

# MUTAZIONI

## Le Mutazioni sono cambiamenti della sequenza del DNA

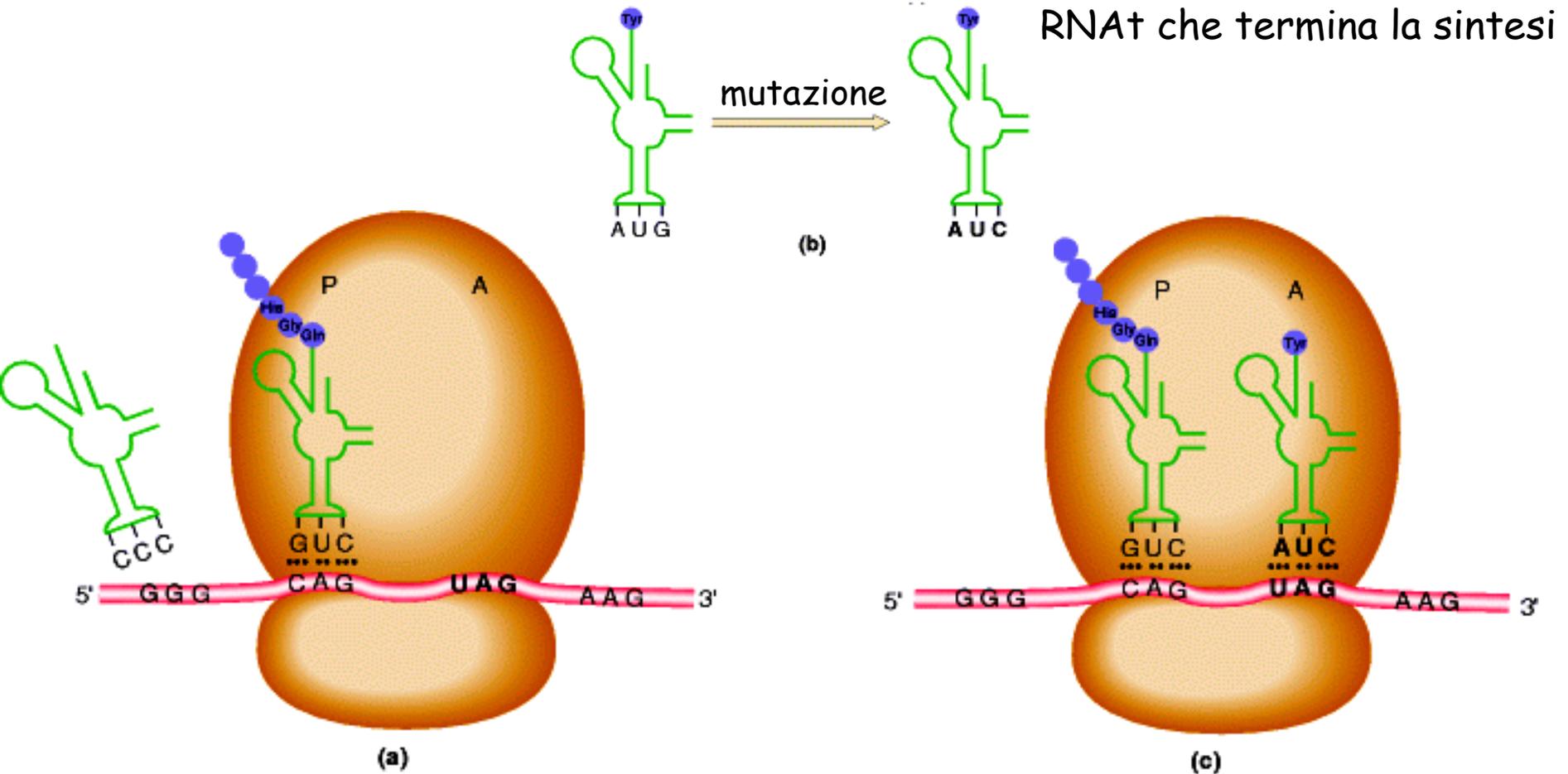
1. Mutazioni somatiche: non vengono trasmesse alla progenie (gli individui in cui si verifica una mutazione somatica sono mosaici: es colore degli occhi, colore dei capelli, della pelle).
2. Mutazioni germinali: vengono trasmesse alla progenie (le più importanti in genetica).



# Le Mutazioni

## Mutazioni non senso (nonsense)

Sono quelle che creano, in una regione codificante, un codone di terminazione: UAA, UAG, UGA. Si crea un polipeptide tronco.



## Anomalie della struttura dei cromosomi

I cromosomi anomali si originano per rotture cromosomiche: infatti i cromosomi sono strutture relativamente fragili che, talvolta, si rompono spontaneamente. L'incidenza delle rotture viene notevolmente aumentata dall'esposizione dei cromosomi stessi ad una grande varietà di agenti, fra cui i raggi X ed alcuni composti chimici. Gli effetti di questi agenti sono particolarmente accentuati nelle cellule in divisione, come ad esempio le cellule embrionali. I cromosomi rotti tendono a subire il processo della riparazione: le estremità rotte si comportano come se fossero adesive (si avvicinano e si fondono) e nel processo intervengono forse enzimi particolari che facilitano la riparazione. Nella maggioranza dei casi i cromosomi rotti si riparano correttamente e le estremità si ricongiungono al punto di frattura. Altre volte il processo non è corretto e da ciò deriva un'anomalia cromosomica.

I tipi di anomalie più importanti sono 4:

**delezioni:** un segmento di cromosoma si rompe e viene perduto

**duplicazioni:** un segmento cromosomico è rappresentato un n° di volte maggiore del normale

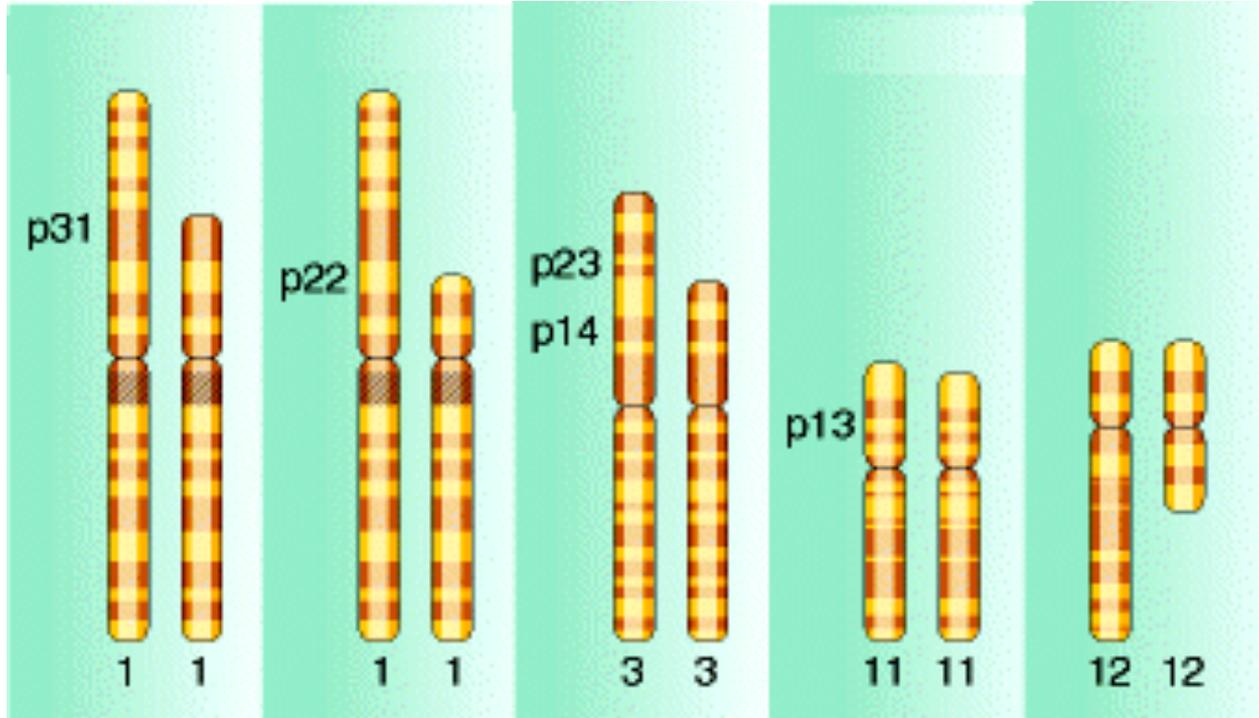
**inversioni:** un segmento di cromosoma è inserito in modo invertito

**traslocazioni:** due cromosomi non omologhi si rompono e i loro tratti terminali vengono scambiati

# Anomalie della struttura dei cromosomi

## Delezioni

Neuroblastoma      Tumore del polmone a cellule piccole      Tumore di Wilms      Tumore del testicolo



# Anomalie della struttura dei cromosomi

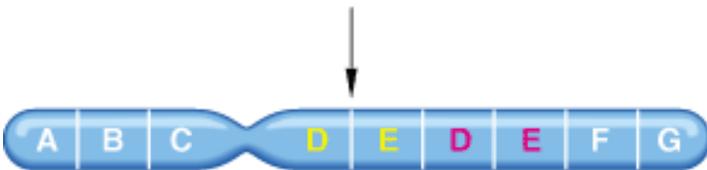
## Duplicazioni

### Sindrome dell'X fragile.

Rappresenta la forma più comune di ritardo mentale. La maggior parte delle persone normali hanno 29 "ripetizioni" alla fine del cromosoma X ma quelle affette dalla sindrome dell'X fragile ne hanno fino a 700 dovute alle duplicazioni.

Maschi affetti 1 : 1.500

Femmine affette 1 : 2.500



# Anomalie della struttura dei cromosomi

## Inversioni

Sequenza normale



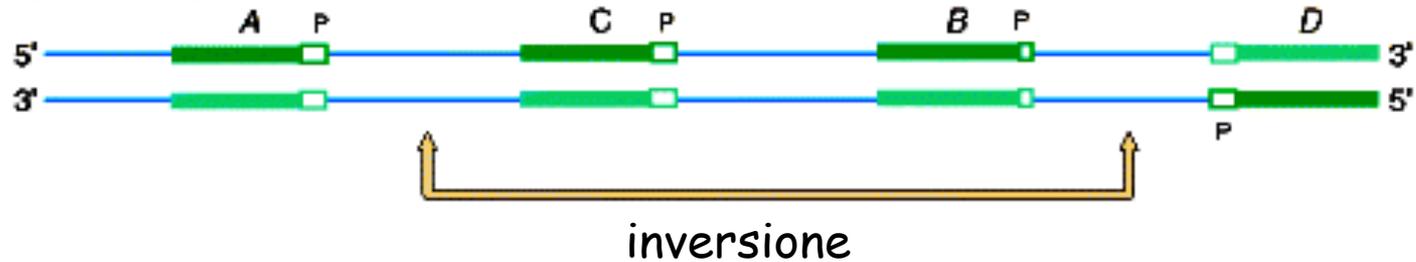
Rottura nel DNA



Allineamento invertito



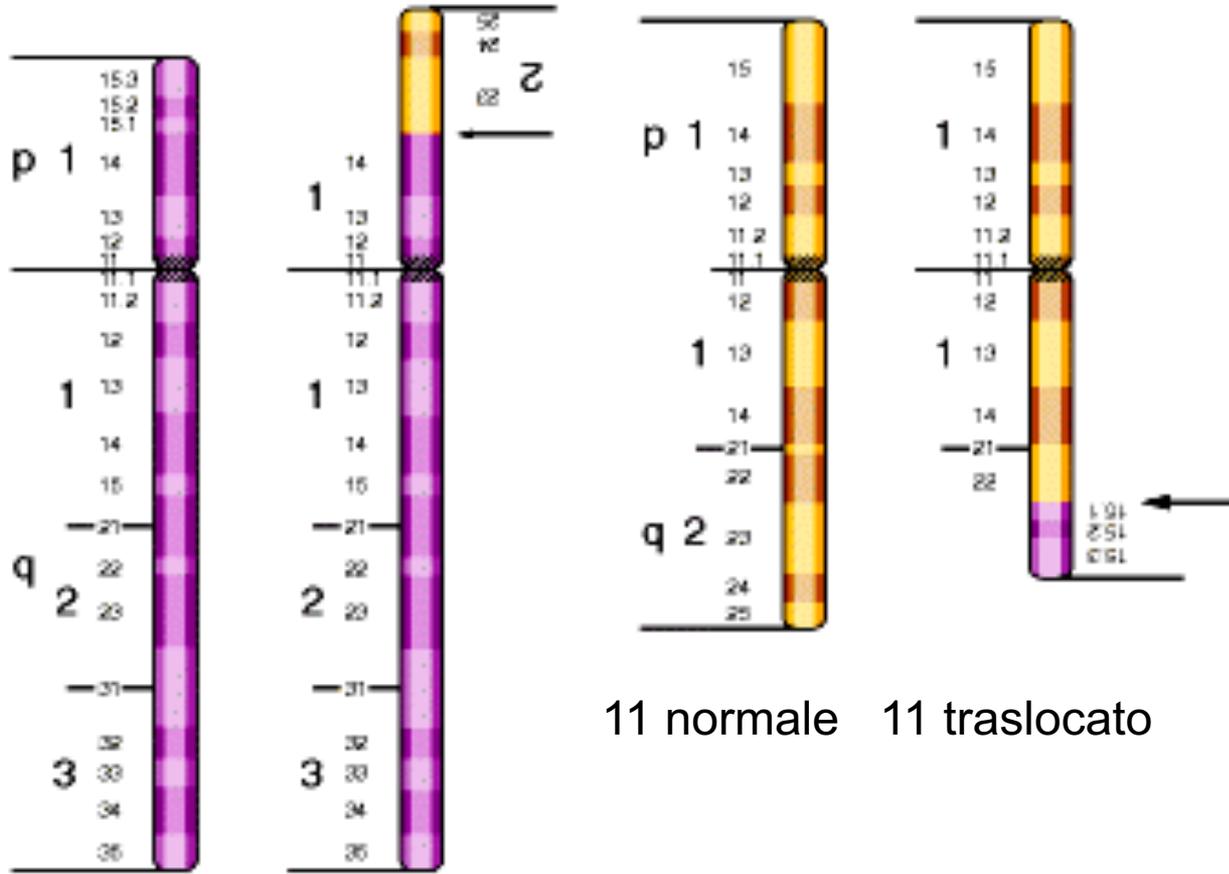
Legame delle rotture



# Anomalie della struttura dei cromosomi

## Traslocazioni

5p15; 11q23



5 normale 5 traslocato

11 normale 11 traslocato

# Riassunto delle alterazioni genomiche

## (a) Mutazioni puntiformi e piccole delezioni

Seq. normale

	N-Phe	Arg	Trp	Ile	Ala	Asn-C
RNA <sup>m</sup>	5'-UUU	CGA	UGG	AUA	GCC	AAU-3'
DNA	3'-AAA	GCT	ACC	TAT	CGG	TTA-5'
	5'-TTT	CGA	TGG	ATA	GCC	AAT-3'

Mutazione senso

	3'-AAT	GCT	ACC	TAT	CGG	TTA-5'
	5'-TTA	CGA	TGG	ATA	GCC	AAT-3'
	N-Leu	Arg	Trp	Ile	Ala	Asn-C

Mutazione non senso

	3'-AAA	GCT	ATC	TAT	CGG	TTA-5'
	5'-TTT	CGA	TAG	ATA	GCC	AAT-3'
	N-Phe	Arg	Stop			

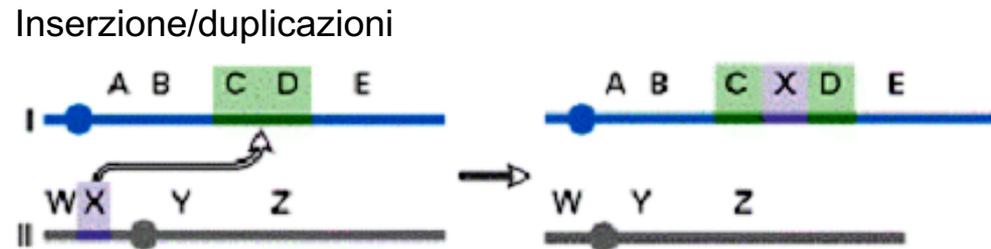
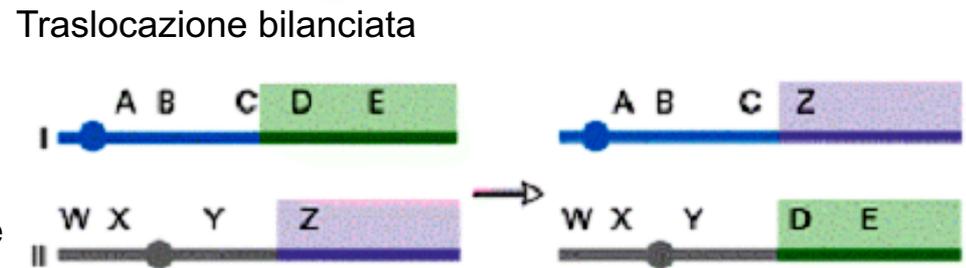
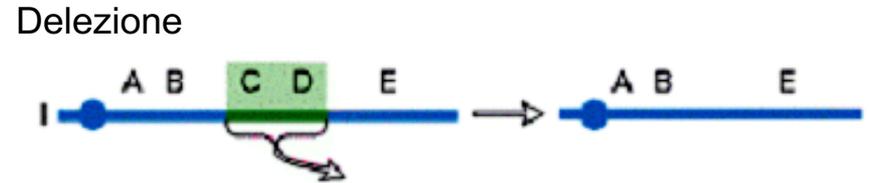
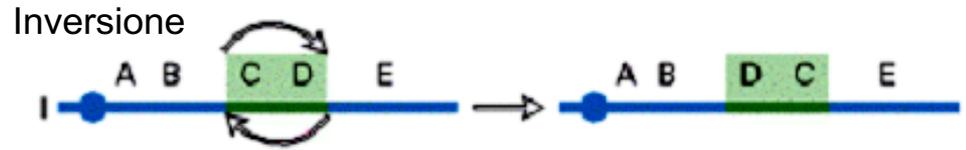
### Slittamento del quadro di lettura per inserzione di base

	3'-AAA	GCT	ACC	ATA	TCG	GTT A-5'
	5'-TTT	CGA	TGG	TAT	AGC	CAA T-3'
	N-Phe	Arg	Trp	Tyr	Ser	Gln

### Slittamento del quadro di lettura per delezione di basi

		GCTA				
		CGAT				
	3'-AAA	CCT	ATC	GGT	TA-5'	
	5'-TTT	GGA	TAG	CCA	AT-3'	
	N-Phe	Gly	Stop			

## (b) Anomalie cromosomiche



## **Mutazioni nel DNA indotte da agenti chimici, fisici e biologici**

Una serie di agenti possono indurre alterazioni permanenti nella struttura e/o sequenza nucleotidica: tra questi vengono generalmente riportati:

- a) Acido nitroso ( $\text{HNO}_2$ )
  - a) Idrossilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ )
  - a) Agenti alchilanti
  - b) Analoghi delle basi
- } **CHIMICI**
- 
- a) Radiazioni X,  $\gamma$ , U.V.
- } **FISICI**
- 
- a) Virus oncogeni a DNA
  - b) Virus oncogeni a RNA
- } **BIOLOGICI**

## Anomalie del numero di cromosomi

### Poliploidia e polisomia

Gameti: **aploidi** = 22 autosomi + 1 cromosoma sessuale

Cellule somatiche: **diploidi** = 44 autosomi + 2 cromosomi sessuali

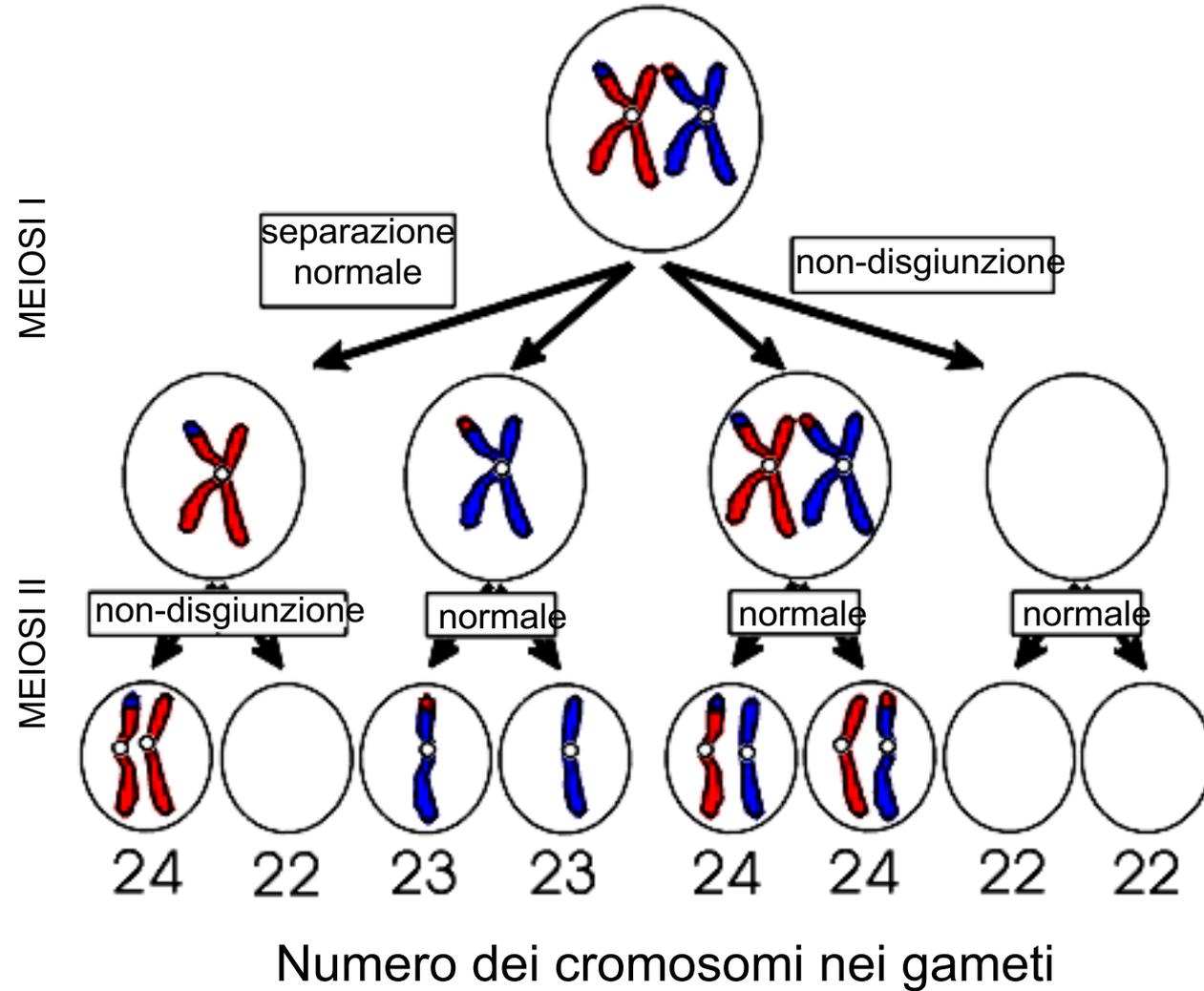
Cellule con 3 corredi aploidi di cromosomi (in totale 69): **triploidi**

Cellule con 4 corredi aploidi di cromosomi: **tetraploidi**.

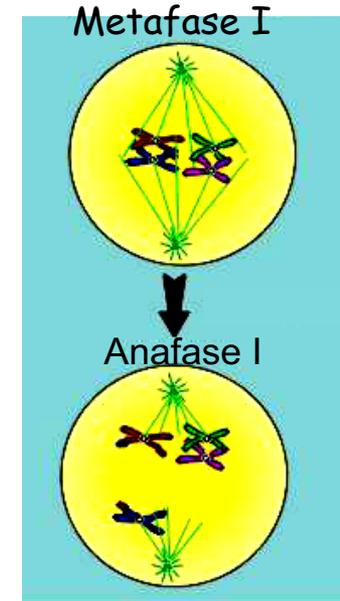
Più in generale le cellule che portano più di due corredi aploidi di cromosomi sono dette **poliploidi**.

Un secondo tipo di anomalia del numero dei cromosomi riguarda singole unità anziché interi corredi. Una cellula somatica normale è diploide ed ha 46 cromosomi mentre una cellula in cui un cromosoma è mancante ne ha 45 ed è detta **monosomica** per il cromosoma presente in singola anziché in doppia copia. Ad esempio una femmina con un solo cromosoma X anziché due (XO) è monosomica per l'X. Al contrario le cellule che hanno 3 copie di un cromosoma anziché 2 sono dette **trisomiche** per quel cromosoma. Ad esempio un individuo con 3 copie del cromosoma 21 è un trisomico 21, cioè ha una trisomia del cromosoma 21. Più in generale un individuo è **polisomico** quando ha più di 2 copie di un dato cromosoma. Nell'uomo l'unico livello significativo di polisomia degli autosomi è la trisomia mentre per i cromosomi sessuali si possono riscontrare anche livelli superiori di polisomia quali la **tetrasomia** (4 copie di uno dei cromosomi sessuali).

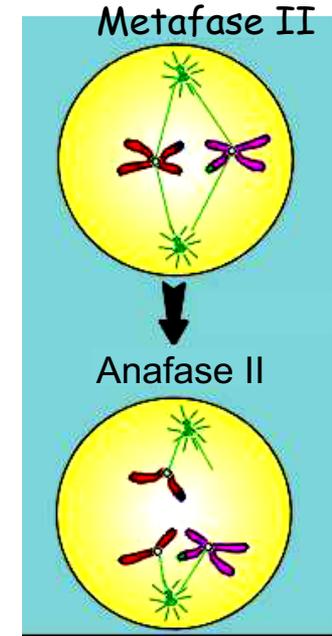
**Anomalie del numero di cromosomi**  
**Non-disgiunzione primaria durante la meiosi**



Non-disgiunzione nella meiosi I



Non-disgiunzione nella meiosi II



## Anomalie del numero di cromosomi

**Il dosaggio genico** all'interno della cellula è estremamente **importante**: le cellule umane si sono adattate ad un corretto ed armonioso equilibrio delle azioni di geni presenti in doppia copia a causa della omologia fra gli autosomi.

A causa dell'importanza di un dosaggio adeguato, **un numero troppo elevato o troppo scarso di copie di geni può alterare i normali processi dello sviluppo**, anche se i geni in sovrappiù o assenti non sono mutati. Queste anomalie sono il risultato di di uno squilibrio grossolano del numero e dell'azione dei geni e, secondo una regola generale, maggiore è lo squilibrio e più grave è l'anomalia. **Alcuni squilibri** sono sufficientemente lievi e non hanno pressoché alcun effetto sullo sviluppo ma altri, quelli più estesi, sono **letali**: conducono alla morte dell'embrione o del bambino in tenera età.

# Anomalie del numero dei cromosomi

Numero e tipo delle anomalie cromosomiche negli aborti spontanei e nei nati vivi rapportati a 100.000 gravidanze accertate

		100.000 gravidanze accertate	
		15.000 aborti spontanei 7.500 anomalie cromosomiche	85.000 nati vivi 550 anomalie cromosomiche
<b>Trisomia</b>			
A:	{ 1	0	0
	{ 2	159	0
	{ 3	53	0
B:	{ 4	95	0
	{ 5	0	0
C:	6-12	561	0
D:	{ 13	128	17
	{ 14	275	0
	{ 15	318	0
E:	{ 16	1229	0
	{ 17	10	0
	{ 18	223	13
F:	19-20	52	0
G:	{ 21	350	113
	{ 22	425	0
<b>Cromosomi sessuali</b>			
	XYY	4	46
	XXY	4	44
	XO	1350	8
	XXX	21	44
<b>Traslocazioni</b>			
	Bilanciate	14	164
	Non bilanciate		52
		225	
<b>Poliploidia</b>			
	Triploidia	1275	0
	Tetraploidia	450	0
<b>Altro (mosaici, ecc.)</b>		280	49
<b>TOTALE</b>		<b>7.500</b>	<b>550</b>

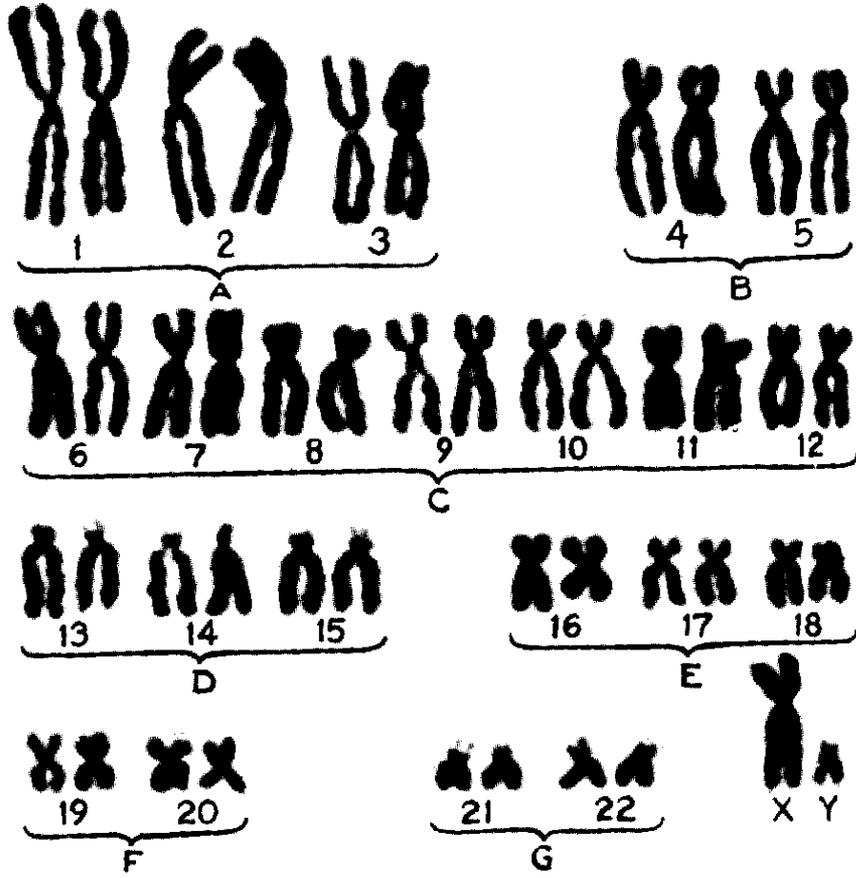
# CARIOTIPO

# Il Cariotipo Umano

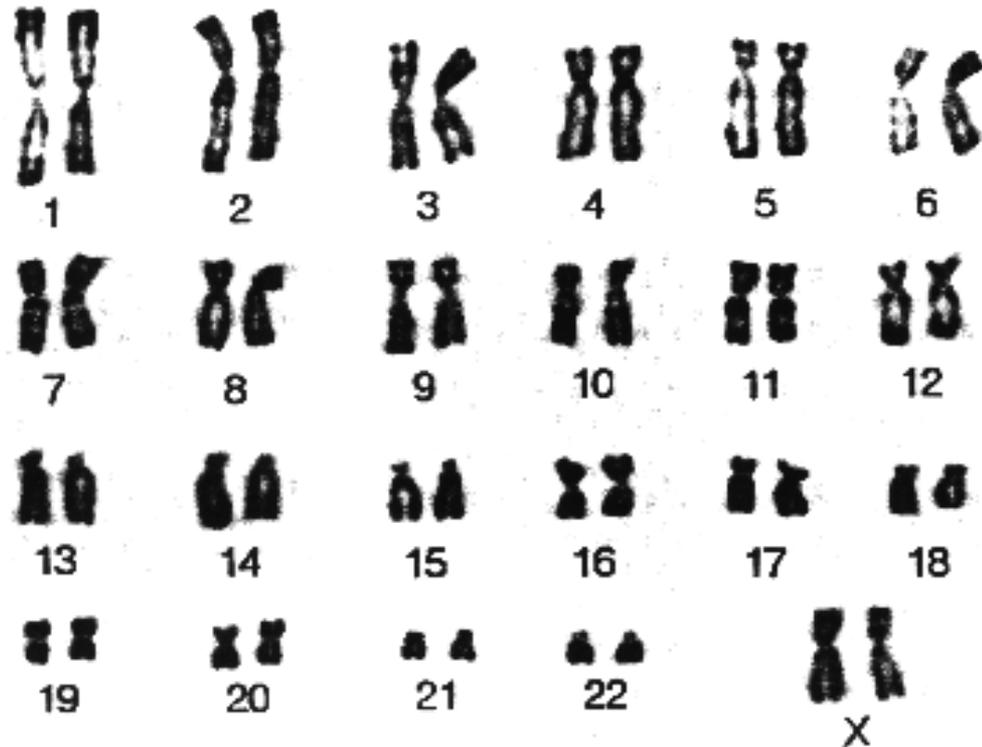
46 cromosomi.

44 autosomi: 22 coppie di cromosomi omologhi

2 cromosomi sessuali

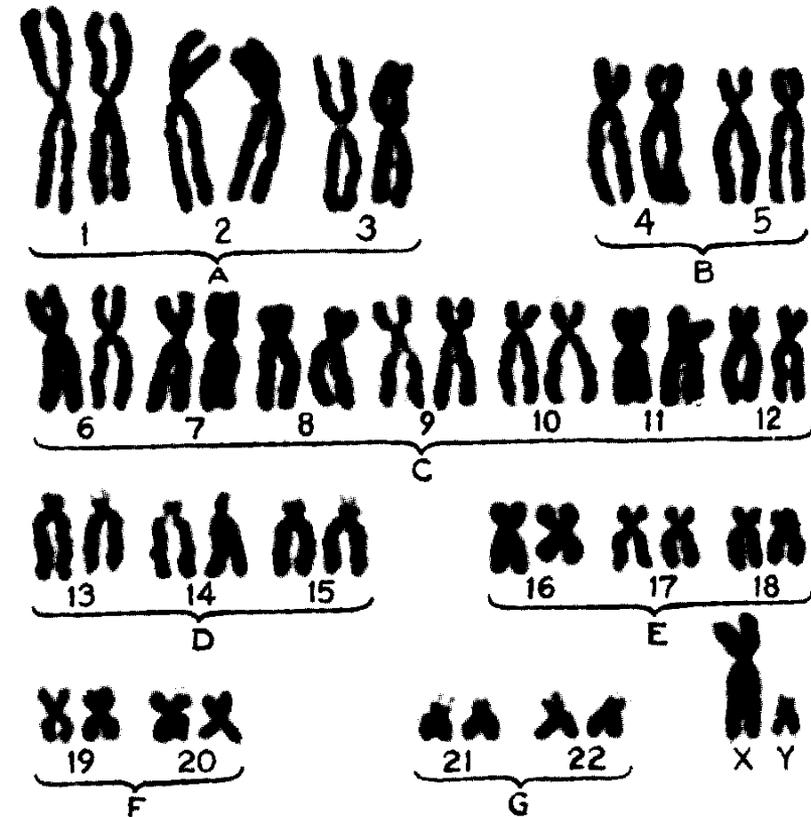


Il cariotipo normale di un maschio



Il cariotipo normale di una femmina

# Definizione dei gruppi dei cromosomi umani



Gruppo	Numerazione	Caratteristiche distintive
A	da 1 a 3	Grandi metacentrici
B	4 e 5	Grandi submetacentrici
C	da 6 a 12 più l'X	Medi submetacentrici
D	da 13 a 15	Medi acrocentrici
E	da 16 a 18	Medi submetacentrici, più piccoli del gruppo C
F	19 e 20	Piccoli metacentrici
G	21 e 22 più Y	Piccoli acrocentrici

### Tecnica di bandeggio

**Bandeggio G-I** cromosomi metafasici vengono sottoposti ad una parziale digestione delle proteine, quindi colorate con un colorante Giemsa e osservati al microscopio

**Bandeggio Q-I** cromosomi metafasici vengono sottoposti a trattamento con la mostarda chimica quinacrina. Il bandeggio fluorescente viene osservato con un microscopio speciale a luce ultravioletta

**Bandeggio R-I** cromosomi metafasici vengono sottoposti ad alte temperature per ottenere una parziale denaturazione del DNA e quindi colorati con Giemsa e osservati al microscopio

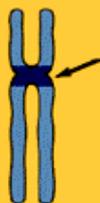
**Bandeggio C-I** cromosomi metafasici vengono trattati chimicamente in modo che il DNA venga estratto dai bracci ma non dal centomero. Segue colorazione con Giemsa ed osservazione al microscopio

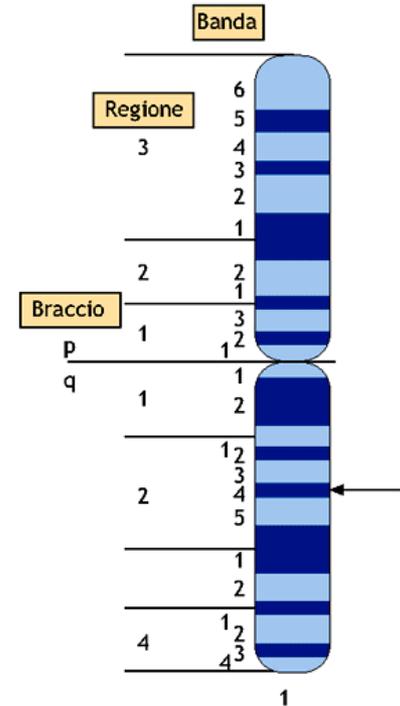
### Aspetto dei cromosomi

 Le bande G sono colorate di scuro

 Le bande che si colorano di scuro con il bandeggio G, emettono fluorescenza quando esposte a luce ultravioletta

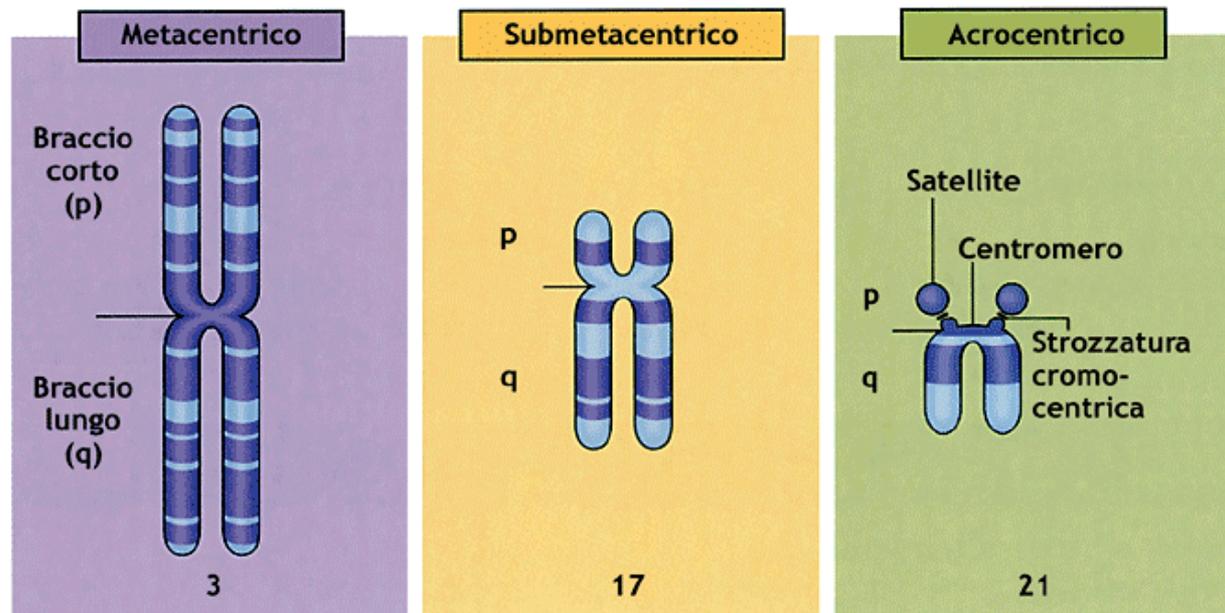
 Le bande scure corrispondono alle bande chiare del bandeggio G

 Si colora di scuro il centomero che corrisponde ad una regione di eterocromatina costitutiva

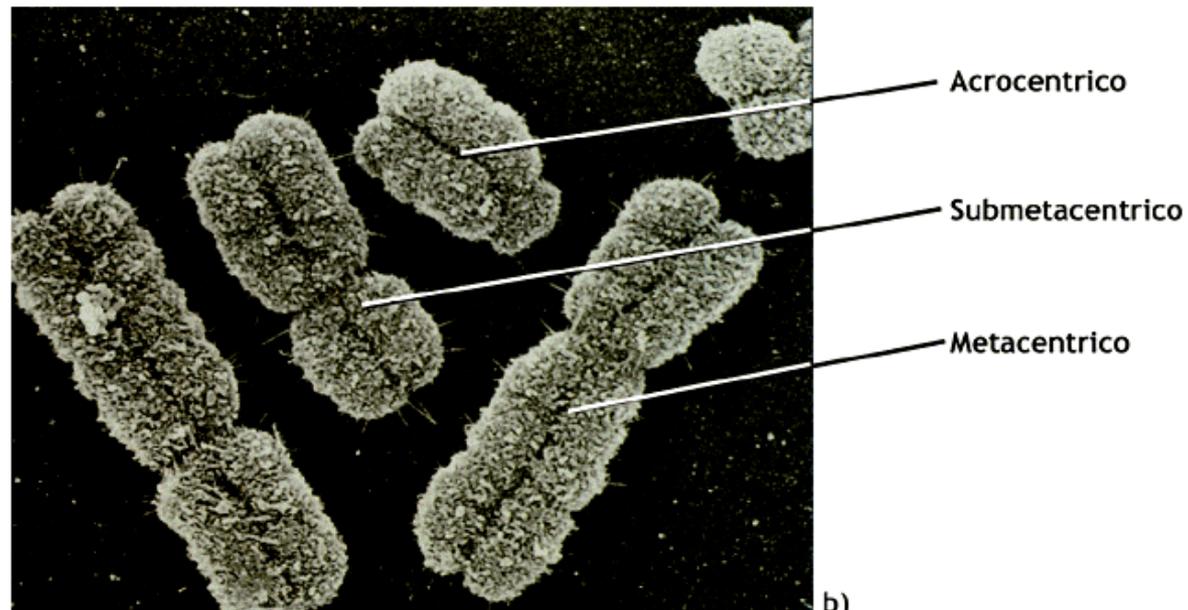


**Figura 10.51** Rappresentazione di un cromosoma umano (n. 1). Si evidenziano centromero, braccio corto (p) e lungo (q), regioni e relative bande numerate; come esempio la freccia indica il locus 1q2.4 cioè posizionato sul cromosoma 1, braccio lungo, regione 2, banda 4.

**Figura 10.50** Bandeggio dei cromosomi. (a) Rappresentazione delle usuali procedure di colorazione dei cromosomi per la preparazione dei cariotipi. (b) Cromosomi umani colorati con Giemsa: in evidenza le bande G. (c) Rappresentazione schematica dell'ideogramma con bande G.



a)



b)

**Figura 10.49** Classificazione generale dei cromosomi basata sulla posizione del centromero. (a) Rappresentazione schematica dei tre tipi di cromosoma; (b) immagine microscopica di una piastra metafase che mostra gli stessi tipi di cromosomi.

# Come si prepara il cariotipo

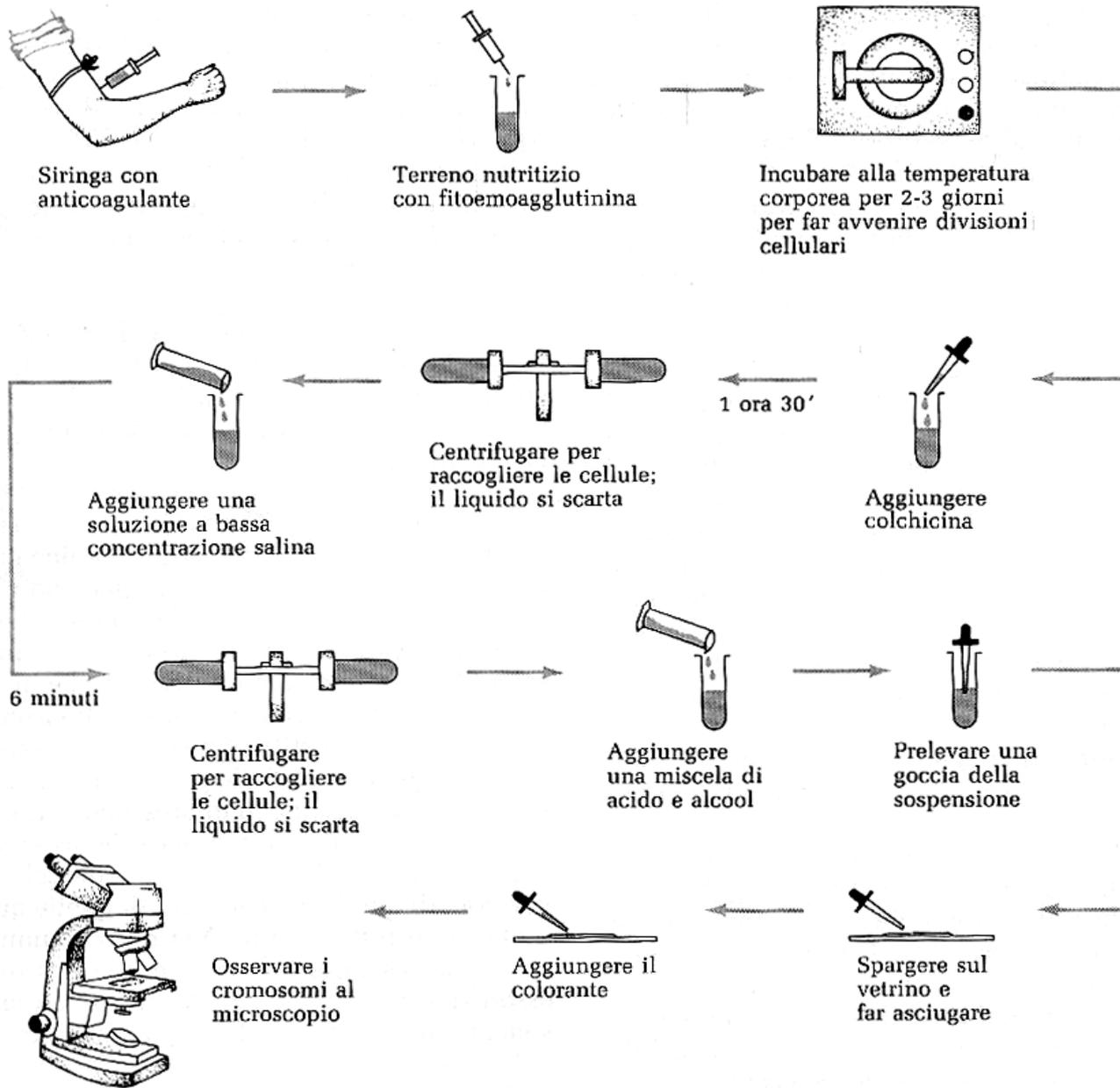
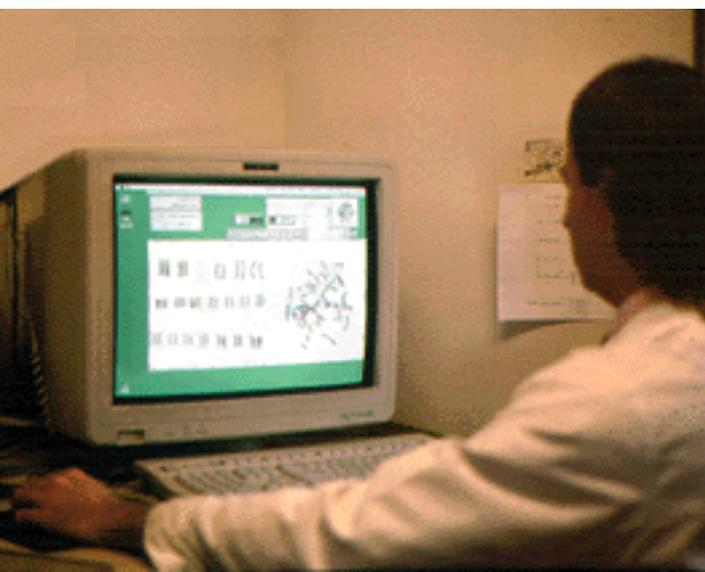
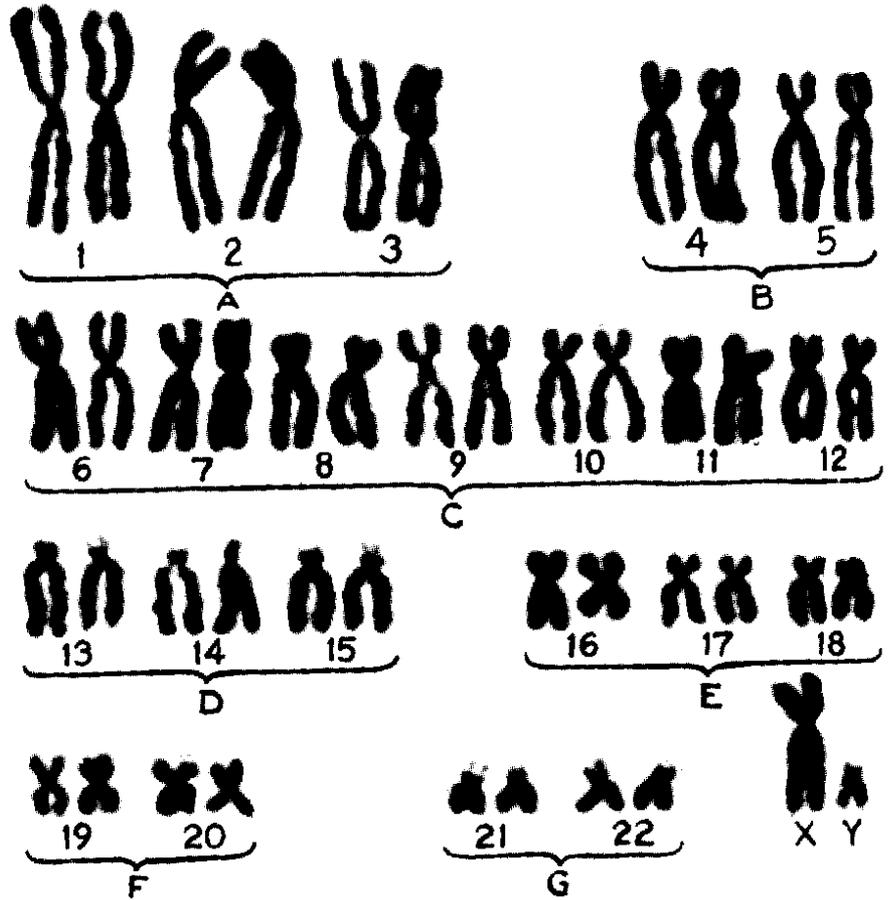


Fig. 2.1. Schema del protocollo sperimentale per visualizzare i cromosomi in metafase mitotica. Si noti la tappa dell'aggiunta di colchicina (per evi-

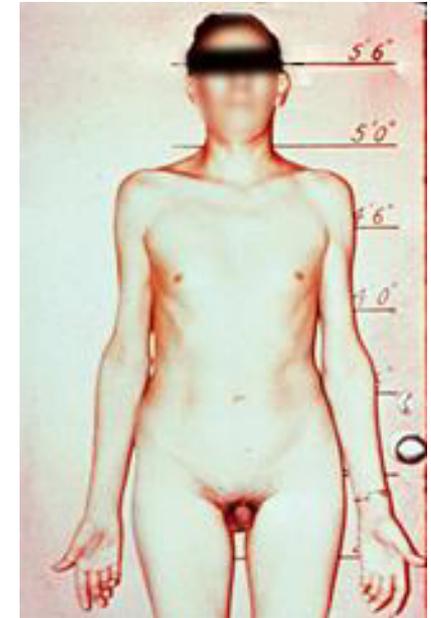
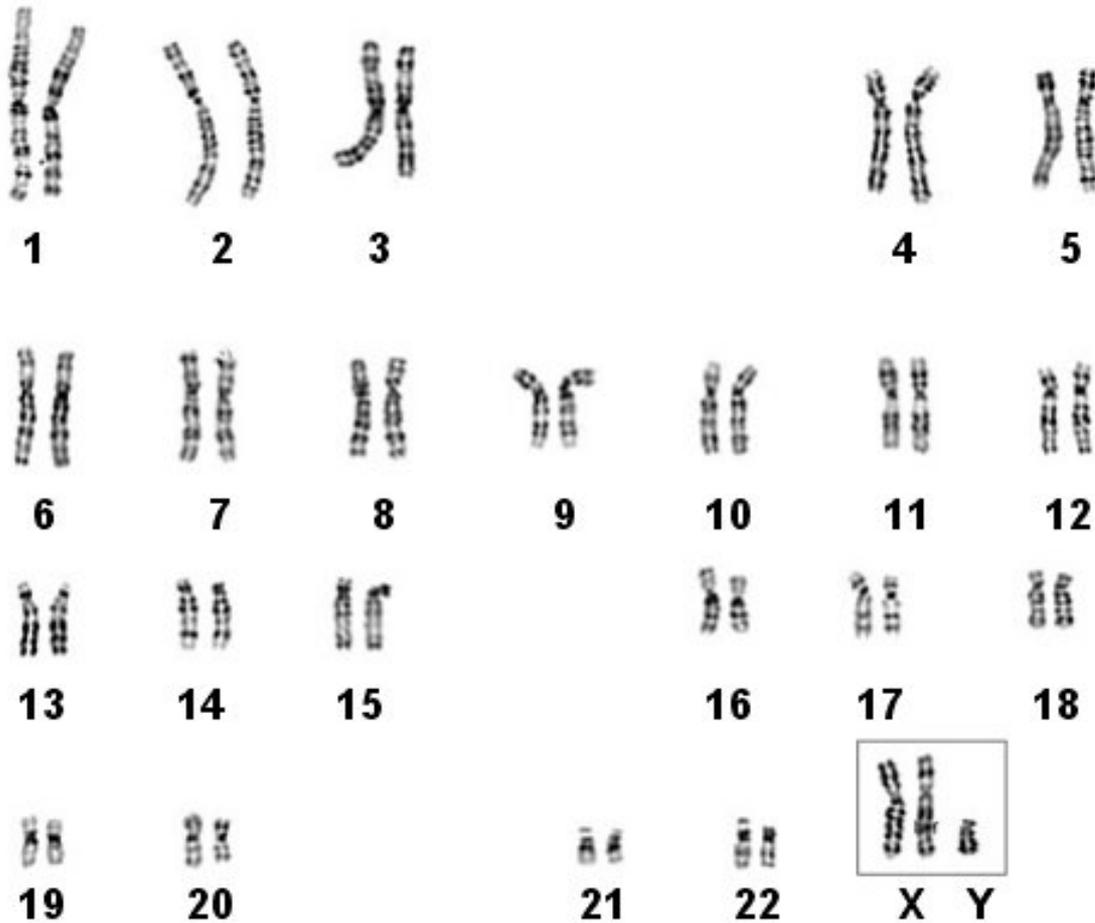
tare la formazione del fuso) e dell'immersione in soluzione a bassa concentrazione salina per far gonfiare le cellule e disperdere i cromosomi.

# Come si prepara il cariotipo



# Anomalie del numero dei cromosomi sessuali

## Sindrome di Klinefelter: XXY



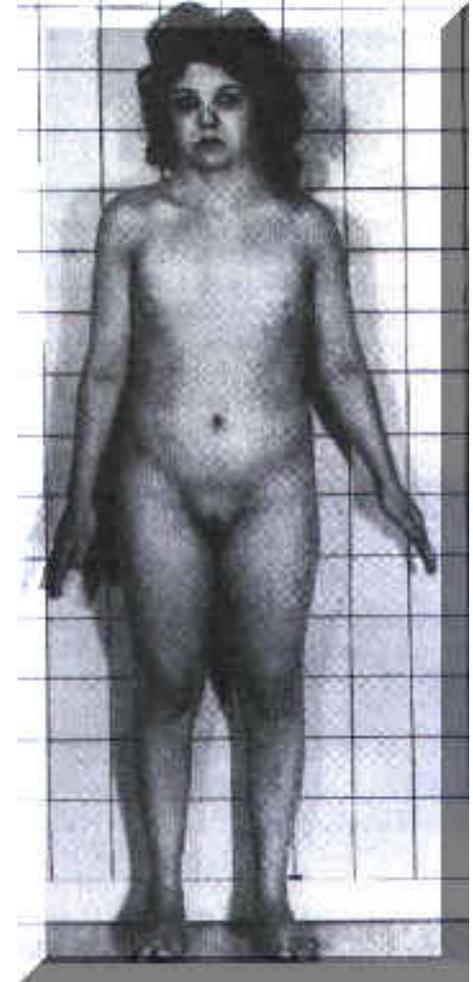
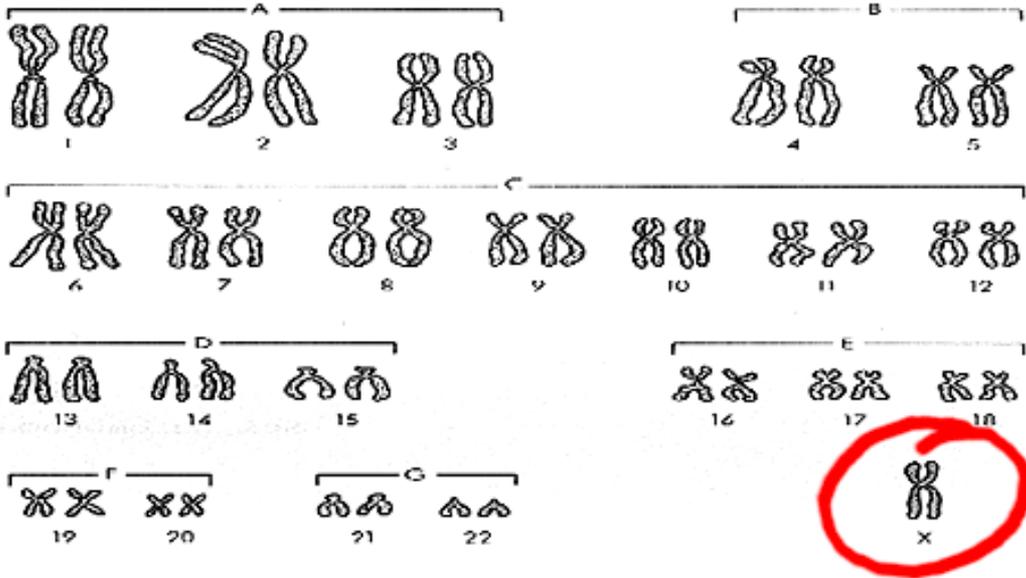
1 ogni 1000

Maschio; tendenza alla statura alta; mancanza di maturazione sessuale, a volte c'è un certo ingrossamento del petto; associato frequentemente a ritardo mentale sterile.

Nei 2/3 dei casi la condizione è il risultato di una non-disgiunzione primaria nella madre che ha prodotto un uovo con due cromosomi X.

# Anomalie del numero dei cromosomi sessuali

## Sindrome di Turner: XO



Femmina; statura bassa; a volte c'è un rialzamento della pelle fra il collo e le spalle; mancanza di maturazione sessuale; capacità mentali pressoché normali; sterile



1 ogni 5000

Dal 15 al 20% dei feti che vanno incontro ad aborto spontaneo e che hanno una anomalia cromosomica rilevabile sono XO e ciò fanno di questa condizione una delle più comuni anomalie cromosomiche fra gli aborti spontanei. Più dell'1% di tutte le gravidanze accertate riguardano embrioni con assetto cromosomico XO e circa i 3/4 di queste sono provocate da spermatozoi anomali privi del cromosoma sessuale.

## Anomalie del numero dei cromosomi sessuali

Alcune fra le anomalie dei cromosomi sessuali più frequenti nell'uomo

Anomalia	Nome della sindrome	Frequenza approssimativa	Sintomi principali
XXX (47,XXX)	Trisomia X	1 ogni 950 neonate femmine	Femmina; fisicamente pressoché normale; tendenza al ritardo mentale; fertile.
XYY (47,XYY)	Sindrome dell'extra Y	1 ogni 950 neonati maschi	Maschio; tendenza alla statura alta; effetti comportamentali incerti; fertile.
XXY (47,XXY)	Sindrome di Klinefelter	1 ogni 1000 neonati maschi	Maschio; tendenza alla statura alta; mancanza di maturazione sessuale, a volte c'è un certo ingrossamento del petto; associato frequentemente a ritardo mentale; sterile.
XO (45,X)	Sindrome di Turner	1 ogni 5000 neonate femmine	Femmina; statura bassa; a volte c'è un rialzamento della pelle fra il collo e le spalle; mancanza di maturazione sessuale; capacità mentali pressoché normali; sterile

## Anomalie del numero dei cromosomi autosomi

La maggior parte delle trisomie degli autosomi e la totalità delle monosomie sono talmente gravi da non essere compatibili con la vita. Il risultato dell'anomalia può essere il mancato impianto della blastocisti, l'aborto spontaneo o un embrione con grossolane malformazioni. Cionondimeno esistono tre trisomie degli autosomi che sono compatibili con lo sviluppo embrionale e con la nascita, che danno però origine a bambini gravemente anormali.

Le più frequenti trisomie cromosomiche tra i nati vivi.

Trisomia	Nome della sindrome	Frequenza approssimativa
13 (47, + 13)	S. di Patau	1 su 5.000
18 (47, + 18)	S. di Edwards	1 su 6.500
21 (47, + 21)	S. di Down	1 su 750

# Anomalie del numero dei cromosomi autosomi

## La sindrome di Down: trisomia 21

1 su 750

Nel 97% dei casi i bambini trisomici sono il prodotto di una non-disgiunzione primaria che ha generato un gamete con due copie del cromosoma 21. Nel 3% uno dei genitori, anche se fenotipicamente normale, è portatore di una mutazione cromosomica che conferisce un alto rischio di trisomia 21 per il figlio.

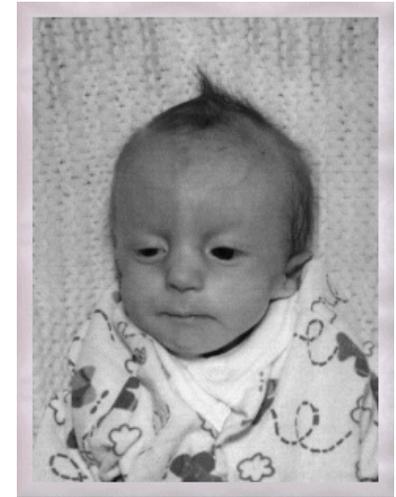
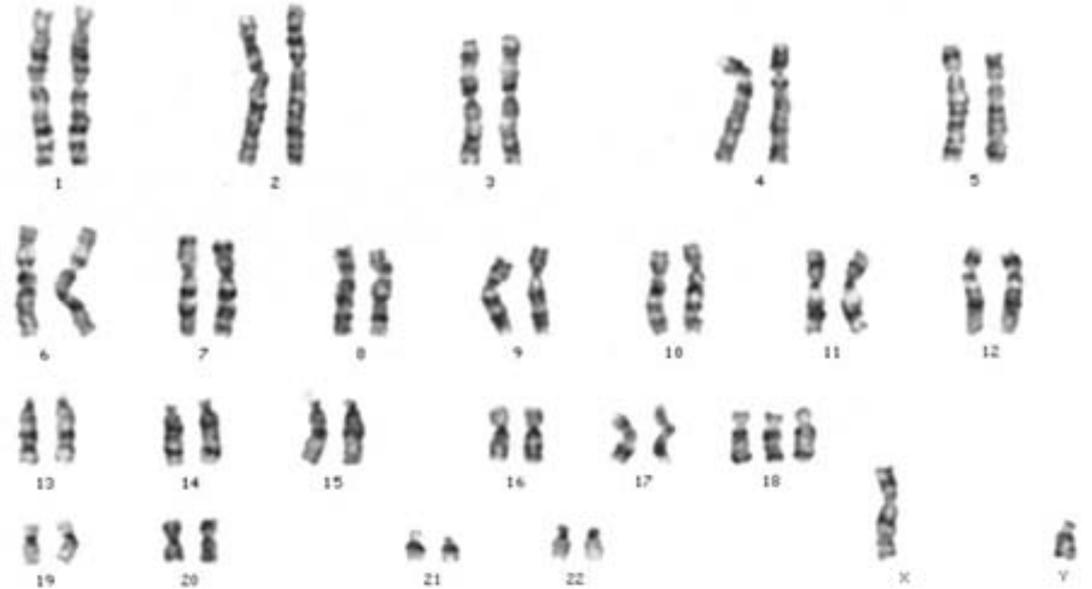


Costantemente ritardati; statura bassa per difetti nella maturazione dell'apparato scheletrico e il tono muscolare è scarso e conferisce un aspetto facciale caratteristico ai bambini più grandi e adulti; il 40% ha difetti cardiaci; molti presentano l'epicanto, una piccola plica cutanea nell'angolo interno dell'occhio vicino alle ghiandole lacrimali che da all'occhio stesso un aspetto orientaloide da cui deriva il nome volgare della malattia: mongolismo.

# Anomalie del numero dei cromosomi autosomi

## La sindrome di Edwards: trisomia 18

1 su 6.500

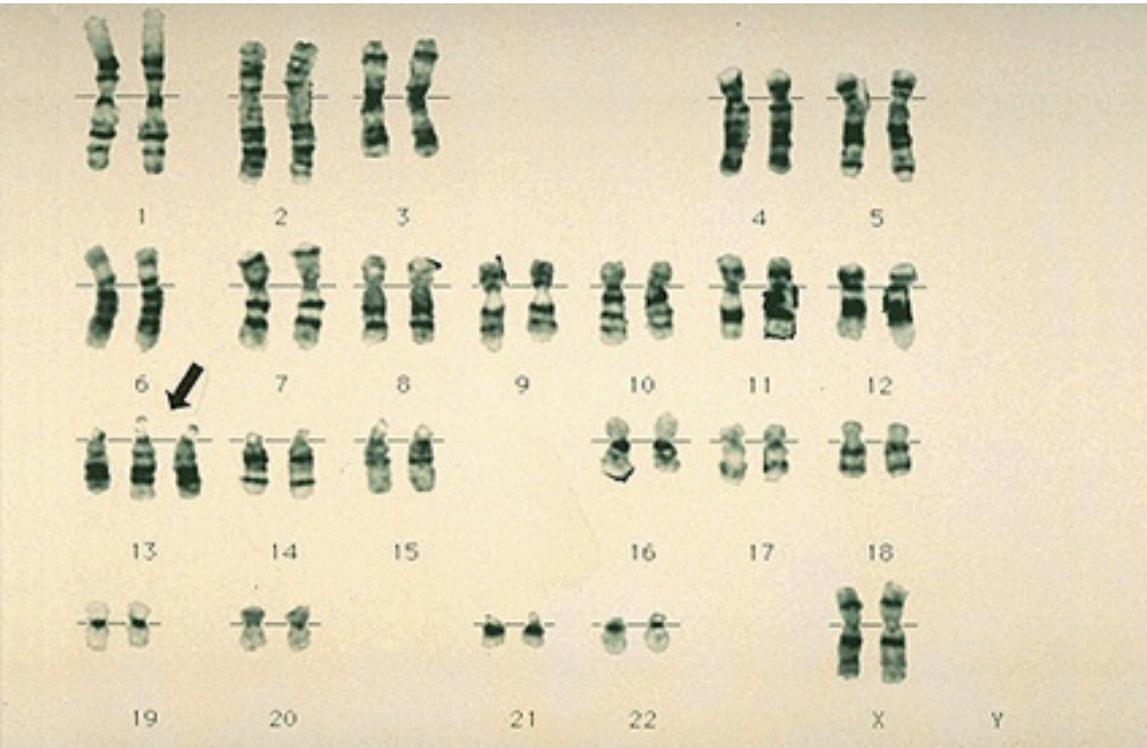


Ritardo fisico e mentale; cranio allungato e orecchie malformate con un basso punto di inserzione; mandibola e cavità orale piccole; dita in posizione anormale con il secondo che si sovrappone al terzo; tutti con difetti cardiaci. Il 65% degli affetti è femmina, probabilmente perché i maschi vanno incontro con maggiore facilità all'aborto spontaneo.

# Anomalie del numero dei cromosomi autosomi

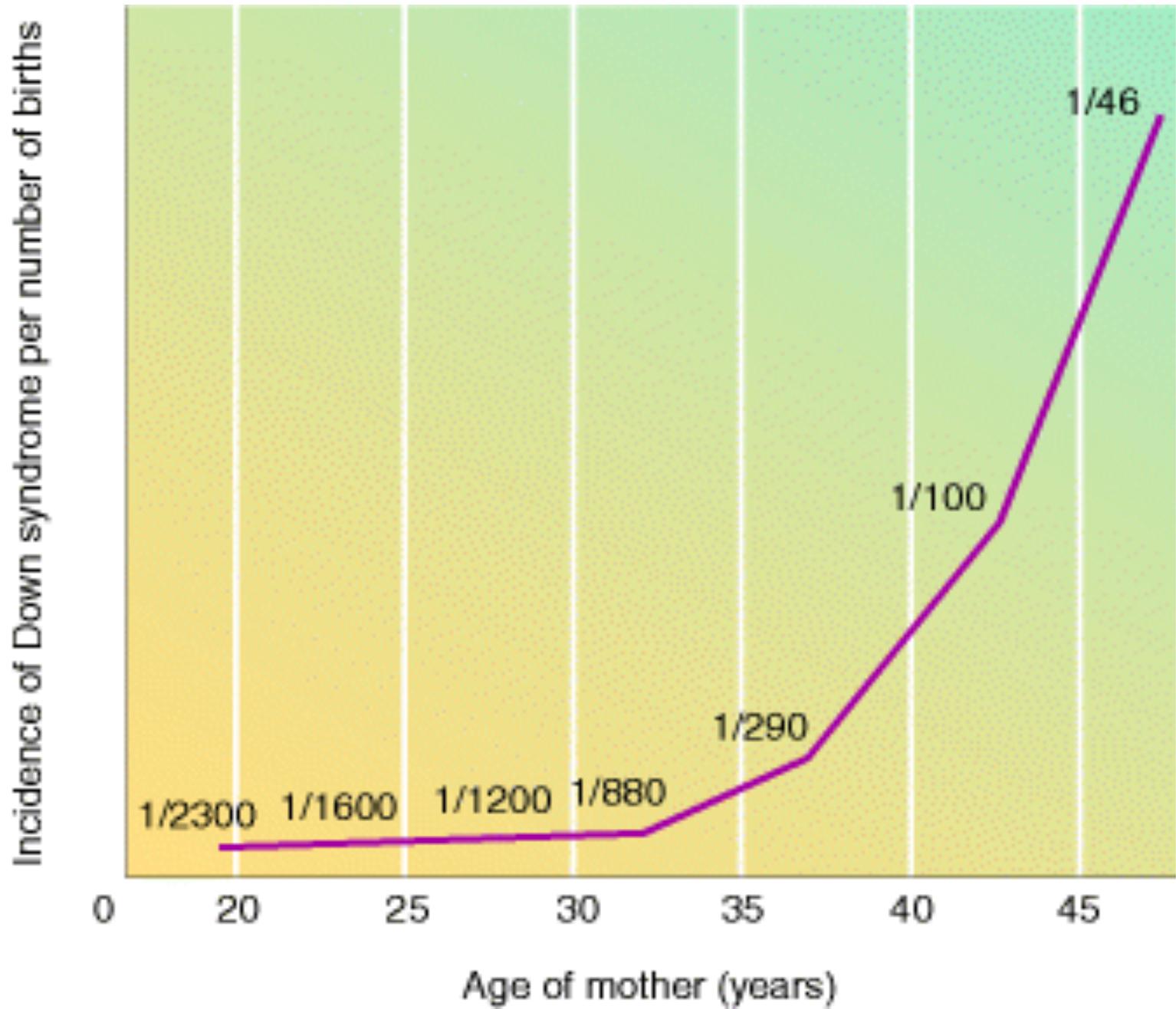
## La sindrome di Patau: trisomia 13

1 su 5.000



Gravemente ritardati mentalmente e fisicamente; cranio e occhi piccoli; orecchie malformate e spesso sordità; nella maggioranza dei casi vi è labioschisi o palatoschisi; dita malformate e sovranumerarie; nel 70% vi sono difetti cardiaci. Rapporto sessi 1:1. Sopravvivenza 3-4 mesi.

## Sindrome di Down ed età materna



Procedura  
transaddominale per  
il prelievo del  
campione

Aspirazione di cellule  
dei villi coriali

Sonda  
ecografica

Tecnica di  
prelievo del  
campione per  
via cervicale

Catetere

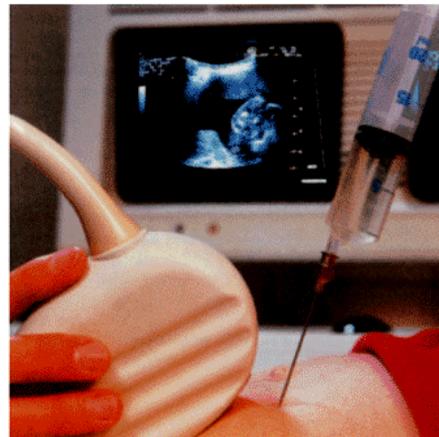
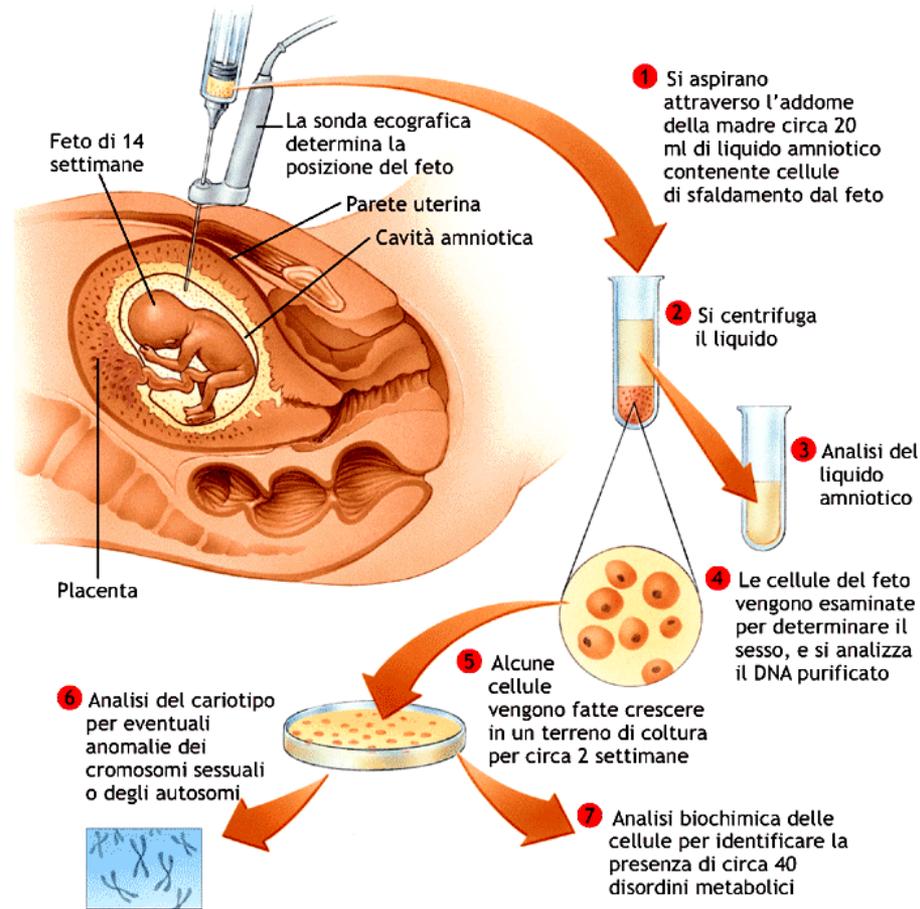
Siringa

Aspirazione di cellule  
di villi coriali

Villi coriali Catetere

Le cellule sono messe in coltura;  
si eseguono test biochimici e la  
cariotipizzazione

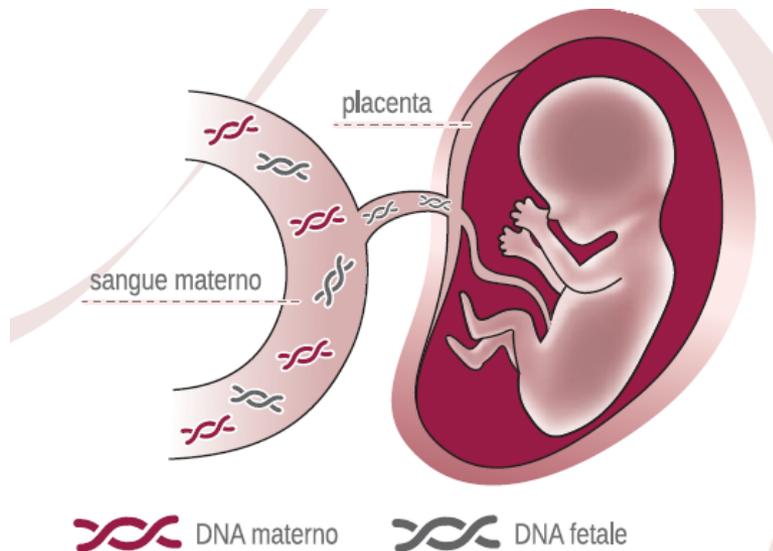
■ **Figura 10.47** **Tecnica di prelievo dei villi coriali.** Attraverso la vagina viene introdotto in utero un catetere con il quale è possibile prelevare un campione di cellule fetali dal corion.



■ **Figura 10.48 Amniocentesi.** La procedura prevede l'inserimento di un ago, attraverso le pareti addominale ed uterina, con il quale è possibile aspirare un campione di liquido amniotico da cui si possono selezionare cellule fetali che, coltivate ed espanse opportunamente, consentiranno le analisi programmate.

# Cell-Free DNA (cfDNA)

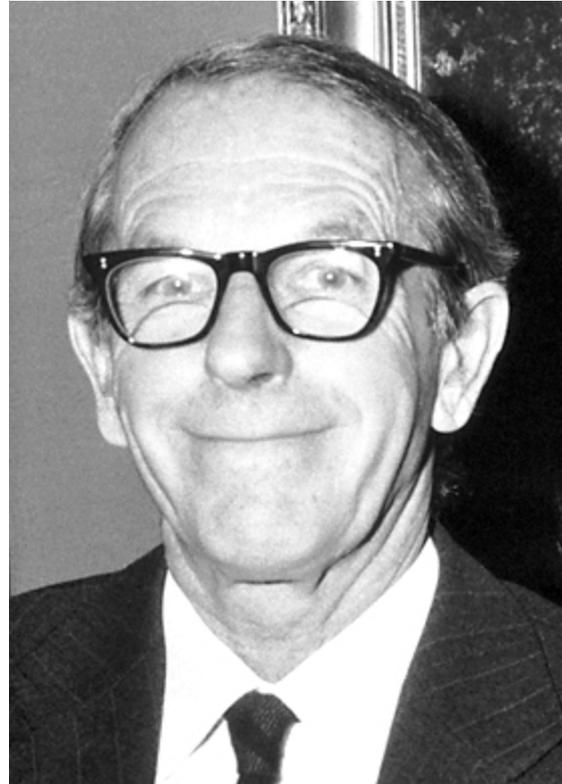
## Test sul DNA libero fetale nel sangue materno



Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997

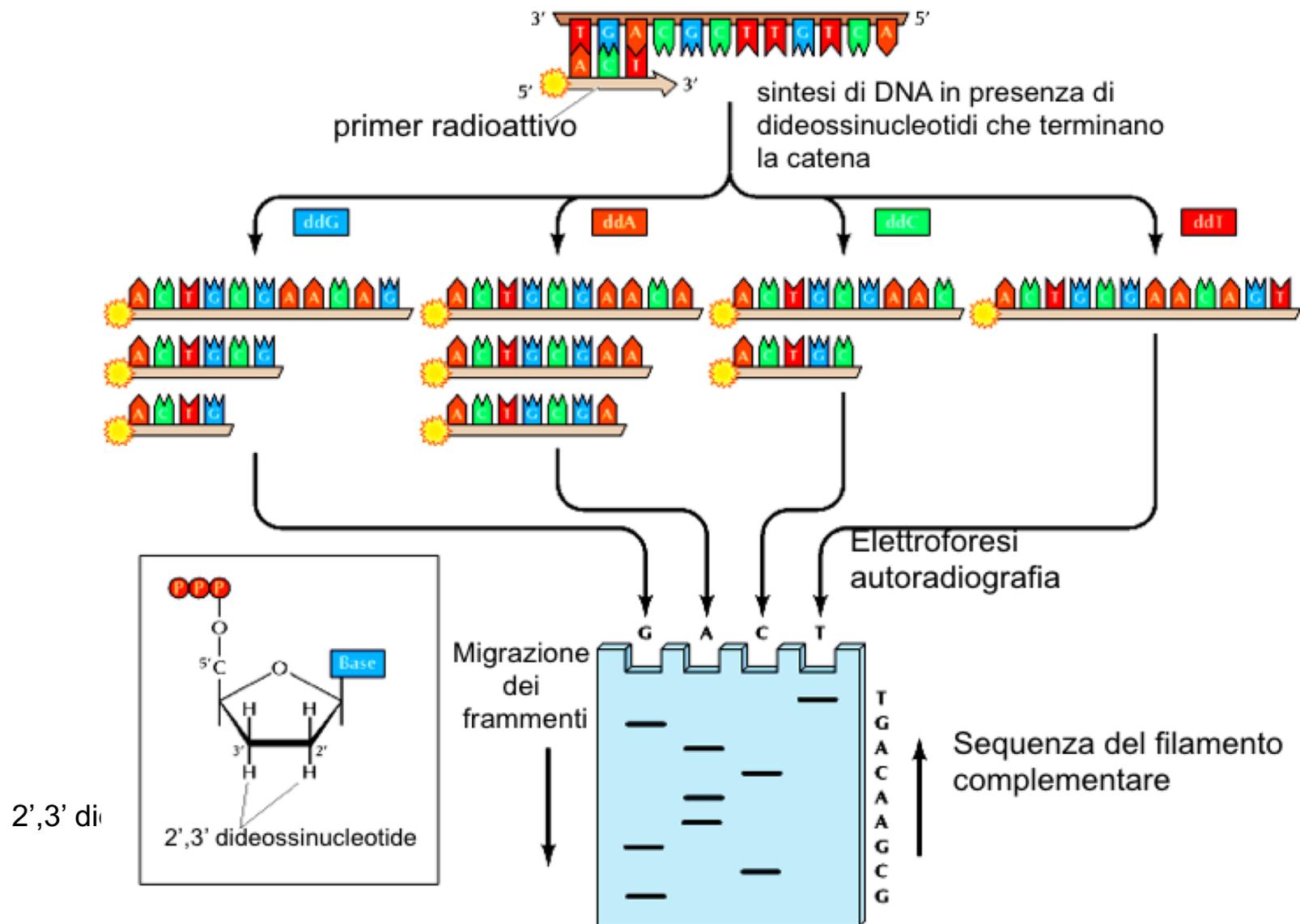
- È un esame non invasivo e privo di rischi eseguito su sangue materno
- È considerato un test probabilistico e non diagnostico
- Analizza il rischio di trisomie fetali più comuni (Trisomia 13, 18, 21)
- Fornisce informazioni sulle aneuploidie X, Y e sul sesso del feto
- Viene eseguito in gravidanza dalla decima settimana di gestazione in poi

# Analisi di mutazioni tramite il sequenziamento del DNA: il metodo di Sanger

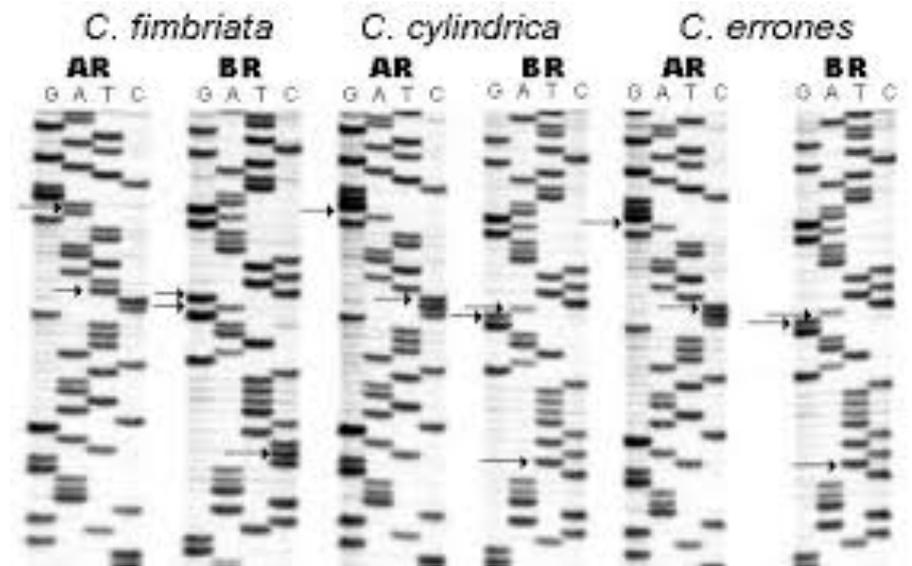


**The Nobel Prize in Chemistry 1980  
Paul Berg, Walter Gilbert, Frederick  
Sanger**

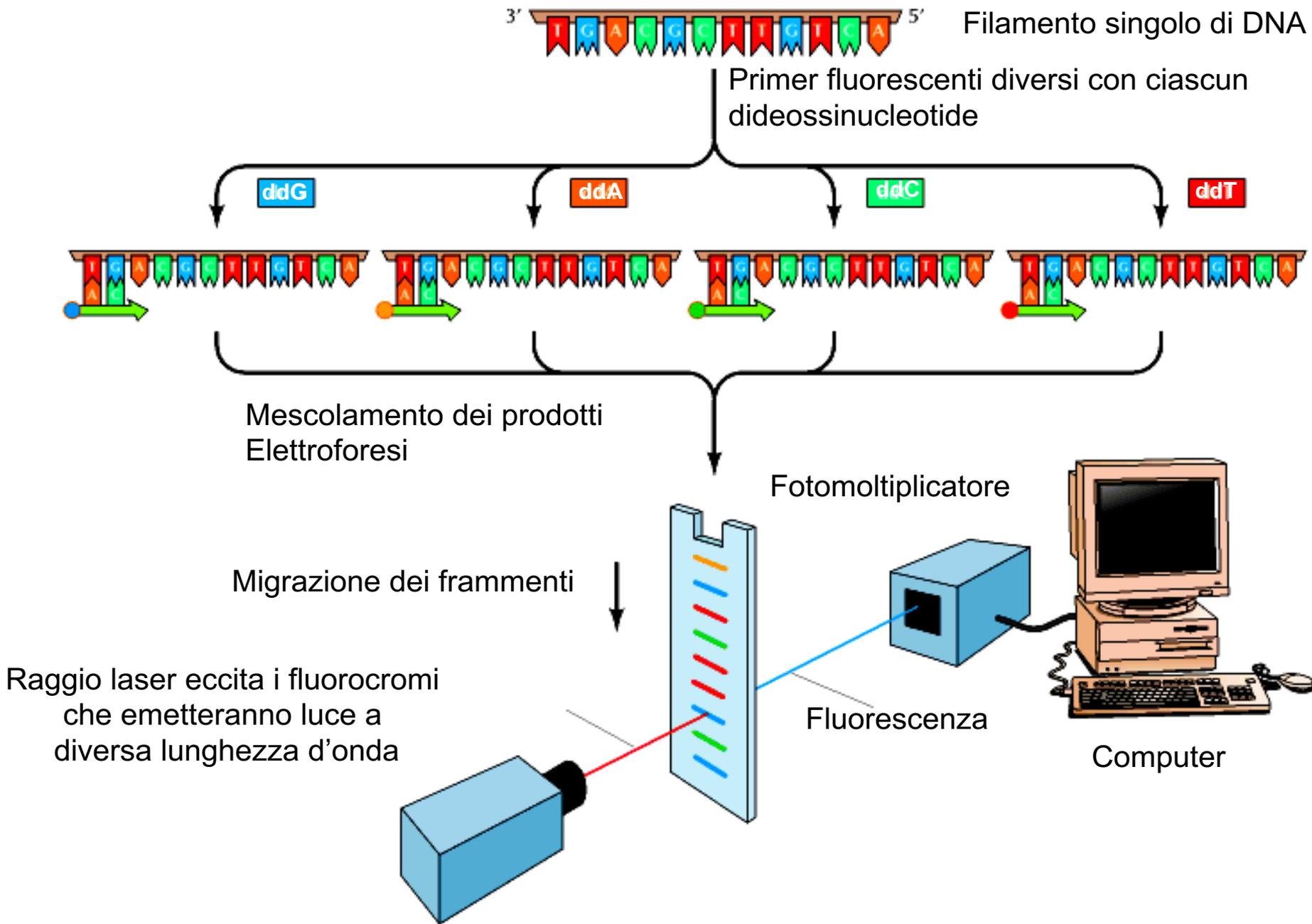
**Il sequenziamento si basa sulla duplicazione del DNA quindi utilizza:  
DNA da sequenziare, enzima (DNA polimerasi), primer, deossinucleotidi**



1000 pb (1 Kb) in 5 giorni



# Sequenziamento automatico del DNA: 1 Kb in 2 giorni

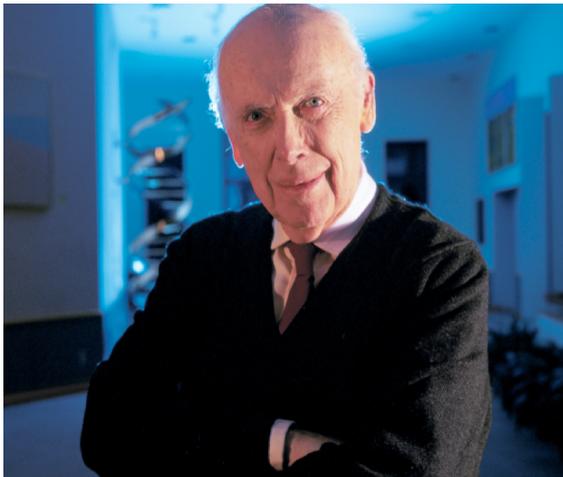


# Human Genome Project

The Human Genome Project (HGP) refers to the International effort, formally begun in October 1990 and completed in 2003 with the aims:

- 1) to determine the complete sequence of the genome
- 2) to discover all the estimated 20,000-25,000 human genes
- 3) to make them accessible for further biological study

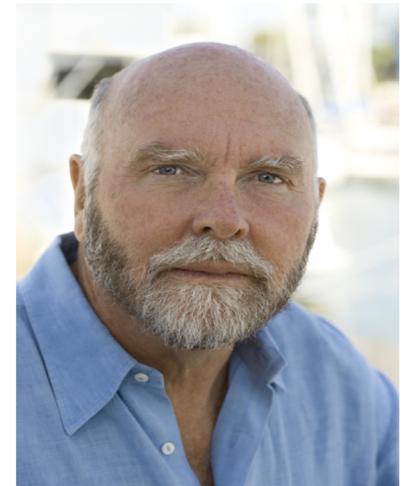
**James Watson**



**Francis Collins (NIH)**



**John Craig Venter (Celera)**



# **NEXT GENERATION SEQUENCING: how to sequence hundreds of millions of short sequences (35bp-100bp) in a single run**

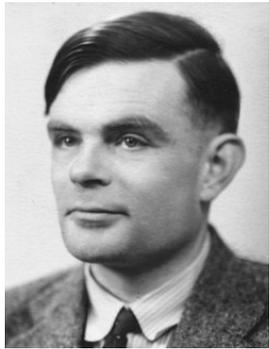
- The Human Genome Project: took 13 years and \$3 billion (Capillary Electrophoresis)
- Sequencing whole genome ( $3 \times 10^9$  pb) today costs \$ 2000 and **it takes one day**

# NEXT GENERATION SEQUENCING

- ❖ E' una tecnica in grado di sequenziare in breve tempo milioni di frammenti di DNA
- ❖ Può essere impiegata per sequenziare
  - il genoma
  - gli esoni
  - il trascrittoma- cioè tutto l'RNA presente nella cellula



# Informatics is needed to deal with very large datasets



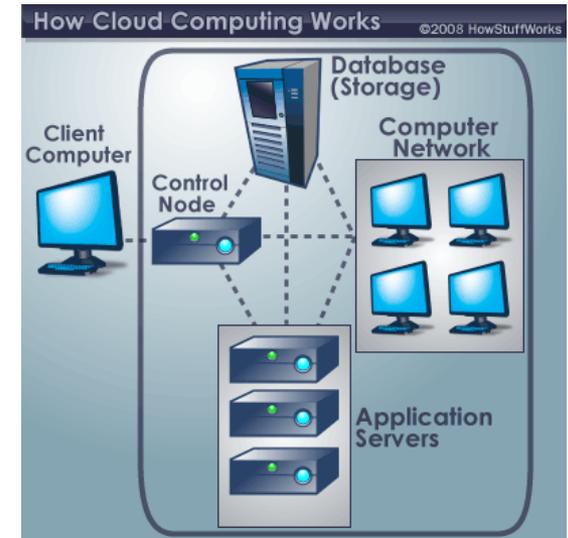
Alan Turing  
(1912-1954)



Steve Jobs  
(1955-2011)



Bill Gates  
(1955-)



Mainframe  
digital  
computers  
1940s



Personal  
computers  
1980s



INTERNET

Cloud  
computing  
2010s

# Medicina personalizzata

L'approccio al trattamento personalizzato (prevede l'utilizzo di strumenti di analisi e test di diagnostica molecolare), con l'obiettivo di:

- 1) conoscere il rischio di insorgenza di una determinata patologia;
- 2) prescrivere i farmaci più adatti e gestire le patologie in modo ottimale per un paziente.

# The Polymerase Chain Reaction: a revolutionary invention



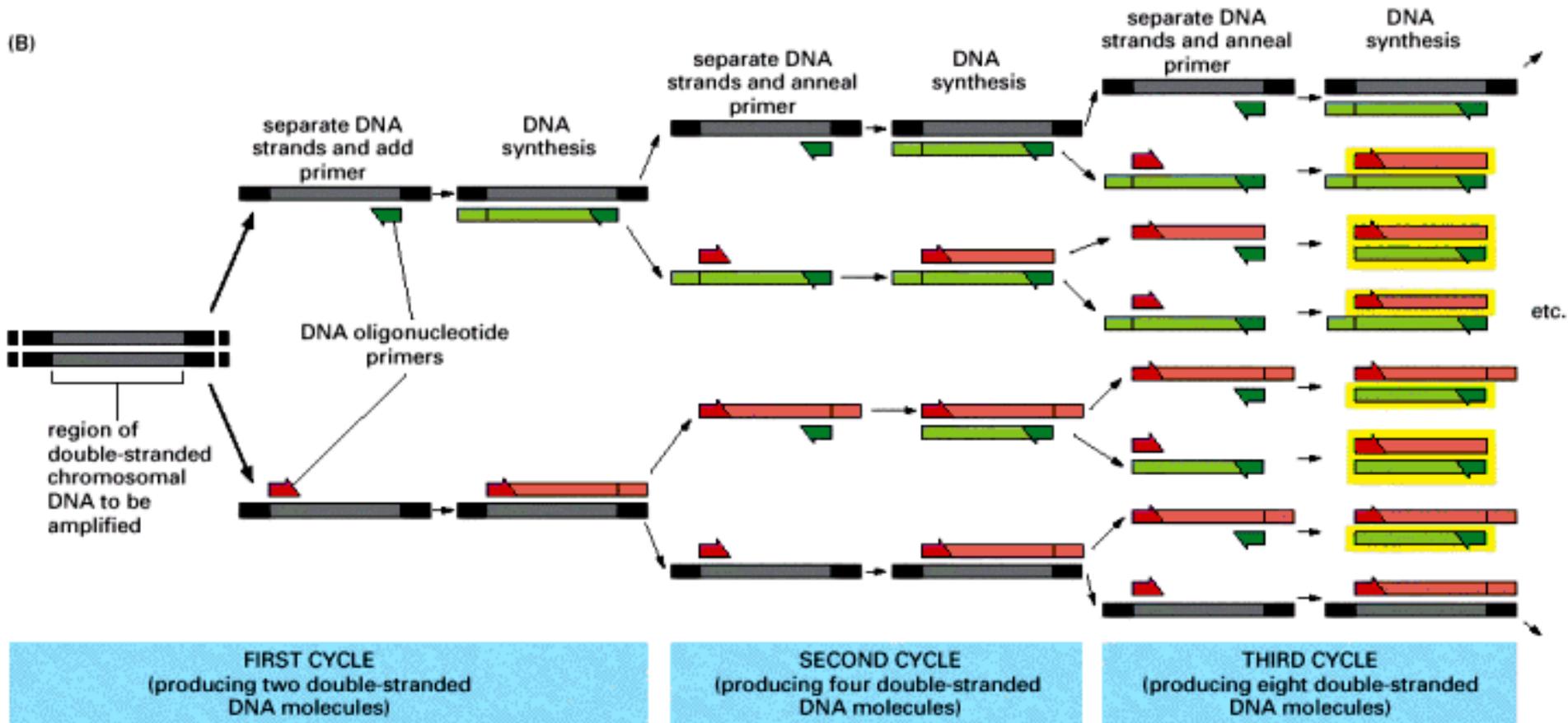
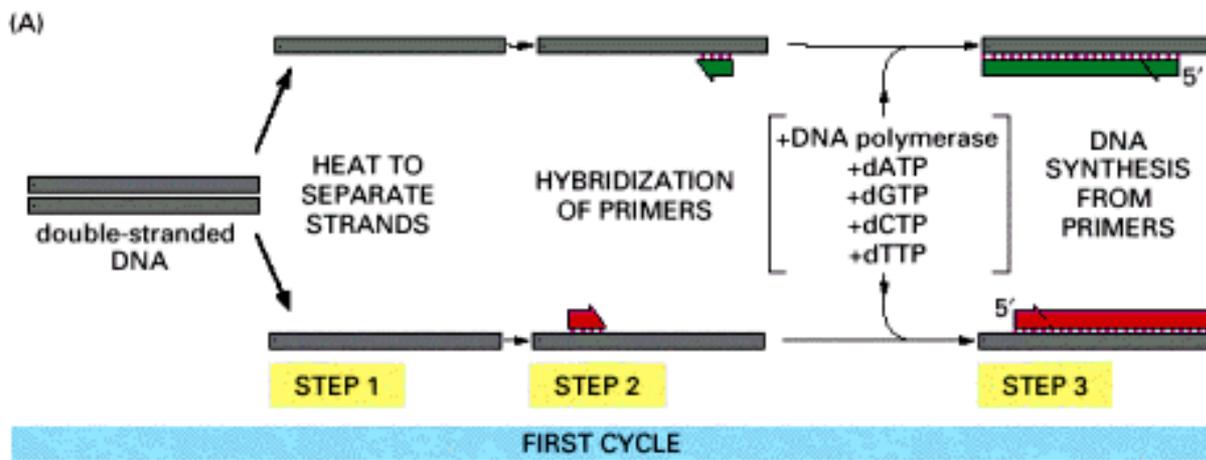
**Kary B. Mullis**  
**Nobel Price Chemistry 1993**

# Yellowstone National Park and the importance of basic research

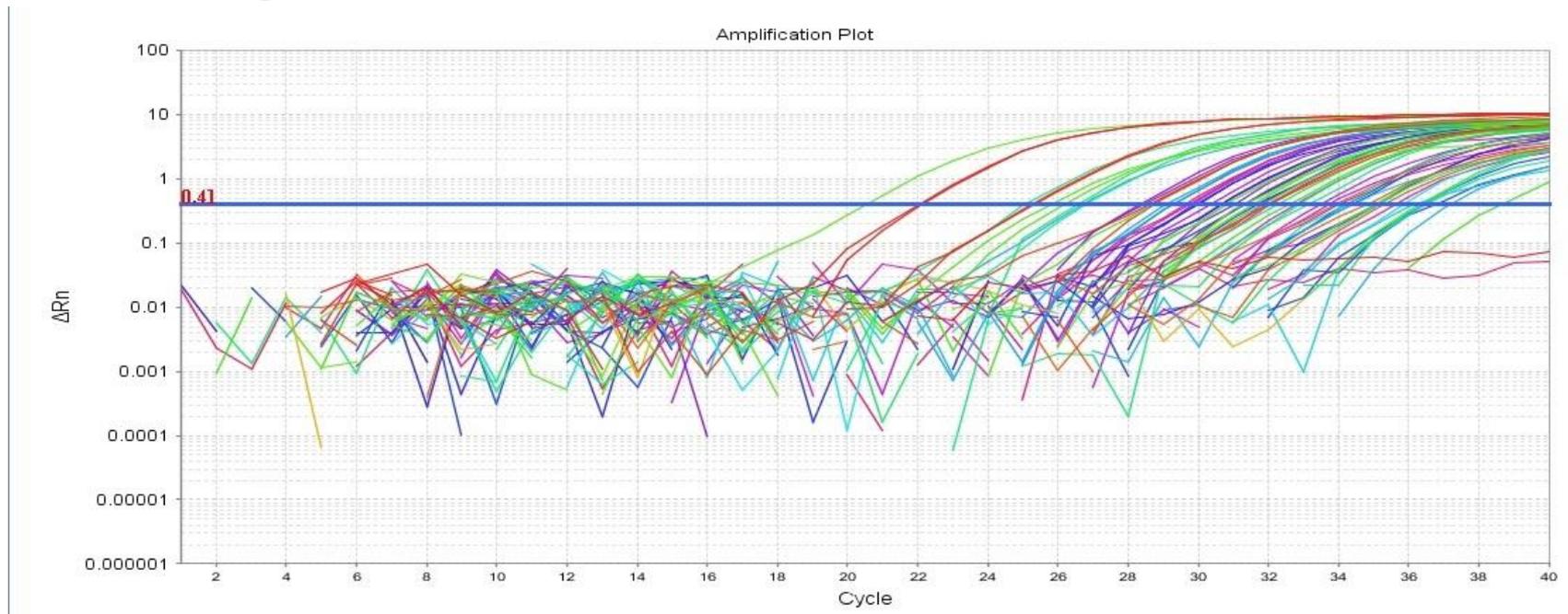


**La Taq polimerasi è stata isolata dai batteri termofili**

# PCR: Polymerase Chain Reaction



# Termociclatore per Polymerase Chain Reaction



# Applicazioni della PCR

- **Analisi della presenza di sequenze virali**
  - **in Pap Smear- HPV**
  - **in linfonodi in pazienti con AIDS-HIV**
- **Presenza di cellule tumorali residue in pazienti oncologici**
- **Test genetici (villi coriali, cellule del sangue, biopsie da tumori)**
- **Analisi forensiche**

# THE CANCER GENOME ATLAS

- The Cancer Genome Atlas (TCGA) coordinated effort to accelerate the understanding of the molecular basis of cancer through the application of genome analysis technologies (33 types of cancer)
- National Cancer Institute (NCI) and the National Human Genome Research Institute (NHGRI)
- September 2008: first results of comprehensive study of **glioblastoma multiforme** (91 tumor samples)
- July 2011: comprehensive characterization of the **ovarian cancer** genome (486 tumors samples)
- July 2012: exome sequencing and gene expression analysis of 276 tumors samples **of colon and rectal cancers**
- November 2015: TCGA study identifies seven distinct subtypes of **prostate cancer**
- April 2018 TCGA publishes the Pan-Cancer Atlas Exit Disclaimer, a collection of cross-cancer analyses delving into overarching themes on cancer using the complete TCGA data set (11000 samples)

## **Clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein : CRISPR-Cas9 : **Taglia e cuci****

CRISPR-Cas9 was adapted from a naturally occurring genome editing system in bacteria.

Researchers create a small piece of RNA with a short "guide" sequence that binds to a specific target sequence of DNA in a genome. The RNA also binds to the Cas9 enzyme. The RNA is used to recognize the DNA sequence, and the Cas9 enzyme cuts the DNA at the targeted location

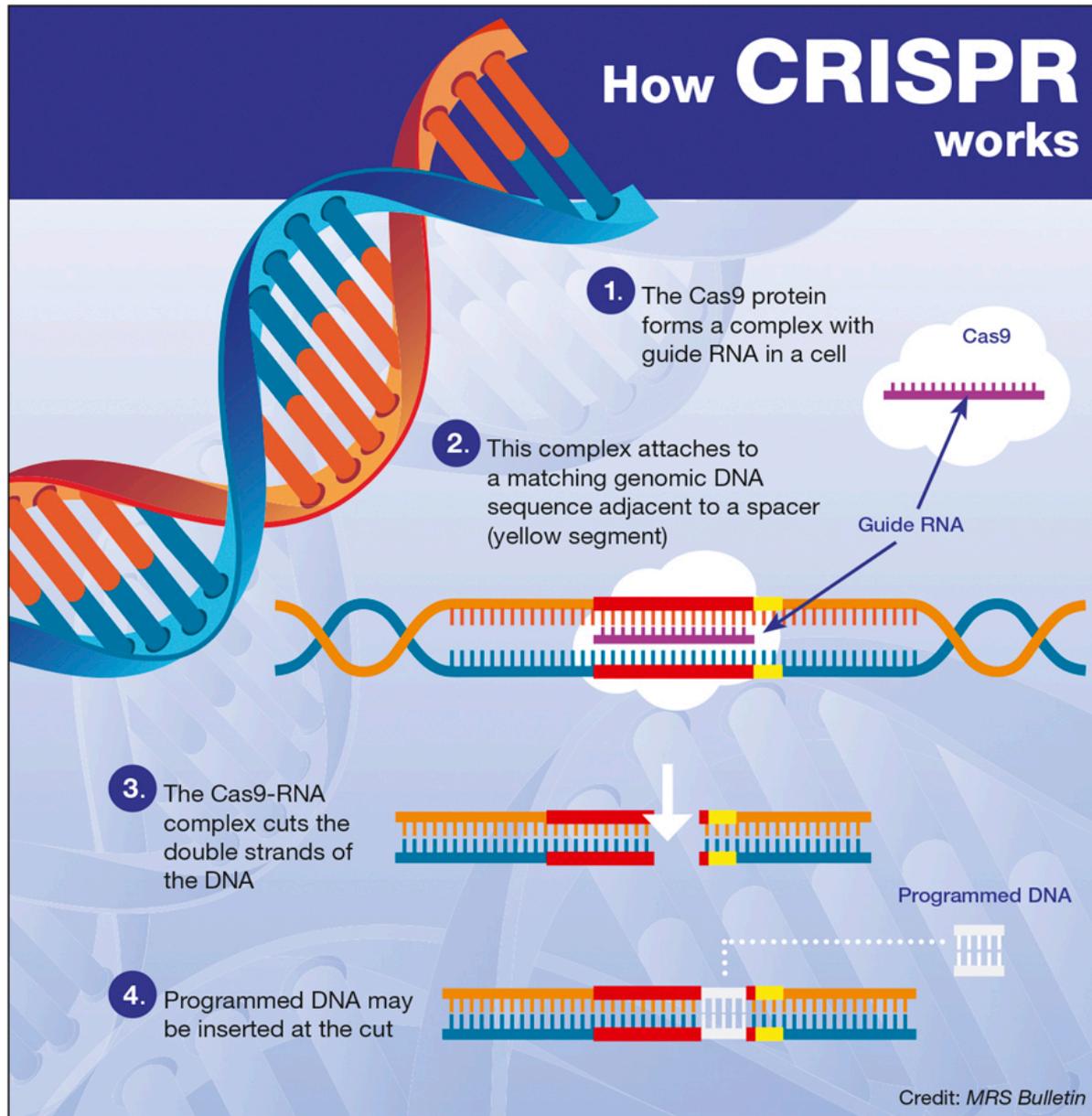
Once the DNA is cut, researchers use the cell's own DNA repair machinery to add or delete pieces of genetic material, or to make changes to the DNA by replacing an existing segment with a customized DNA sequence.

<https://youtu.be/aR8-FHFflgk>

It is being explored in research on a wide variety of diseases, including single-gene disorders such as [cystic fibrosis](#), [hemophilia](#), and [sickle cell disease](#). It also holds promise for the treatment and prevention of more [complex diseases](#), such as cancer, heart disease, mental illness, and human immunodeficiency virus (HIV) infection.

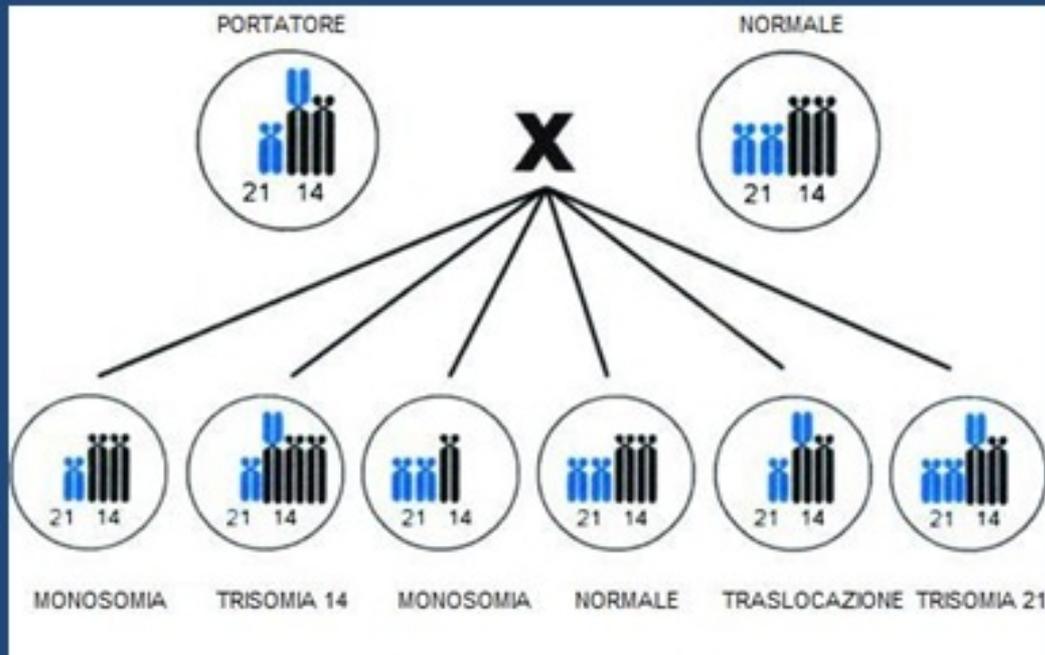
Ethical concerns arise when genome editing, using technologies such as CRISPR-Cas9, is used to alter human genomes.

# How CRISPR works



<https://www.cambridge.org/core/journals/mrs-bulletin/news/crispr-implications-for-materials-science#>

# Traslocazione Robertsoniana



## Traslocazione Robertsoniana

