

Comprende



versione **Ebook**
e **Software**
di simulazione

Maurizio Clementi

Elementi di Genetica Medica

II edizione

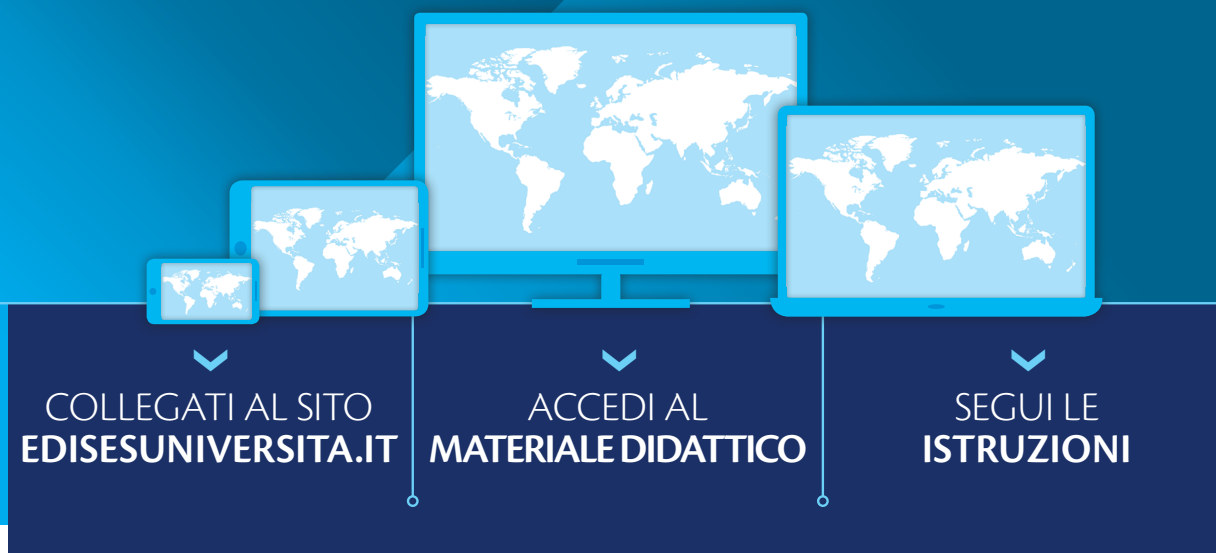
Con la collaborazione di
Matteo Cassina
Elena Di Gianantonio
Leonardo Salviati
Eva Trevisson



Accedi all'ebook e ai contenuti digitali

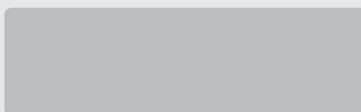
Espandi le tue risorse

un libro che **non pesa**
e si **adatta** alle dimensioni
del **tuo lettore!**



Utilizza il codice personale contenuto nel riquadro per registrarti al sito **edisesuniversita.it** e attivare la tua **area riservata**. Potrai accedere alla **versione digitale** del testo e a ulteriore **materiale didattico**.

Scopri il tuo **codice personale** grattando delicatamente la superficie



Il volume NON può essere venduto, né restituito, se il codice personale risulta visibile.
L'**accesso al materiale didattico** sarà consentito **per 18 mesi**.

Per attivare i **servizi riservati**, collegati al sito **edisesuniversita.it** e segui queste semplici istruzioni

Se sei registrato al sito

- clicca su *Accedi al materiale didattico*
- inserisci email e password
- inserisci le ultime 4 cifre del codice ISBN, riportato in basso a destra sul retro di copertina
- inserisci il tuo **codice personale** per essere reindirizzato automaticamente all'area riservata

Se non sei già registrato al sito

- clicca su *Accedi al materiale didattico*
- registrati al sito o autenticali tramite facebook
- attendi l'email di conferma per perfezionare la registrazione
- torna sul sito **edisesuniversita.it** e segui la procedura già descritta per *utenti registrati*



Ulteriori materiali e strumenti didattici sono accessibili dalla propria **area riservata** secondo la procedura indicata nel frontespizio.

Dalla sezione **materiali e servizi** della tua area riservata potrai accedere a:

- **Ebook:** versione digitale del testo in formato epub, standard dinamico che organizza il flusso di testo in base al dispositivo sul quale viene visualizzato. Fruibile mediante l'applicazione gratuita BookShelf, consente una visualizzazione ottimale su lettori e-reader, tablet, smartphone, iphone, desktop, Android, Apple e Kindle Fire.
- **Software di simulazione:** un vastissimo database di quesiti a risposta multipla per effettuare esercitazioni sull'**intero programma** o su **argomenti specifici**.

L'accesso ai contenuti digitali sarà consentito per **18 mesi**.

ELEMENTI DI GENETICA MEDICA

MAURIZIO CLEMENTI

Con la collaborazione di:

Matteo Cassina
Elena Di Gianantonio
Leonardo Salviati
Eva Trevisson

II Edizione



Maurizio Clementi
Elementi di Genetica Medica - II Edizione
Copyright © 2020 Edises Università s.r.l. – Napoli

9 8 7 6 5 4 3 2 1 0
2024 2023 2022 2021 2020

Le cifre sulla destra indicano il numero e l'anno dell'ultima ristampa effettuata

*A norma di legge è vietata la riproduzione,
anche parziale, del presente volume o di
parte di esso con qualsiasi mezzo.*

L'Editore

*L'Editore ha effettuato quanto in suo potere
per richiedere il permesso di riproduzione
del materiale di cui non è titolare del copy-
right e resta comunque a disposizione di
tutti gli eventuali aventi diritto.*

A cura di

Maurizio Clementi – Università degli Studi di Padova
con la collaborazione di

Matteo Cassina, Elena Di Gianantonio, Leonardo Salviati, Eva Trevisson – Università degli Studi di Padova

Fotocomposizione e progetto grafico

doma book di Di Grazia Massimo – Napoli

Stampato presso la

Tipografia Sograte S.r.l.

Zona Ind. Regnano – Città di Castello (PG)

per conto della

Edises Università s.r.l. – Piazza Dante, 89 – Napoli
Tel. 0817441706/07 Fax 0817441705

www.edisesuniversita.it

info@edisesuniversita.it

ISBN 9788833190723



PREFAZIONE

La Genetica è forse la branca della scienza che ha avuto il più veloce e importante sviluppo nell'ultimo ventennio. Il Progetto Genoma Umano, completato nel 2003, ha fornito ai ricercatori gli elementi di base per la comprensione della struttura del Genoma. I miglioramenti tecnologici e bioinformatici degli anni seguenti hanno permesso di iniziare a comprendere il funzionamento del genoma e i meccanismi biologici alla base delle malattie umane. Non sono mancate sia le difficoltà interpretative sia le “sorpresa” legate alla complessità del funzionamento del genoma. È prevedibile un ulteriore importante e rapido sviluppo nei prossimi anni. In particolare, è atteso nel prossimo decennio il trasferimento delle conoscenze ottenute in laboratorio alla pratica clinica, in ambito diagnostico, prognostico e terapeutico.

Per questo è ambizioso il progetto di preparare un libro di introduzione alla Genetica Medica. La rapidità con cui si accumulano nuove conoscenze rischia di rendere qualunque libro non adeguatamente aggiornato.

Tenendo conto di queste limitazioni, abbiamo scritto questo libro per fornire una base per gli studenti delle Scuole di Medicina e Biologia che intraprendono gli studi di Genetica.

Questo volume è particolarmente ricco di schemi, tabelle e immagini che possono aiutare lo studente nella comprensione di concetti a volte complessi. Ha un indirizzo decisamente didattico e introduce in maniera semplice e diretta alla complessità dello studio della Genetica Medica. Le informazioni dei vari capitoli forniscono non solo le conoscenze di base, ma anche quelle relative agli sviluppi della ricerca applicata alla Genetica Medica, consentendo allo studente di affrontare lo studio di argomenti specifici o la comprensione di articoli scientifici.

La possibilità di avere la versione digitale del testo e di applicativi per integrare il libro con altre fonti (lezioni, diapositive, articoli scientifici) è un ulteriore elemento che rende più agevole ed efficace lo studio della materia.

Gli Autori

INDICE GENERALE

Capitolo 1

IL GENOMA UMANO

Il genoma umano

1

2

Capitolo 2

MUTAZIONI

Classificazione

Mutazioni spontanee ed indotte. Agenti mutageni

8

9

9

- Mutazioni spontanee: errori durante la replicazione del DNA 10
- Mutazioni indotte 13

Capitolo 3

POLIMORFISMI

Polimorfismi a livello del DNA

16

17

- Polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP) 17
- Polimorfismi di restrizione (RFLP) 17
- Polimorfismi di ripetizione (VNTR) 18
- Microsatelliti o STR 18
- Variazioni del numero di copie o CNV (Copy Number Variations) 19

Capitolo 4

MALATTIE GENETICHE E LORO FREQUENZA

Malattie genetiche

Frequenza delle malattie genetiche

21

22

22

Capitolo 5

TECNICHE DI INDAGINE MOLECOLARE

Materiale da utilizzare e tecniche di base

24

25

Metodi di ricerca di mutazioni

31

- Analisi indiretta 31
- Analisi diretta 31
- Analisi di mutazioni note 32
- Analisi di mutazioni ignote 32
- Tecniche quantitative (Southern, RQ-PCR, MLPA) 34

Sequenziamento e next generation sequencing

36

Capitolo 6

CROMOSOMI

44

Ciclo cellulare

45

Mitosi

45

Meiosi

47

- Meiosi I 47
- Meiosi II 50

Gametogenesi

50

Cromosomi, cariotipo ed esame cromosomico

53

- Bandeggio 57
- Esame cromosomico standard e ad alta risoluzione 58
- Cromosomi sessuali X e Y 61

Capitolo 7

MALATTIE CROMOSOMICHE

66

Frequenza delle anomalie cromosomiche

67

Classificazione delle anomalie

- cromosomiche 67
- Classificazione per sede 67
- Classificazione per tipo 69

Crossing over ineguale

79

Non-disgiunzione ed età materna

82

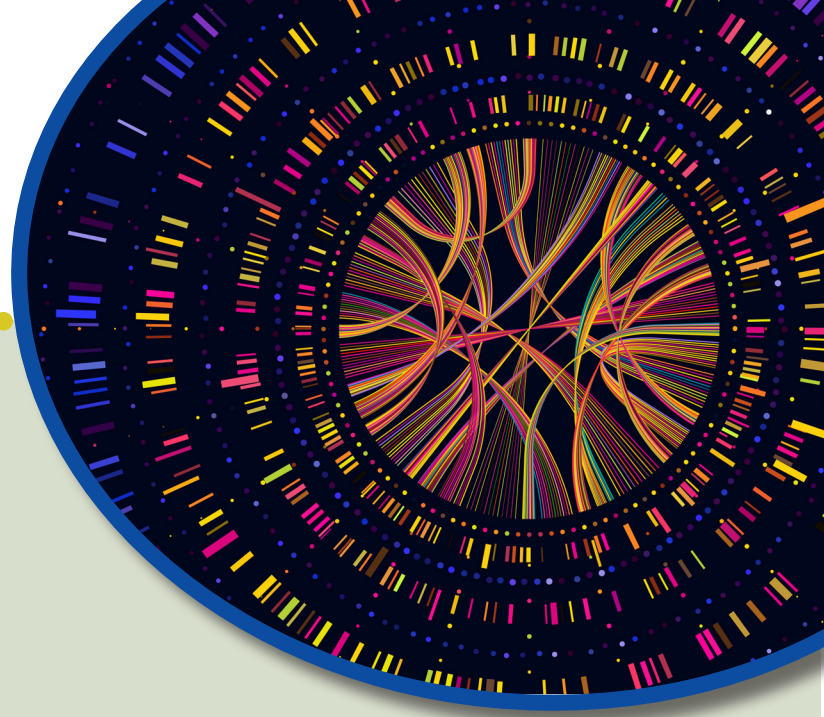
Effetti fenotipici delle anomalie cromosomiche

82

Alcune sindromi cromosomiche	84	Sindrome dell'X fragile	127
• Sindrome di Down	84	Atassia di Friedrich	129
• Sindrome di Turner	84	Distrofia miotonica	129
• Sindrome di Klinefelter	84		
• Sindrome XYY	85		
 Capitolo 8		 Capitolo 11	
TECNICHE DI STUDIO		MALATTIE COMPLESSE	
DEI CROMOSOMI	86	E IDENTIFICAZIONE DEI GENI	
		DI SUSCETTIBILITÀ	130
Tecniche di citogenetica classica	87	Malattie complesse o multifattoriali	131
Tecniche di citogenetica molecolare	87	Identificazione dei geni di suscettibilità	
• FISH (Fluorescent <i>In Situ</i>		alle malattie complesse	133
Hybridization)	87	• Analisi di linkage	133
• Array-CGH	90	• Studi di associazione	135
 Capitolo 9		 Capitolo 12	
MALATTIE MONOGENICHE	95	IL TUMORE COME MALATTIA GENETICA	137
Malattie monogeniche	96	Oncogeni e proto-oncogeni	140
Malattie autosomiche dominanti	104	Oncosoppressori	142
• Penetranza ed espressività	105	Geni mutatori	145
• Mutazioni <i>de novo</i>	106	Riarrangiamenti cromosomici e cancro	147
• Mosaicismo gonadico	107	Tumori con predisposizione ereditaria	148
Malattie autosomiche recessive	109	Il retinoblastoma: un modello della	
Trasmissione X-linked ed inattivazione del		cancerogenesi	150
cromosoma X	112	Applicazione clinica	151
Malattie X-linked recessive	113		
Malattie X-linked dominanti	116	 Capitolo 13	
Malattie legate al cromosoma Y	116	CONSULENZA GENETICA	152
 Capitolo 10		Metodologia	153
EREDITÀ NON MENDELIANA	118	Motivi delle richieste di consulenza	
Malattie mitocondriali	119	genetica	154
• Eredità materna	121	Anamnesi familiare	154
• Eteroplasmia	121		
• Effetto soglia	122	 Capitolo 14	
• Segregazione casuale	122	DIAGNOSI PRENATALE	
• Manifestazioni cliniche	122	NON INVASIVA E INVASIVA	156
• Rischio di ricorrenza	122	Diagnosi prenatale invasiva	157
Imprinting e disomia uniparentale	123	• Tecniche di prelievo di materiale	
Mutazioni dinamiche	125	embrio-fetale	157
		• Diagnosi prenatale citogenetica	158

Diagnosi genetica preimpianto	161	Metodi per identificare i teratogeni	
Indicazioni	161	nell'uomo	171
PGD per malattie monogeniche	161	• Studi sugli animali	171
Diagnosi prenatale non invasiva	161	• Case-report e studi epidemiologici	171
• Test biochimici	161	Farmacocinetica in gravidanza	172
• Ecografia	162	Consulenza teratologica	172
• Non Invasive Prenatal Testing (NIPT)	162	Farmacogenomica	172
 Capitolo 15		 Capitolo 17	
TEST GENETICI	165	GENETICA DI POPOLAZIONE	174
Tipi di test genetici	166	Stima delle frequenze alleliche	175
• Test diagnostici	166	Legge di Hardy-Weinberg	176
• Test preclinici (presintomatici)	166	• Assunzioni della legge di Hardy-Weinberg e costanza delle frequenze alleliche	176
• Test predittivi o di suscettibilità	166		
• Test di screening	167		
Limiti dei test genetici	167	QUESTIONARIO	181
 Capitolo 16		GLOSSARIO	187
TERATOLOGIA	168	BIBLIOGRAFIA	191
Cosa sono i teratogeni	169	INDICE ANALITICO	193
Principi di base della teratologia clinica	170		

3



POLIMORFISMI

Polimorfismi a livello del DNA

Polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP)

Polimorfismi di restrizione (RFLP)

Polimorfismi di ripetizione (VNTR)

Microsatelliti o STR

Variazioni del numero di copie o CNV (Copy Number Variations)

I genomi di organismi appartenenti a una stessa specie presentano delle differenze nella sequenza nucleotidica, che sono riconducibili ad eventi mutazionali.

In generale per **polimorfismo** s'intende l'esistenza di **differenze tra individui**, sia a livello del DNA (polimorfismi del DNA) sia a livello delle proteine prodotte (polimorfismi proteici).

Un locus è considerato polimorfico se presenta almeno due alleli dei quali il più raro ha una frequenza maggiore dell'1%. Gli alleli con una frequenza minore dell'1% sono detti invece **varianti rare** e sono quelli a cui è riconducibile la maggioranza delle malattie genetiche.

Polimorfismi a livello del DNA

I polimorfismi proteici (ossia le differenze a carico di porzioni genomiche codificanti proteine) rappresentano solo una piccola quota, intorno al 5%, della **variabilità genetica**. La grande **diversità genetica** presente in una popolazione, da cui deriva l'**unicità genetica** di ogni individuo, è quindi da attribuire sostanzialmente ai polimorfismi del DNA che interessano per la maggior parte il DNA non codificante e di conseguenza non sono apprezzabili a livello fenotipico. È stato, comunque, dimostrato che il DNA di due individui non imparentati differisce per circa un nucleotide ogni 1000 e differenze si osservano anche a carico delle sequenze ripetute sia relativamente alla lunghezza che al numero di copie.

Riassumendo, una sequenza di DNA può esistere in forme diverse, che possono essere identificate grazie a varie procedure, quali Southern blotting, PCR, DNA chip.

Molti polimorfismi costituiscono importantissimi **marcatori genetici**, essendo forme alleliche facilmente distinguibili e quindi comparabili ad alleli **codominanti** di un locus mendeliano (assenza di dominanza e recessività).

Di seguito analizzeremo i principali tipi di polimorfismi:

- **polimorfismi di singoli nucleotidi** o **SNP** (*Single Nucleotide Polymorphism*);
- **polimorfismi di restrizione** o **RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione);
- **polimorfismi di ripetizione** o **minisatelliti** o **VNTR** (*Variable Number of Tandem Repeats*, numero variabile di ripetizioni in tandem);

- **sequenze microsatelliti** o **STR** (*Short Tandem Repeats*, ripetizioni brevi in tandem);
- **variazioni del numero di copie** o **CNV** (*Copy Number Variations*).

Polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP)

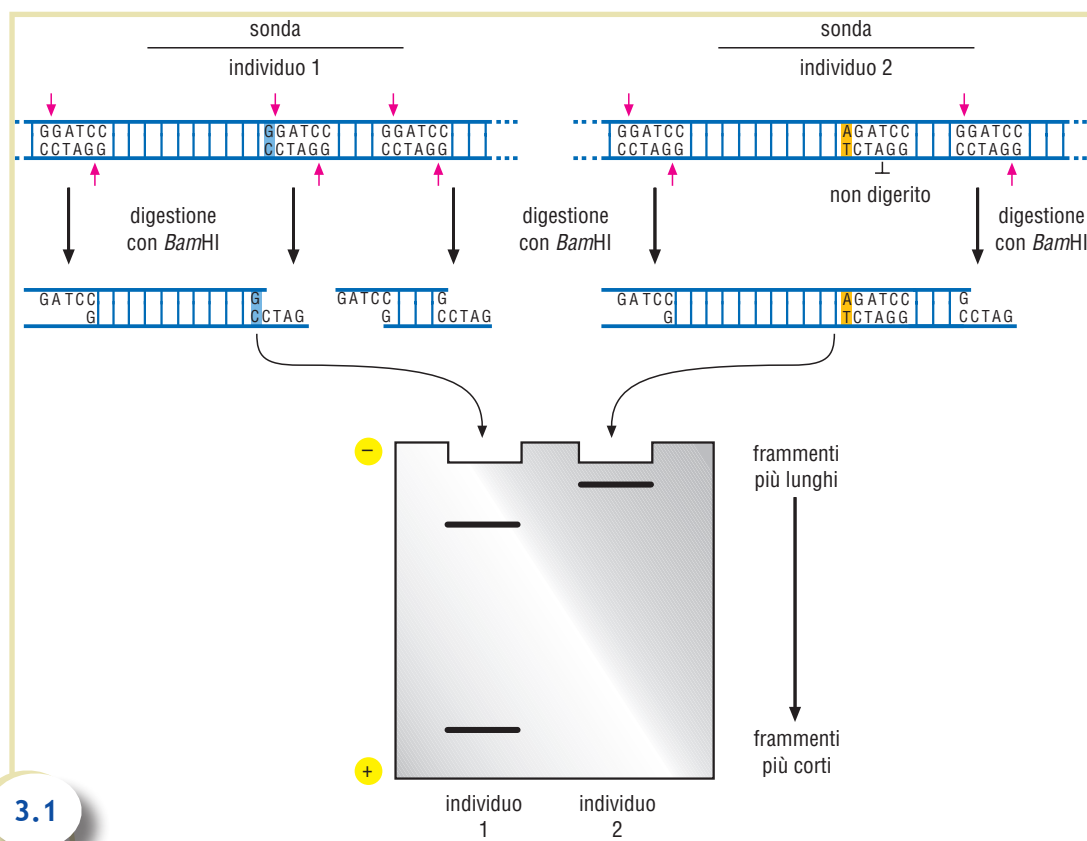
Per **polimorfismo di un singolo nucleotide (SNP)** s'intende la variazione di un singolo nucleotide in un locus. Tale classe rappresenta senz'altro il tipo di polimorfismo più comune: il sequenziamento del genoma umano ha evidenziato, infatti, che tra due individui non imparentati esiste una differenza nucleotidica ogni circa 1000 nucleotidi. L'ibridazione ad alta stringenza con oligonucleotidi specifici consente la tipizzazione degli alleli di un SNP e quindi con l'impiego di microarray è possibile tipizzare simultaneamente centinaia di migliaia di SNP. Oggi le moderne tecniche permettono di analizzare tutti gli SNP presenti in un genoma.

Polimorfismi di restrizione (RFLP)

L'analisi di genomi di individui diversi ha dimostrato che in seguito a digestione con enzimi di restrizione, seguita da elettroforesi e quindi da Southern blotting, si ottengono frequentemente per un medesimo tratto di DNA frammenti di restrizione di diversa lunghezza (**polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione**). Ciò è dovuto ad una differenza di una singola base che determina la perdita o la comparsa di un sito di restrizione per uno specifico enzima. In **Figura 3.1** è mostrato il procedimento che permette l'identificazione di questo tipo di polimorfismo. Osservando il DNA dei due individui, notiamo che è presente una differenza: nell'individuo 2 vi è una coppia GC al posto di TA in un sito di restrizione per l'enzima *Bam*HI. Questa mutazione ha comportato quindi nell'individuo la perdita di un sito per l'enzima, per cui l'ibridazione con la sonda identificherà nell'individuo 1 due frammenti di diverso peso molecolare e nell'individuo 2 un solo frammento più lungo.

Oggi gli RFLP sono solitamente identificati con una procedura che prevede l'amplificazione della regione genomica di interesse, la digestione del prodotto di PCR con l'enzima appropriato ed una corsa elettroforetica per separare i vari frammenti ottenuti.

Gli RFLP sono polimorfismi a **locus singolo e bialelelico**, in quanto gli alleli possibili sono solo due.



3.1

RFLP. Dopo digestione con l'enzima *Bam*HI, il Southern blot produce profili diversi sul gel.

Polimorfismi di ripetizione (VNTR)

Questo tipo di polimorfismo è dovuto alla presenza di un **numero variabile di sequenze ripetute in tandem**. Gli alleli, quindi, differiscono per il numero di corte sequenze di DNA, uguali o più o meno uguali, presenti tra due siti di riconoscimento di un enzima di restrizione. Come illustrato in **Figura 3.2**, i frammenti di restrizione di diversa lunghezza possono essere rilevati da una sonda che riconosce una sequenza unica nel genoma, al di fuori delle sequenze ripetute, ma compresa tra i due siti di taglio.

Attualmente, una più rapida identificazione di questo tipo di polimorfismo è realizzabile mediante PCR e grazie all'impiego di primer oligonucleotidici che riconoscono tratti esterni alle sequenze ripetute.

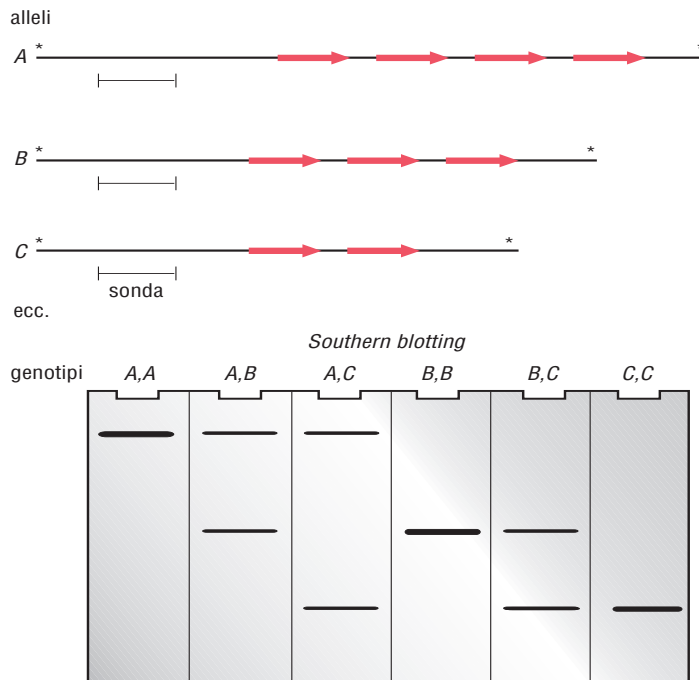
I VNTR rappresentano un polimorfismo a **singolo locus**, ma **multiallelico**, proprio in virtù del numero variabile di sequenze ripetute.

Questi polimorfismi sono noti anche con il nome di **minisatelliti**.

Microsatelliti o STR

Gli STR sono simili ai VNTR, in quanto anch'essi contengono un numero variabile di sequenze ripetute, con l'unica differenza che in essi la sequenza è breve, dell'ordine di 2-6 nucleotidi. Le ripetizioni più frequenti sono quelle dinucleotidiche, particolarmente la sequenza "CA" ("TG" sul filamento complementare). Il numero variabile di ripetizioni di ogni microsatellite è riconducibile ad un tasso di mutazione maggiore di queste sequenze, a sua volta causato, nella maggior parte dei casi, da errori durante la replicazione del DNA. La DNA polimerasi, durante la replicazione, nel copiare sequenze ripetute di questo tipo può compiere errori di "scivolamento", comportando duplicazione o delezione di una ripetizione.

3.2



VNTR. I tre alleli presentano un numero diverso di sequenze ripetute (freccette): 4 in A, 3 in B e 2 in C. Il Southern blot dopo ibridazione con una sonda che riconosce una sequenza unica, esterna alle ripetizioni e compresa tra due siti di restrizione, permette l'identificazione dei frammenti di diversa lunghezza.

Sebbene esistano meccanismi atti alla riparazione (*mismatch repair*), talvolta questi falliscono, con conseguente variazione del numero di sequenze ripetute. Gli STR, presenti in numero pari a circa 100.000 e distribuiti abbastanza uniformemente ad una distanza media di 30 kb, sono altamente polimorfici nella popolazione e quindi altamente informativi.

In **Figura 3.3** è illustrata l'analisi di un STR mediante PCR. Il microsatellite in esame è una ripetizione AATG (4 nucleotidi). Nella popolazione ci sono 6 alleli che presentano un numero di sequenze ripetute variabile. Grazie all'impiego di due primer, P1 e P2, che si legano alle regioni fiancheggiatrici la sequenza ripetuta, è possibile l'analisi del marcatore.

I polimorfismi del DNA trovano un importantissimo impiego come marcatori nell'analisi del linkage,

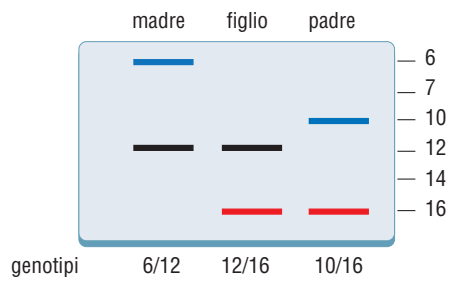
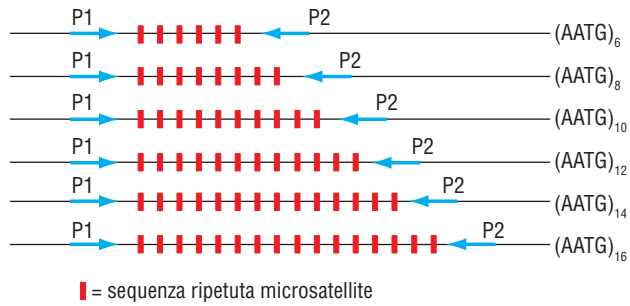
nell'identificazione personale e nella diagnosi di malattie genetiche.

Variazioni del numero di copie o CNV (Copy Number Variations)

Dall'analisi di un numero sempre maggiore di genomi umani è scaturito che le variazioni possono interessare anche tratti molto più ampi di DNA. I polimorfismi CNV, ossia la presenza di un numero diverso di copie, sono riconducibili a duplicazioni (numero maggiore di copie) o delezioni (numero minore di copie) di tratti genomici di estensione variabile da un migliaio a milioni di basi. Le CNV, che possono interessare il genoma in misura del 10%, possono essere in alcuni casi rare ed in altri frequenti.

3.3

Analisi di un STR mediante PCR. Nella parte in basso il marcatore viene impiegato per un accertamento di paternità (compatibilità confermata).



Maurizio Clementi

Elementi di Genetica Medica

Accedi all'ebook e ai
contenuti digitali

> Espandi le tue risorse >

con un libro che **non pesa** e si **adatta**
alle dimensioni del tuo **lettore**



All'interno del volume il **codice personale** e le istruzioni per accedere alla versione **ebook** del testo e agli ulteriori servizi.
L'accesso alle risorse digitali è **gratuito** ma limitato a **18 mesi dalla attivazione del servizio**.

