

CROMOSOMI E DISORDINI CROMOSOMICI

I cromosomi sono le strutture tramite cui le cellule eucariotiche organizzano il proprio DNA. Le aberrazioni cromosomiche numeriche rappresentano anomalie di centinaia o più di geni, perché riguardano tutti i geni contigui che si trovano su quel cromosoma. Nella maggior parte dei casi queste aberrazioni sono incompatibili con la vita. Altre sono compatibili con la vita ma mostrano fenotipi evidenti.

Tecnologie per l'analisi cromosomica

Nel 1956 furono individuati i primi metodi di analisi cromosomiche. Nel 1959 fu identificato un extra cromosoma 21 nella sindrome di Down, e poi la sindrome di Klinefelter (47, XXY) e Turner (45, X). Nel 1970 tecniche di bendaggio cromosomico hanno permesso la caratterizzazione di cromosomi individuali.

Le anomalie cromosomiche hanno un'importanza medica evidente, soprattutto perché sono presenti il 10% degli spermatozoi e nel 25% degli ovociti maturi.

Dal 15-20% circa di tutte le gravidanze si concludono con aborti spontanei, e molti più zigoti ed embrioni sono così anormali che non sopravvivono oltre i primi giorni/settimane dopo la fecondazione.

In circa il 50% degli aborti spontanei ci sono anomalie cromosomiche. L'incidenza di anomalie cromosomiche negli embrioni morfologicamente normali è di circa il 20%.

Le anomalie cromosomiche spiegano quindi la perdita spontanea di una percentuale molto elevata di tutti i concepimenti nell'uomo.

Alla nascita l'incidenza di anomalie cromosomiche è molto più bassa (0.5-1%).

L'anomalia cromosomica più frequente è quella associata alla sindrome di Down, trisomia 21.

Tuttavia anche tra le più comuni aneuploidie, l'aborto spontaneo è frequente.

Sindrome di Down-trisomia 21

Sebbene la base cromosomica della sindrome di Down sia stata scoperta solo nel 1959 a Parigi, tale sindrome era nota e deriva il suo nome dal Dr. Langdon Down, che ne riportò le caratteristiche nei suoi rapporti all'ospedale di Londra, fin dal 1866.

La durata di vita dei pazienti con sindrome di Down è aumentata significativamente negli ultimi 30 anni: dai 25 anni negli anni 80, ora possono vivere 60 anni e oltre.

Caratteristiche:

Oltre all'aspetto caratteristico del viso, altri aspetti sono la ipotonia già presente alla nascita. Il 50% degli individui presenta cardiopatie congenite. Questa caratteristica presenta caratteristiche di gravità variabile, e può impattare la qualità della vita (forme benigne sono compatibili con una lunga sopravvivenza). Un deficit cognitivo è presente, ma superabile con trattamenti psicoattitudinali che possono consentire l'inserimento lavorativo. Vi è un alto rischio di sviluppare Alzheimer ed un elevato rischio di leucemia, caratteristiche presenti oltre i 40 anni.

Incidenza

L'incidenza media è intorno ad 1:800. Tuttavia varia molto in base all'età materna.

A 40 anni, l'incidenza è di 1:100

Il cromosoma 21 aggiuntivo è di origine materna in oltre il 90% dei casi.

Ciò si verifica comunemente a causa della non disgiunzione nella meiosi I materna.

La trisomia 21 deriva da una non disgiunzione cromosomica alla meiosi → evento somatico anche se riguarda le cellule germinali.

Tale anomalia perciò non è ereditaria.

Ciò che gli studi sulla sindrome di Down ci insegnano:

- Anomalie cromosomiche numeriche, ma anche strutturali sono frequentemente osservate negli embrioni
- Non sono anomalie ereditarie, ma somatiche
- Le trisomie si generano per fenomeni di non-disgiunzione nei gameti o nelle prime fasi di sviluppo embrionale

- Tali anomalie aumentano con l'età della madre
- La maggior parte delle aberrazioni cromosomiche sono gravi e sono causa di aborti spontanei
- La trisomia 21 (un piccolo cromosoma povero di geni) è probabilmente un'aberrazione più «sopportabile» rispetto ad altre e per questo è più frequentemente osservata nei nati vivi

Lezione del dr. Vincenzo Aiello- CITOGENETICA

Storia della citogenetica

- Nel 1882 Fleming descrive la divisione cellulare. Si rende conto della presenza di corpiccioli a forma di bastoncino (chiamati poi cromosomi da Waldeyer nel 1888), introducendo il termine mitosi. Per la prima volta, inoltre, grazie a particolari tecniche di colorazione evidenzia il nucleo delle cellule e la presenza di una massa filamentosa, detta cromatina.

Nel 1902 Sutton e boveri notano che i cromosomi si comportano in accordo con le leggi ereditarie di Mendel, e riprendono i suoi studi. Nel 1950 iniziano degli studi per evidenziare i cromosomi, e le prime cellule osservate sono delle sezioni di testicolo. Si iniziano a dare anche numeri dei cromosomi, inizialmente si pensava fossero 48.

Nel 1952 Hus introduce nelle metodiche per evidenziare i cromosomi una soluzione ipotonica, che riusciva a rigonfiare le cellule. Anche lui contò 48 cromosomi.

Nel 1955 Ford e Hamerton introducono l'uso della colchicina, che riusciva a bloccare le cellule in metafase, e la qualità era migliore. La colchicina era estratta da una pianta.

Il 22 dicembre del 1955 in Svezia, Levan e Tjio riescono ad ottenere una qualità molto buona della visualizzazione dei cromosomi, e ne contano 46.

Nel 1956 Tjio e Levan pubblicano l'articolo "the chromosome Number of man", in cui raccontano i loro studi. Nei laboratori di apre un nuovo campo di indagine: la citogenetica.

La cosa più importante era essere riusciti ad avere una visualizzazione chiara dei cromosomi: ciò permise di studiare i cariotipi di soggetti con diverse patologie. In questo modo di studiata la sindrome di down, e se ne visualizzo la causa. Idem per la sindrome di klinefelter e di Turner.

Nel 1960 Nowell inserisce in una cultura di linfociti la fitomino-glutimina, che stimola la divisione dei linfociti T. Nel 1960 fu anche scoperto il cromosoma Philadelphia.

Nel 1966, nella conferenza di denver, si cerca di dare un organizzazione dei cromosomi, ordinando il cariotipo in ordine di grandezza e dividendolo in gruppi (a, b, c, d, e, f, G).

Negli anni '70 vengono fatte diverse scoperte. Casperson infatti iniziò ad usare un altro colorante

fluorescente: in questo colorante i cromosomi non avevano tutti lo stesso colore uniforme, ma presentavano regioni più fluorescenti di altre → bande

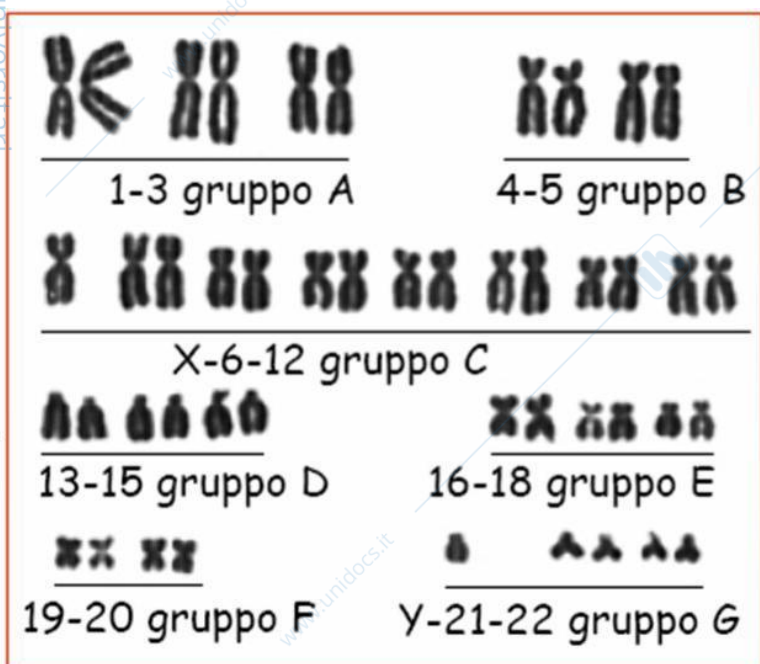
Fu introdotta così la tecnica del bandeggio proteico, fatto con QFQ e GTG.

Le bande sono coincidenti con entrambi i coloranti.

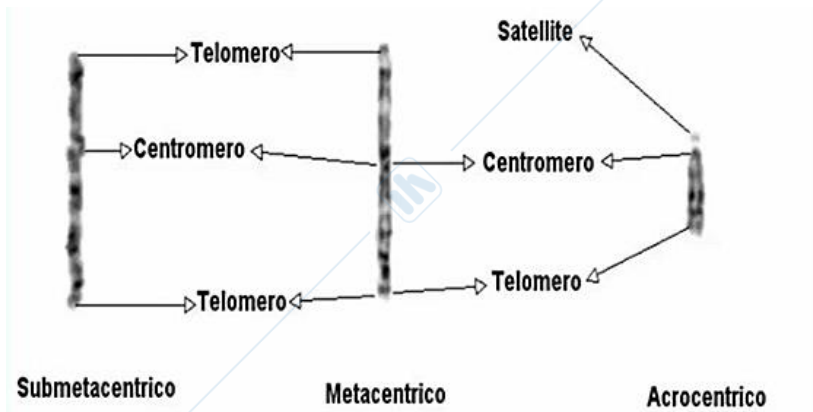
Le bande G più scure sono dette positive (ricche di A-T), quelle più chiare negative (ricche di G-C).

Cosa sono i cromosomi?

Sono portatori di informazione. Ogni cromosoma deve avere 3 elementi importanti: centromero, telomeri e origini di replicazione. Il DNA è ripiegato secondo un pattern preciso.



In base alla posizione del centromero i cromosomi sono classificabili in:



Ogni cromosoma è formato da due cromatidi (in metafase). Le estremità del centromero sono chiamate bracci, chiamati P quello piccolo, Q quello lungo.

Come si fa a fare il cariotipo?

Si usa principalmente il microscopio, fatto da oculari, obiettivi, e fonte luminosa. Una volta posto il vetrino sul tavolino del microscopio, viene usata una telecamera per fare la foto.

Le cellule osservate sono bloccate in metafase, quindi la colchicina rompe al livello del fuso mitotico e quindi i cromosomi non migrano ma restano bloccati.

Perché si studiano i cromosomi?

La citogenetica classica permette di identificare i riarrangiamenti cromosomici coinvolgenti non meno di 5 Mega basi.

Per indagine citogenetica si intendono le analisi che permettono lo studio dell'assetto cromosomico (cariotipo). Le anomalie cromosomiche sono classificabili in anomalie numeriche (o aneuploidie) e anomalie strutturali.

Anomalie cromosomiche

- Di numero: trisomie, monosomie, tetraploidie (92) e triploidie (69) → queste ultime due osservate negli aborti
- Di struttura: traslocazione, inversioni, delezioni, duplicazioni

Le traslocazioni possono anche essere bilanciate, nella maggioranza dei non sono correlate ad un fenotipo anomalo, o sbilanciate, correlate ad un fenotipo anomalo (malformazione e ritardo mentale).

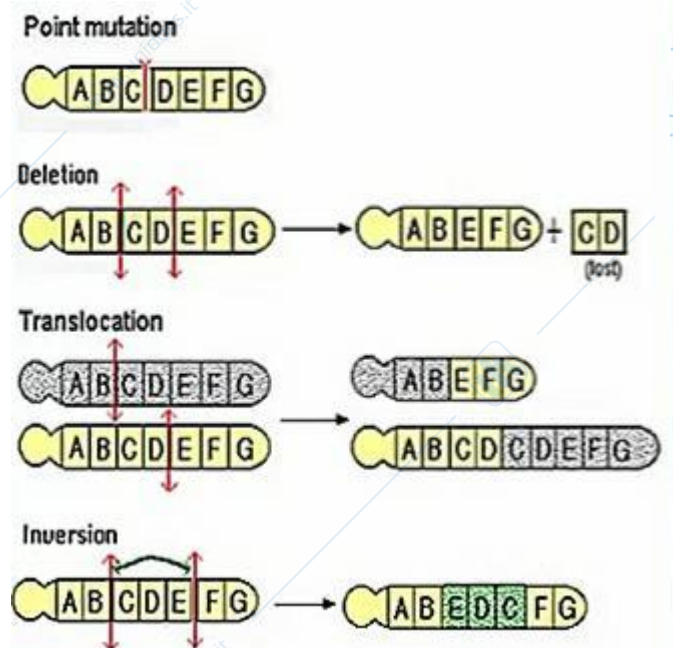
La gravità delle anomalie cromosomiche dipende dal tipo di cromosoma e dalla quantità di geni coinvolti. Tanto più è grave lo sbilanciamento cromosomico tanto più precoce sarà l'interruzione della gravidanza.

Sindrome di Turner

Prevalenza: 1/2500 femmine

Caratteristiche cliniche:

- Pterigium colli
- Bassa statura
- Disgenesia gonadica
- Rene a ferro di cavallo



- Difetti cardiaci
- Torace largo a scudo

C'è una monosomia dell'X

Sindrome di down

Clinica:

- Volto piccolo, rotondo e di profilo piatto
- Naso piccolo rivolto verso le alto
- Brachicefalia
- Microcrania
- Occipite piatto
- Bocca piccola e lingua prominente

Cause:

Nel 95% dei è dovuta a una non-disgiunzione cromosomica di un cromosoma 21 durante la gametogenesi (meiosi) che è quasi sempre quella materna. Nel 4% dei casi è legata ad una traslocazione robertsoniana del cromosoma 21, che viene ad attaccarsi ad un altro cromosoma acrocentrico, per cui la conta totale dei cromosomi di questi pazienti è di 46, ma la massa cromatinica del cromosoma 21 è rappresentata per 3 volte. Spesso si verifica de novo ma puo anche essere trasmessa da uno dei genitori nel quale è presente una traslocazione bilanciata.

Sindrome di klinefelter

Maschi con un coronosoma X in più: 47 XXY

Sindrome di patau (trisomia 13)

1:20000 nati

Grave ritardo mentale, cardiopatie, labiopalatoschisi, ciclopia, polidattilia.

Sindrome di Edwards (trisomia 18)

1:7500 nati

Più colpite le femmine 3:1

Ritardo della crescita e mentale, cardiopatie, sindattilia, morte nei primi mesi.

Studio del cariotipo

Il cariotipo può essere fatto pre natale (con analisi dei villi coriali, liquido amniotico, sangue fetale), neonatale (su sangue periferico) e post natale (sangue periferico o biopsia cutanea).

Il cariotipo in epoca prenatale è indicato alle donne con più di 35 anni, se ci sono malformazioni ecografie, se c'è un precedente figlio con anomalia coronosomica, se c'è un anamnesi genetica familiare positiva, se il tri-test è positivo o se ci sono precedenti aborti ripetuti.

In epoca neonatale viene fatto se ci sono segni clinici ben definiti o un fenotipo particolare. Il epoca post natale è fatto se ci sono segni clinici precisi, ritardo mentale o motorio, amenorrea, ipogenitalismo, infertilità o sterilità.

Amniocentesi:

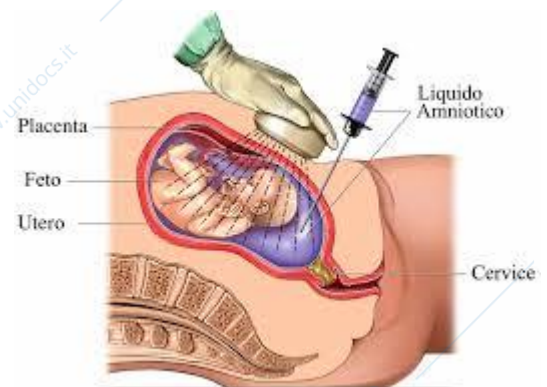
È un prelievo del liquido amniotico, che si esegue dopo la 16esima settimana di gestazione per via trasaddominale, sotto controllo ecografico continuo. Il rischio di aborto è molto basso.

Dal liquido amniotico sono separati gli amniociti, che sono poi coltivati in delle fiaschette, e crescono in circa 1 settimana.

Villocentes

È un prelievo della placenta, che si esegue dopo la 10ma settimana di gestazione per via trasaddominale, sotto controllo ecografico continuo. Il rischio di aborto è 0,5-1%.

I villi sono messi in una piastra Petri con terreno di cultura, e poi sono osservati al microscopio.



Improntate è separare il villo dalla decidua, perché nella decidua c'è il DNA della madre. I villi sono attraversati da piccoli capillari.

Tutti i prelievi sono messi in cultura e incubati, a 37° circa e CO₂ al 5%.

Funicolocentesi: prelievo di sangue fetale che viene eseguito a scopo diagnostico e terapeutico dopo la 18esima settimana di gestazione. Il rischio di aborto è del 2%.

I cromosomi da analizzare si ottengono mediante culture da analizzare e mediante la preparazione dei cromosomi. I cromosomi sono visualizzati nella mitosi cellulare, quando la cellula organizza i suoi cromosomi per prepararli alla suddivisione nelle cellule figlie. Il citogenetista deve quindi ottenere cellule in mitosi nelle culture cellulari per analizzare il cariotipo.

Per ottenere buone metafasi da cellule, si trattano con colchicina che le blocca in metafase, poi ipotonica, fissativo ed evaporazione.

1. Seminare le cellule e aggiungere sostanza che stimola la mitosi
2. Incubazione per 2-3 giorni
3. Aggiungere sostanza che blocca la mitosi in metafase (colchicina)
4. Soluzione ipotonica
5. Fissativo
6. Striscio delle cellule su vetrino porta oggetti
7. Identificazione al microscopio

La soluzione ipotonica usata è fatta da cloruro di potassio al 0.57% in acqua 100 ml.

Il fissativo è fatto da acido acetico al 99% e etanolo assoluto in rapporto 1:3.--> elimina parte acquosa della cellula.

Dopo si mette sul vetrino e si apre la metafase, come un'esplosione, e si visualizzano i cromosomi.

Dopo di che i cromosomi si vanno a colorare per fare il bandeggio Q o G.

Infine si ordinano e numerano i cromosomi.

Tecniche di bandeggio

Hanno migliorato molto la qualità della visualizzazione dei cromosomi, rendendone anche più semplice e preciso lo studio.

Esistono diverse tecniche:

- QFQ,GTG, RBA danno un bandeggio di tutti i cromosomi
- CBG, DA/DAPI, NOR sono da supporto

Nel bandeggio **QFQ**, la prima lettera indica il tipo di bandeggio (Q), la seconda la fluorescenza (F) e l'ultimo il colorante usato (Q= quinacrine).

È utile per visualizzare il cromosoma Y e per studiare gli eteromorfoismi e le varianti cromosomiche normali (visti solo su uno dei due cromosomi).

Inoltre danno un'ipercolorazione delle regioni satellitari.

Il bandeggio **GTG** prende questo nome perché è di tipo G, è usata la Tripsina e il Ghimsa.

Questo bandeggio è più preciso e consente di visualizzare meglio difetti genetici.

Il bandeggio **RBA** è di tipo R, ed è fatto con brdU e colorante acridina orange.

Questo permette di visualizzare bene le regioni telomeriche e l'X inattiva.

Il bandeggio **CBG** è di tipo c, si usa idrossido di bario e giemsa come colorante.

Questo bandeggio è di supporto ai precedenti, colora le regioni centromeriche e le regioni eterocromatiche.

È importante anche per vedere certe variabilità dell'eterocromatina, come l'inversione degli cromosoma 9.

Il bandeggio **DA/DAPI**, fatto con distamicina A e 4,6-diamidino 2-fenilindolo (dapi) colora le regioni eterocromatiche del cromosoma 1,9,16,15.



Il bandeggio **Ag-NOR** usa il nitrato d'argento ed è di supporto per vedere se i cromosomi sovrannumerari (marker) contengono anche euromatina (contiene geni importanti) → utile per diagnosi prenatale.

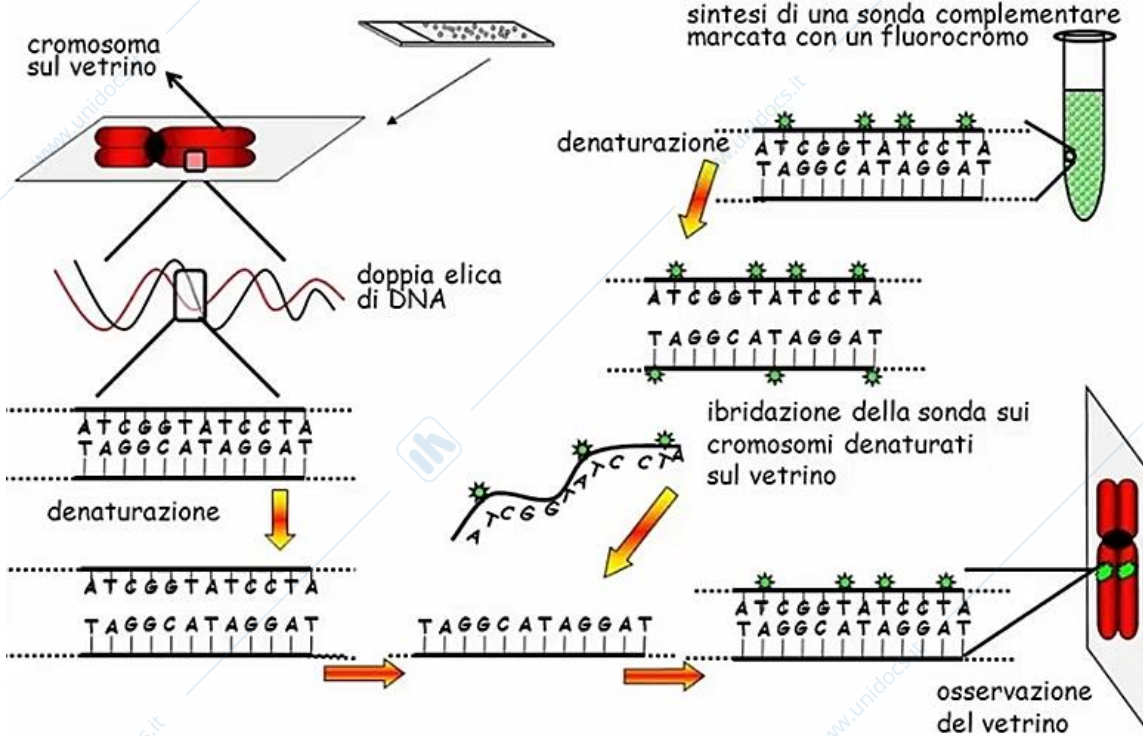
Citogenetica molecolare

Chiamata anche FISH, Ovvero ibridazione in situ flouorescente.

Serve per vedere i singoli geni, e permette l'analisi mirato di una regione cromosomica, consentendo di mettere in evidenza riarrangiamenti in alcune centinaia di basi.

Tale identificazione avviene mediante sonde marcate impiegando fluorocromi che emettono a diverse lunghezze d'onda.

Il preparato citogenetico, ovvero il vetrino con le cellule, è denaturato per far aprire la doppia elica, e idem con una sonda complementare marcata con il fluoroforo (probe). Poi si mettono assieme sul vetrino e si fanno riposare per far avvenire l'appaiamento e il riconoscimento della probe con il campione.

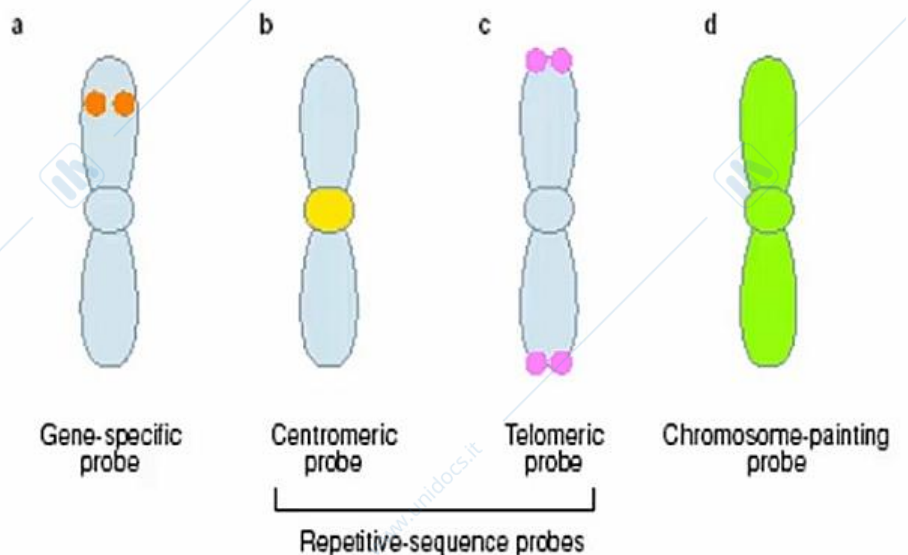


Poi si mette un colorante, di solito il DAPI, per evidenziare tutti i cromosomi.

Le sonde usate sono a sequenze ripetute, sonde painting o sonde a sequenza singola.

Le sonde painting possono colorare tutto il cromosoma, oppure possono colorare solo un braccio/regione/banda specifica. Le sonde microdeletive sono sonde che riguardano piccole delezioni di sonde citogenetiche, che riguardano piccole bande del cromosoma: con queste sonde queste piccole delezioni sono individuate meglio.

Sindromi dovute a piccole delezioni sono ad esempio la sindrome di kallman (KAL1) e la



sindrome di prader-willi/angelman (gene SRNPR).

Sindrome di prader-willi: i pazienti hanno ritardo mentale e scarso accrescimento, ipotonia centrale. Hanno anomalie cromosomiche o molecolari della regione 15q11-q13 (sul cromosoma 15).

Sindrome di angelman: i malati hanno grave ritardo mentale, componente iperattivo e scoppi di risa immotivate. È dovuta a una mancata espressione dei geni materni nella regione 15q12 (q12 indica la regione del braccio).

Sindrome di DiGeorge/velocardiofaciale: è causata da una delezione 22q11.2.

La prevalenza è di 1:6000 nati vivi. Il malato presenta anomalie facciali, difetti cardiaci (troncoconali), deficit immunitario, ritardo mentale, ipocalcemia...

Sindrome di williams-beuren (WBS): causata da una delezione della regione cromosomica 7q11.23, che consiste in circa 1.5/1.8 Mb (25-28 geni).

L'incidenza è di 1/20000.

Causa un disordine multisistemico, che comprende disturbi psichiatrici, deficit di attenzione,

Sindrome smit-magenis e la sindrome di Miller diekers riguardano delezioni del cromosoma 17.

Sindrome cri su chat: riguarda una delezione del 5p e l'incidenza è 1/20000-50000, di cui il 15% è ereditato.

Sindrome di wolf-hirschhorn riguarda una delezione del cromosoma 4p.

È caratterizzata da ritardo mentale, difetto del cuore...frequenza di 1/50000 dati.

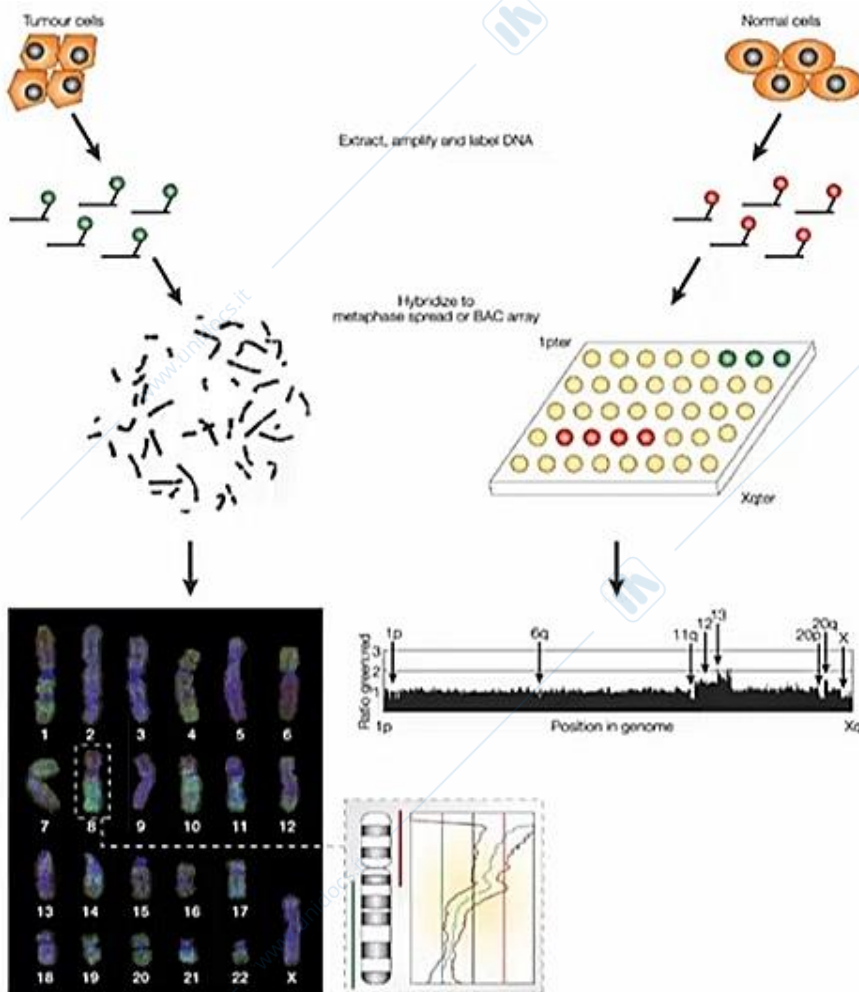
La FISH può essere fatta anche nei nuclei interfascici.

Con la FISH si possono colorare anche tutte le coppie di cromosomi con colori diversi.

La M-FISH è applicata alla citogenetica dei tumori: nelle leucemie soprattutto, ci possono essere traslocazioni e delezioni importanti.

Per colorare in modo diverso le coppie di cromosomi sono usati dei coloranti fluorescenti, e poi si usa un

sistema informatico che elabora i dati dell'ibridazione.



CGH-array

È un'altra pratica di citogenetica molecolare.

Viene estratto DNA da un paziente da indagare, e da un paziente normale.

Ognuno viene marcato con un colore diverso, poi vengono uniti su un microcip (vetrino con sonde già preparate) e poi si fa lo scanner e le si trasforma in algoritmi, trasferibili in grafici. In questo modo possiamo vedere se ci sono danni nel dna, e per ogni cromosoma è fatto un grafico.