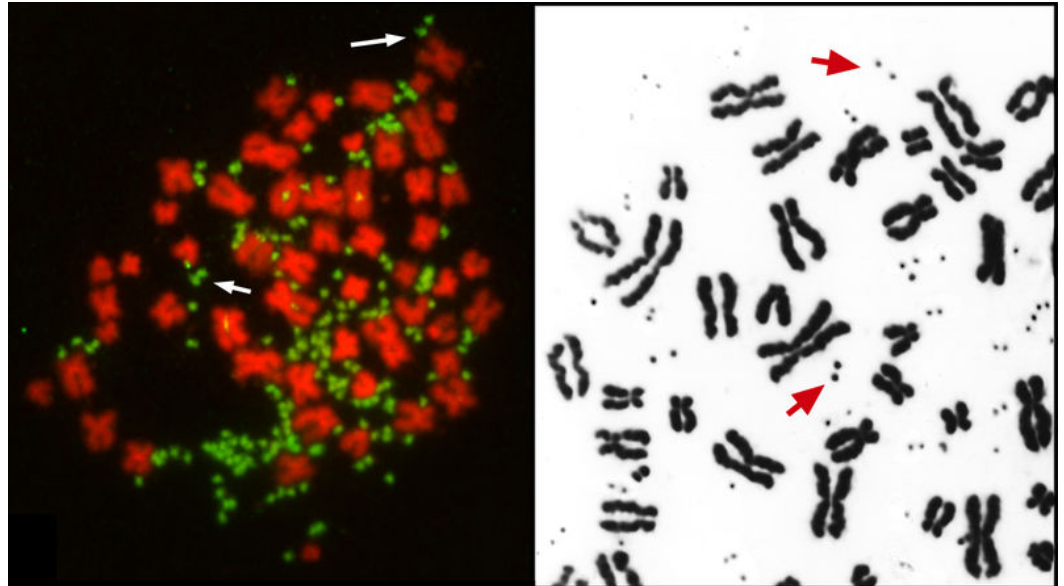
Amplificazione di un frammento di DNA centinaia di volte che, molto probabilmente, contiene geni che favoriscono la progressione del tumore.
Si osserva in numerosi tumori.

- **Homogeneously Staining Regions (HSRs)**

Segmento di DNA amplificato molte volte all'interno di un cromosoma normale

- **Double minutes**

Piccoli corpi di DNA extracromosomico circolare che si replicano nel nucleo prima della divisione cellulare



3) Riarrangiamenti cromosomici: traslocazioni

Neoplasm	Chromosomal translocation	% of cases	Proto-Oncogene affected
Burkitt lymphoma	t(8;14)(q24;q32)	0.80	MYC
	t(8;22)(q24;q11)	0.15	
	t(2;8)(q11;q24)	0.05	
Chronic myeloid leukemia	t(9;22)(q34;q11)	0.90-0.95	ABL-BCR
Acute lymphocytic leukemia	t(9;22)(q34;q11)	0.10-0.15	BCR-ABL
Acute Lymphoblastic leukemia	t(1;19)(q23;p13)		PRL homeobox gene
Acute promyelocytic leukemia	t(15;17)(q22;q11)		PML-RARA
Chronic lymphocytic leukemia	t(11;14)(q13;q32)	0.10-0.30	BCL-1
Follicular lymphoma	t(14;18)(q32;q21)		BCL-2

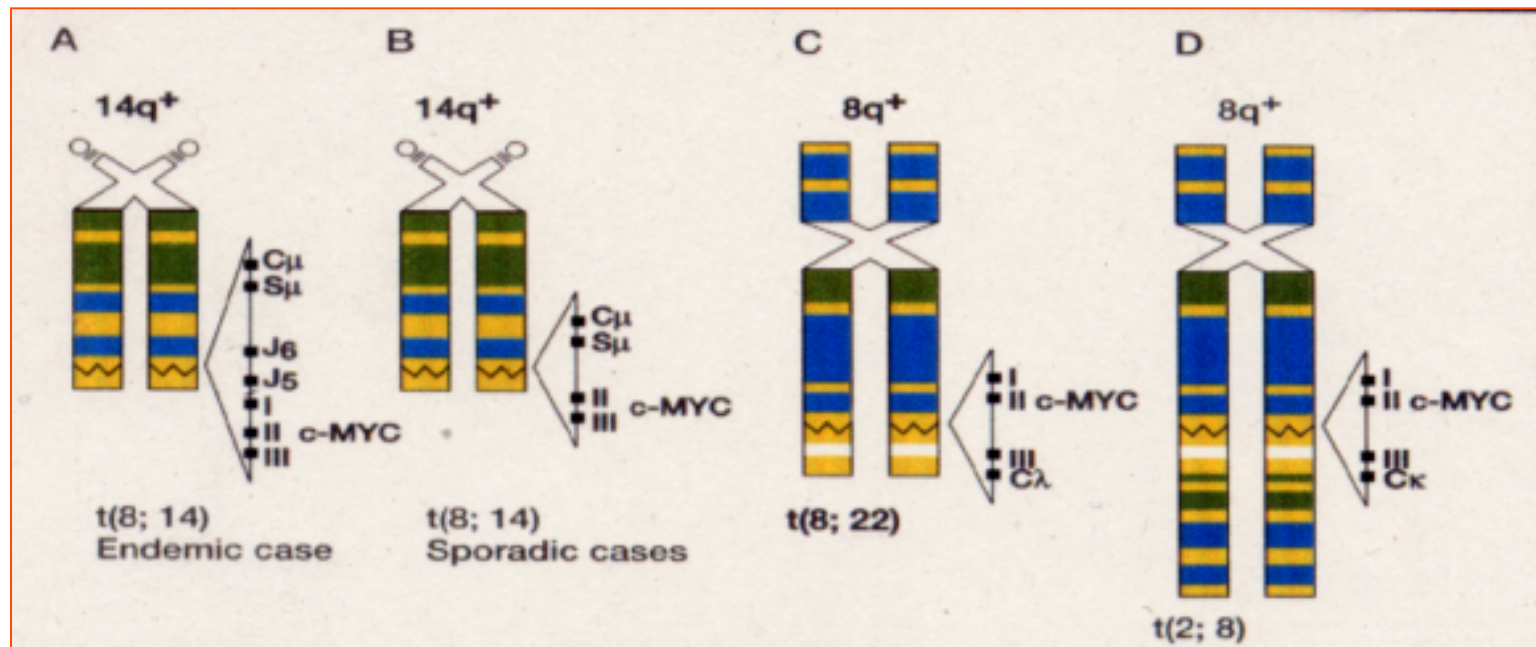
Linfoma di Burkitt

esempio di traslocazione in una regione attiva trascrizionalmente

IGH
14q32

IGL
22q11

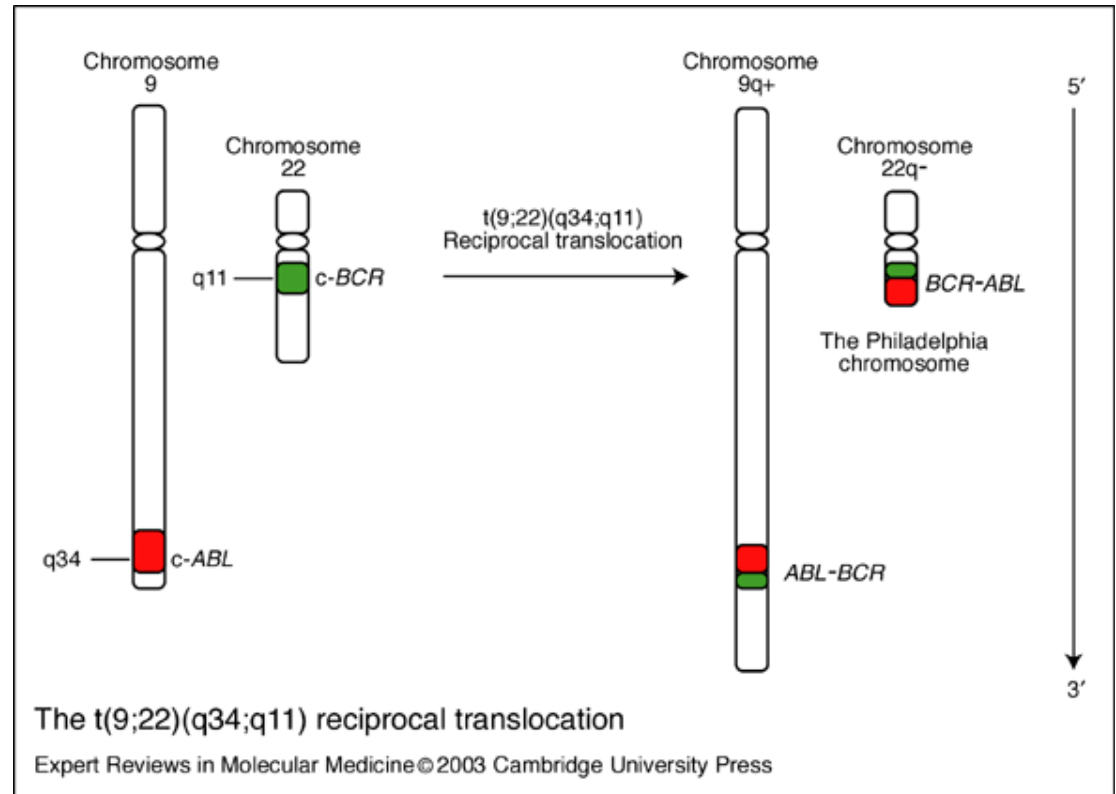
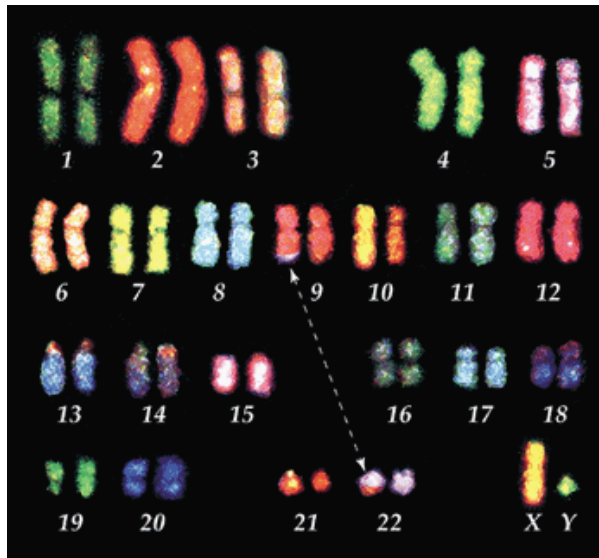
IGK
2p12



**MYC traslocato in loci (geni per immunoglobuline)
che producono anticorpi e che sono
attivamente espressi in cellule B**

LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA (CML)

Esempio di traslocazione cromosomica che genera un nuovo gene (gain of function)



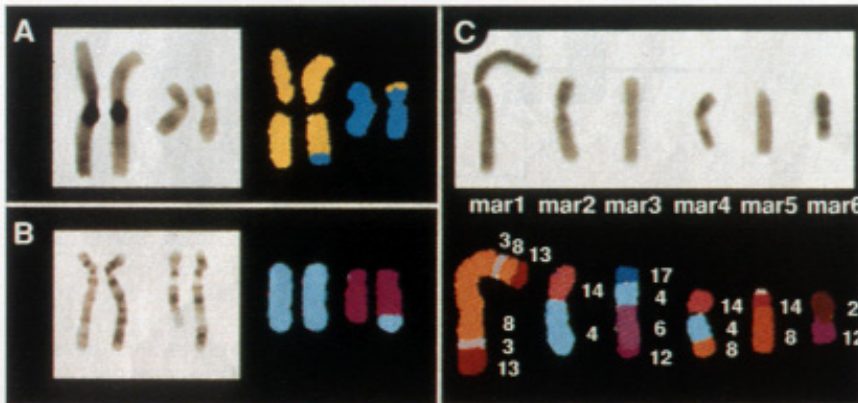
**BRC-ABL proteina di fusione
con attività chinastica costitutiva**

**Utilizzo di farmaci inibitori
delle tirosin chinasi
(imatinib, un competitore dell'ATP)**

SPECTRAL KARYOTYPING

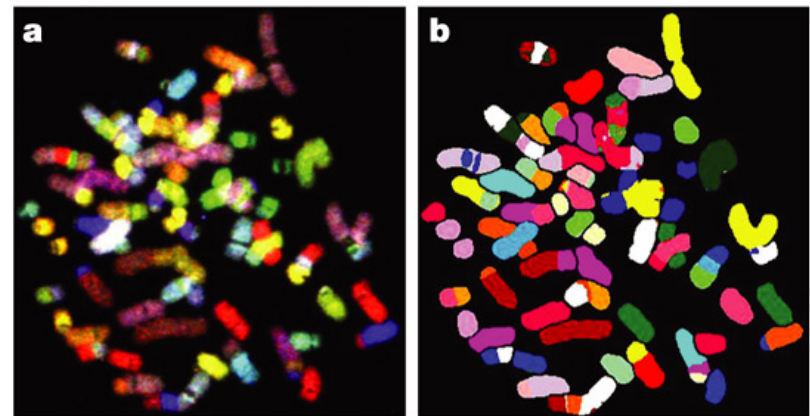


Normal Human Chromosomes



Chromosomes from Human Cancers

Spectral karyotyping:
utilizzo di sonde marcate
con coloranti diversi per
ciascun cromosoma

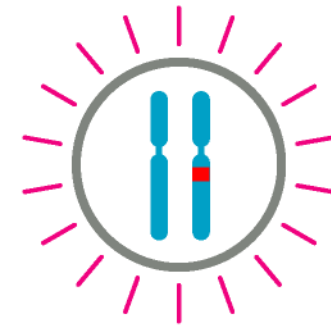


ONCOGENI

(A) mutazione ad acquisto di funzione con iperattivazione



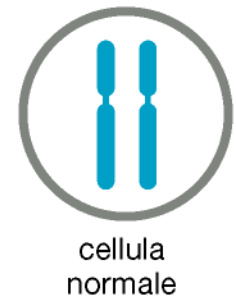
un unico evento di mutazione
nel proto-oncogene
lo trasforma in oncogene



sopravvivenza
e proliferazione
eccessive

la mutazione attivatoria conferisce
all'**oncogene** la facoltà
di sopravvivere e proliferare

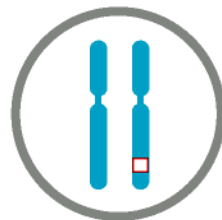
(B) mutazione a perdita di funzione con disattivazione



un evento mutageno



disattiva una copia
del gene
oncosoppressore

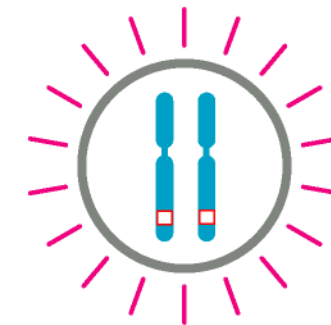


nessun effetto
della mutazione
a carico di una sola copia

un secondo evento
mutageno



disattiva la seconda
copia del gene
oncosoppressore



sopravvivenza
e proliferazione
eccessive

due mutazioni disattivanti azzerano
la funzione svolta dal gene
oncosoppressore, e riducono il controllo
sulla sopravvivenza e proliferazione cellulare

GENI ONCOSOPPRESSORI

Geni oncosoppressori

Controllano la proliferazione cellulare

INATTIVAZIONE di geni oncosoppressori: perdita di funzione

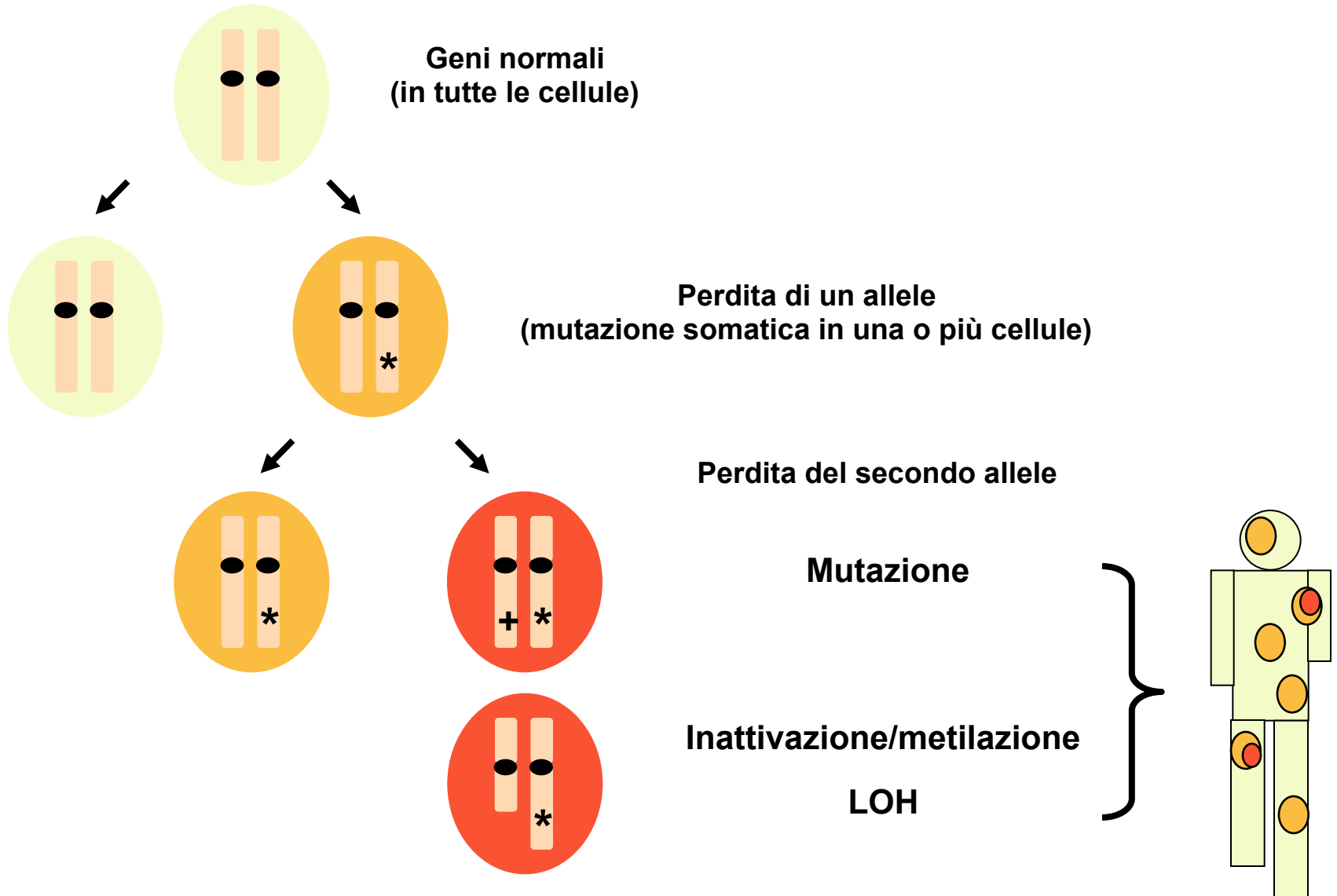
Effetto RECESSIVO: entrambi gli alleli sono inattivati

IPOTESI “TWO-HITS”
Tumori ereditari e sporadici

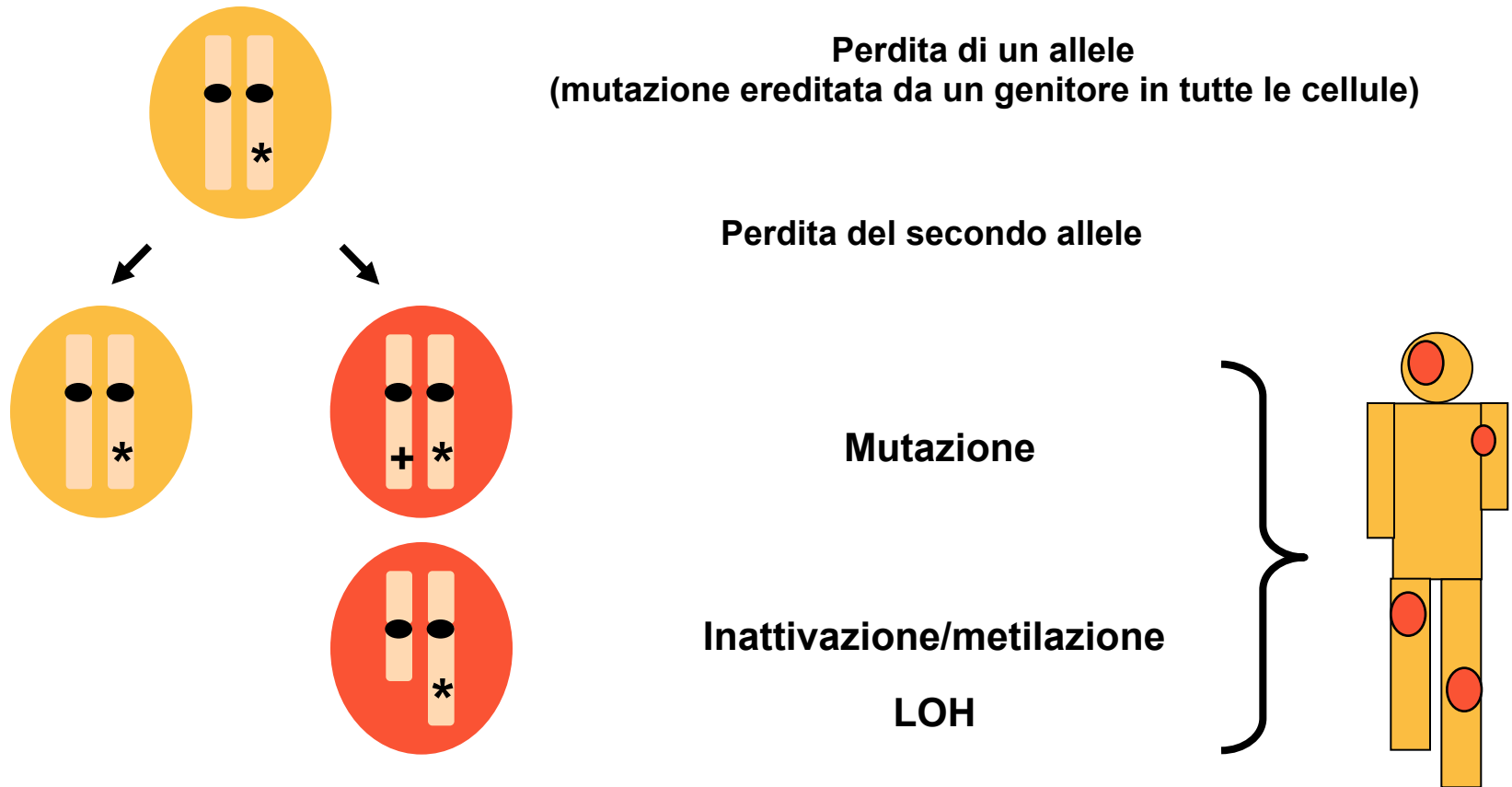
Tumori sporadici
2 mutazioni somatiche

Tumori ereditari
1 mutazione germinale + 1 mutazione somatica

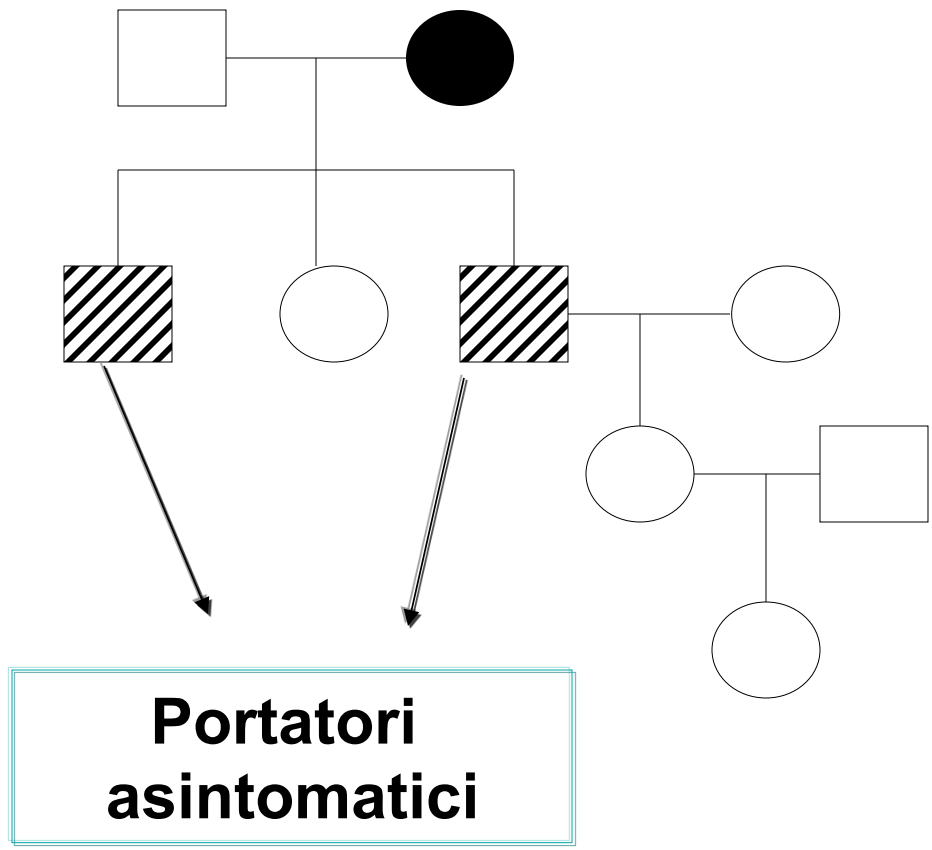
TUMORE SPORADICO: 2 Mutazioni somatiche



TUMORE EREDITARIO: Mutazione germinale + mutazione somatica



Ciò che viene ereditato è la PREDISPOSIZIONE



Tumori ereditari (5%): potenziali indicatori

- **Casi multipli nella famiglia in più generazioni (parenti di primo grado)**
- **Specifici tipi di tumore nello stesso individuo o in membri diversi della famiglia**
- **Riconoscimento di una sindrome con predisposizione a tumori**
- **Esordio ad un'età più giovane rispetto ai tumori sporadici**
- **Diagnosi di tumore con nota componente ereditaria (retinoblastoma, tumore midollare della tiroide, feocromocitoma)**
- **Mutazione identificata in gene-tumore in un membro della famiglia**

Consulenza genetica

Identificare famiglie e individui a rischio
Test molecolari di screening di mutazioni
Prevenire tumore e fornire terapie adeguate
Diagnosi prenatale

Geni Oncosoppressori implicati in Tumori Ereditari

Gene	Malattia
APC	FAP (Familial Adenomatous Polyposis)
VHL	Sindrome di Von Hippel-Lindau
WT1	Tumore di Wilms Ereditario
RB1	Retinoblastoma Ereditario
NF1	Neurofibromatosi 1
NF2	Neurofibromatosi 2
p53	Sindrome di Li Fraumeni
P16/CDK4	Melanoma Ereditario
PTCH	Nevoid Basal Cell carcinoma syndrome
MEN1	MEN (Multiple Endocrine Neoplasia) tipo 1
BRCA1 BRCA2	Carcinoma Ereditario Mammella/Ovaio

RETINOBLASTOMA (MIM 180200)



Raro tumore embrionario della retina

Autosomico dominante

1/15-18.000 nati

3% dei tumori in età pediatrica

Insorgenza: nei primi 3 anni, difficilmente dopo i 7 anni

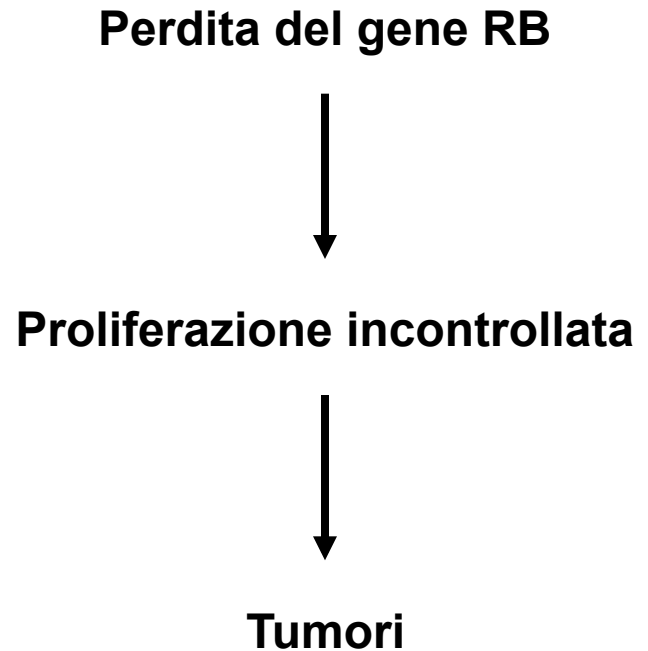
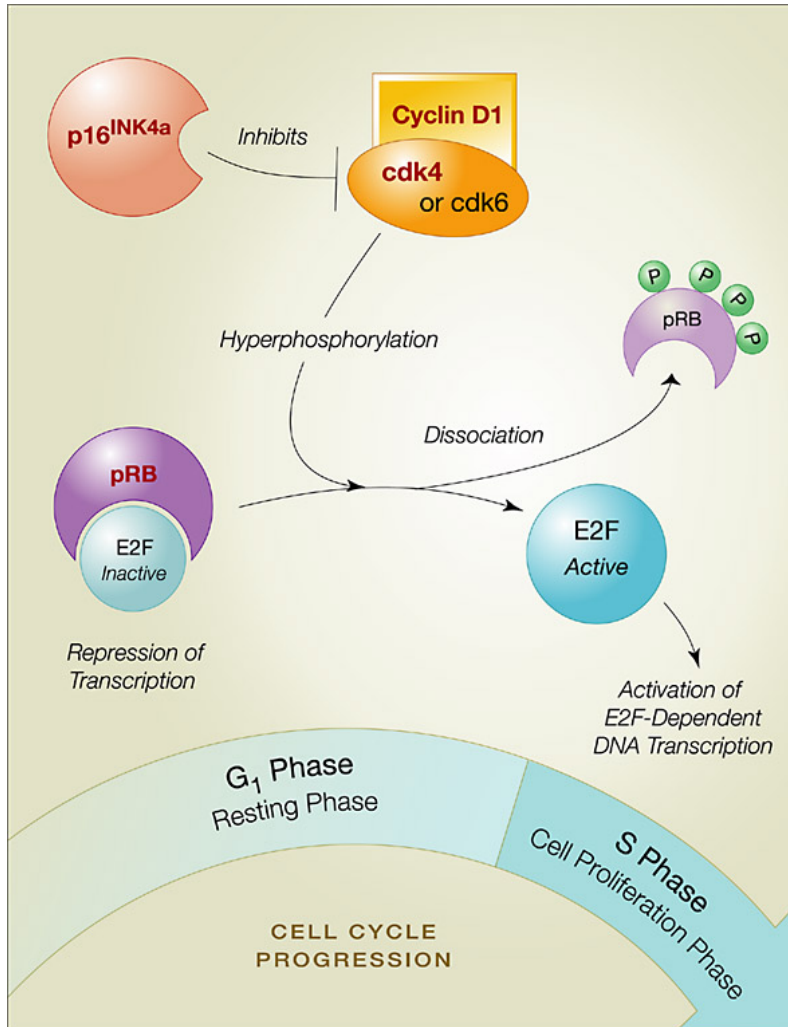
Sporadico/Ereditario

Unilaterale/Bilaterale

Unifocale/Multifocale

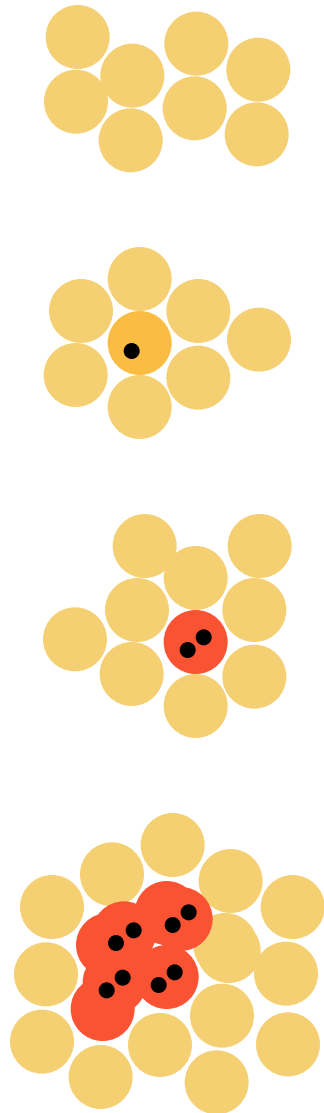
Mutazioni in RB1 (oncosoppressore)

PATHWAY RB1: controllo del ciclo cellulare



RETINOBLASTOMA SPORADICO

R
E
T
I
N
A

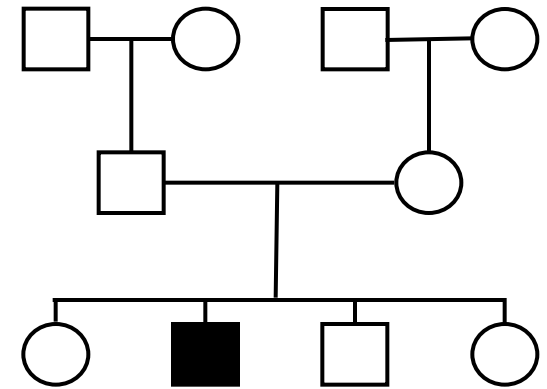


I mutazione somatica

II mutazione somatica

Gene normale

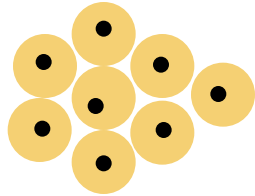
Tumore unilaterale
unifocale
Insorgenza tardiva
(24-30 mesi)



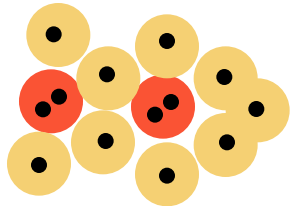
NON rischio 2° tumore
NON rischi da terapia radiante
NON trasmissione ereditaria

RETINOBLASTOMA EREDITARIO

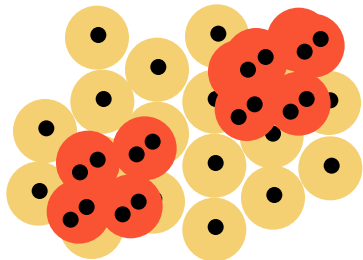
R
E
T
I
N
A



Mutazione germinale
tutte le cellule



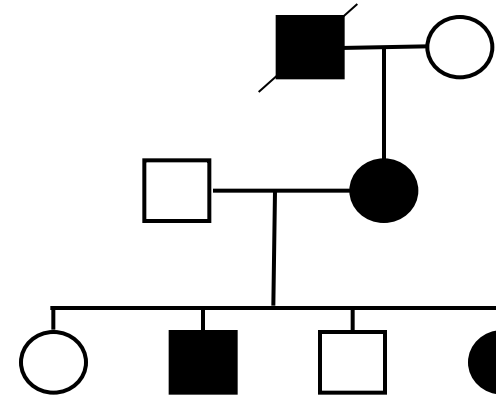
Mutazione
somatica



Tumore bilaterale
(Unilaterale > bilaterale)

Multifocale

Insorgenza precoce
(<12 mesi, anche in utero)



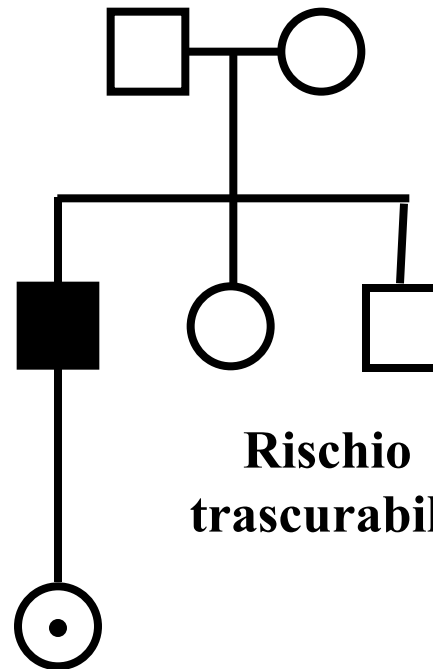
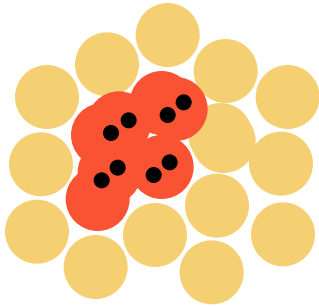
Rischio 2° tumore (RR=400)
(osteosarcoma, fibrosarcoma, melanoma)

Rischi da terapia radiante

Trasmissione ereditaria
Autosomica dominante

RETINOBLASTOMA SPORADICO

60%

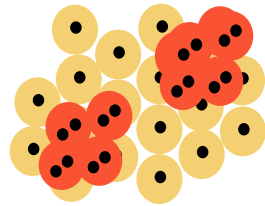


Rischio
trascurabile

1/100

RETINOBLASTOMA EREDITARIO (40%)

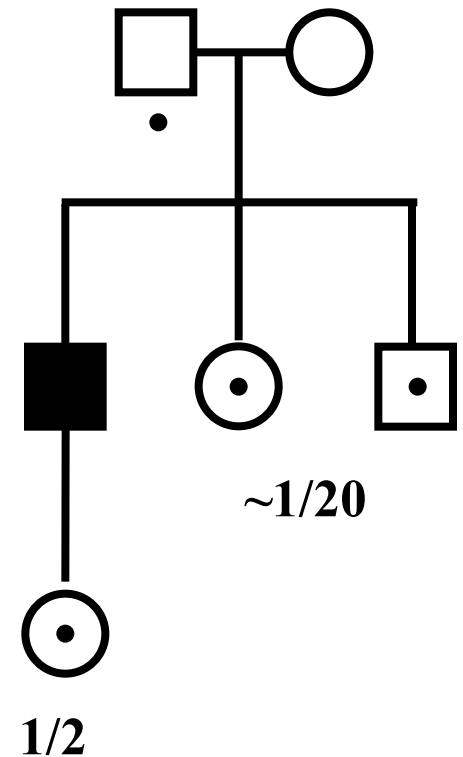
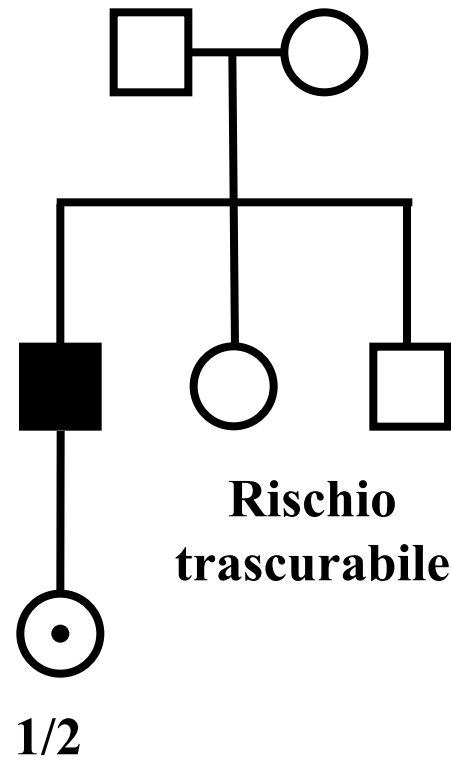
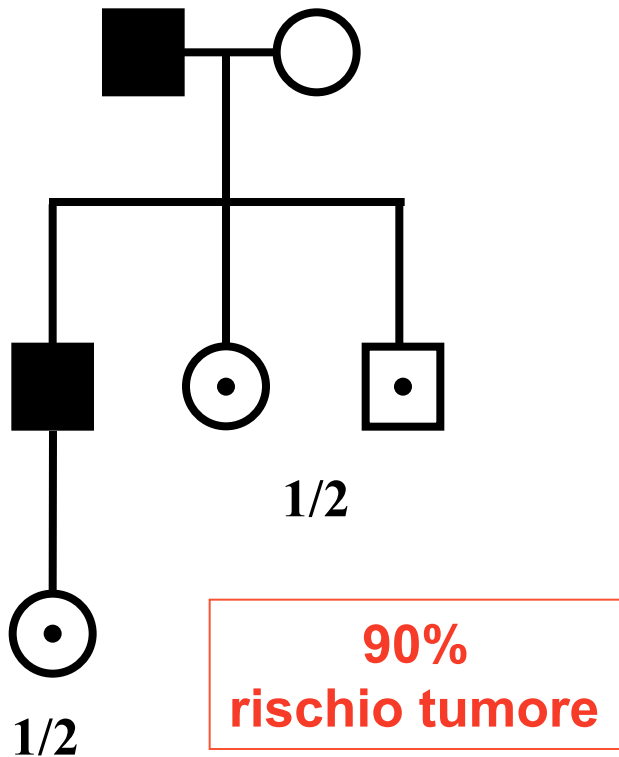
Mutazione germinale
nei genitori (10-15%)



Mutazione germinale
assente nei genitori (85-90%)

“de novo”
(90-95%)

Mosaicismo
germinale
(5-10%)

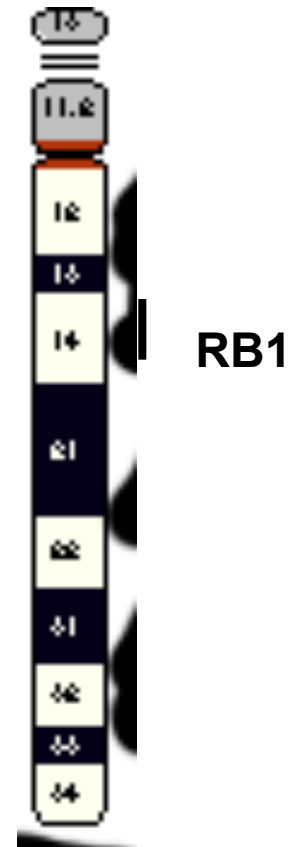


Mutazioni nel gene RB1

Anomalie cromosomiche (15%)
(delezioni, inserzioni, duplicazioni, traslocazioni)

**Piccole delezioni, inserzioni, mutazioni
complesse (15%)**

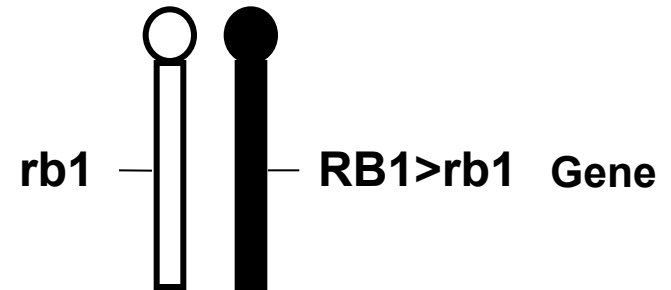
Sostituzioni nucleotidiche (70%)
(mutazioni missense, nonsense, frameshift,
promotore)



13q14

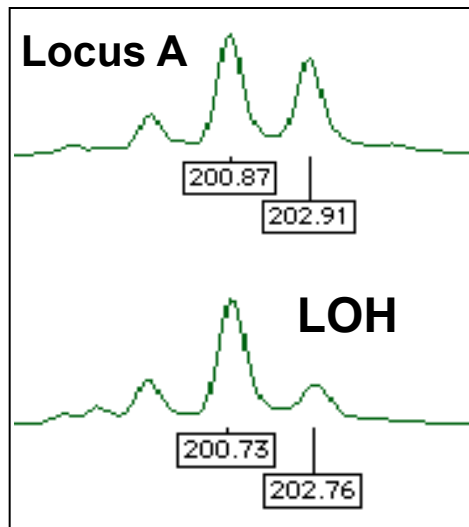
Meccanismi perdita di funzione implicati nel secondo "hit"

- 1) Mutazione somatica
- 2) Metilazione del promotore

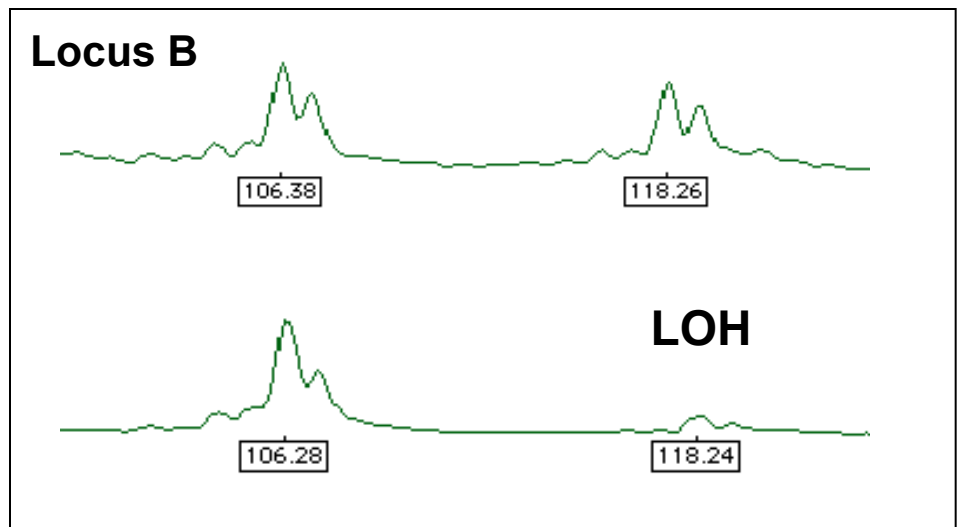


- 3) LOH: Loss of heterozygosity

Sangue
periferico

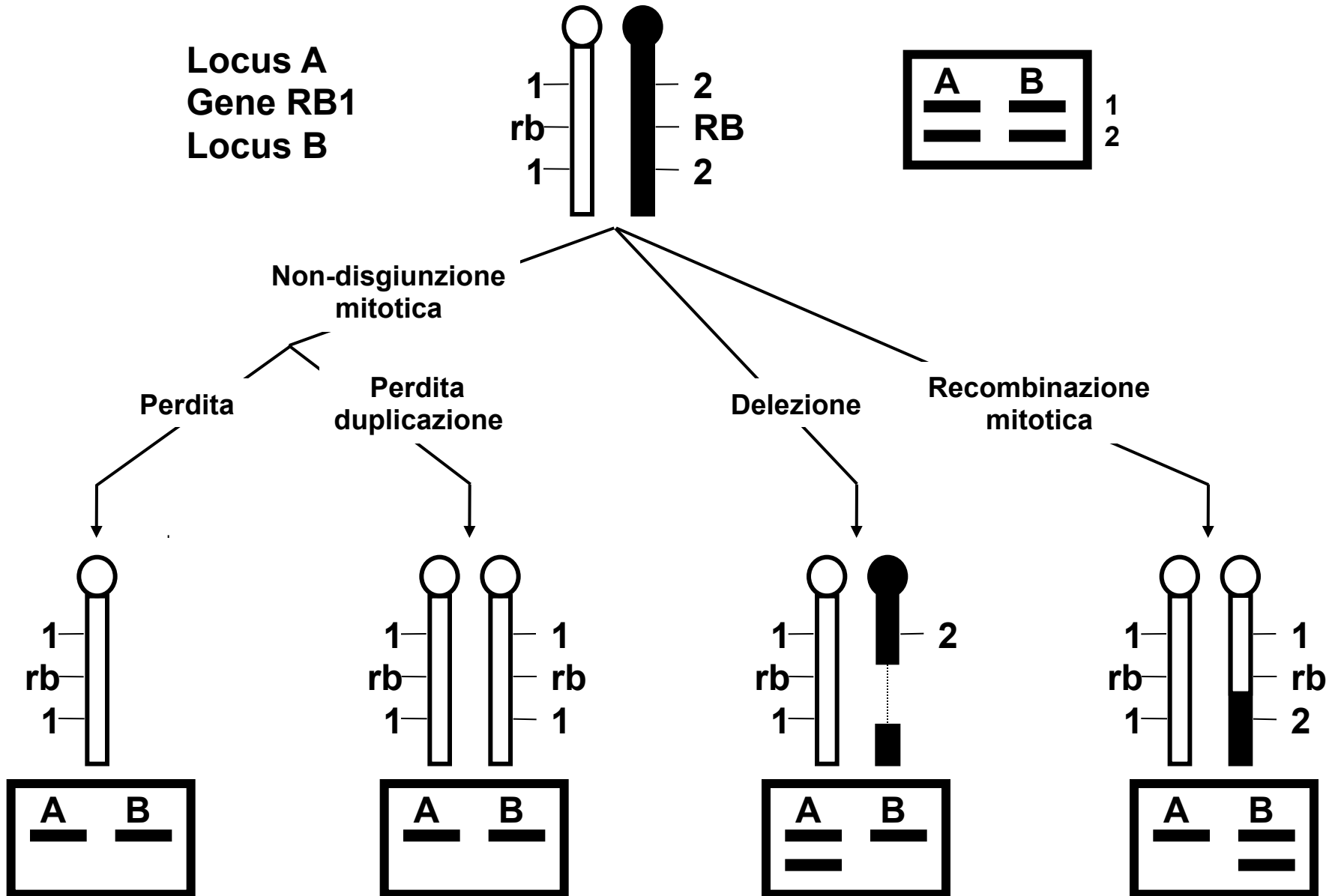


Locus B

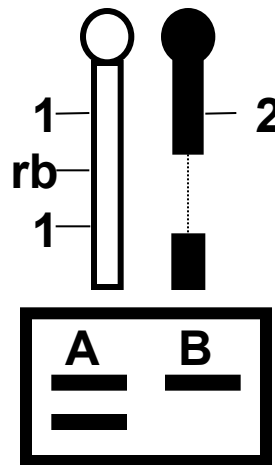
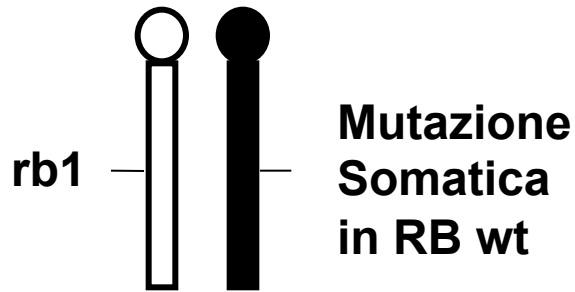


Tessuto
tumorale

Meccanismi implicati nella LOH



Meccanismi perdita di funzione implicati nel secondo "hit"



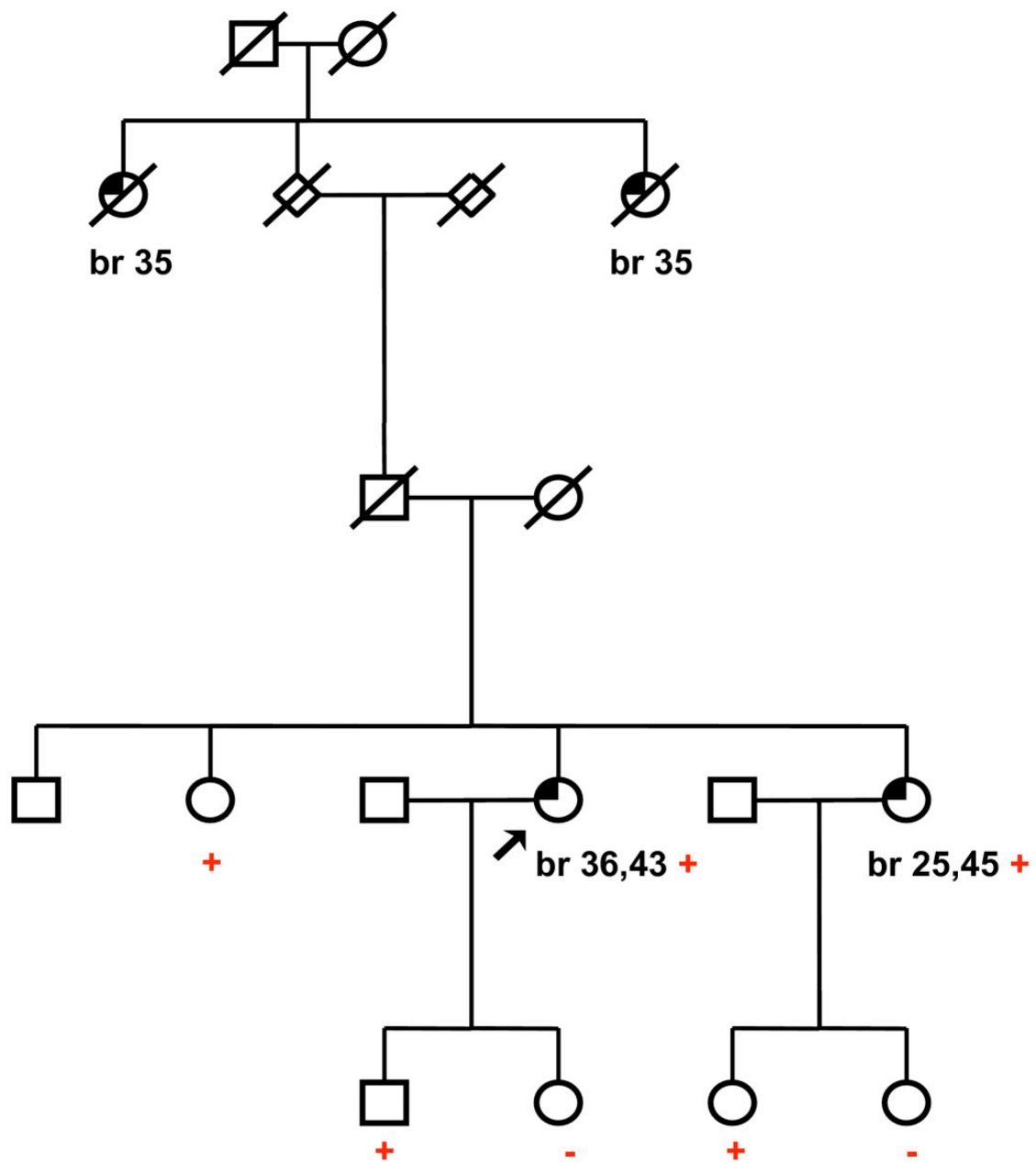
Delezione regione o altri meccanismi che comportano LOH e alterazione di RB wt

Familial breast cancer

Autosomal dominant

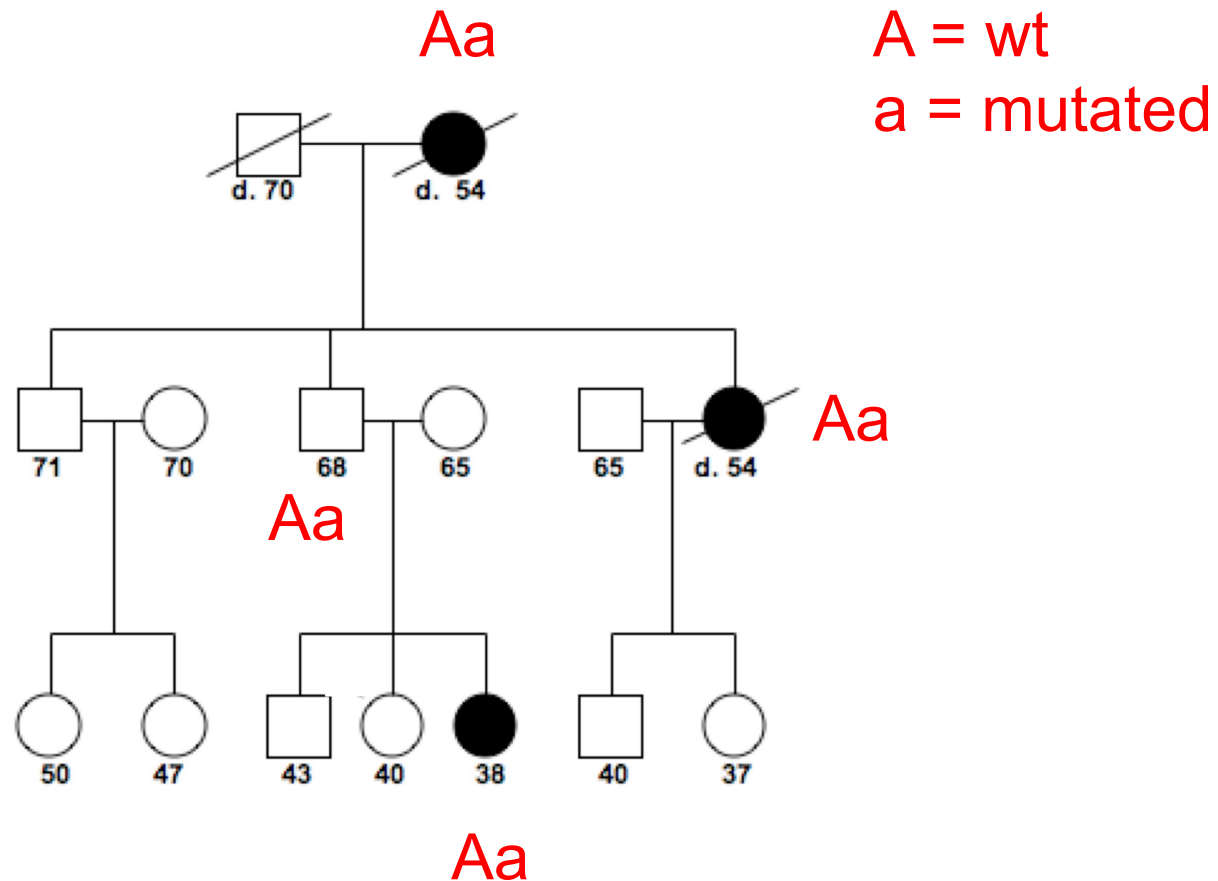
LOH with the loss of the wt allele

Genes < 5% of all breast cancers in the population	BRCA1	BRCA2
Chromosome	17q21	13q12.3
% AD breast cancers	50%	30%
Mutation prevalence	1:850	?
Penetrance (by age 70)		
Breast cancer	65-85%	45-80%(5% male)
Ovarian cancer	39-45%	
Prostate cancer		(7.5% male)



BRCA1: delezione (+) esoni 21-22 in una famiglia con tumore mammella

Indicate the genotype in the members of the family (breast cancer) only when it is certain



**Tumore della mammella:
rischio (nelle femmine) di contrarre il tumore**

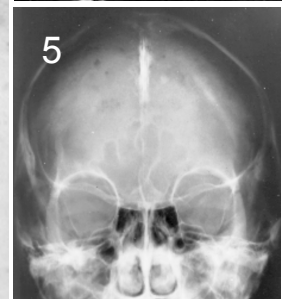
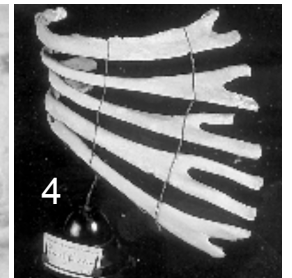
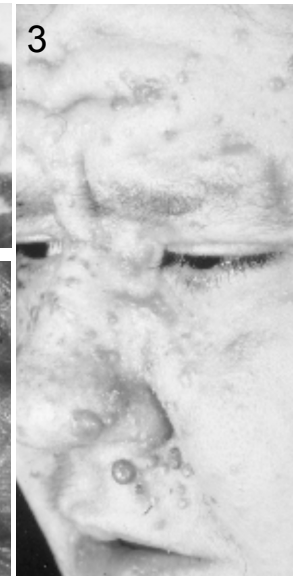
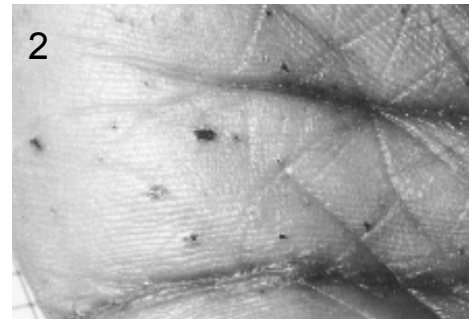
Popolazione generale	1/12
Sorella con diagnosi a 65-70 anni	1/8
Sorella con diagnosi a 40 anni	1/4
Due consanguinei di I grado ammalati prima dei 40 anni	1/3

Vedere lettura approfondimento in moodle

Sindrome dei carcinomi delle cellule basali (NBCCS) Sindrome di Gorlin

Caratteristiche cliniche

- 1) Cheratocisti multiple
- 2) Fossette palmari, plantari
- 3) Carcinomi delle cellule basali
- 4) Anomalie scheletriche
- 5) Calcificazione della falce



Prevalenza: 1: 57.000

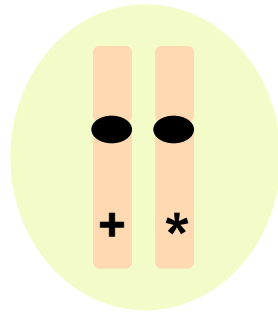
Genetica: autosomica dominante, penetranza completa, espressività variabile

Difetto molecolare: mutazioni nei geni PTCH1 e SUFU. 20-30% mutazioni de novo

Geni di Risposta al danno del DNA

- Riparano i danni al DNA
- Il cancro è causato da mutazioni inattivanti in entrambi gli alleli (considerati un sottogruppo di geni oncosoppressori)
- La perdita della loro funzione determina l'accumulo di mutazioni in altri geni cruciali

TUMORE EREDITARIO: 2 mutazioni germinali



Mutazioni in entrambi gli alleli
(in tutte le cellule)



Evoluzione clonale
(una o più cellule)

Integrità del genoma
Riparazione del DNA

Atassia telangiectasia (linfoma)
Sindrome di Bloom (tumori solidi)
Xeroderma pigmentoso (tumori della pelle)
Anemia di Fanconi (leucemia)

