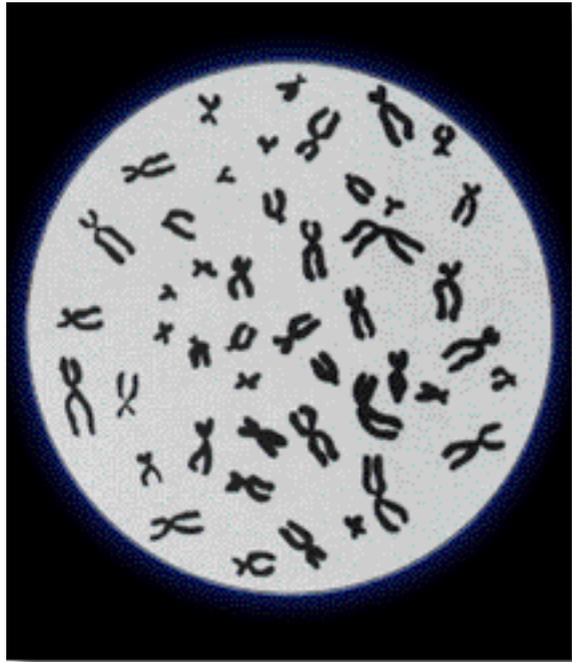


NET RESULT: EACH DNA MOLECULE HAS BEEN PACKAGED INTO A MITOTIC CHROMOSOME THAT IS 50,000x SHORTER THAN ITS EXTENDED LENGTH

ANALISI DEL CARIOTIPO



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

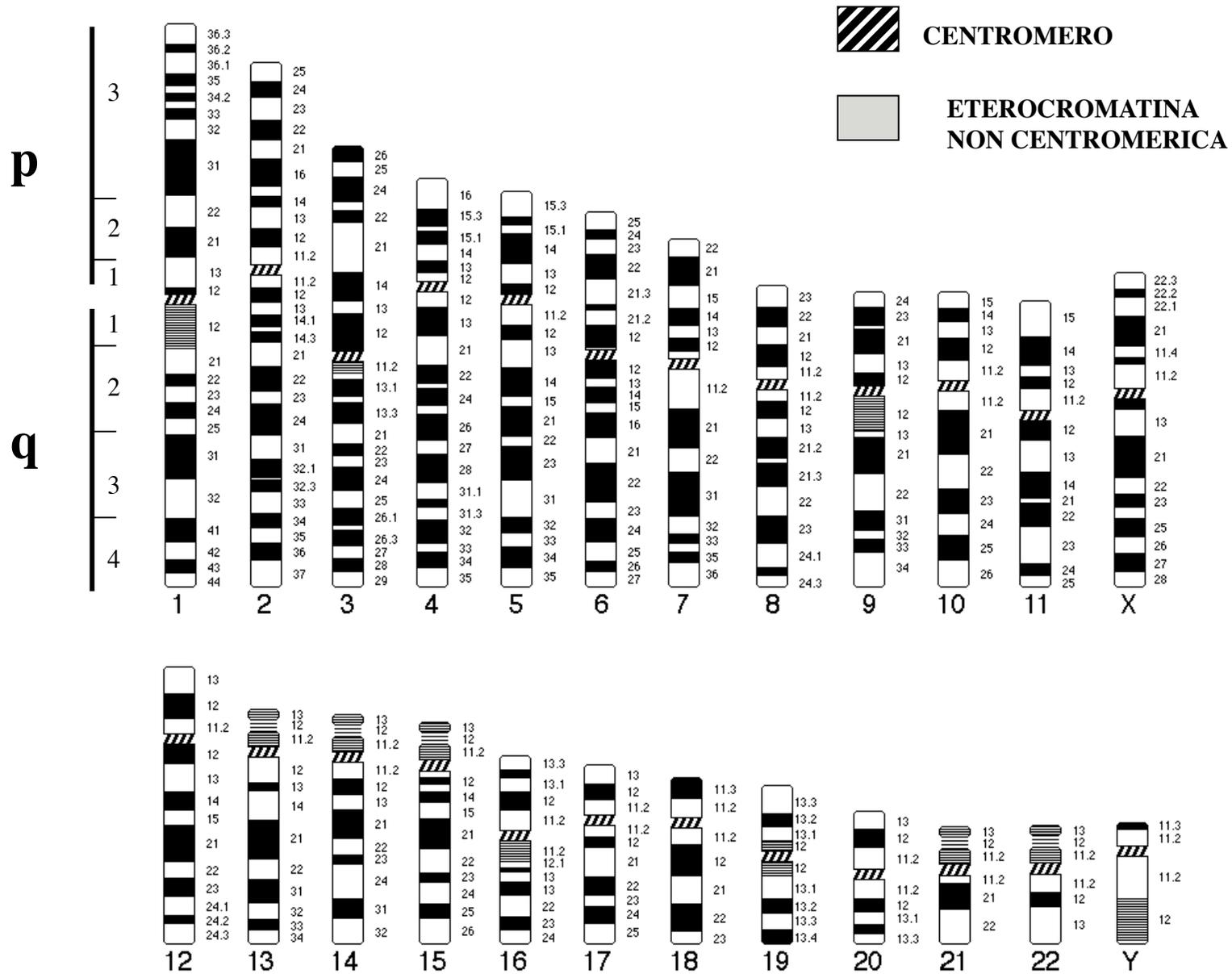
BANDE Q: colorazione con un colorante fluorescente che si lega preferenzialmente a DNA ricco in AT come la Quinacrina. Sono uguali alle bande G.

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

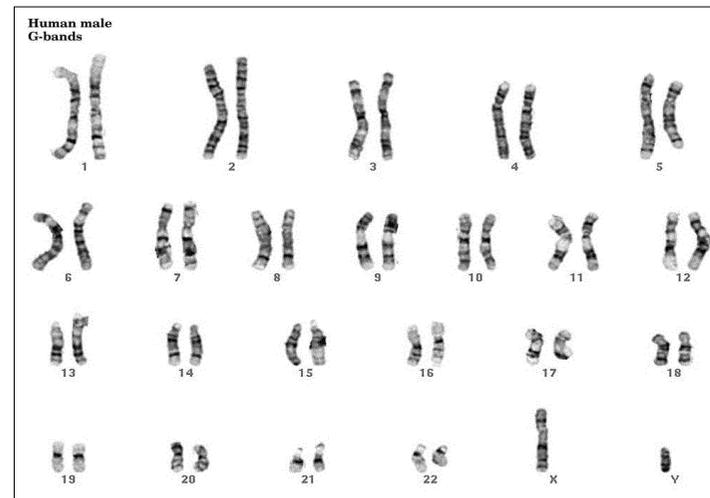
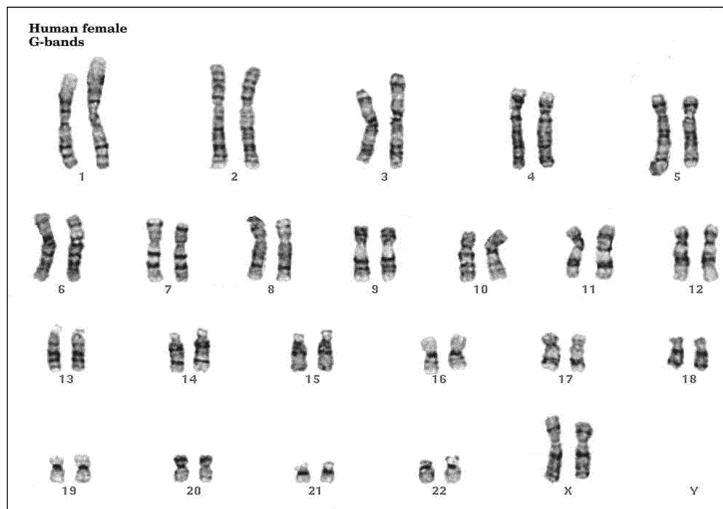
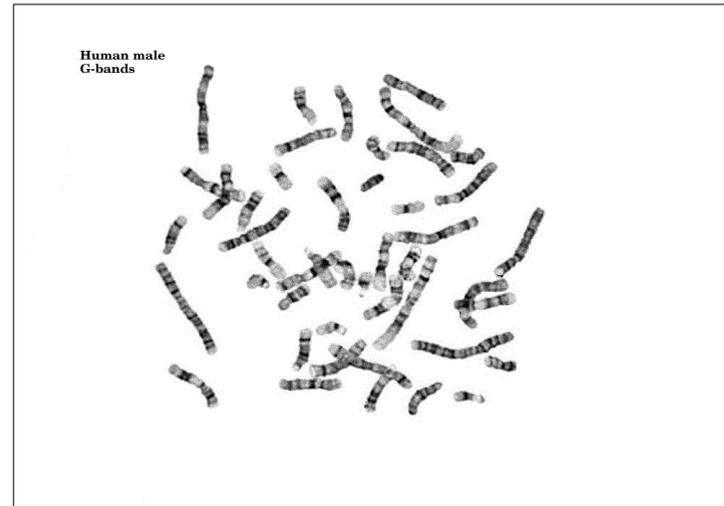
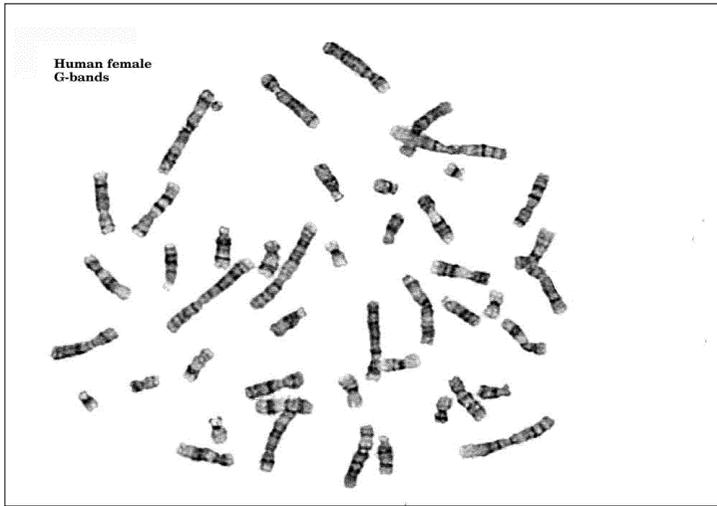
BANDE C: Constitutive heterochromatin (regioni attorno al centromero e Yq). I cromosomi sono denaturati in una soluzione satura di idrossido di bario della colorazione Giemsa

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



BANDE G (IDEOGRAMMA) DEI CROMOSOMI UMANI



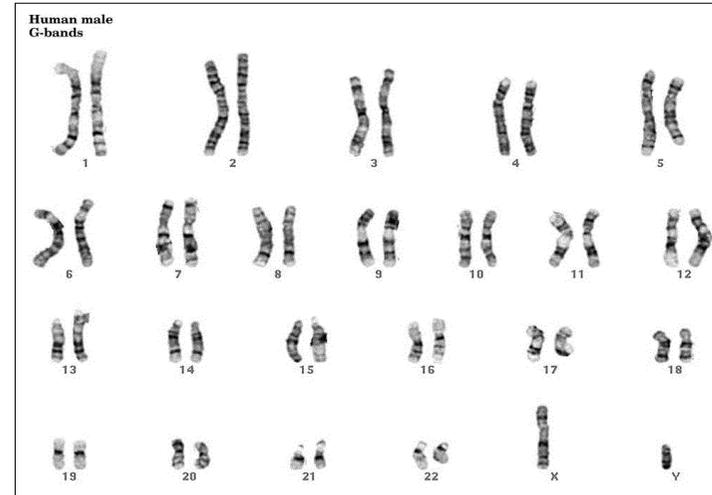
46,XX

CARIOTIPO

46,XY

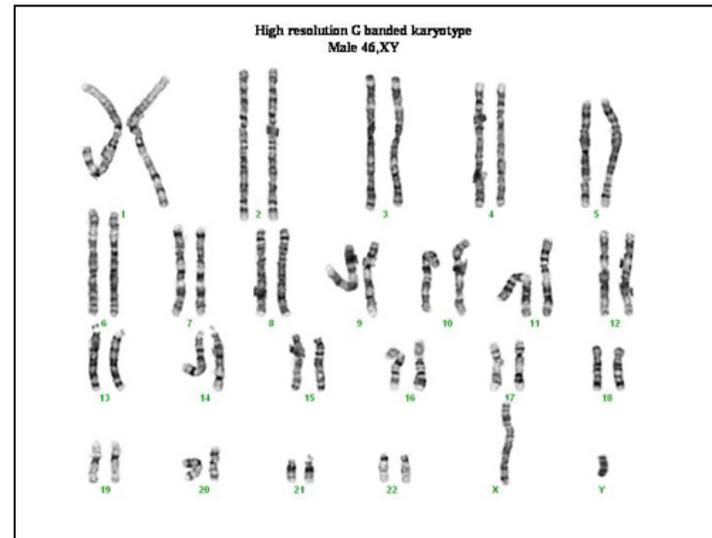
Numero bande → Grado di condensazione

Metafase (450 bande)



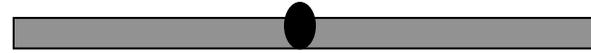
BANDE AD ALTA RISOLUZIONE

Prometaphase (550-850 bande)



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)

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

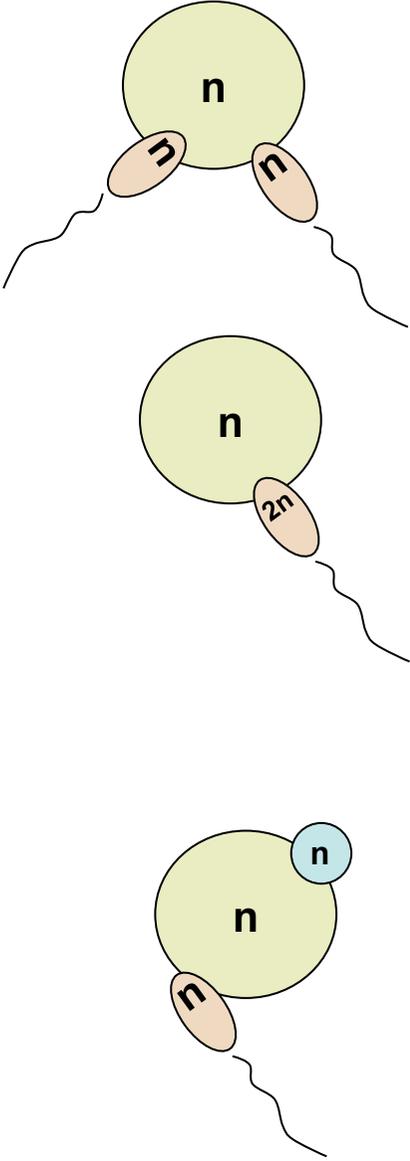
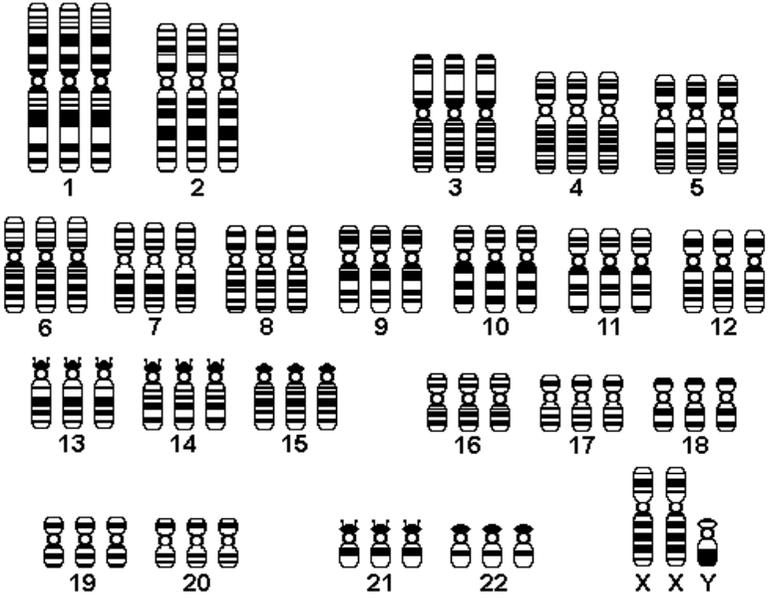
1% degli zigoti

Aborto spontaneo precoce

Triploidia alla nascita è eccezionale, sempre letale

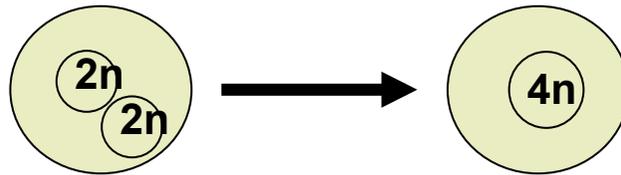
Condizione sporadica che non modifica il rischio di ricorrenza nelle successive gravidanze

TRIPLOIDIA



TETRAPLOIDIA

Replicazione



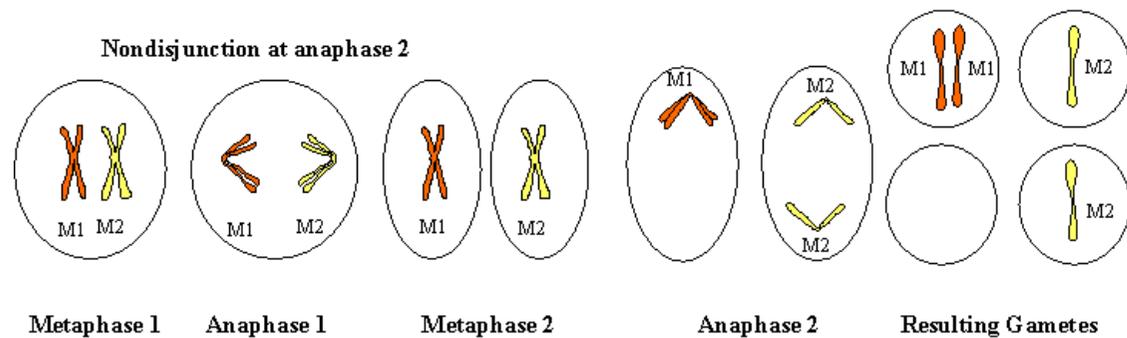
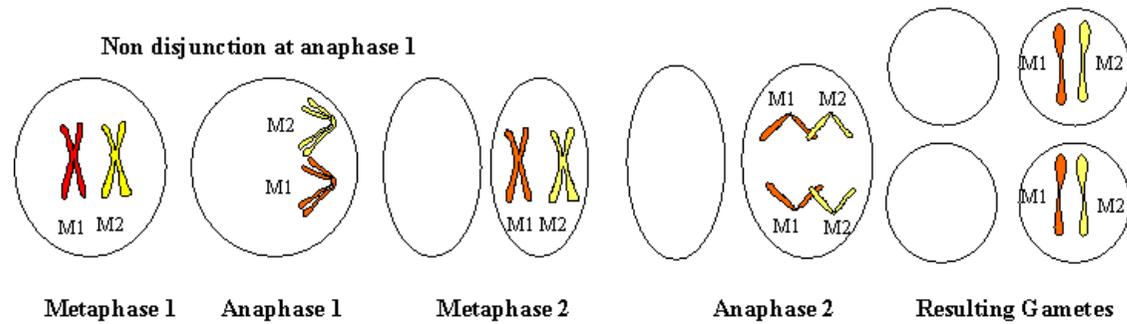
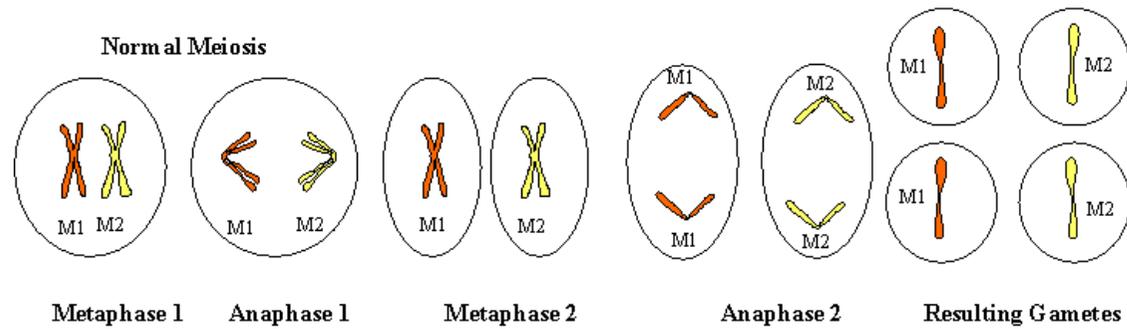
**Senza divisione cellulare
(ENDOMITOSI)**

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.

Produzione di gameti sbilanciati in seguito a non dosgiunzione durante la meiosi

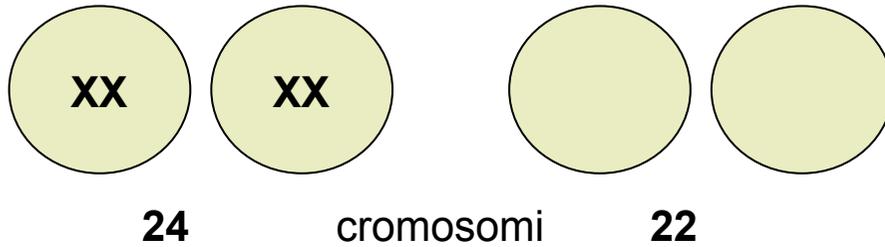


NON DISGIUNZIONE CROMOSOMI SESSUALI

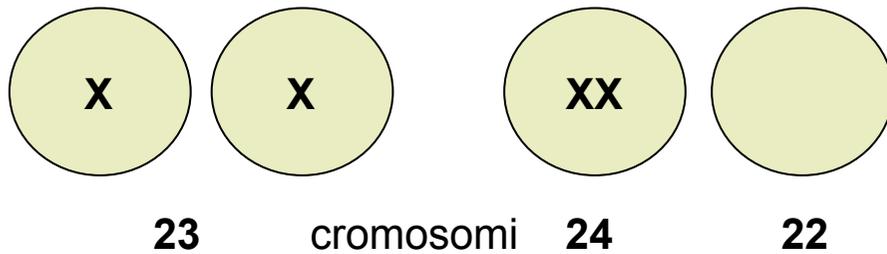
Oogenesi

Non-disgiunzione

I divisione meiotica



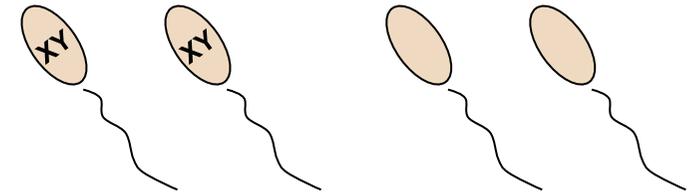
II divisione meiotica



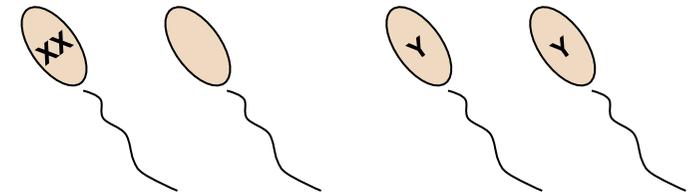
Spermatogenesi

Non-disgiunzione

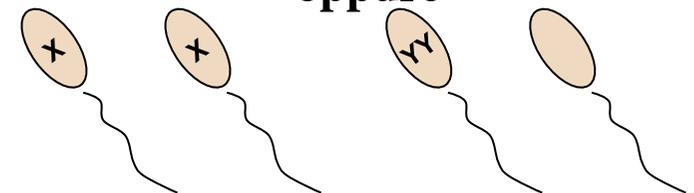
I divisione meiotica



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

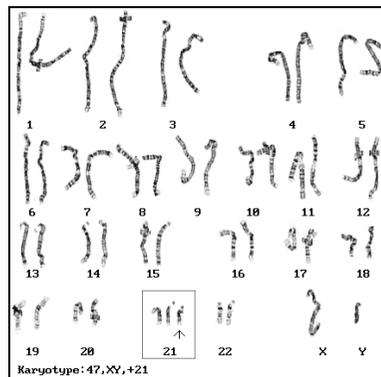
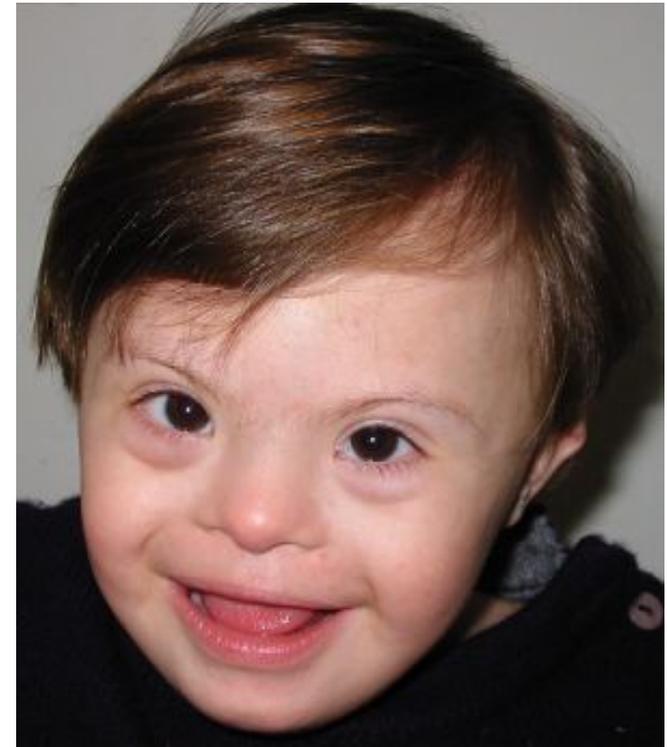
Origine parentale delle aneuploidie

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)**



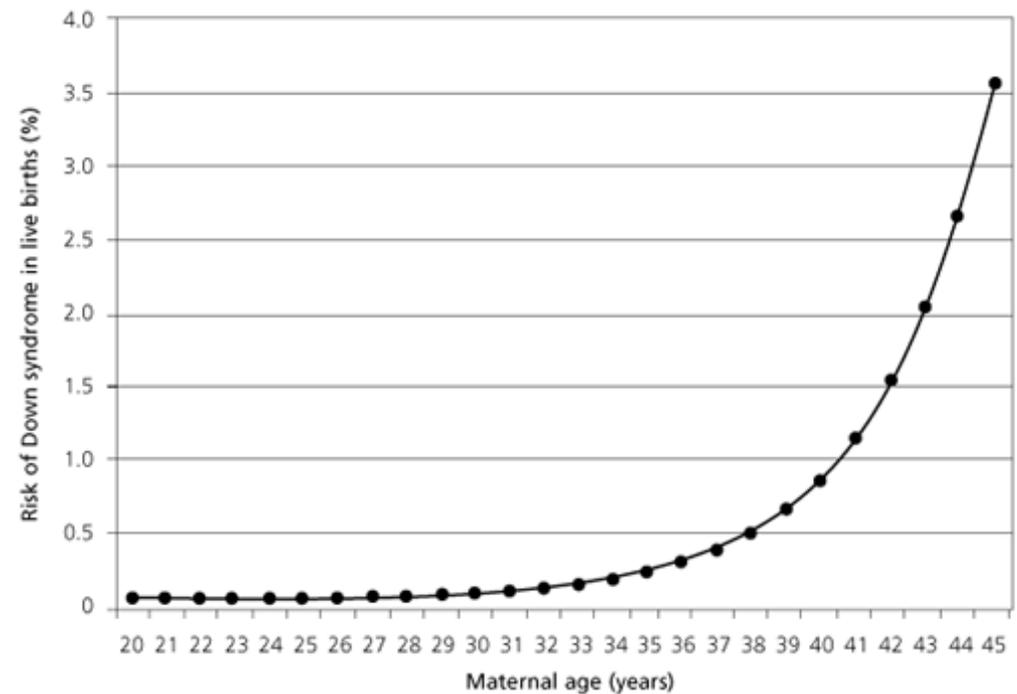
SINDROME DI DOWN: cause genetiche

Non-disgiunzione 92-95%				Mosaico 3-5%	
Meiosi materna 95%		Meiosi paterna 5%			
I 75%	II 25%	I 50%	II 50%		

5% di altre cause
(anomalie cromosomiche strutturali)

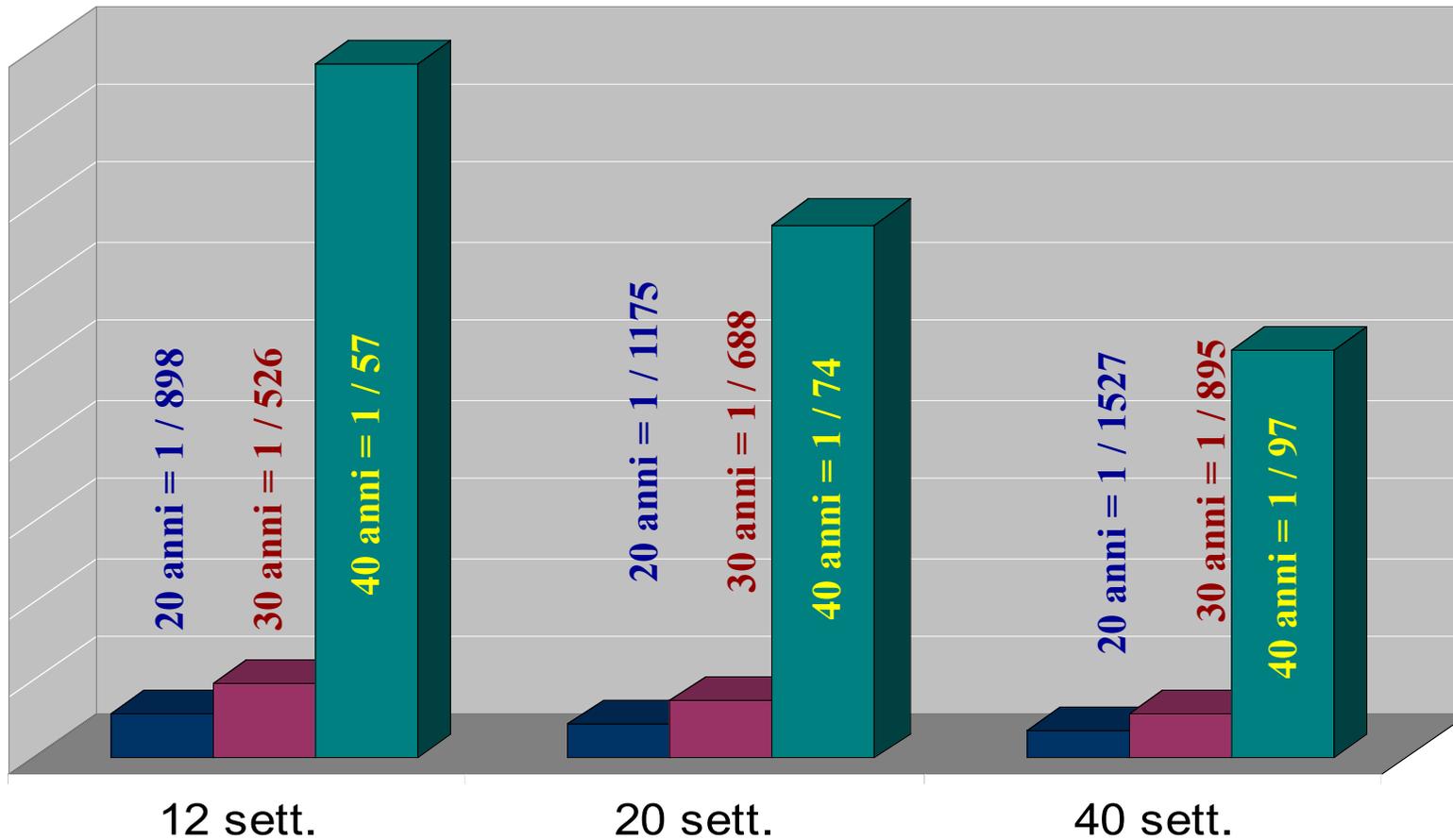
Probabilità di concepire un figlio Down in base all'età materna

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

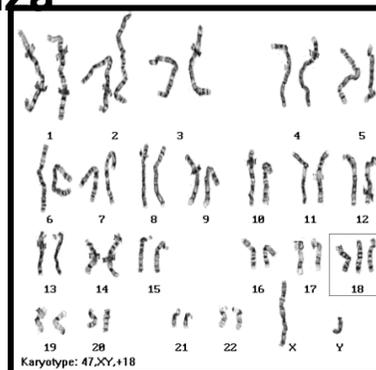
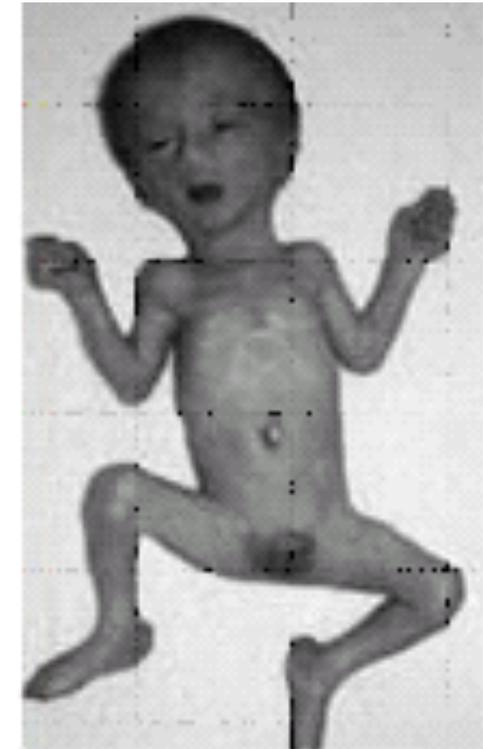


Modificato da Snijders, 1994

Trisomia 18 o sindrome di Edwards

Prevalenza alla nascita: 1:7.700
Femmine:maschi = 5:1

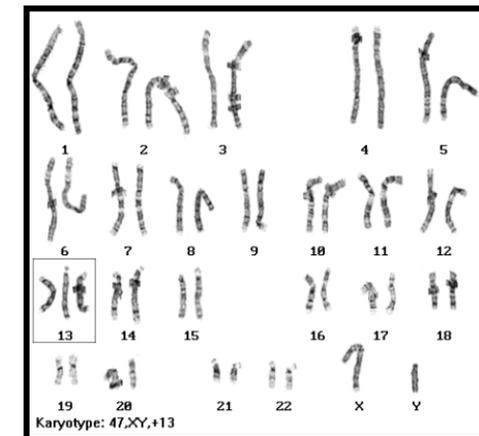
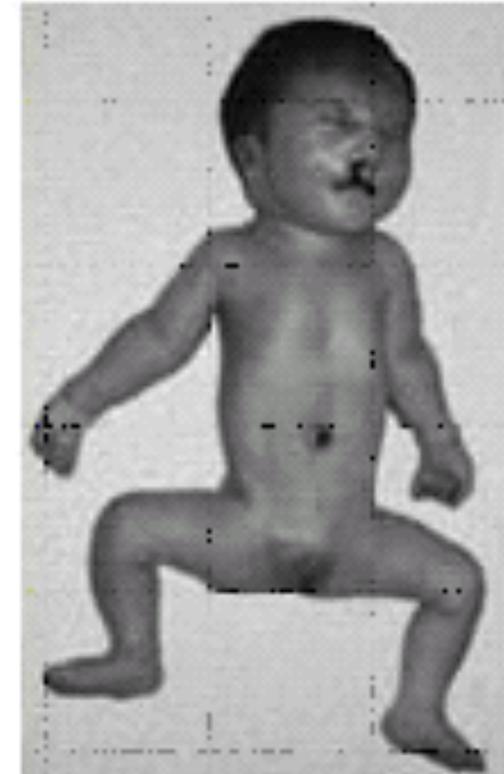
- **Grave ritardo di accrescimento**
- **Facies caratteristica**
(fronte e rime palpebrali strette, naso, bocca, e mento piccoli)
- **Anomalie del cranio, sterno corto, bacino piccolo**
- **Mano chiusa a pugno con flessione delle dita**
- **Piede a “picozza”**
- **Malformazioni sistema nervoso centrale**
- **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

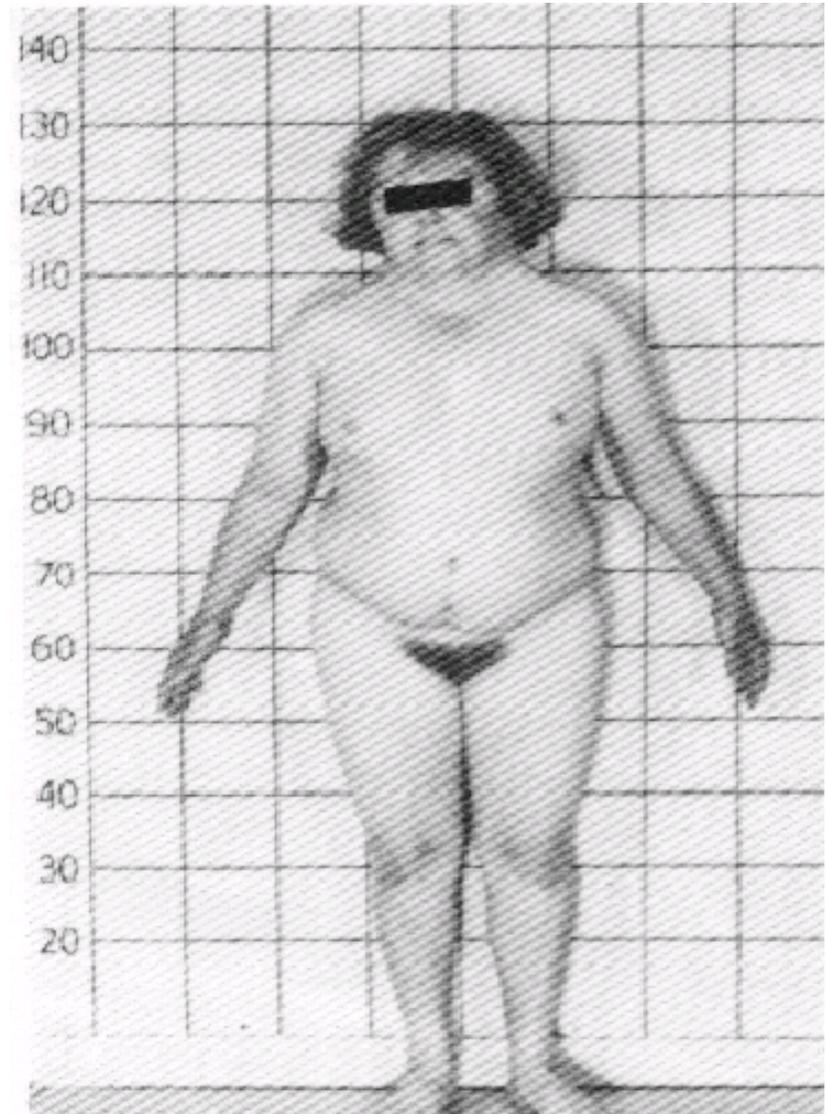
- Schisi facciali e/o del cavo orale
- Microftalmia (occhi piccoli e malformati)
- Polidattilia
- Malformazioni sistema nervoso centrale
- Cardiopatie
- Anomalie intestinali e genitali



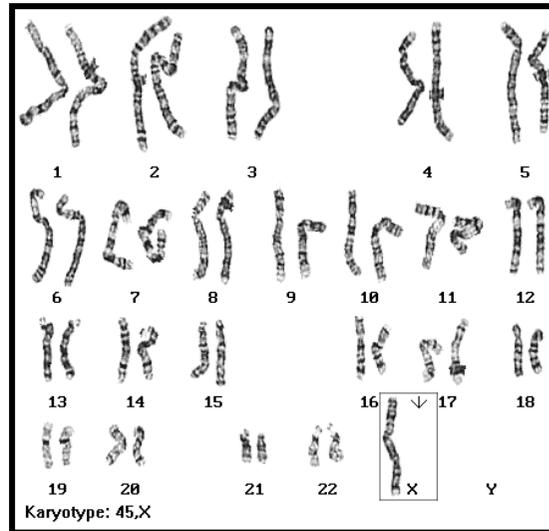
SINDROME DI TURNER

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**

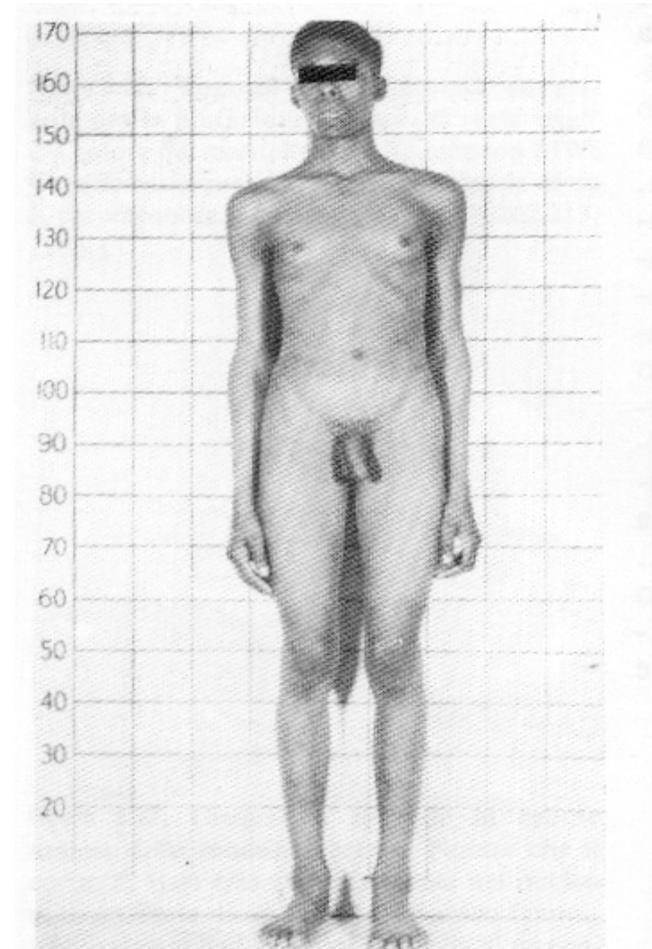
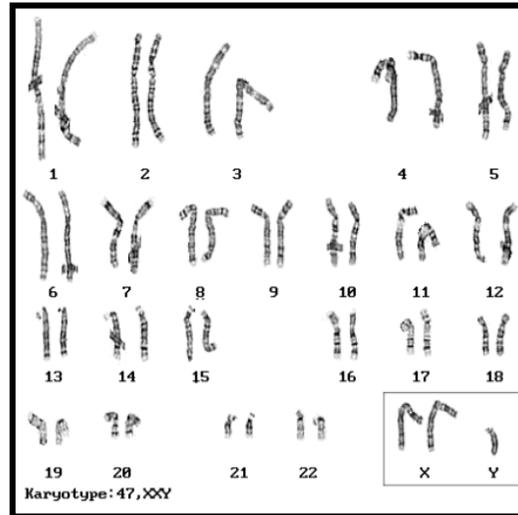


Figura 8.30. La sindrome di Klinefelter. Nota-

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

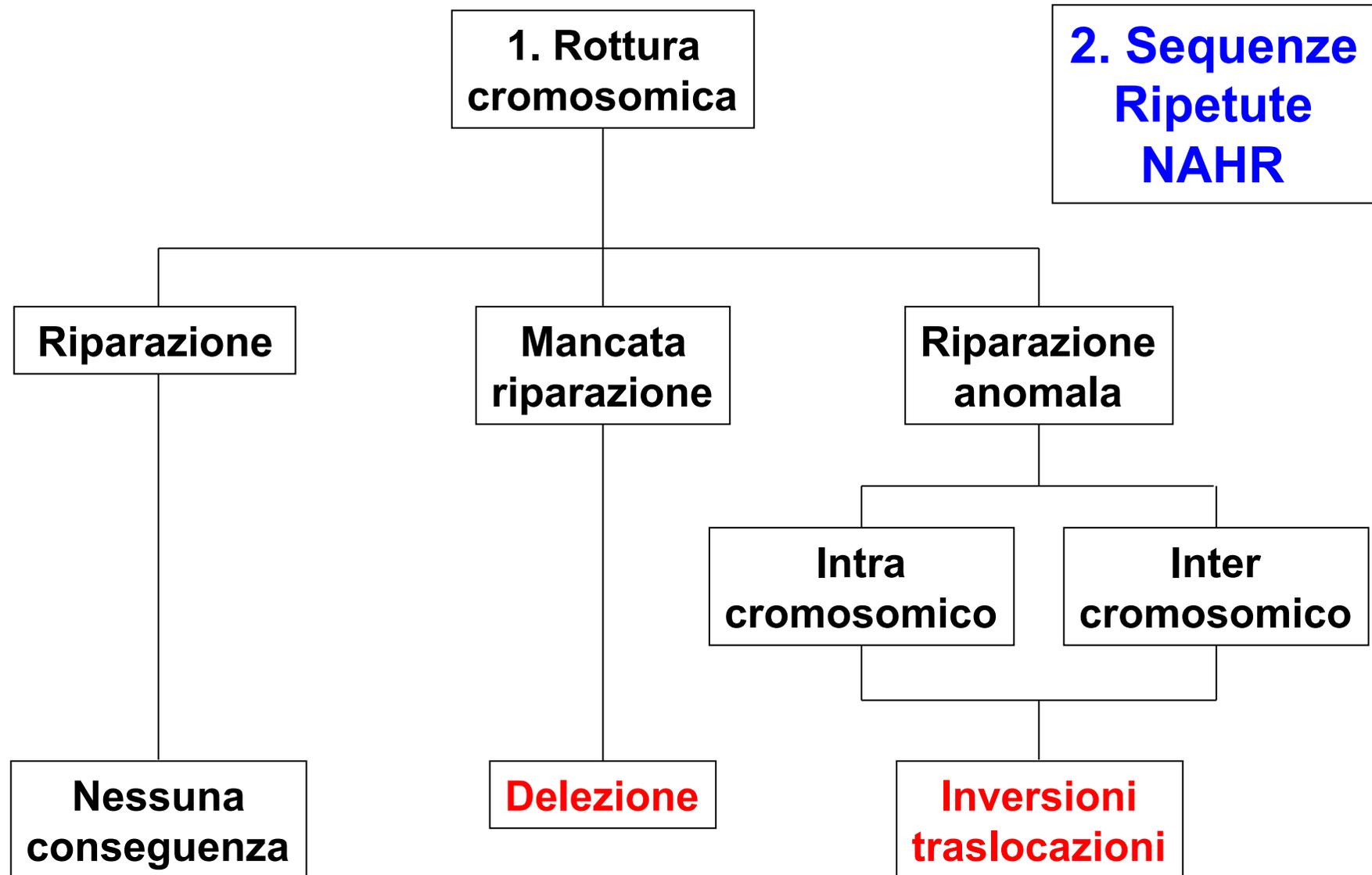
Aneuploidia

- Trisomia
- Monosomia

Di struttura

- Delezione
 - Duplicazione
 - Traslocazione
 - Inversione
- } **CNV**

Cause anomalie di struttura



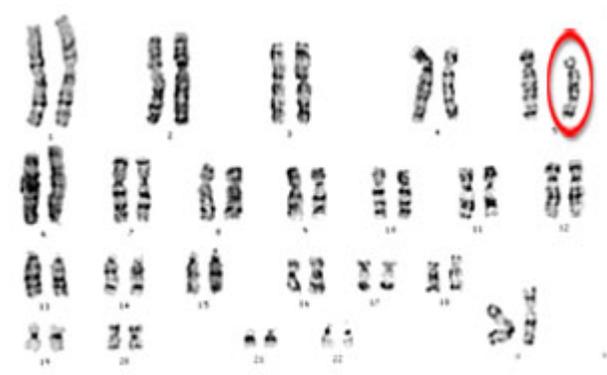
MALATTIA DI CRI DU CHAT – del(5p)

Prevalenza alla nascita: 1:25.000

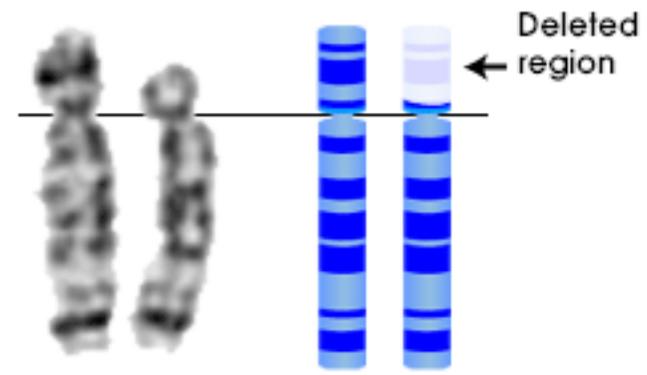
- **Tipico pianto dei pazienti alla nascita**
(miagolio di un gatto)
- **Microcefalia**
(testa piccola e tonda)
- **Ipertelorismo oculare**
(aumento della distanza tra gli occhi)
- **Micrognazia**
(mento piccolo)
- **Padiaglioni auricolari a bassa attaccatura**
- **Grave ritardo mentale**



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



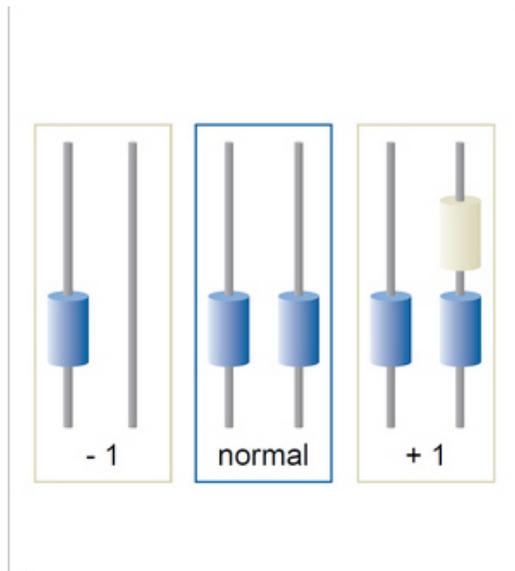
Tokyo Medical University



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)



CNV: copy number variations

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

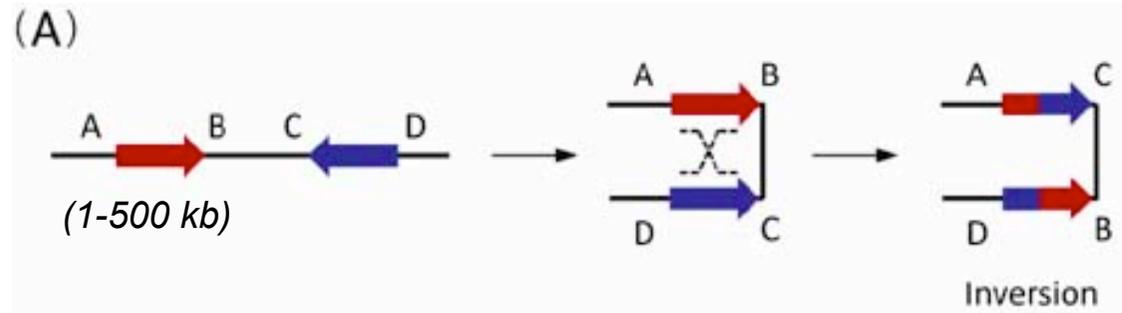
CNV: più (duplicazioni) o meno (delezioni) copie di quel segmento (da un migliaio a qualche milione di paia di basi). La perdita o l'acquisizione di un numero variabile di copie è stato scoperto confrontando i genomi degli individui tra loro. CNV possono essere ereditate o eventi de novo.

CNV sono loci fiancheggiati da blocchi di sequenze ripetute (1-500 kb) chiamate low copy repeats (LCR o duplicazioni segmentali) che favoriscono il crossing over diseguale (non allelic homologous recombination – NAHR)

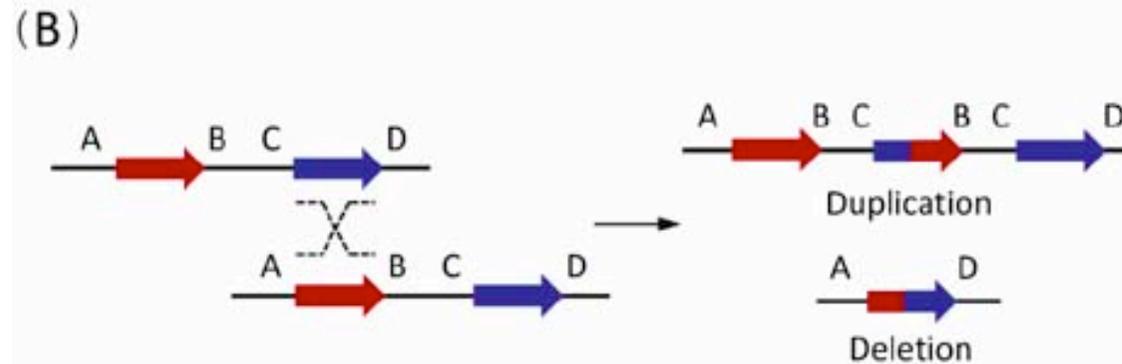
CNV possono includere regioni codificanti e geni, determinando variazioni nel dosaggio dei geni coinvolti. In alcuni casi le CNV sono associate a malattie

The non-allelic homologous recombination (NAHR) events between paired low-copy repeats (LCR)/segmental duplications (SD)

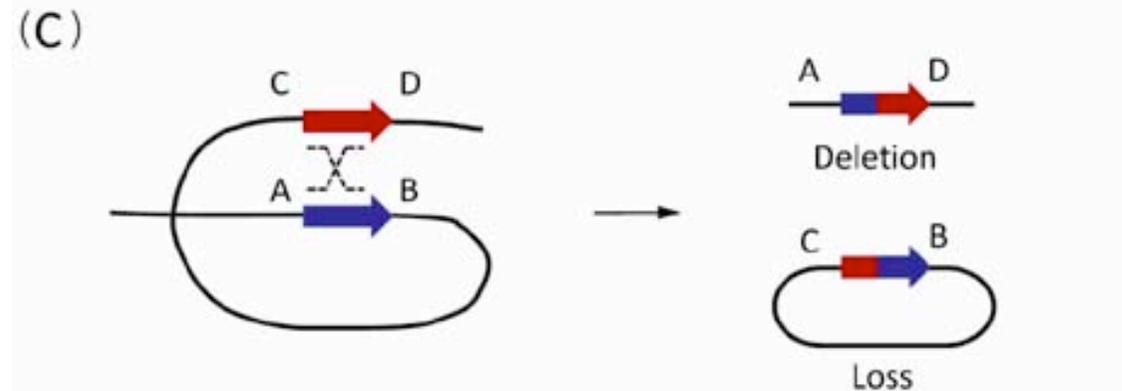
NAHR between reversely oriented LCRs/SDs
(1-500 kb)



Inter-chromatid
(or –chromosomal) NAHR



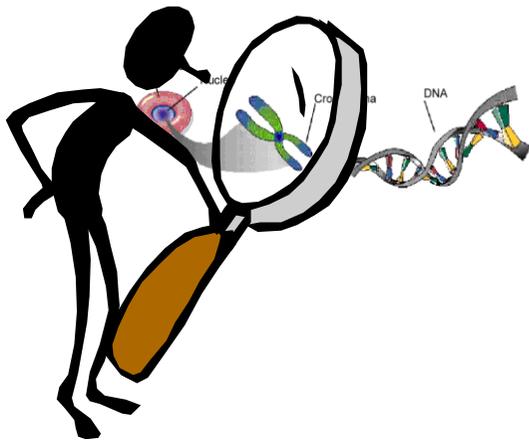
Intra-chromatid NAHR



Metodi per identificare anomalie cromosomiche

Analisi cariotipo (citogenetica classica)

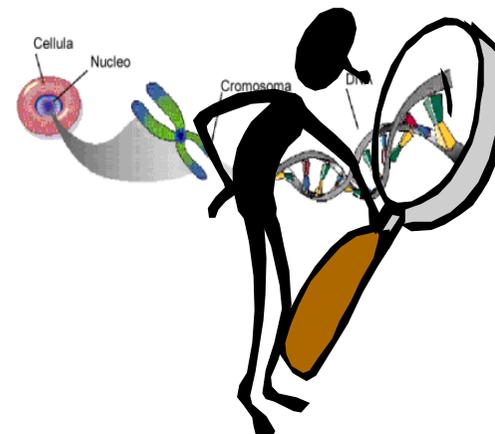
Anomalie cromosomiche
> 5 Mb.

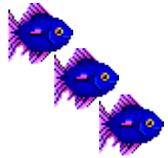


Citogenetica molecolare

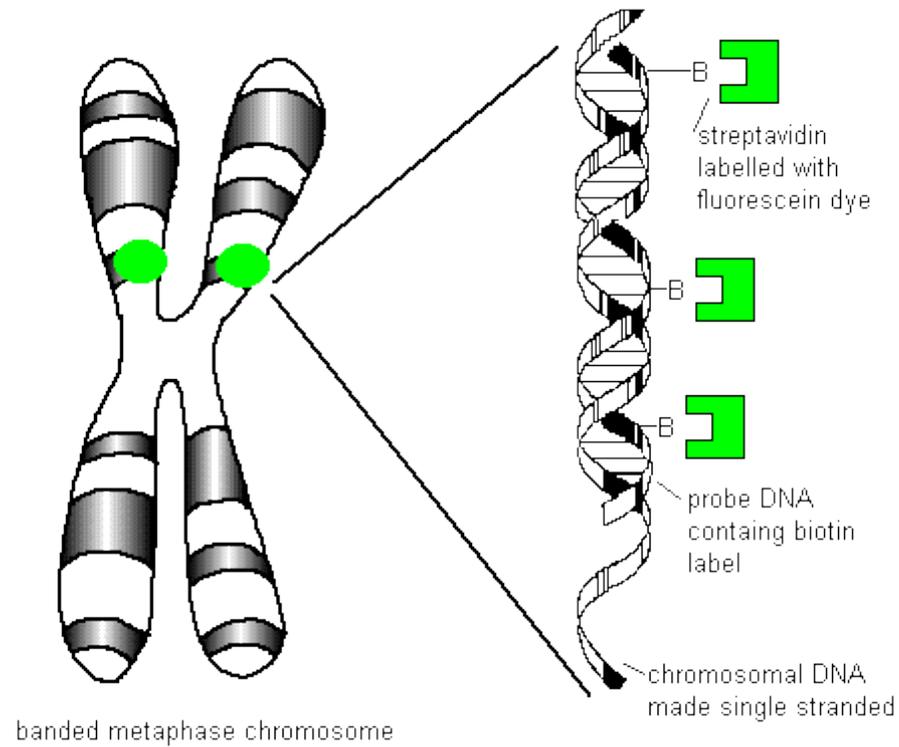
Analisi della struttura
cromosomica con tecniche di
biologia molecolare

Anomalie cromosomiche < 5Mb





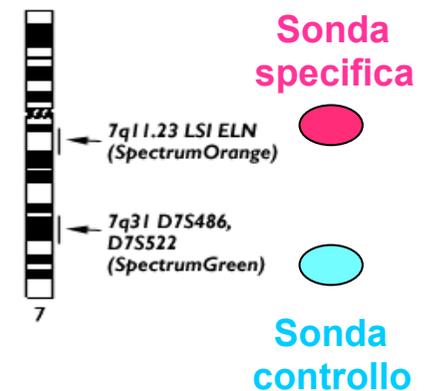
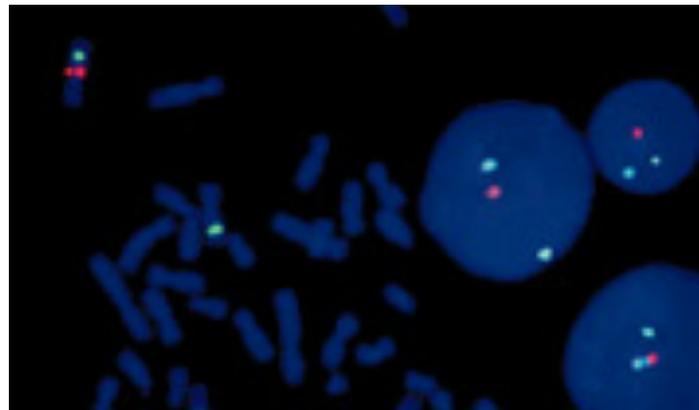
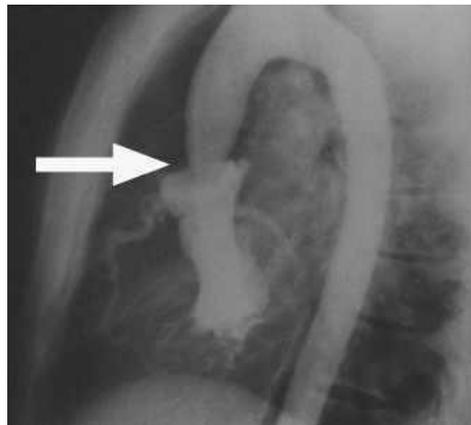
FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)



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**



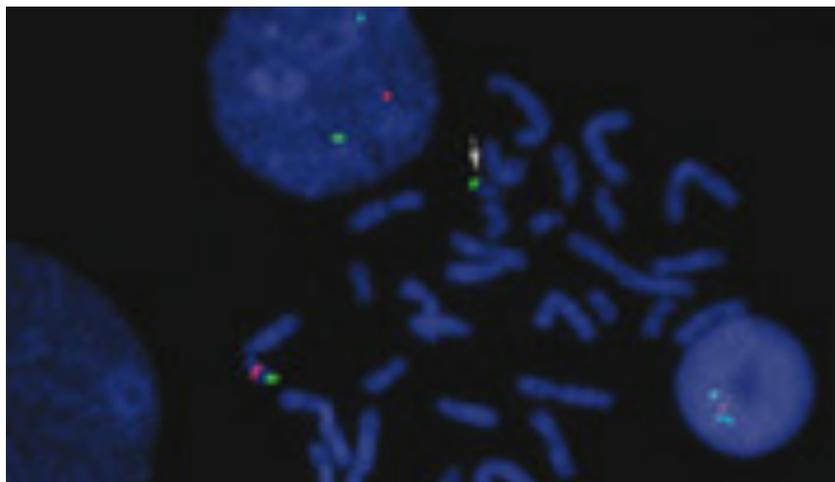
SINDROME DI DiGeorge/velo-cardio-facciale – del(22q11.2)

CATCH22

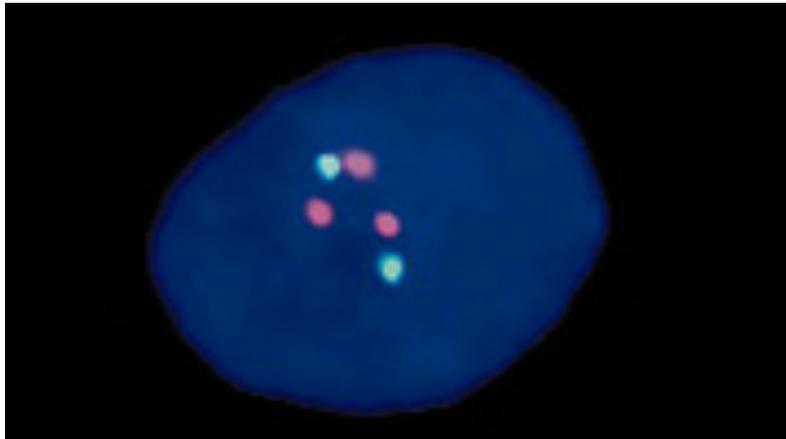
(Cardiac defects, Abnormal facies, Thymic hypo/aplasia, Cleft palate, Hypocalcemia)

Frequenza alla nascita: 1:2.000 - 4.000

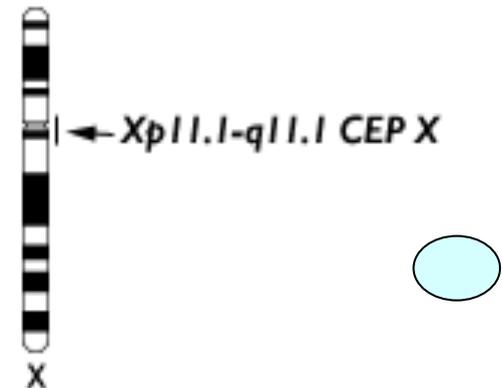
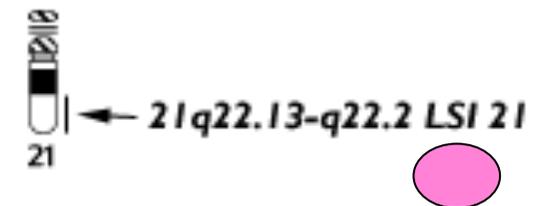
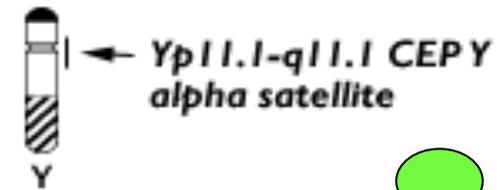
- **Anomalie cranio facciali** (micrognazia, ipertelorismo, filtro corto, palatoschisi, ugola bifida)
- **Ipo-aplasia del timo e delle paratiroidi**
- **Cardiopatía**
- **Ritardo mentale**

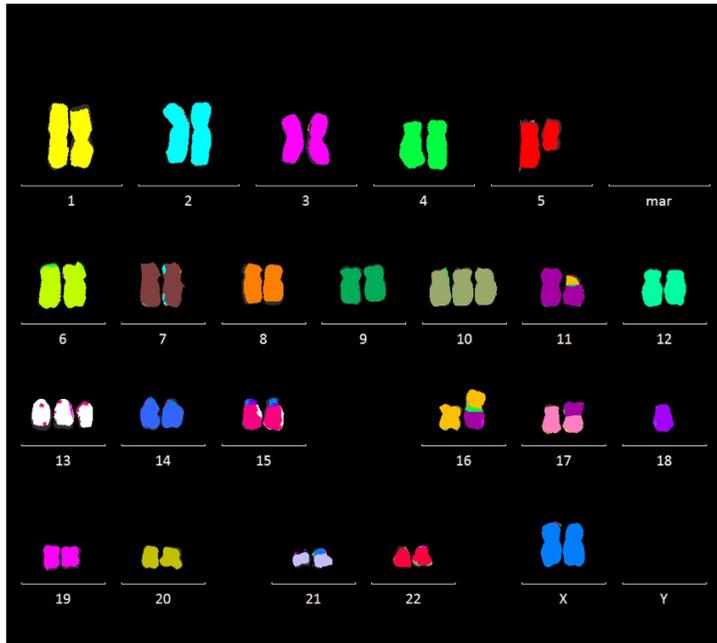


DIAGNOSI DI ANEUPLOIDIE



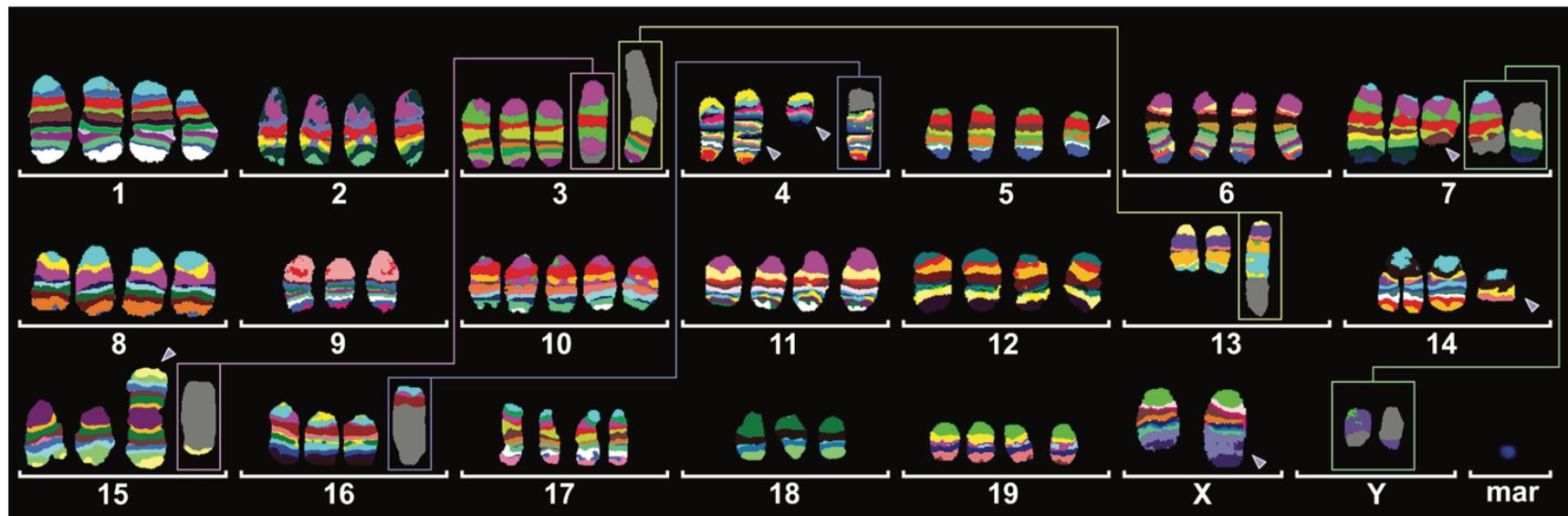
47,XX +21





Multiplex Fluorescence In Situ Hybridization (M-FISH)

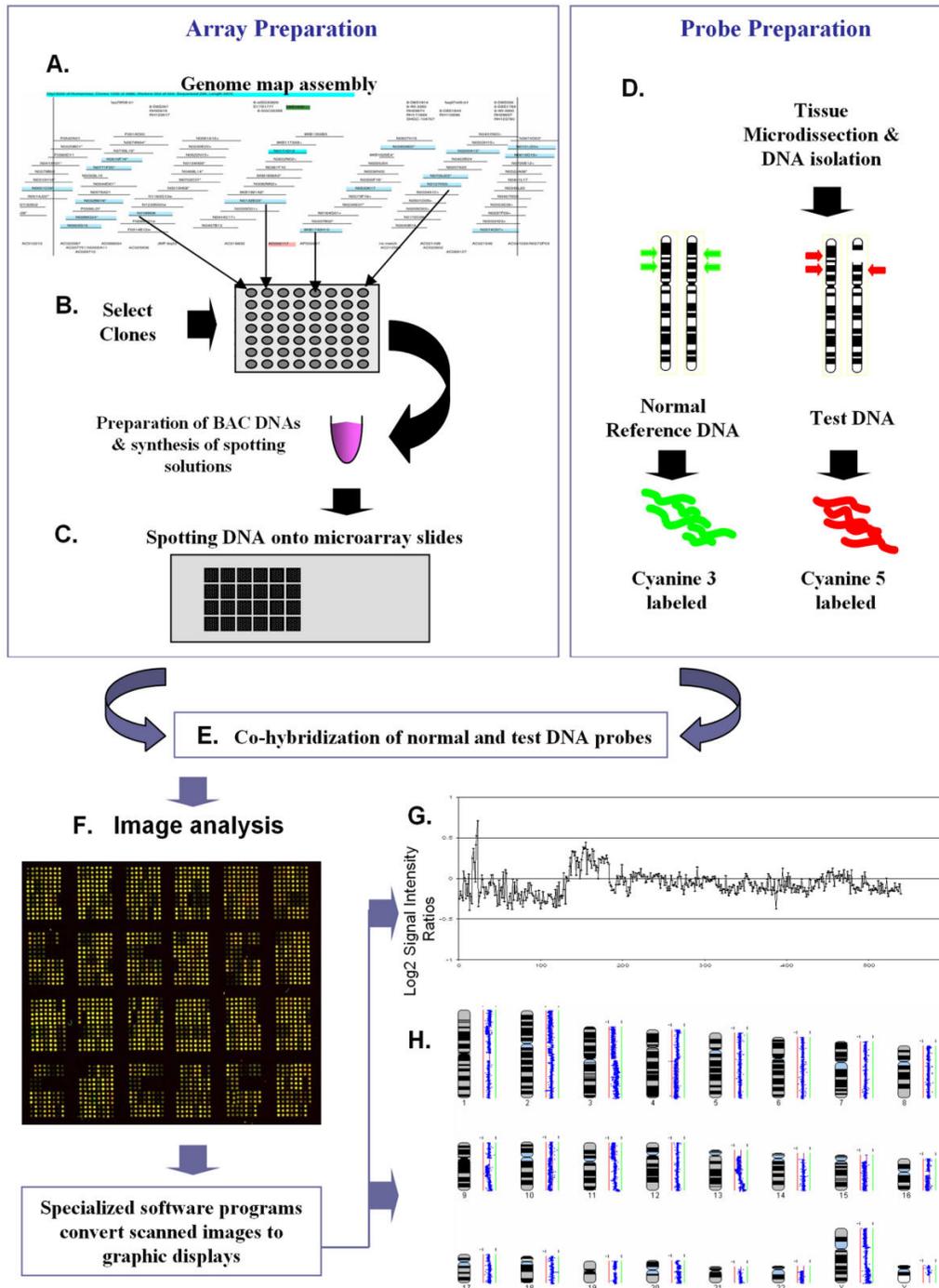
Karyotype of a myelodysplastic syndrome patient (<https://www.mh-hannover.de23973.html>).



Multi-Color Banding (MCB) technique of the NIH 3T3 cell line. Banding for all 21 different murine chromosomes (Leibiger, 2013).

Metodi per l'analisi delle CNVs

- **CGH array** (Comparative Genome Hybridization): si basa sull'ibridazione competitiva ad un array con migliaia di **frammenti genomici** noti, di due campioni di DNA, caso e controllo, marcati diversamente.
- **ROMA**: (Representational Oligonucleotide Microarray Analysis) utilizza array di **oligonucleotidi**, il DNA che deve essere ibridato all'array viene precedentemente trattato con enzimi di restrizione e ligato ad alcune sequenze adattatore per l'amplificazione. Si ottiene un pool di segmenti rappresentativi dell'intero genoma ma con una complessità inferiore.
- **SNP array**: comparazione dell'intensità di segnale del campione con il valore medio di intensità di una campione di controllo; una deviazione dell'intensità rispetto al controllo indica una variazione del numero di copie.

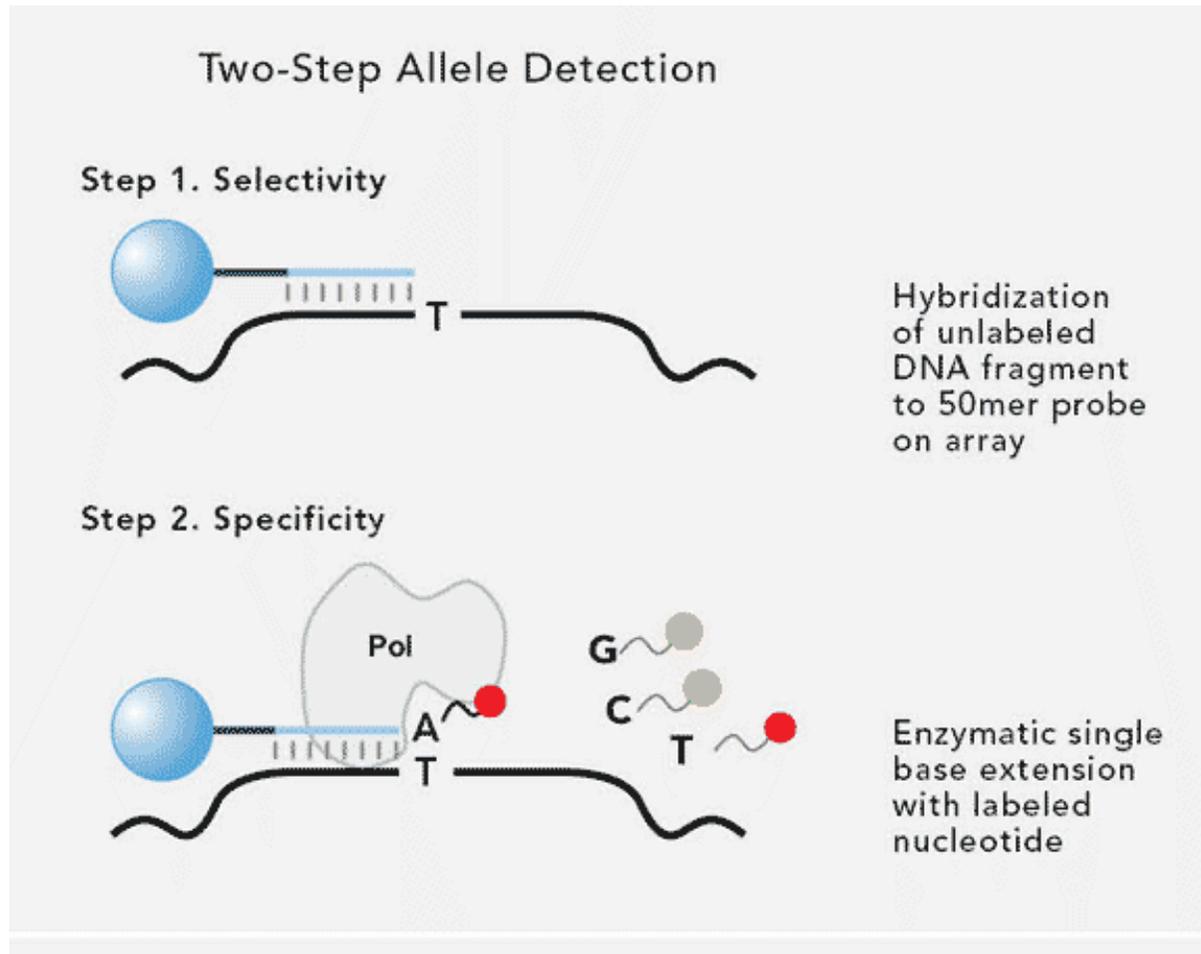


CGH (Comparative Genome Hybridization)

Identification of unbalanced anomalies:

- deletion
- duplication
- amplification

SNP array: genotyping of SNP (single nucleotide polymorphism) in the genome of individuals



Locus
(nucleotide)

ACATGCT
ACAAGCT

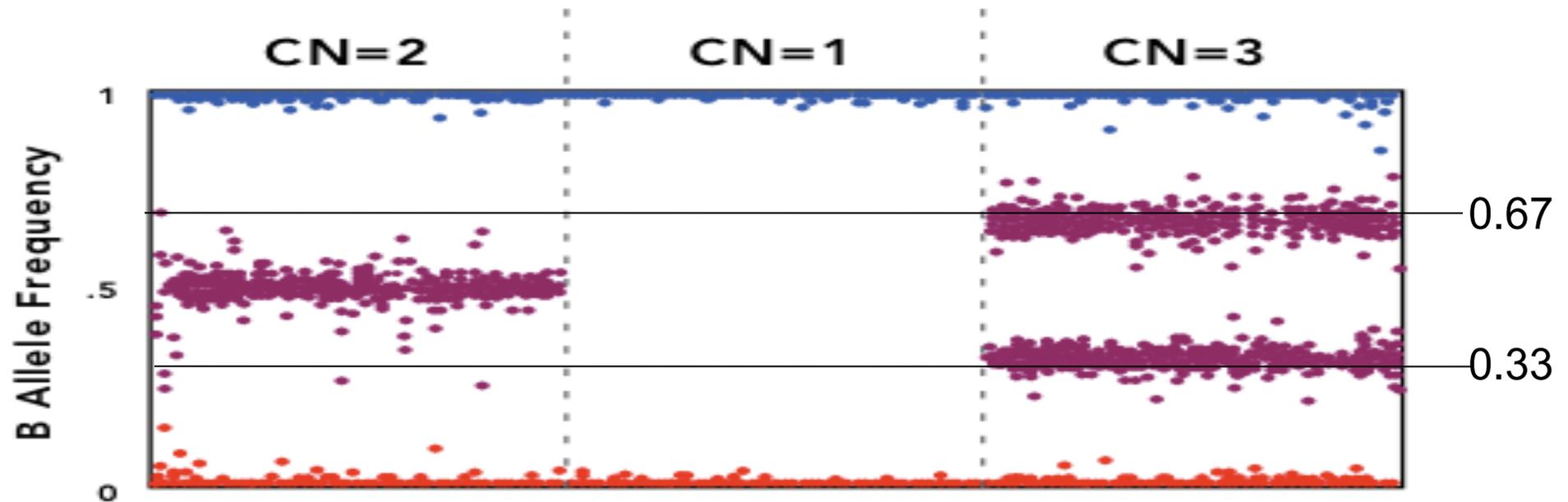
TT
AT
AA

Polymorphism
“neutral”
MAF (minor allele
frequency) >1%

SNP array: genotyping of SNP

B allele frequency (BAF)

Locus:
2 alleles
Allele A
Allele B



CN (copy number) = 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: $0/3 = 0$

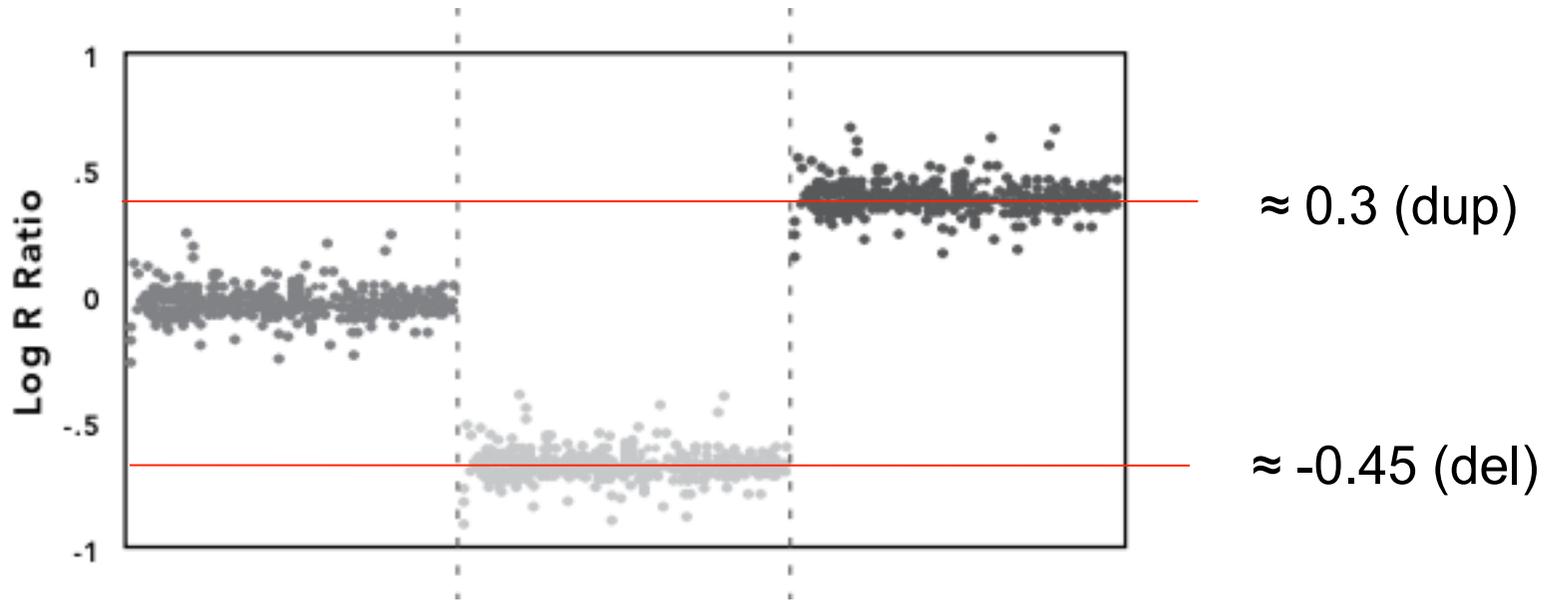
AAB: $1/3 = 0.33$

ABB: $2/3 = 0.67$

BBB: $3/3 = 1$

Log R ratio (LRR)

Logaritmo del rapporto tra l'intensità osservata rispetto a quella attesa
(deviazione dal valore 0 è indice di CNV:
Aumento: duplicazione o amplificazione
Riduzione: delezione.



CN=1

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

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

CN=2

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

CN=3

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

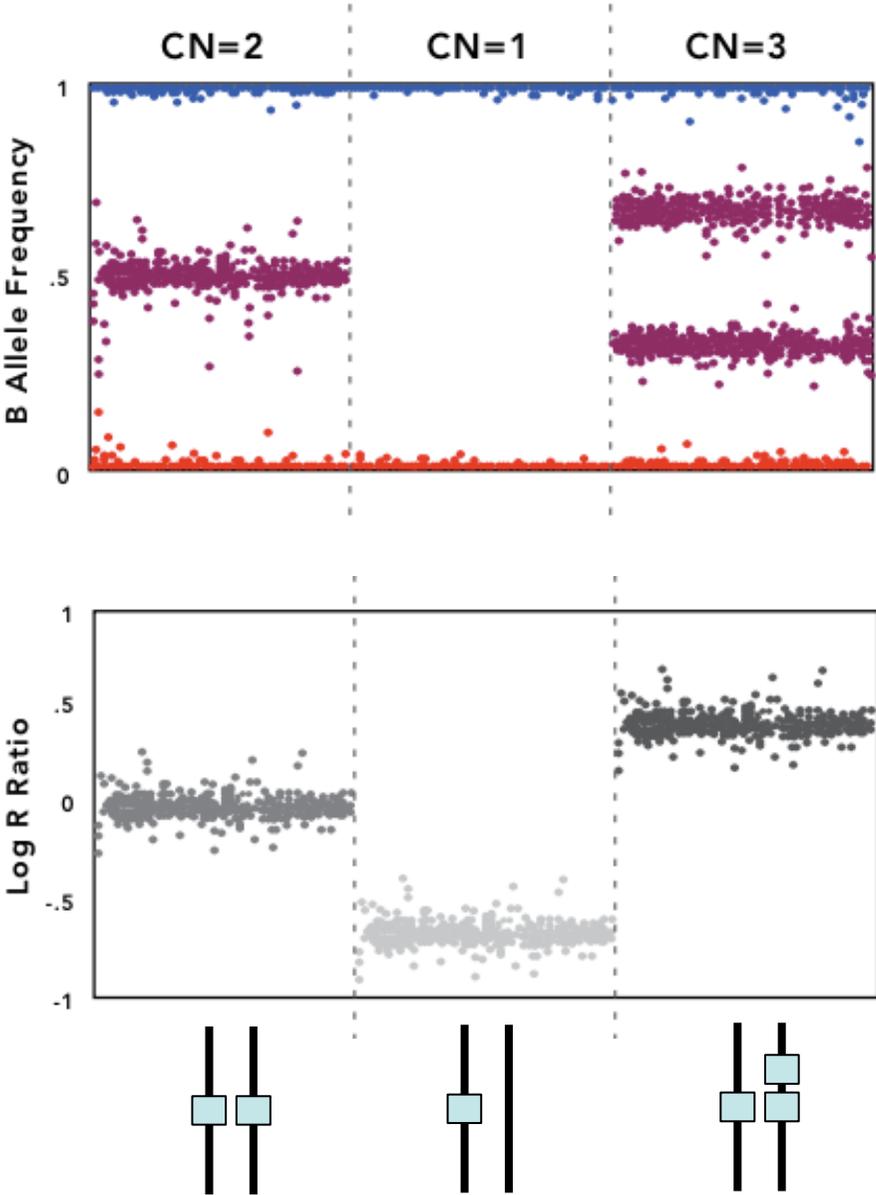
$$\text{LRR}(m) = 0.3$$

CN=4

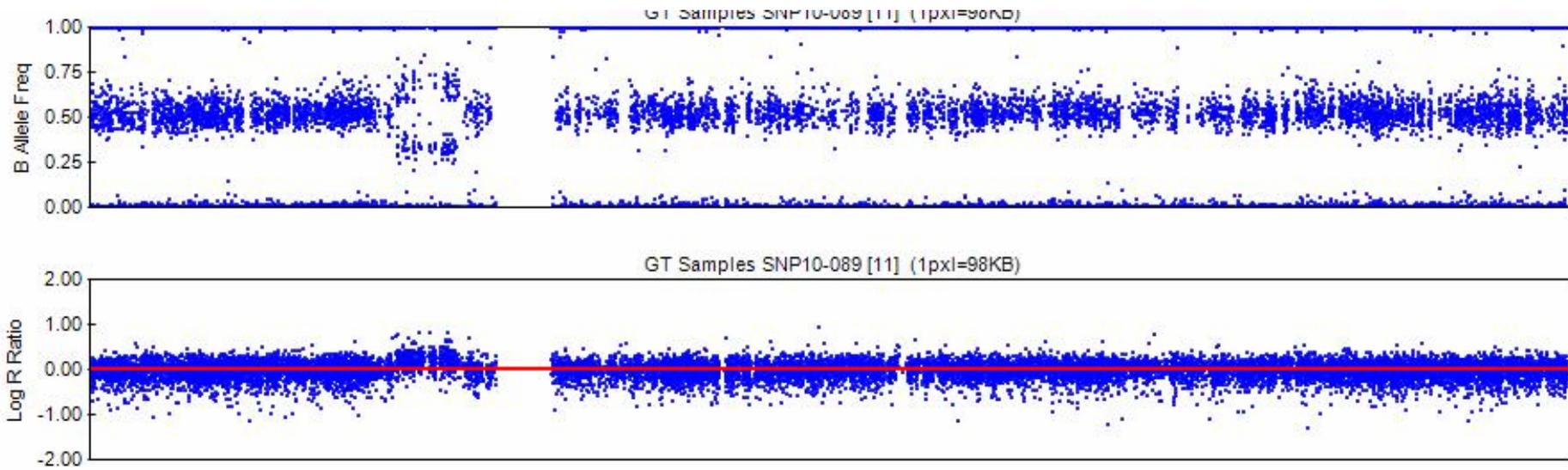
$$\text{LRR} = \ln(4/2) = 1$$

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

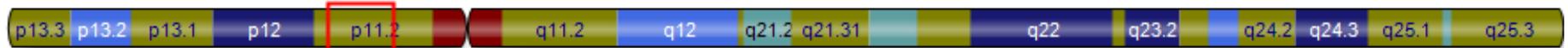
BAF and LRR



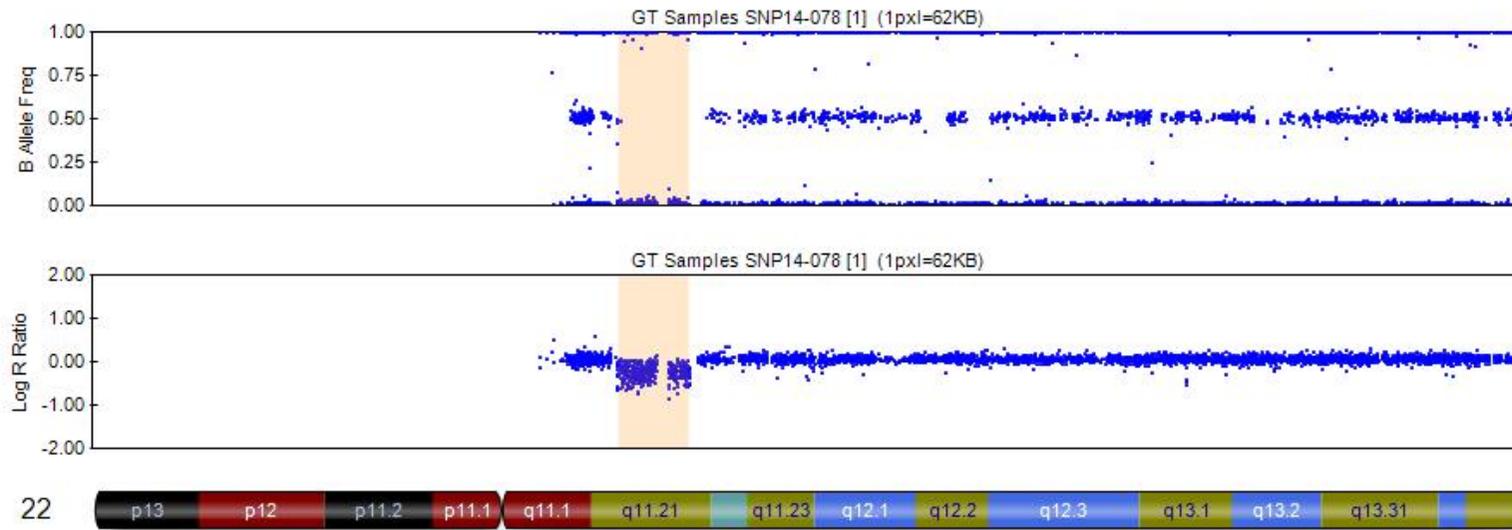
Duplicazione in p11.2



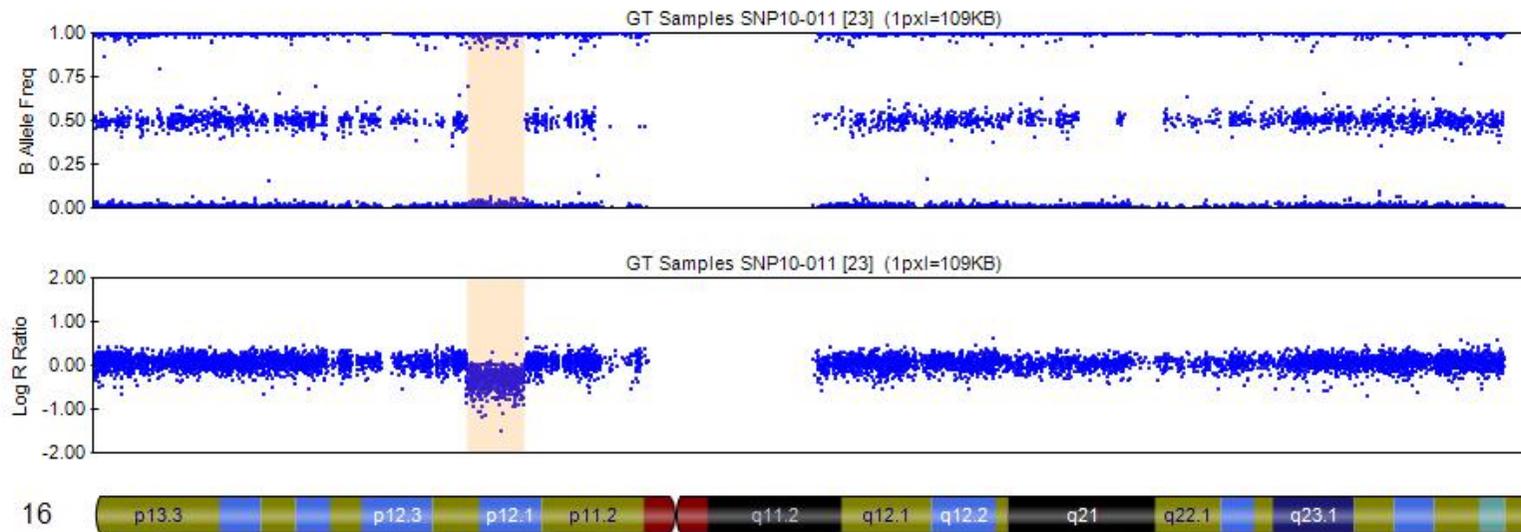
17



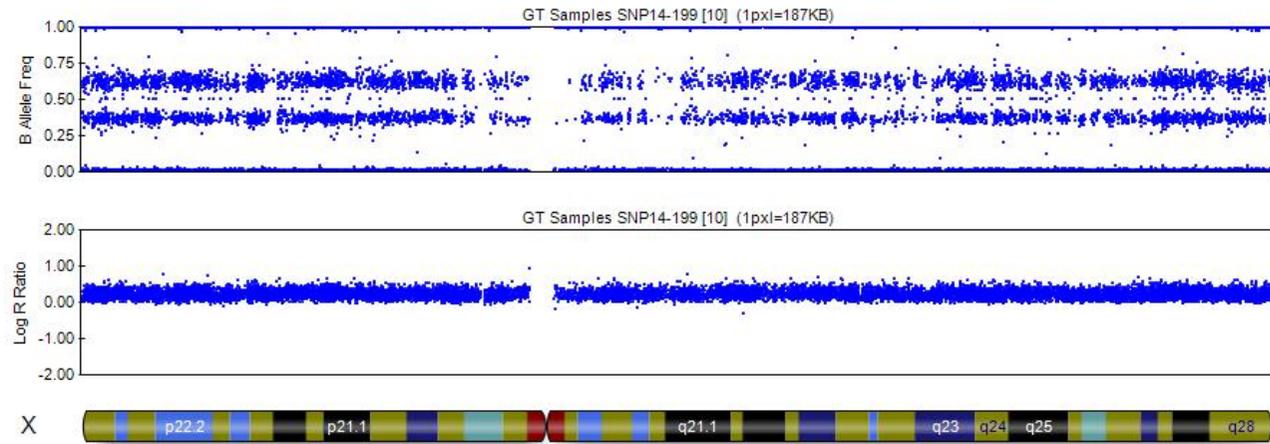
Delezione in q11.21



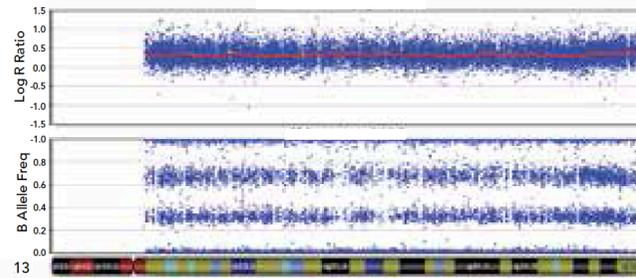
Delezione in p12.2p12.1



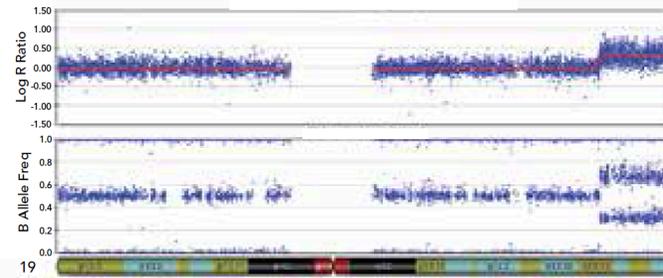
Trisomia X



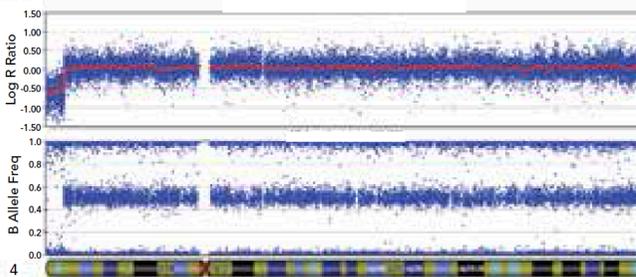
A. Trisomy 13



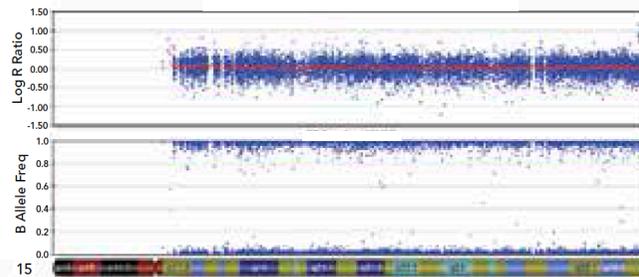
B. Partial Duplication 19q

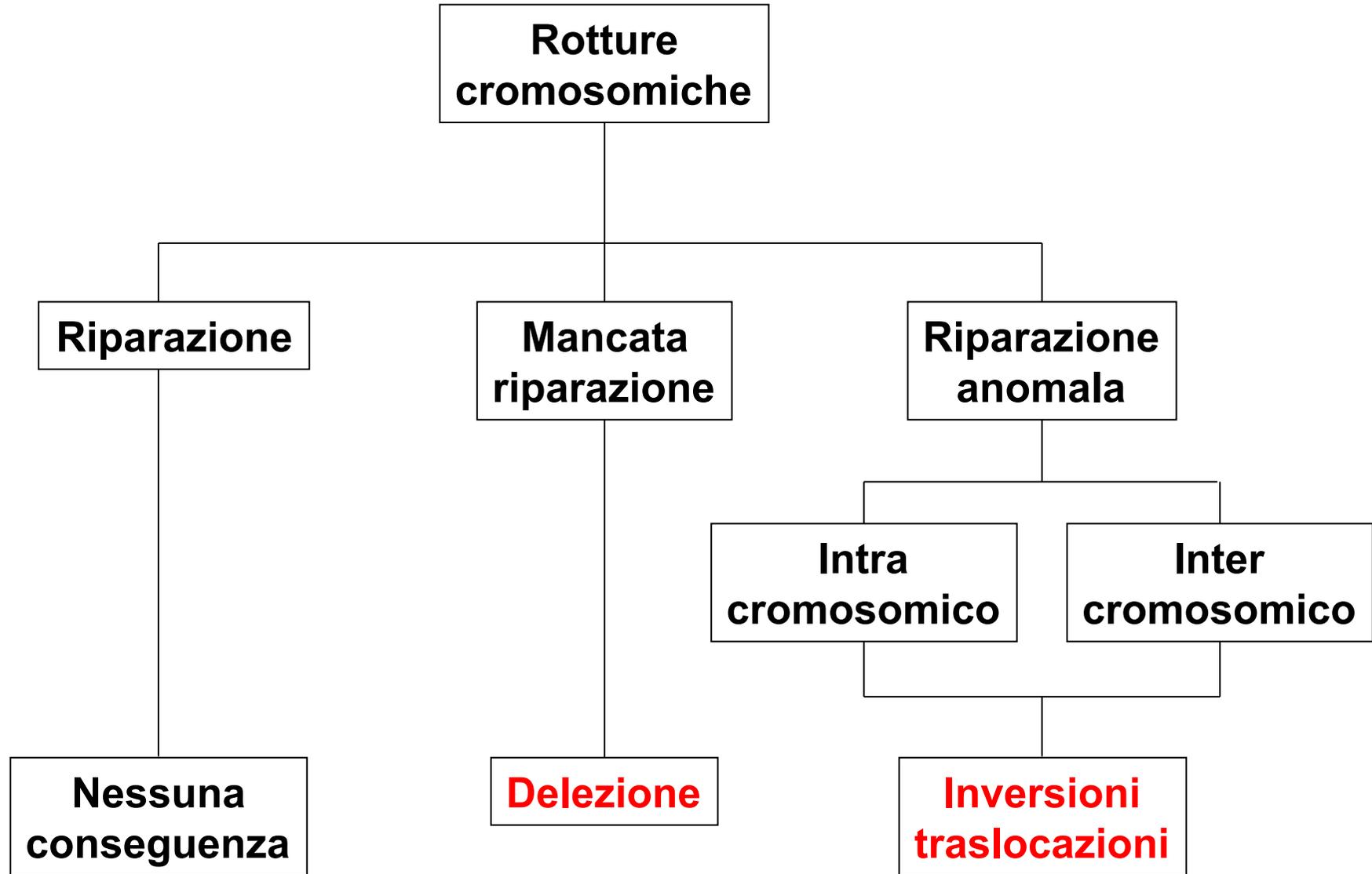


C. Partial Deletion 4p

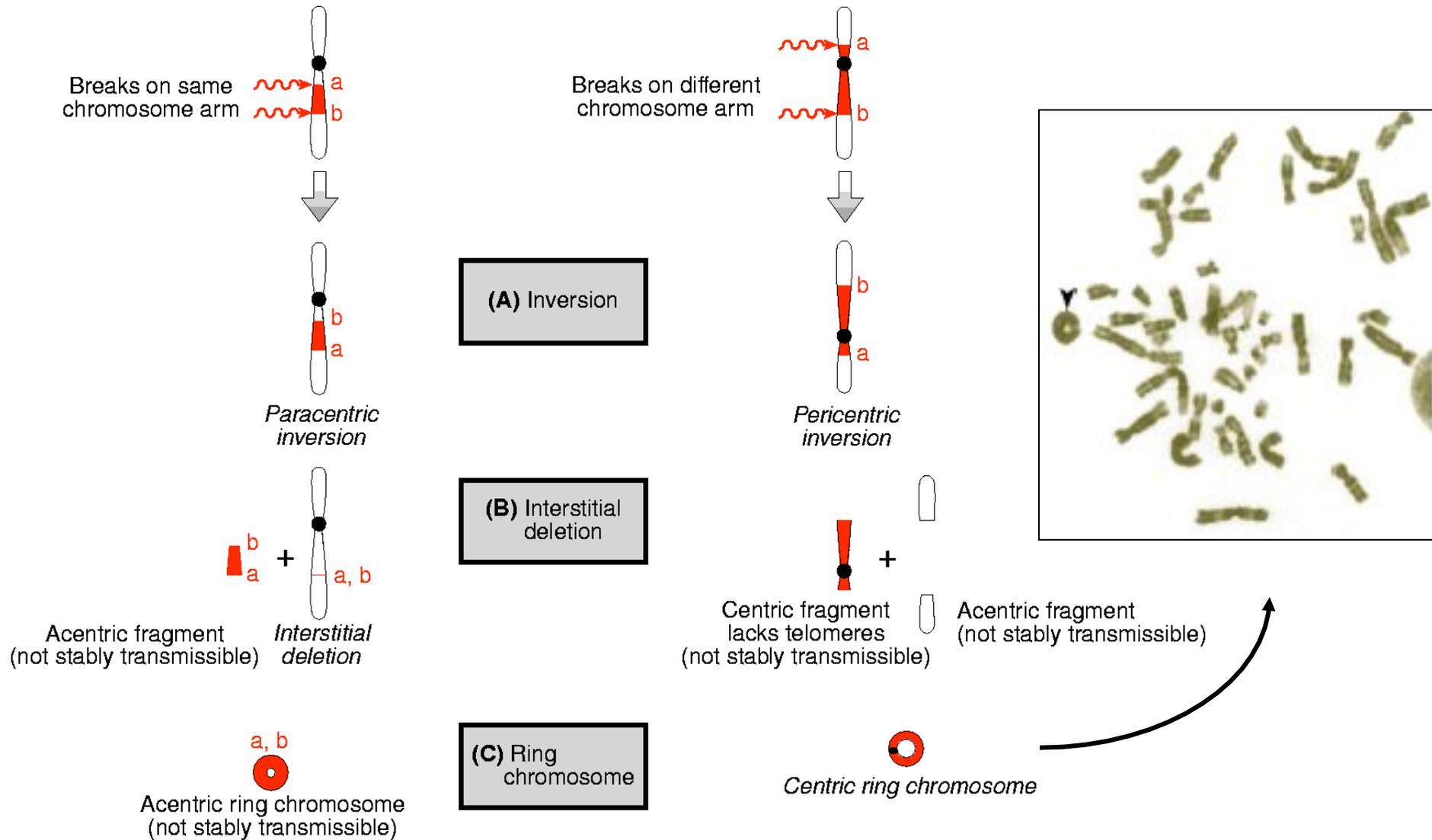


D. UPD of Chromosome 15

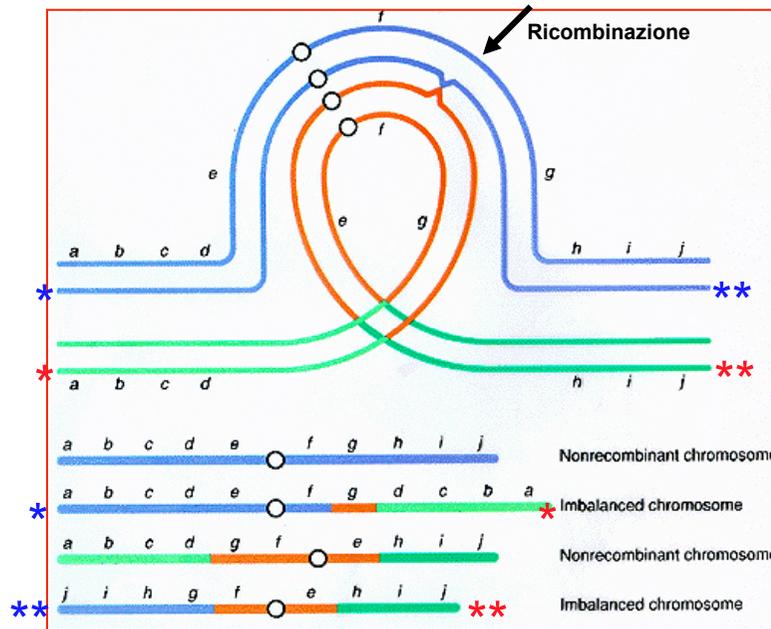




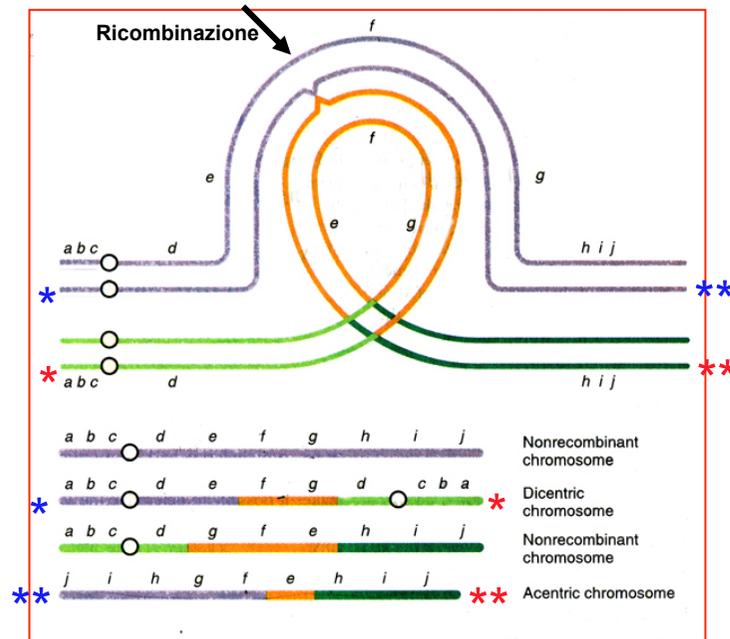
INVERSIONI E CROMOSOMI AD ANELLO



INVERSIONI: PRODUZIONE GAMETI SBILANCIATI



Inversione pericentrica

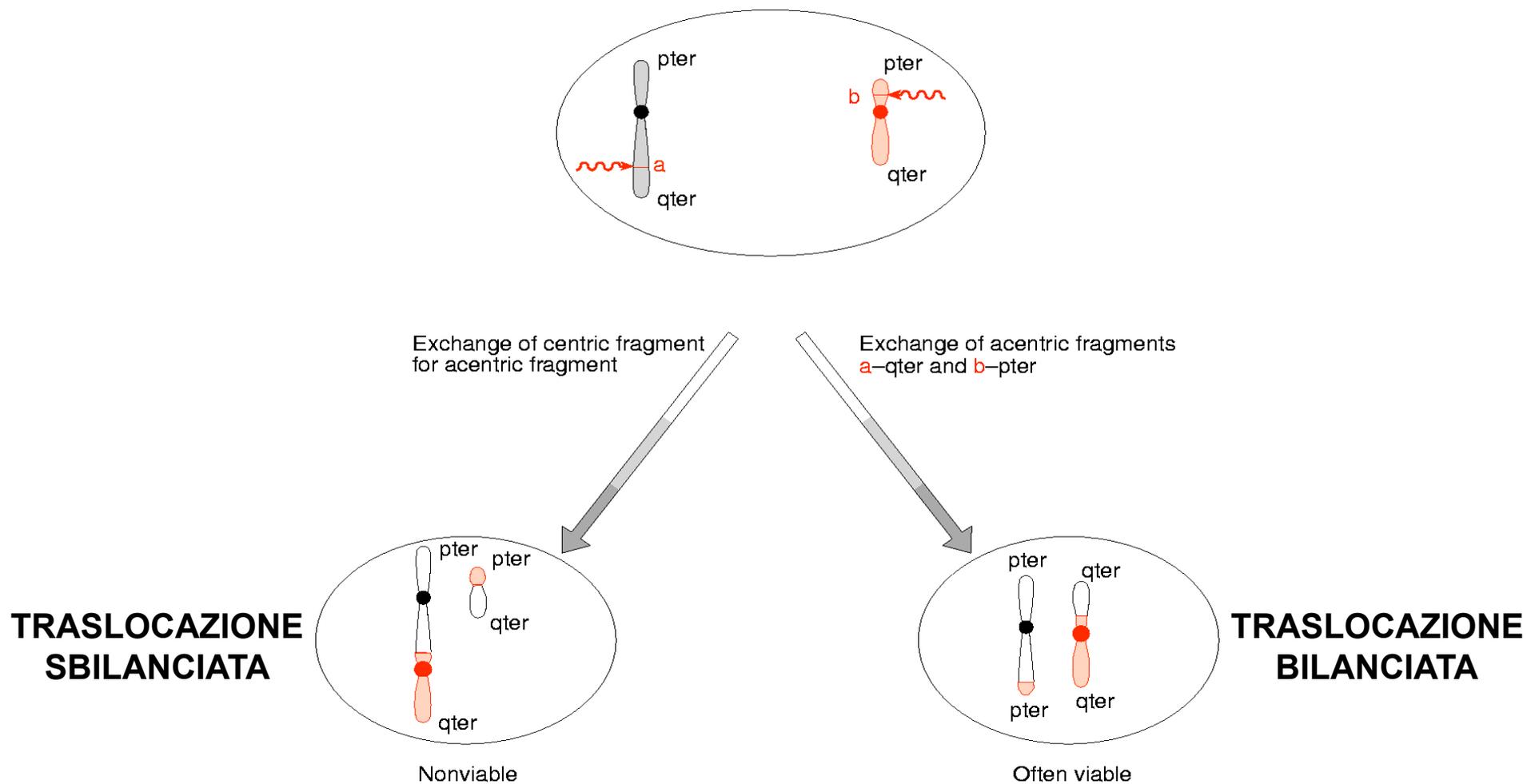


Inversione paracentrica

TRASLOCAZIONI CROMOSOMICHE:

Trasferimento di segmenti tra cromosomi diversi

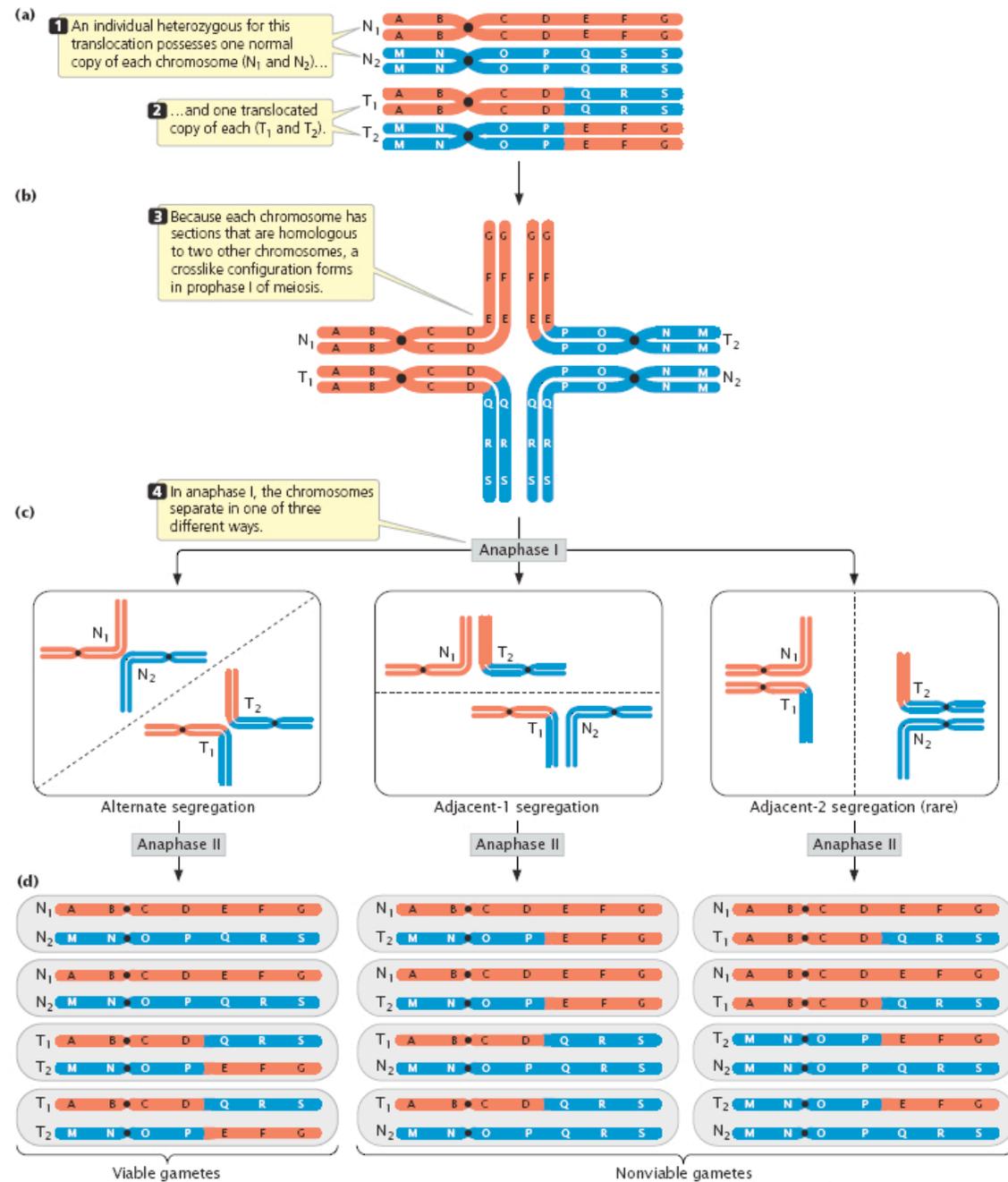
Causa traslocazione: Rotture cromosomiche



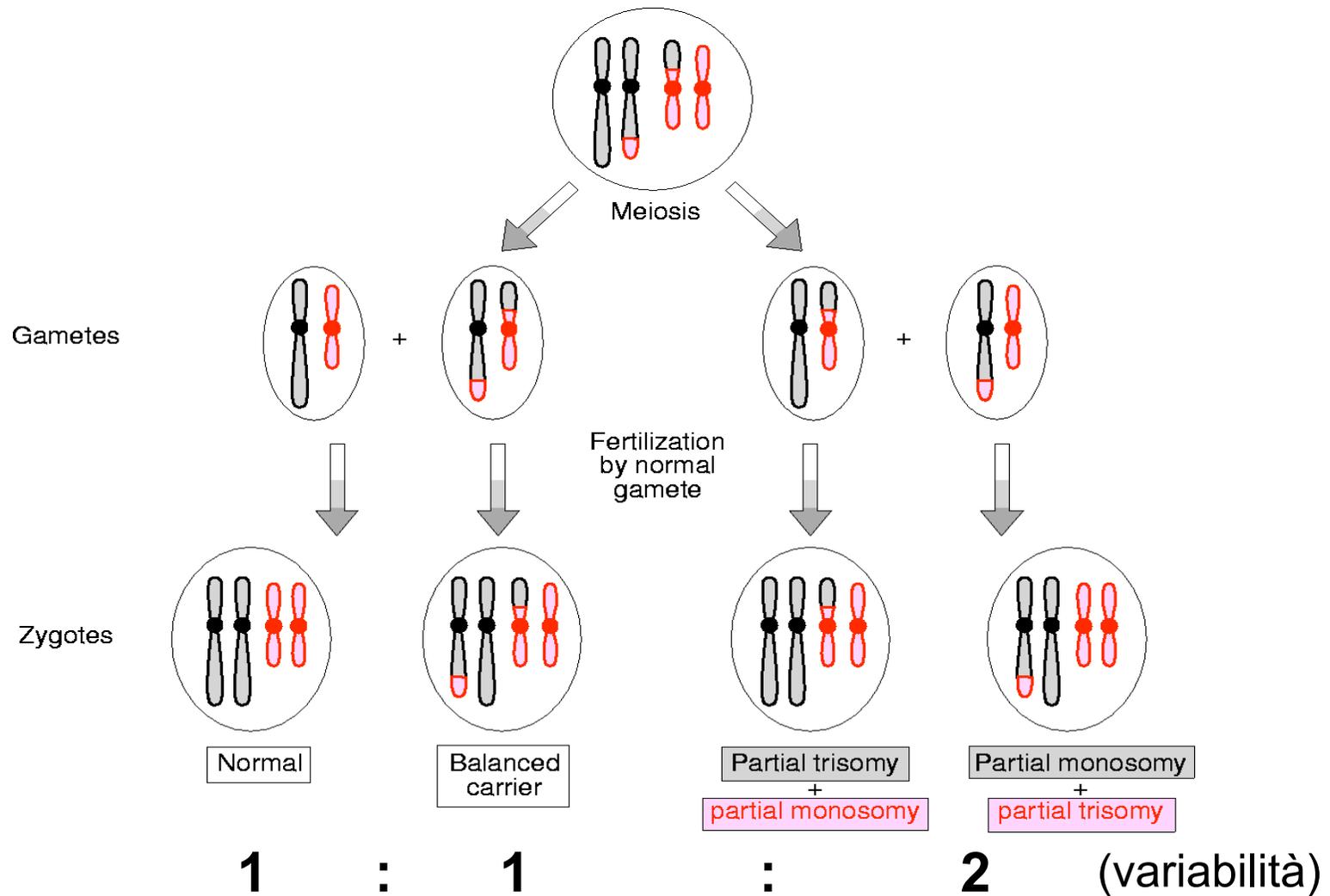
TRASLOCAZIONI BILANCIATE

- **Di solito non c'è perdita di materiale genetico**
- **Eterozigote è di solito clinicamente normale**
- **Non rare tra le coppie con aborti ripetuti e handicap tra i figli**
- **Rischio di produrre gameti sbilanciati**
- **Formazione di un quadrivalente durante l'appaiamento dei cromosomi omologhi durante la meiosi con tre possibili separazioni degli omologhi**

Chromosomal translocations:
 In an individual heterozygous for a reciprocal translocation, crosslike structures form in homologous pairing.



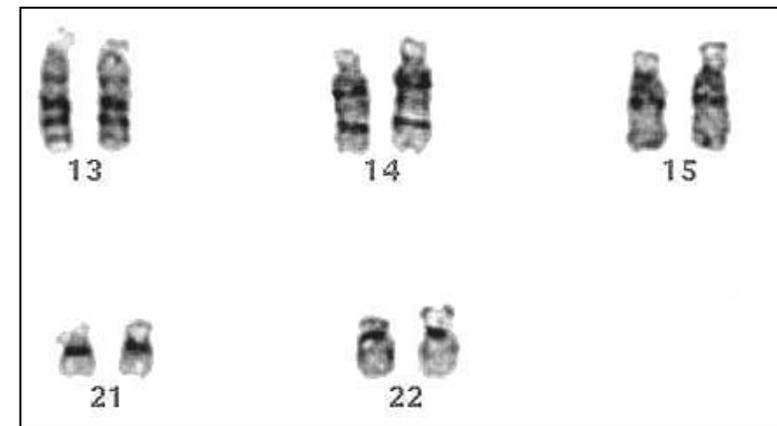
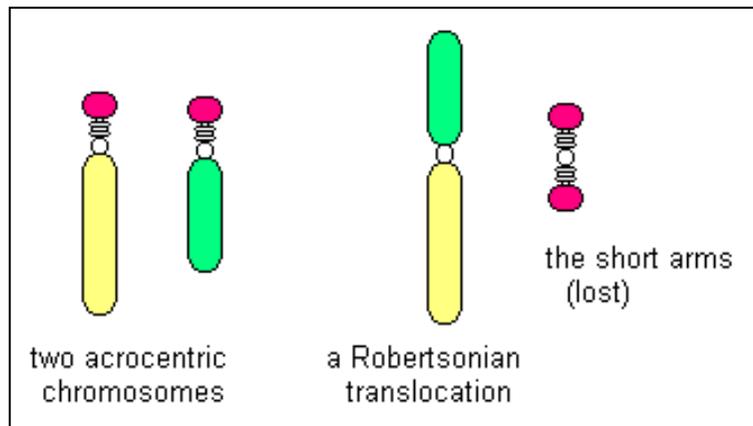
TRASLOCAZIONE RECIPROCA: PRODUZIONE GAMETI SBILANCIATI



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

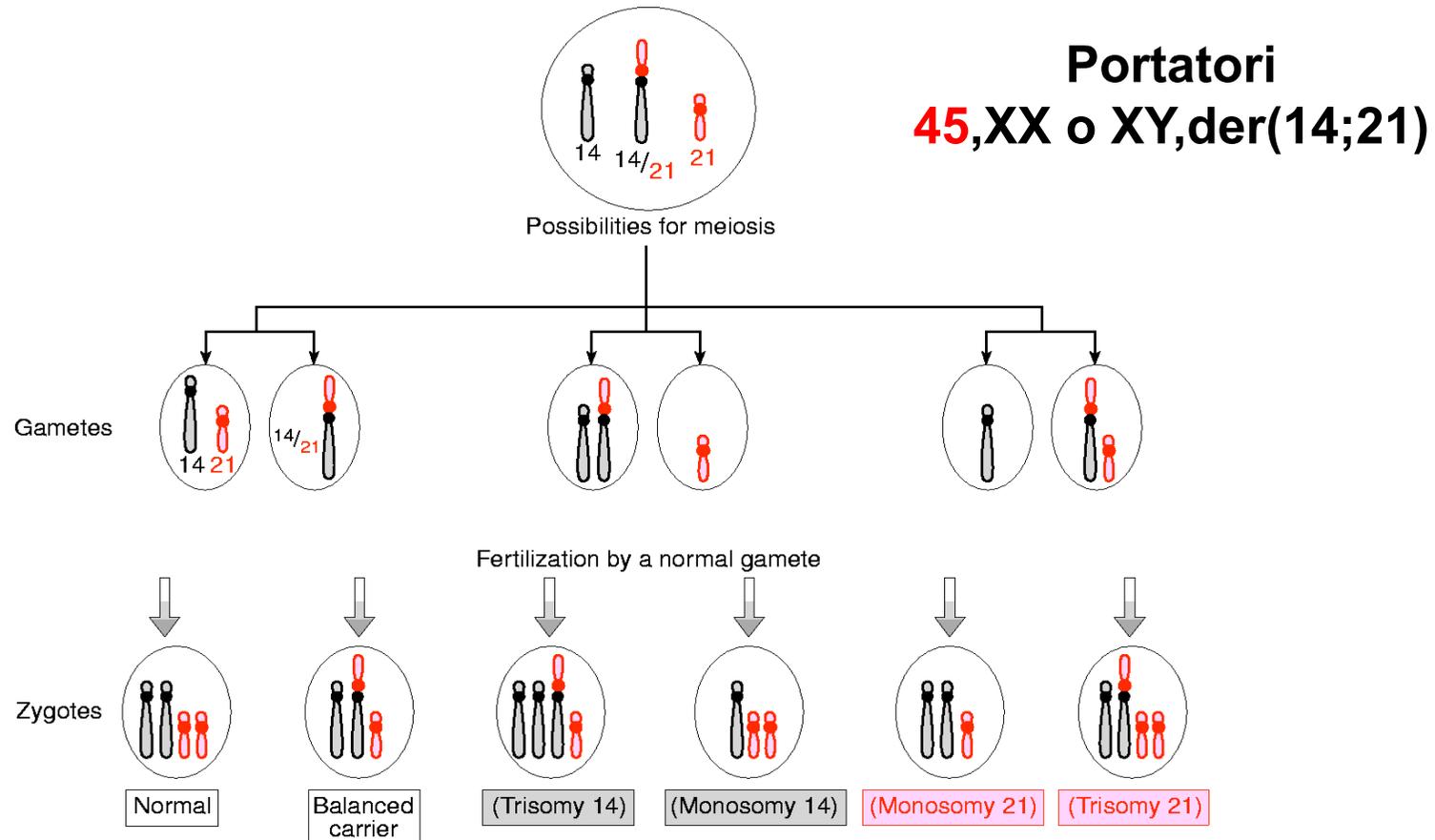
TRASLOCAZIONE ROBERTSONIANA (fusione centrica)

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**

TRISOMIE: CAUSE GENETICHE

	Trisomia libera	Mosaico	Traslocazione	Trisomia parziale
Trisomia 21	92 %	3%	4%*	Rari**
Trisomia 18	95%	% Piccola		
Trisomia 13	90%	5%	5%	

*Traslocazione Robertsoniana

**Duplicazione regione critica del braccio lunfo 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)

1/3 casi: genitore eterozigote per una traslocazione bilanciata

CROMOSOMA X: Anomalie strutturali e inattivazione dell' X

Inattivazione
“apparentemente” non casuale

- Delezioni
- Duplicazioni
- Cromosoma ad anello

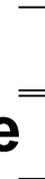


Cromosoma X alterato

- Traslocazioni X;autosomi

Traslocazioni bilanciate

Traslocazioni sbilanciate

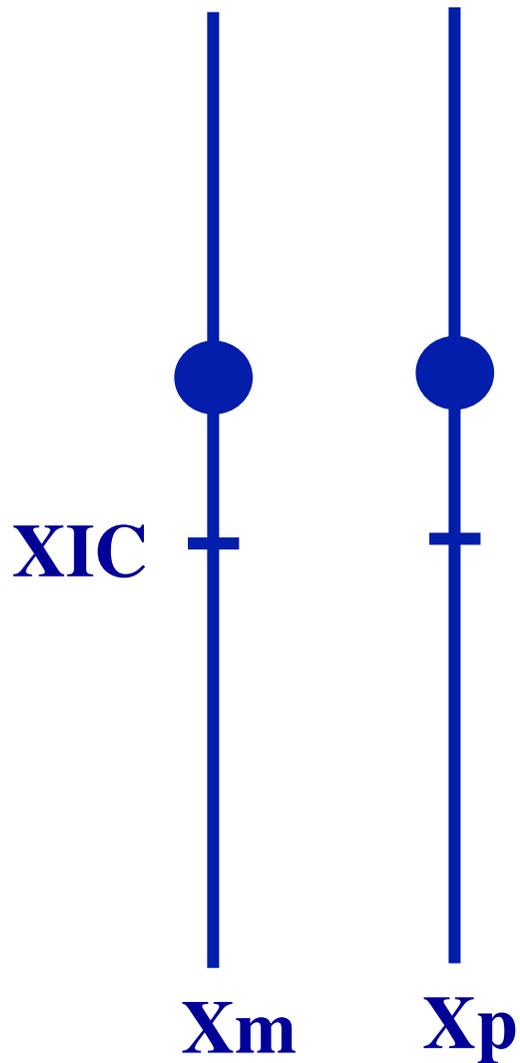


Cromosoma X normale

Cromosoma X alterato

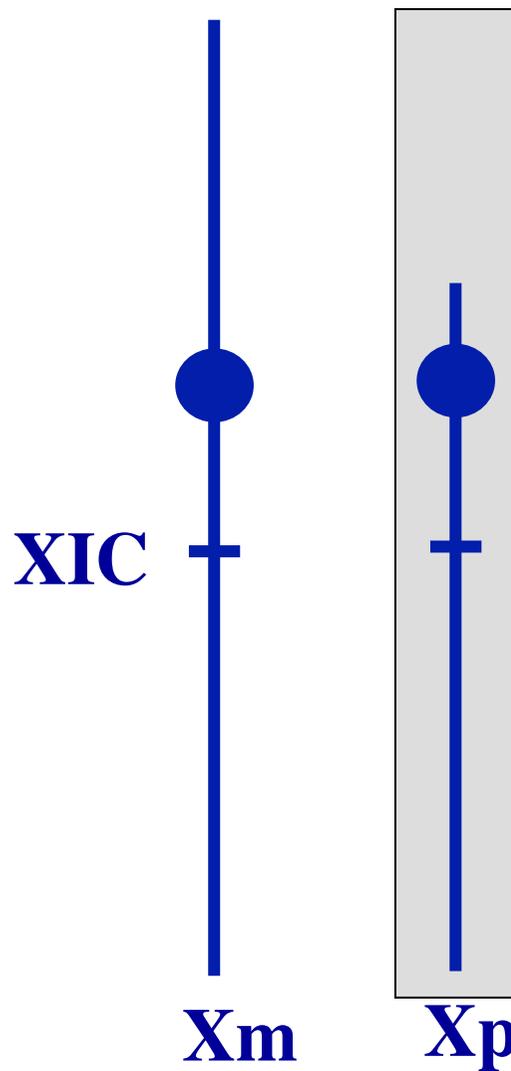
Inattivazione dell' X è sempre casuale. Il vantaggio selettivo delle cellule con materiale genetico bilanciato potrebbe sembrare un' inattivazione non casuale

46,XX



Inattivazione
Casuale

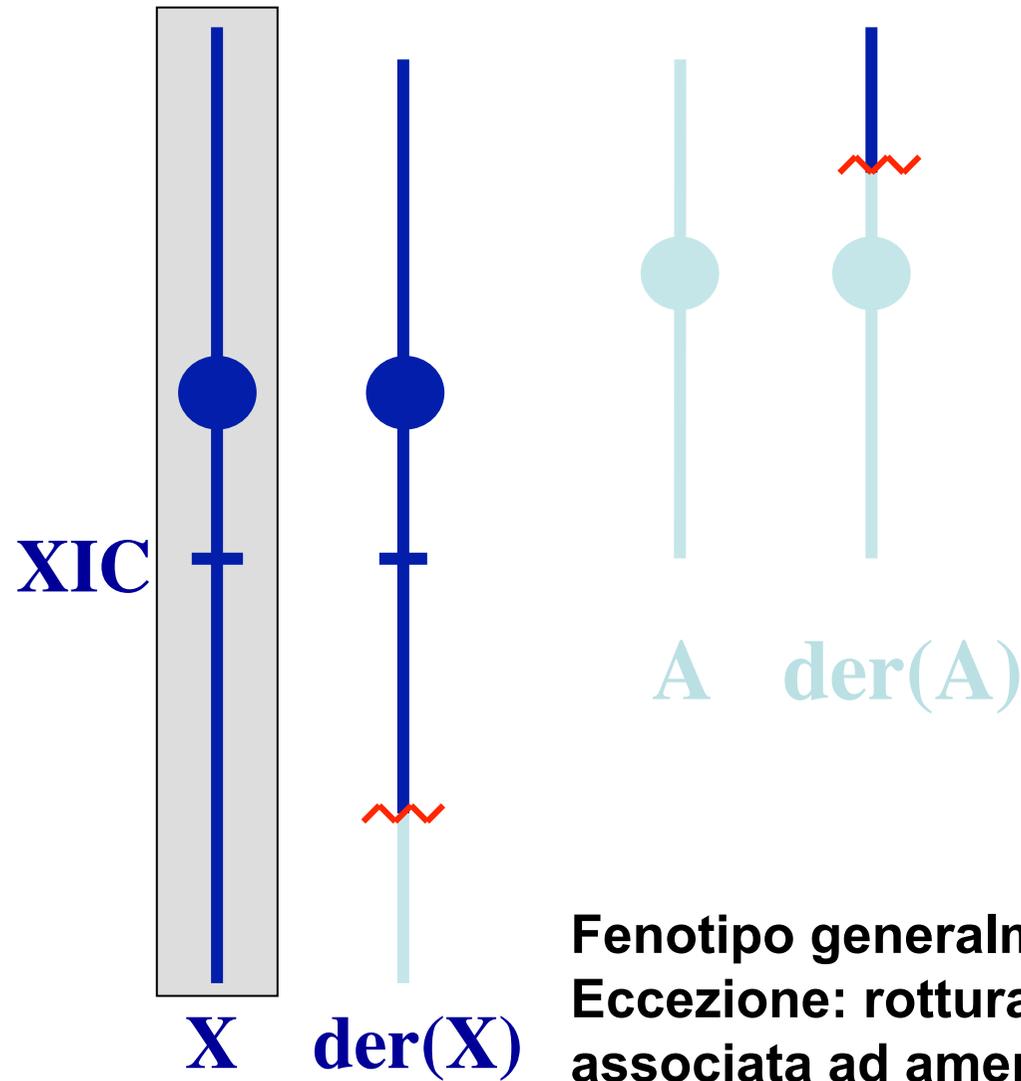
X anomalo



Inattivazione
non causuale

Disgenesia gonadica
con bassa statura
(Simil-Turner)

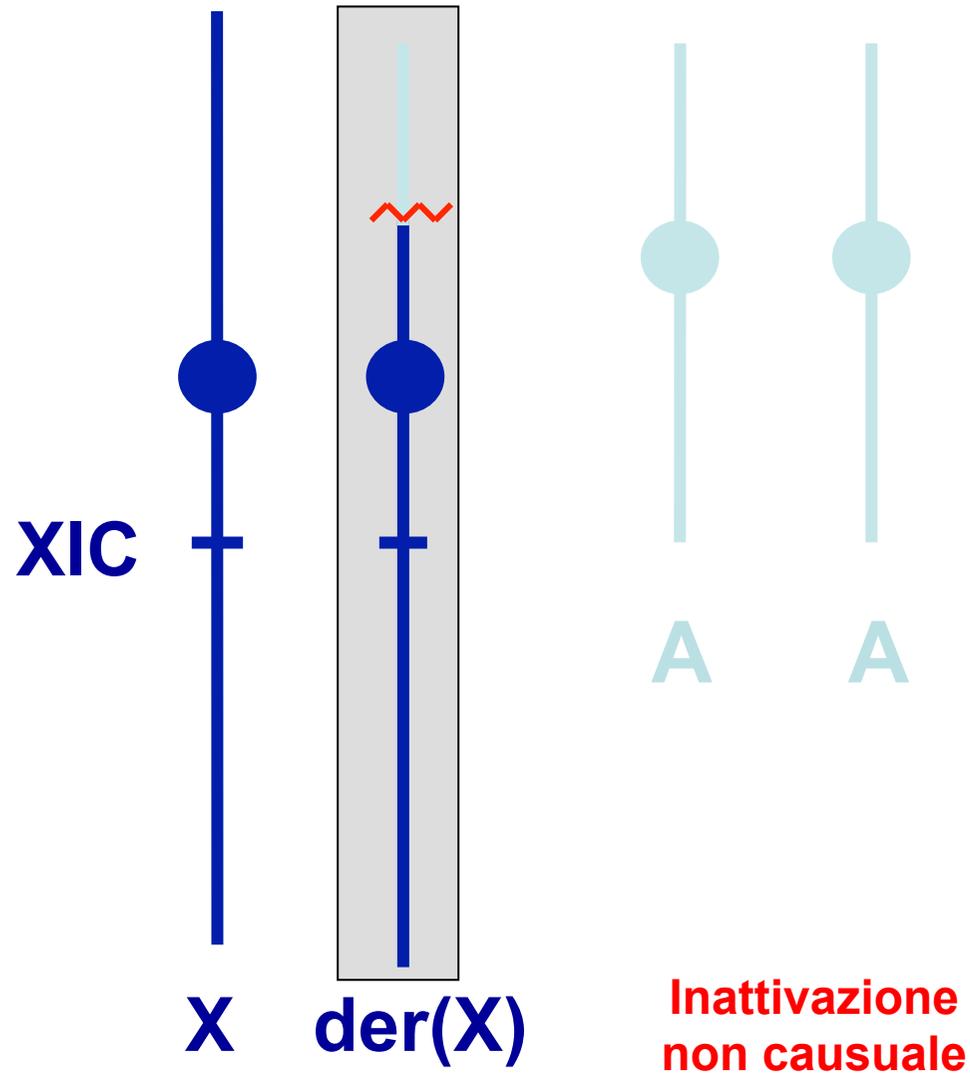
TRASLOCAZIONE BILANCIATA



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