



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI  
DELLA BASILICATA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE**

# **Diagnostica clinica e molecolare**

**Prof.ssa Maria Brigida Lioi**

**Potenza, 10 maggio 2017**

# CITOGENETICA

## **CLINICA:**

Anomalie numeriche e strutturali dei cromosomi ed effetti a livello fenotipico;

## **MOLECOLARE:**

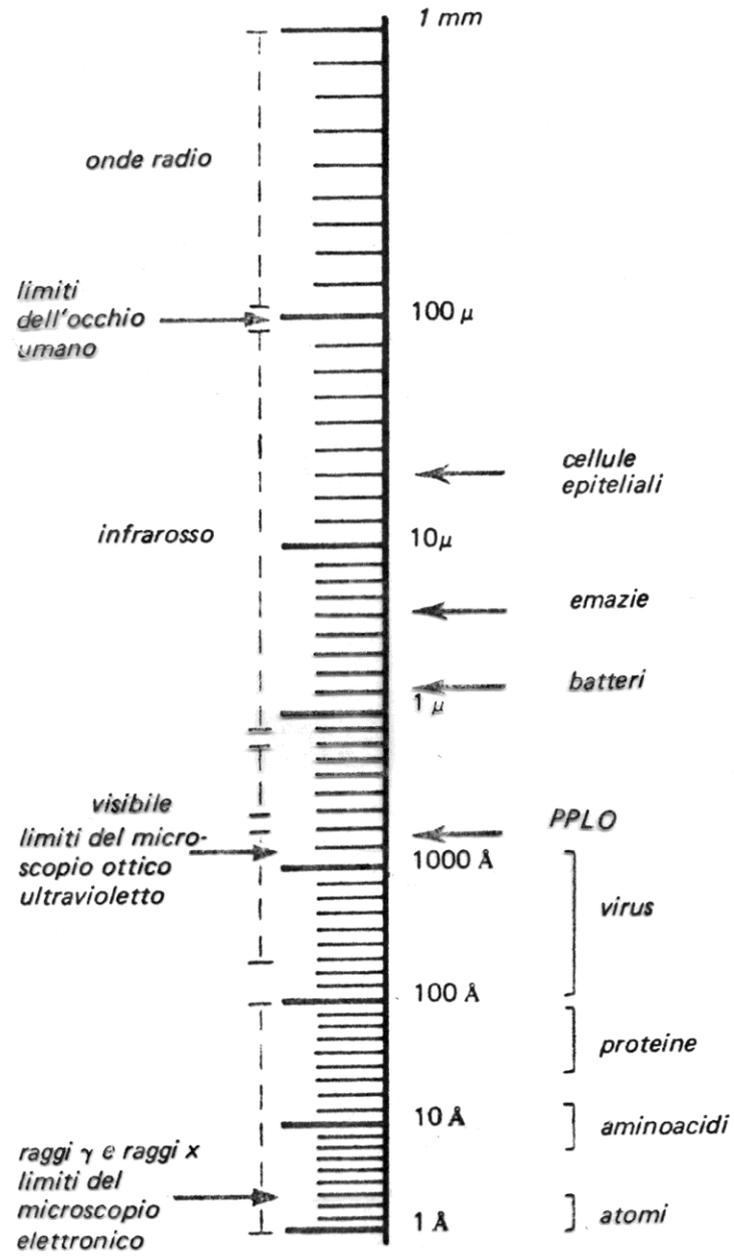
Struttura del singolo cromosoma, eterocromatina, NORs, SCE, ecc.;

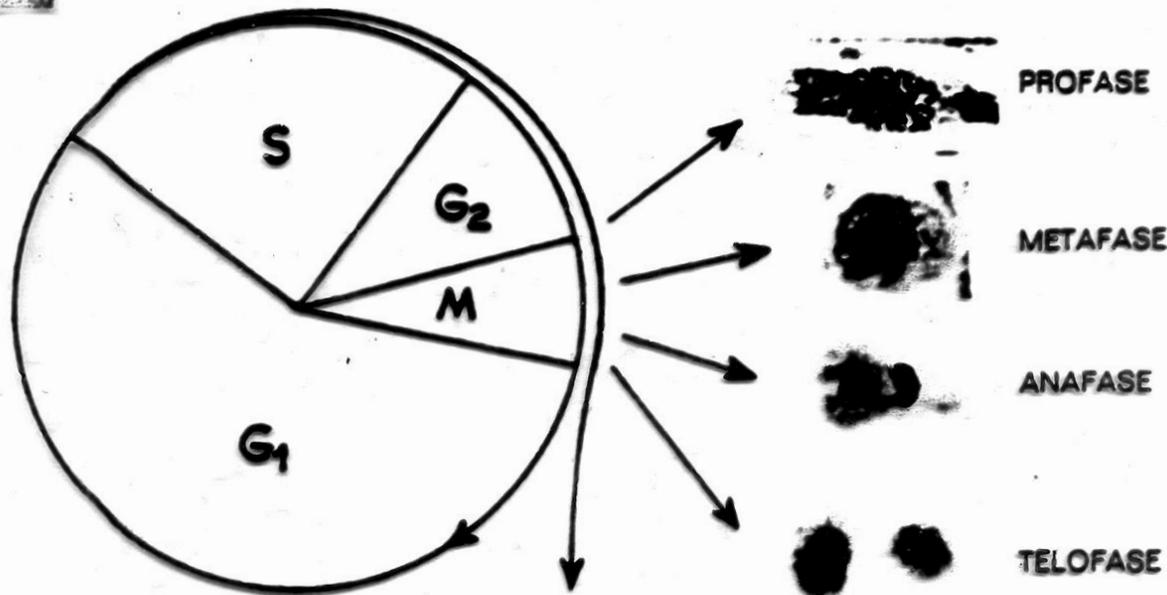
## **EVOLUZIONISTICA:**

Relazioni citotassonomiche tra le specie;

## **DI MODIFICAZIONE:**

Modificazioni dell'assetto genetico, Micromanipolazione degli embrioni, DNA ricombinante, ecc.





**FIG. 1.** Schema del ciclo cellulare e aspetto del nucleo nei differenti periodi che lo compongono. Successione dei vari periodi del ciclo cellulare e corrispondenti variazioni nell'aspetto del nucleo.

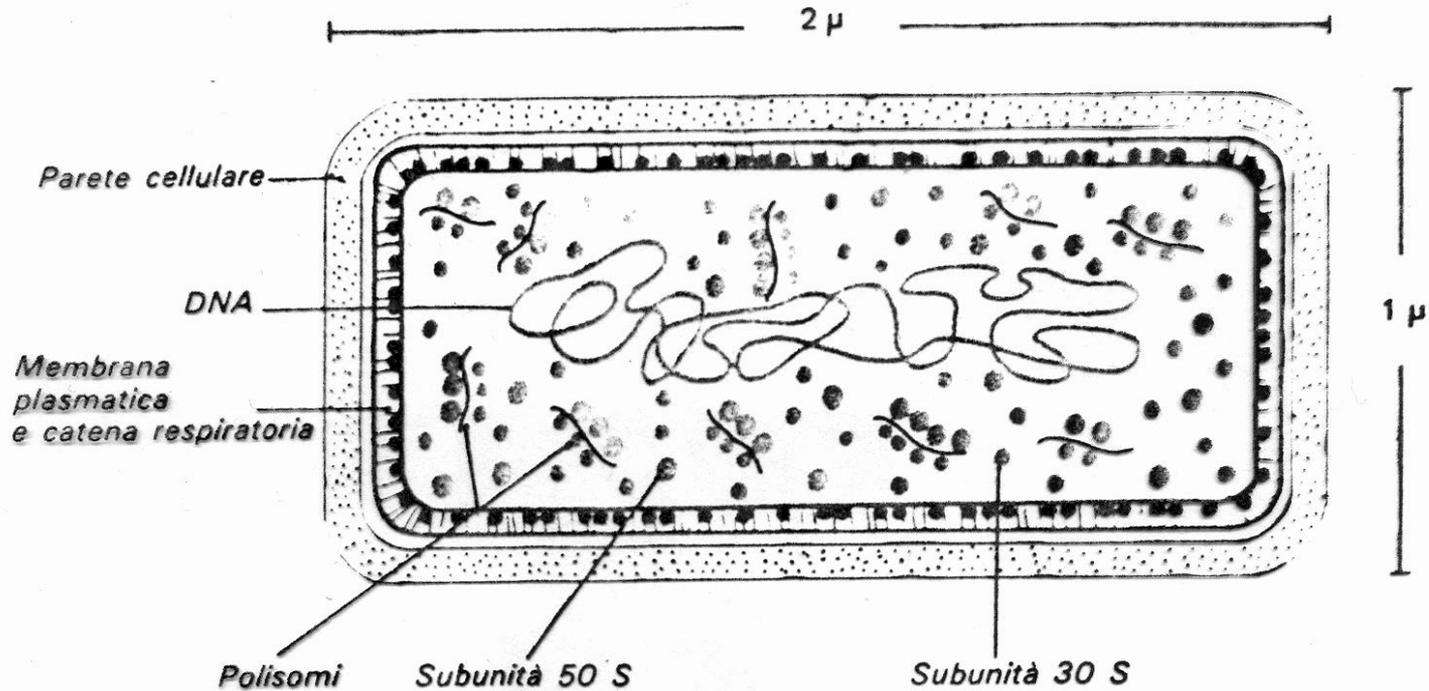


Fig. 1.12 - Schema della struttura di un batterio *Escherichia coli*. Sono rappresentati la parete cellulare, la membrana plasmatica, il DNA, i polisomi e le due subunità 30 S e 50 S dei ribosomi.

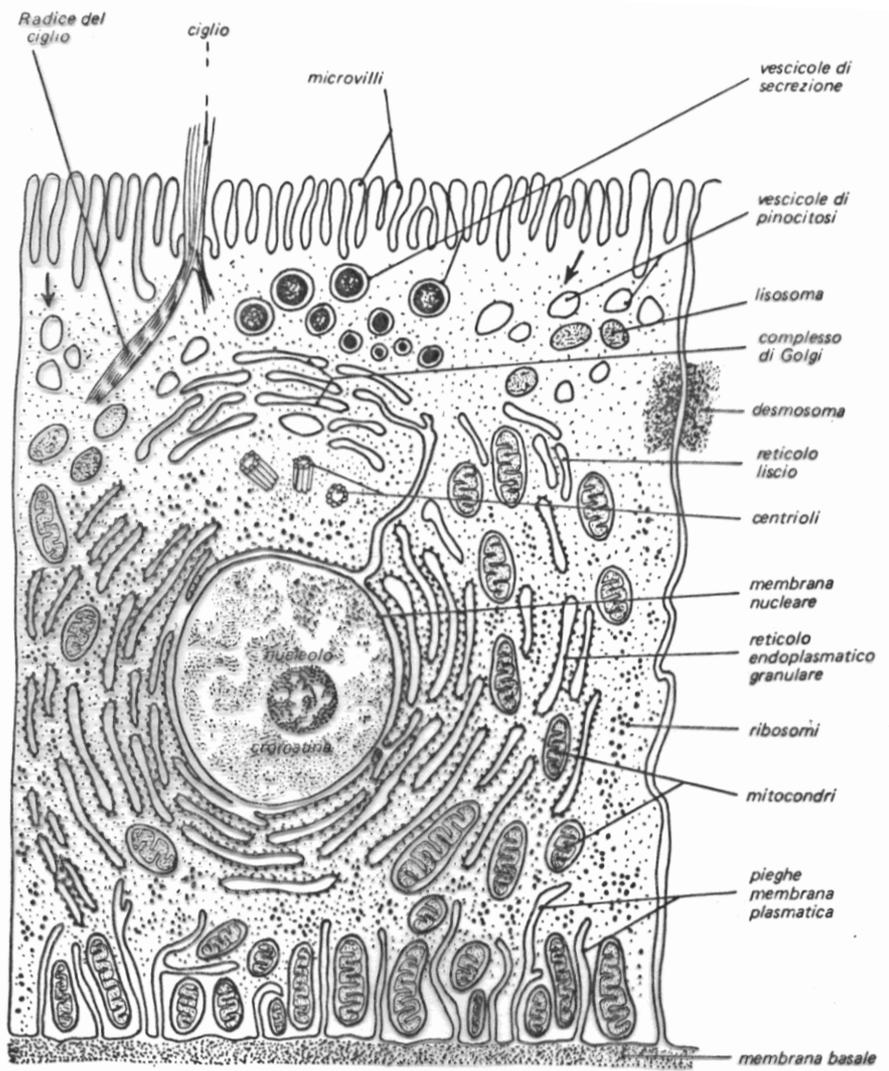
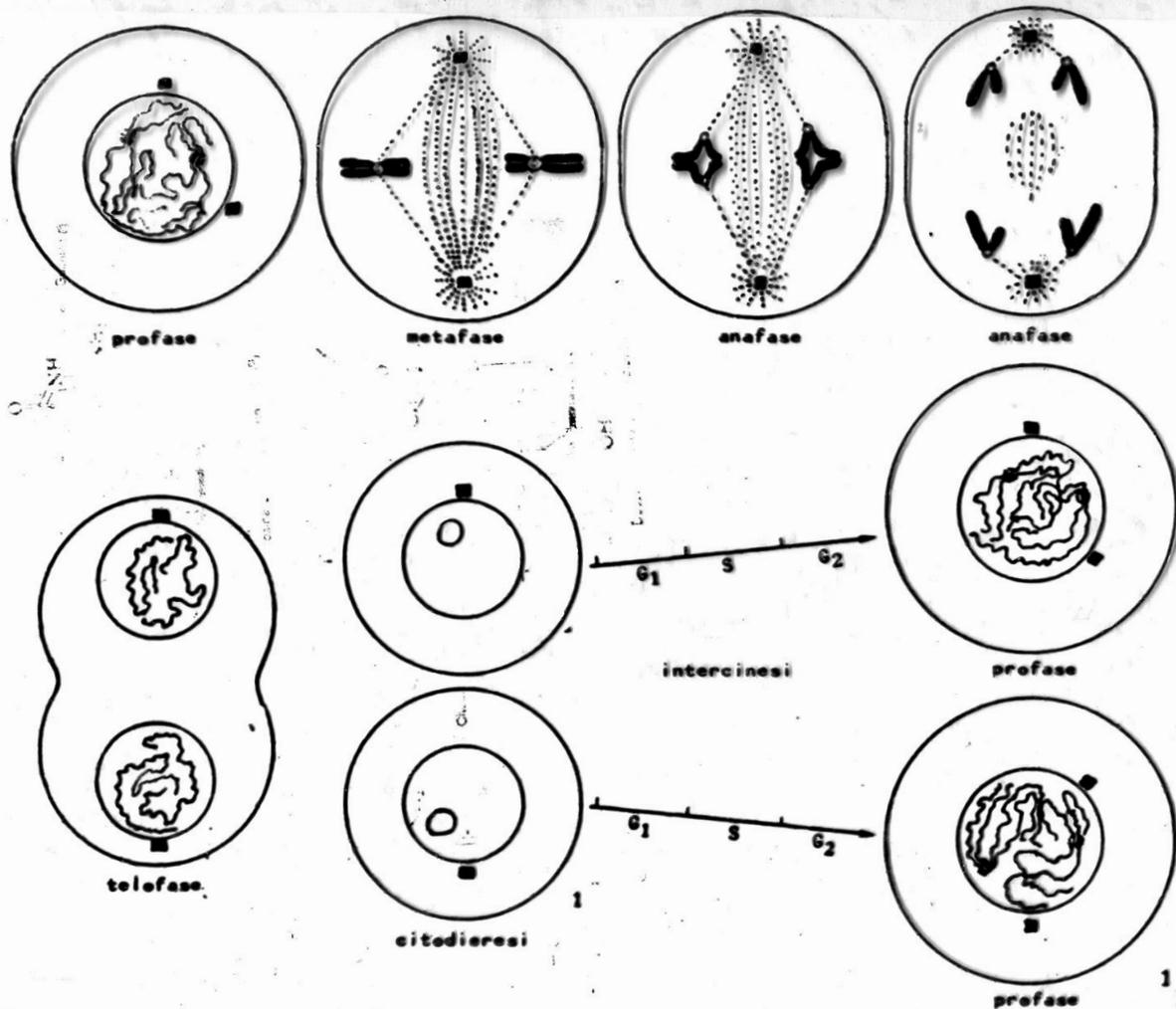
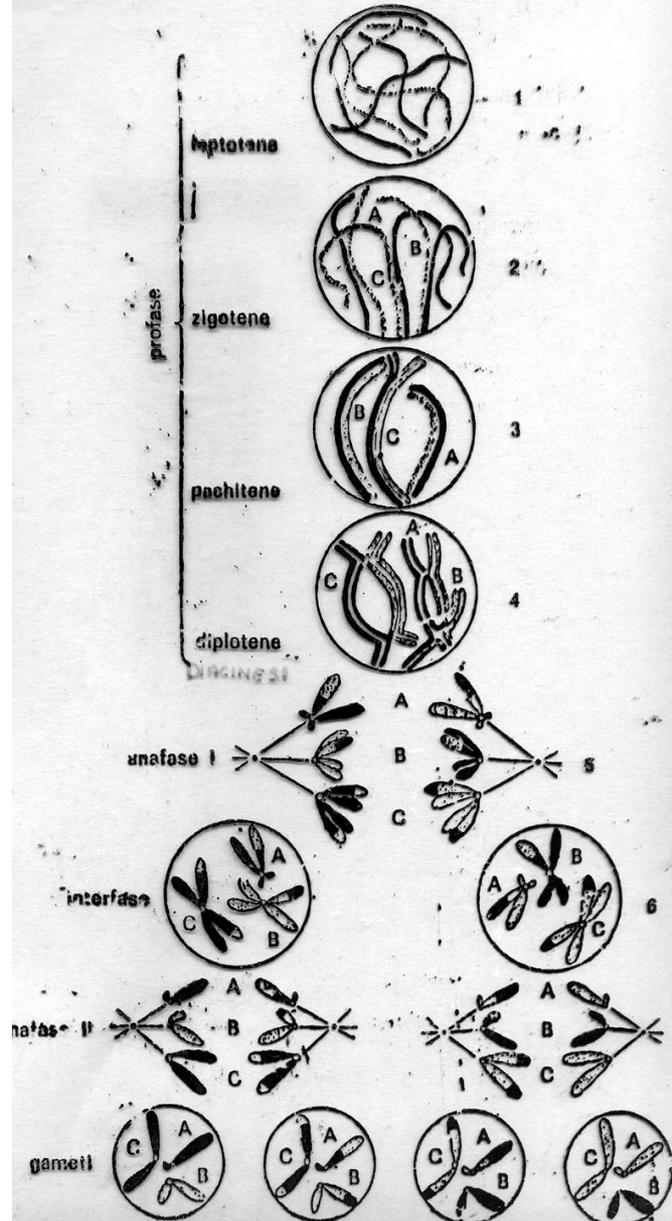


Fig. 1.19. - Rappresentazione schematica della ultrastruttura di una cellula animale poggianti sulla membrana basale (da E.D.P. De Robertis, W. Nowinski e F.A. Saez.: *Cell biology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1970).



**FIG. 7.** Schema delle varie fasi della mitosi e della intercinesi, spiegate nel testo; per comodità di raffigurazione è stato riportato l'esempio di una cellula con soli due cromosomi.



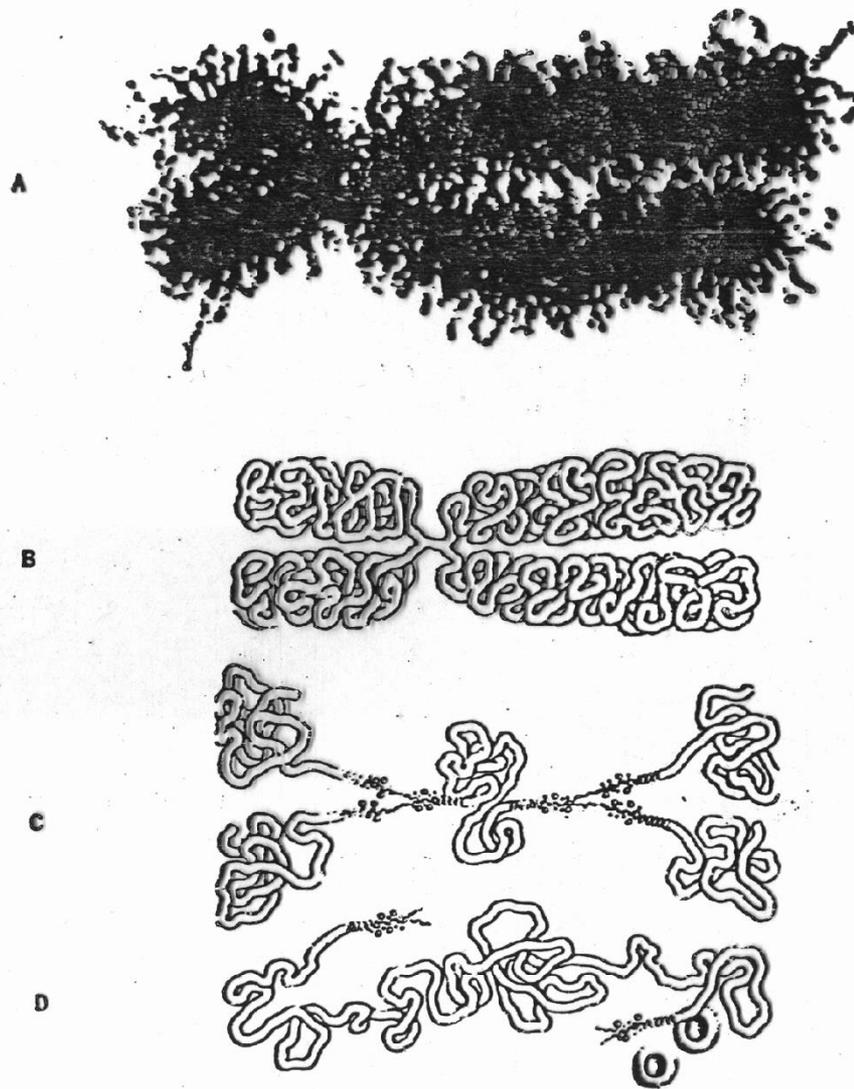


Figura 4 - Cromosoma eucariotico: A, al microscopio elettronico; B, schema interpretativo in metafase; C e D, in interfase (Du Praw, 1971).

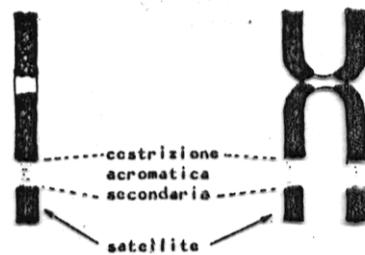
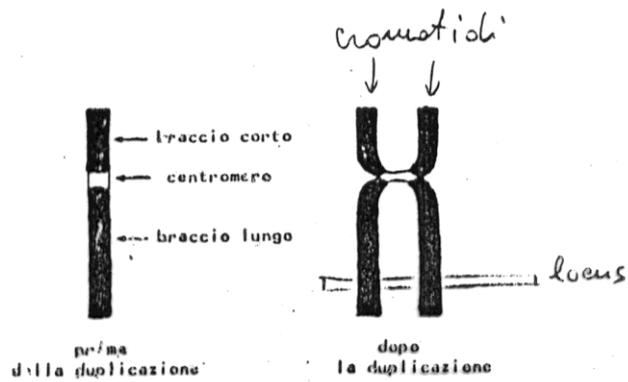


Figura 2 - Schema di cromosoma eucariotico prima e dopo la duplicazione

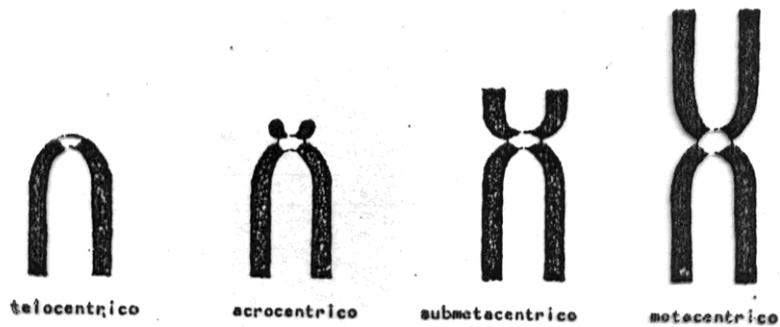


Figura 3 - Classificazione dei cromosomi eucariotici in base alla posizione del centromero.



Figura 1- Metafase umana al microscopio ottico.

A



B

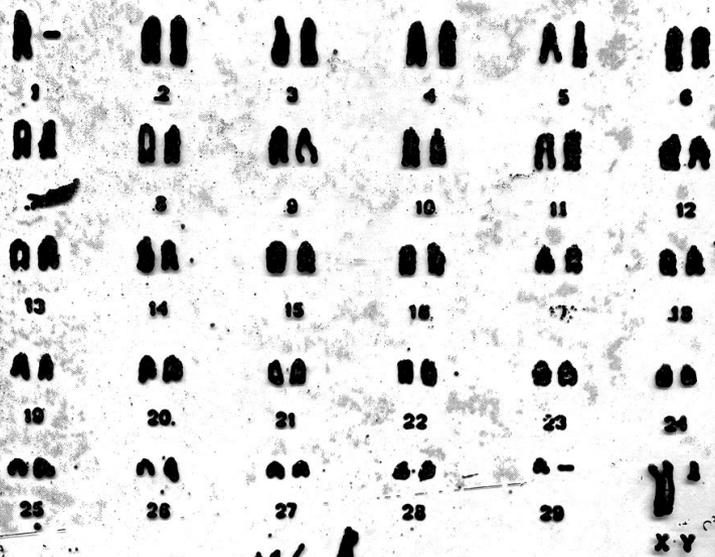


Figura 111 - *Fusaria moniliformis* (A) e cariotipo convenzionale (B) di sero pedotico portatore di traslocazio- e robertsoniana di tipo 1/29 alla serie stereogot (n=50, XY2).

11/29

601

AA 1	CC 2	AA 3	AA 4	AA 5	AA 6
AA 7	AA 8	AA 9	AA 10	AA 11	AA 12
AA 13	AA 14	AA 15	AA 16	AA 17	AA 18
AA 19	AA 20	AA 21	AA 22	AA 23	AA 24
AA 25	AA 26	AA 27	AA 28	AA 29	AA 30

X Y

Casiotipo:

Tipo genetico :

Matricola : 524010

Azienda :

Localita' :

Data del  
prelievo : 23/3/63

AA 1	AA 2	AA 3	AA 4	AA 5	AA 6
AA 7	AA 8	AA 9	AA 10	AA 11	AA 12
AA 13	AA 14	AA 15	AA 16	AA 17	AA 18
AA 19	AA 20	AA 21	AA 22	AA 23	AA 24
AA 25	AA 26	AA 27	AA 28	AA 29	AA 30

X Y

Casiotipo:

Tipo genetico :

Matricola : 51192

Azienda :

Localita' :

Data del  
prelievo : 24/3/63

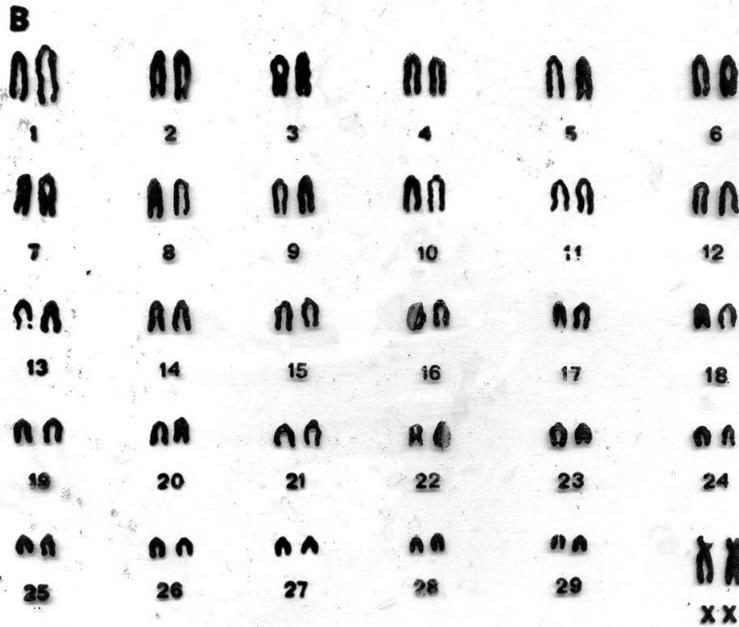


FIGURA II - Piastra metafisica (A) con nucleo picnotico e cariotipo convenzionato (B) di vacca podolica carotologicamente normale ( $2n=60,XX$ ).

A



B

--	AA	AA	AA	AA	AA
1	2	3	4	5	6
AA	AA	AA	AA	AA	AA
7	8	9	10	11	12
AA	AA	AA	AA	AA	AA
13	14	15	16	17	18
AA	AA	AA	AA	AA	AA
19	20	21	22	23	24
AA	AA	AA	AA	--	AA
25	26	27	28	29	XX

tt 1/29 AA

FIGURA IV - Piastra metafasica (A) e cariotipo convenzionale (B) di vacca podolica portatrice di traslocazione robertsoniana di tipo 1/29 allo stato omozigote (n=59,XX,tt).

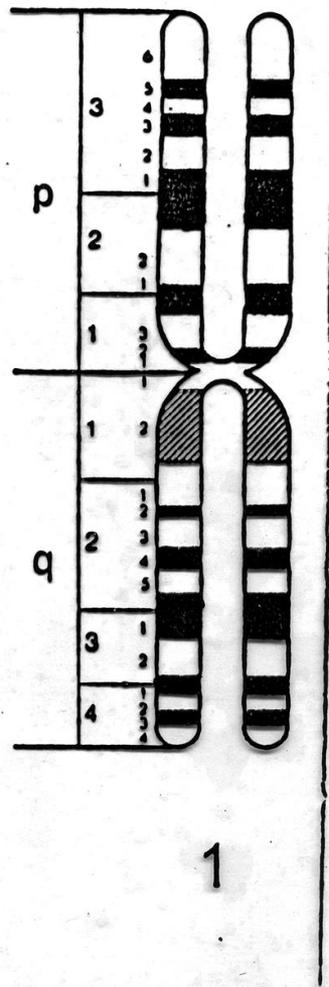


Figura 10 - Cromosoma 1 dell'uomo con il bandeggio G definito nella Conferenza di Parigi (1971).

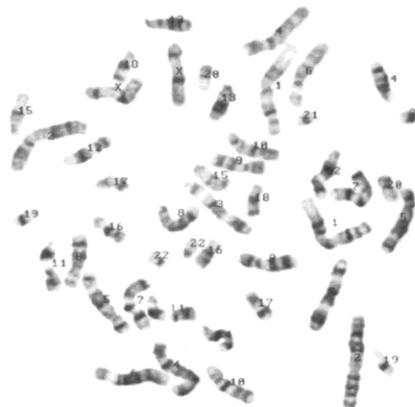
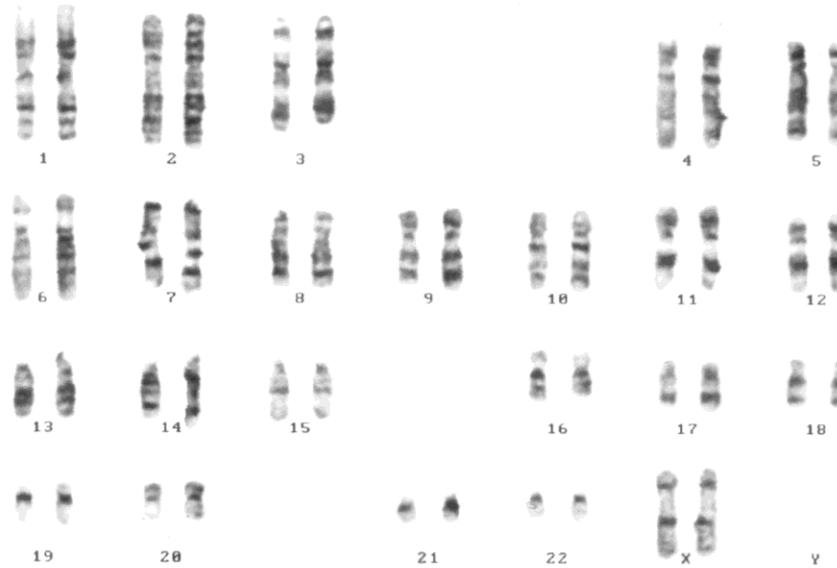
ioni







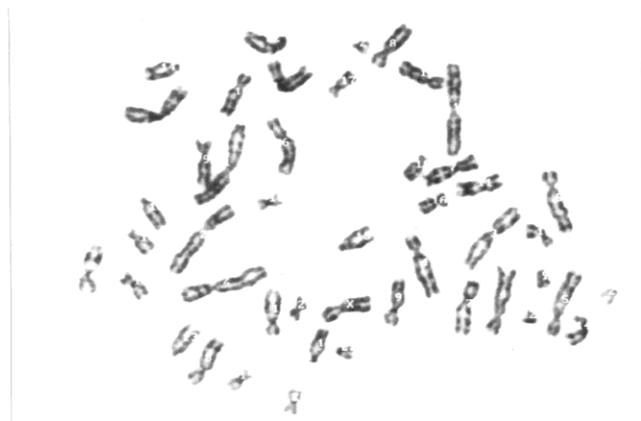
# Chantal for Leica Quantimet Karyotyping Workstation



**Quantity:** 0  
**Nx:** 12.3  
**Ny:** 45.6  
**No:** 1  
**Time:** 08:59:00  
**Date:** 07.04.1993

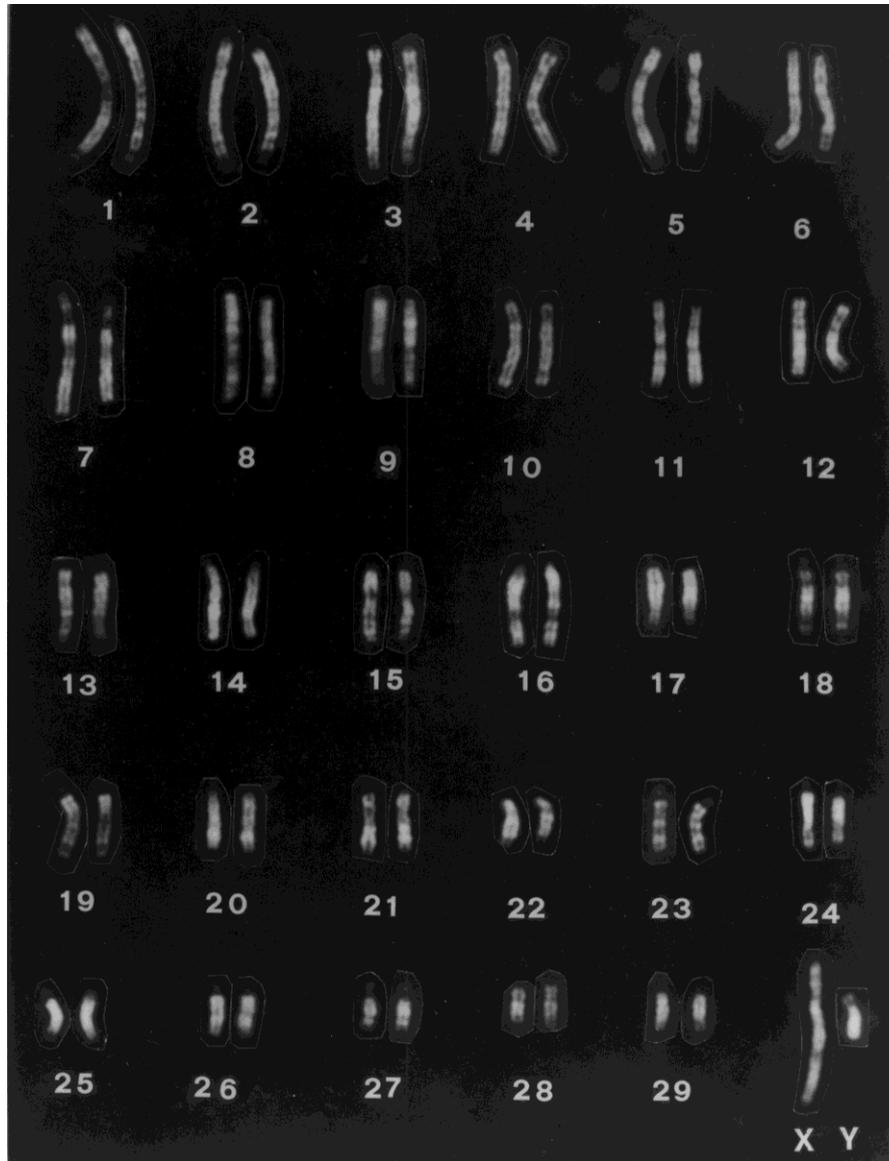
**Name:** Mustermann  
**Material:** Metaphase  
**Operator:** Leica Vertrieb GmbH

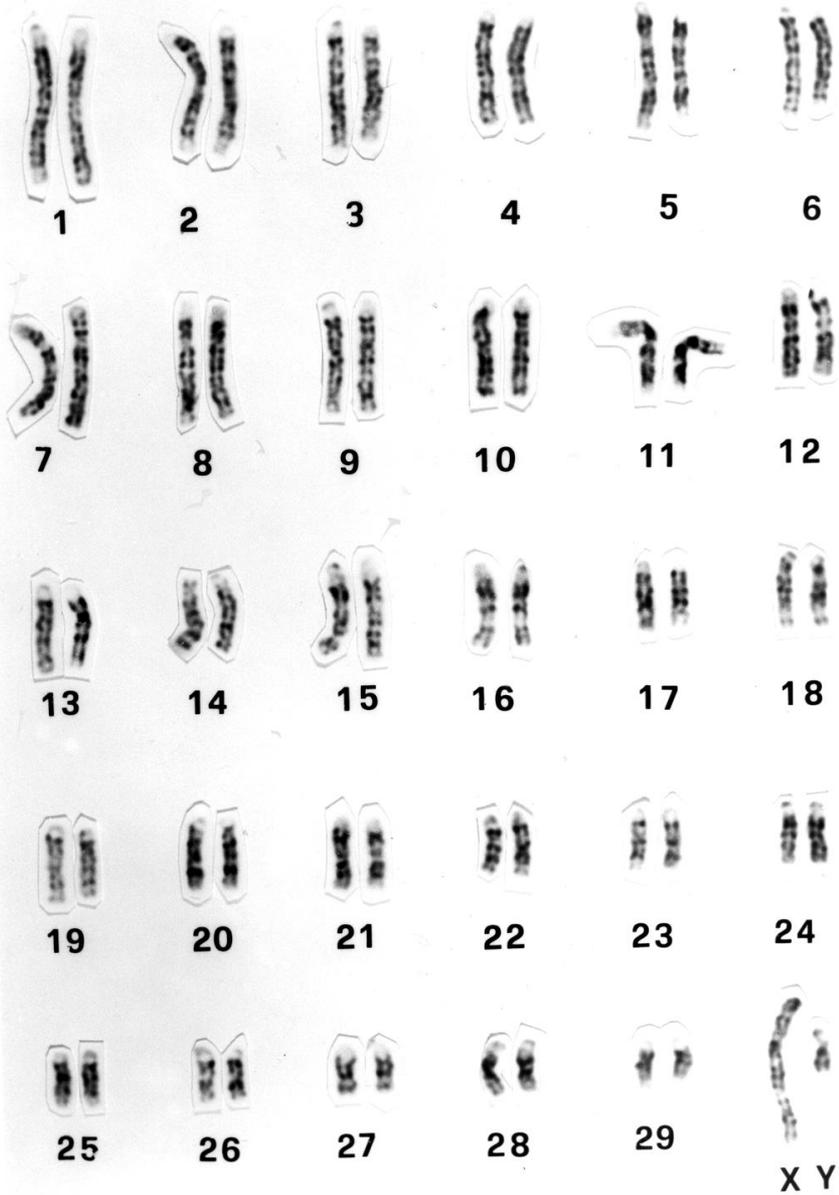
# Chantal for Leica Quantimet Karyotyping Workstation

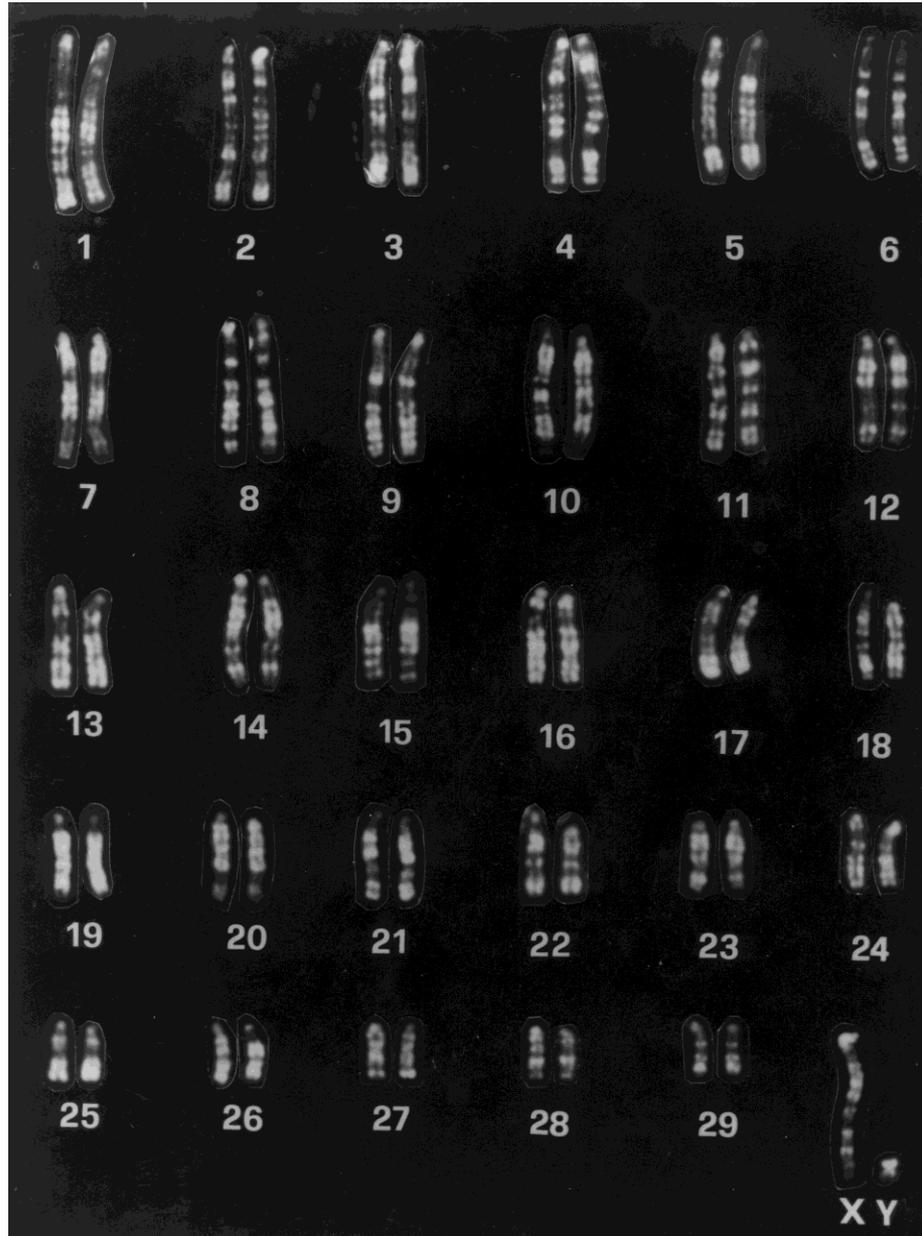


Quantity:	0
Nx:	10
Ny:	10
No:	LA-1234
Time:	09:42:25
Date:	05/07/1993

**Name:** Rossi Maria  
**Material:** Amniotic Fluid  
**Operator:** Leica SpA - Quantitative Microscopy





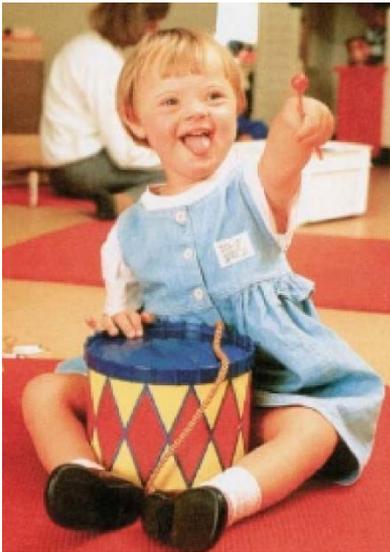


**CLASSIFICAZIONE DELLE ANOMALIE CROMOSOMICHE FINORA RICONTRATE NEGLI ORGANISMI ANIMALI  
O VEGETALI**

<b>Condizione</b>	<b>terminologia</b>	<b>Interpretazione citologica</b>
	<b>A : Anomalie numeriche</b>	
<b>Aneuploidia</b>	Monosomia (2n-1) Trisomia (2n+1) Tetrasomia ( 2n+2) Doppia trisomia (2n+1+1) Nullisomia ( 2n-2)	Perdita di un cromosoma Aggiunta di un cromosoma Aggiunta di una coppia di omologhi Aggiunta di due cromosomi non omologhi Perdita di una coppia di omologhi
<b>Euploidia</b>	Aploidia ( n) Triploidia ( 3n) Tetraploidia(4n) Autotetraploidia(4n) Allotetraploidia(4n)	Un solo genoma Tre genomi Quattro genomi Quattro genomi della stessa specie Quattro genomi di specie o generi diversi
	<b>B: Anomalie strutturali</b>	
<b>traslocazione</b>	(a)Fusione centrica (b)Fusione a tandem  (c)Reciproca	Fusione di tipo centromero-centromero (C-C) Fusione tra telomero e telomero (T-T) e tra telomero e centromero (T-C) Trasposizione di segmenti
<b>Inversione</b>	(a)Pericentrica (b)Paracentrica	Inversione di due segmenti cromosomici intorno al centromero Inversione di due segmenti cromosomici non interessante il centromero
<b>Delezione</b>	(a)Terminale (b)Interstiziale	Perdita di un segmento cromosomico terminale Perdita di un segmento cromosomico interstiziale
<b>Rottura</b>	(a)Terminale (b)Interstiziale	Discontinuità nella struttura cromosomica localizzata nei telomeri Discontinuità nella struttura cromosomica localizzata in regioni intermedie
<b>Duplicazione</b>		Raddoppiamento di un segmento cromosomico
<b>Gap o segmento acromatico</b>		Discontinuità di colorazione ma non di struttura

# Sindrome di Down

## Trisomia 21



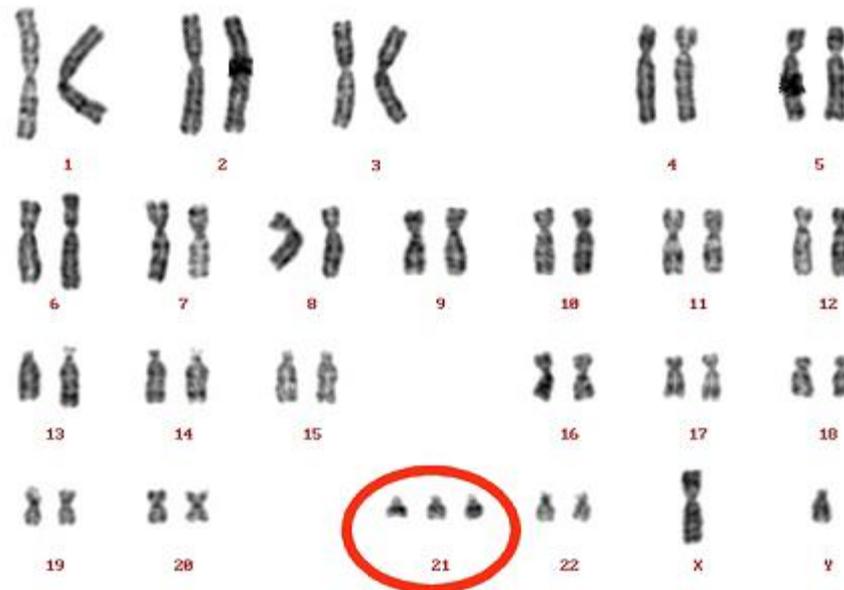
*Frequenza: 1/700 nati*

*Fenotipo: viso arrotondato e profilo facciale piatto, fessure palpebrali oblique, naso piccolo e largo, orecchie malformate, bassa statura e aspetto tozzo del corpo, cardiopatie congenite e deficit immunitari, ritardo mentale.*

*Età media di sopravvivenza: 50 anni.*

# Cause della Sindrome di Down

92% dei casi: **trisomia del cromosoma 21** (47,XX + 21 o 47,XY + 21)  
causata da non disgiunzione meiotica (3/4 di origine materna).

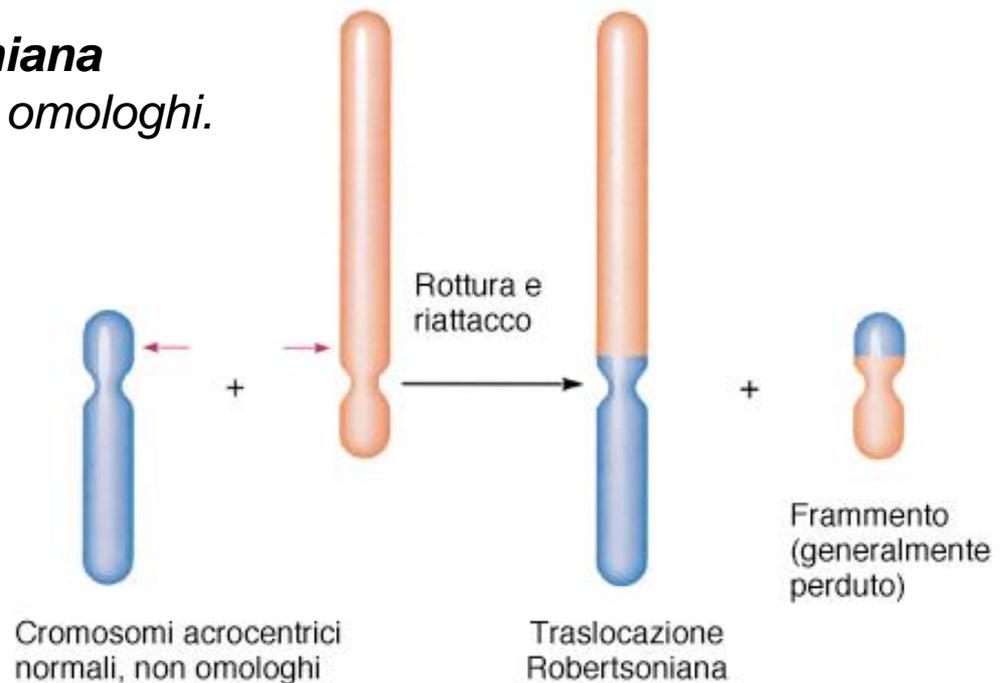


# Cause della Sindrome di Down

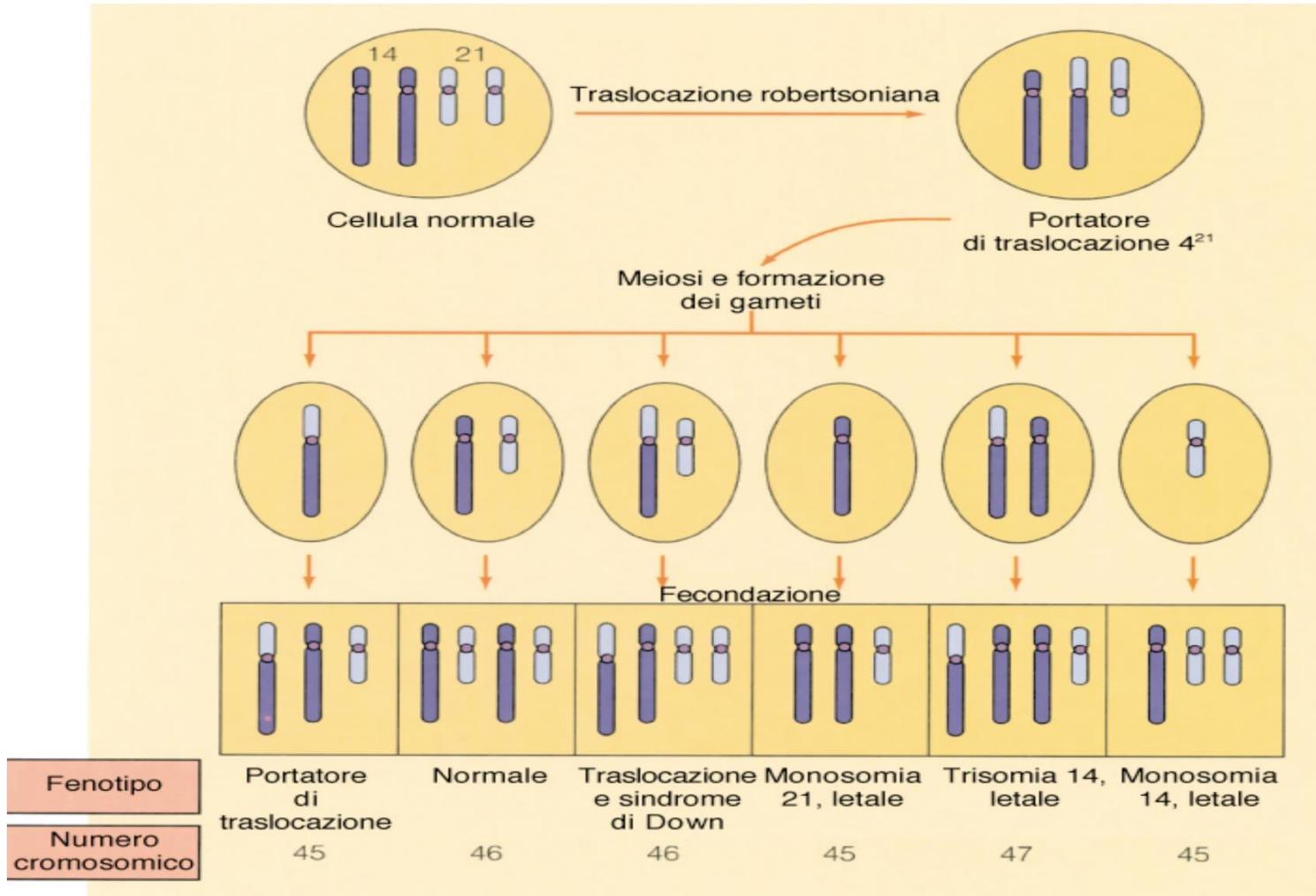
3% dei casi: **mosaicismo** (46,XX / 47,XX + 21 o 46,XY / 47,XY + 21).

5% dei casi: **trisomia 21 da traslocazione**.

***Traslocazione robertsoniana***  
*tra cromosomi acrocentrici non omologhi.*



# Cause della Sindrome di Down



*Gameti prodotti da un individuo portatore di una traslocazione robertsoniana e zigoti prodotti dopo la fecondazione.*

# Sindrome di Down

*Il principale fattore di rischio per la Sindrome di Down è l'età materna.*

Età materna	Frequenza nascita bambini con sindrome di Down
20 anni	1:1500
25 anni	1:1350
30 anni	1:900
35 anni	1:380
40 anni	1:110
45 anni	1:28

# Sindrome di Edwards

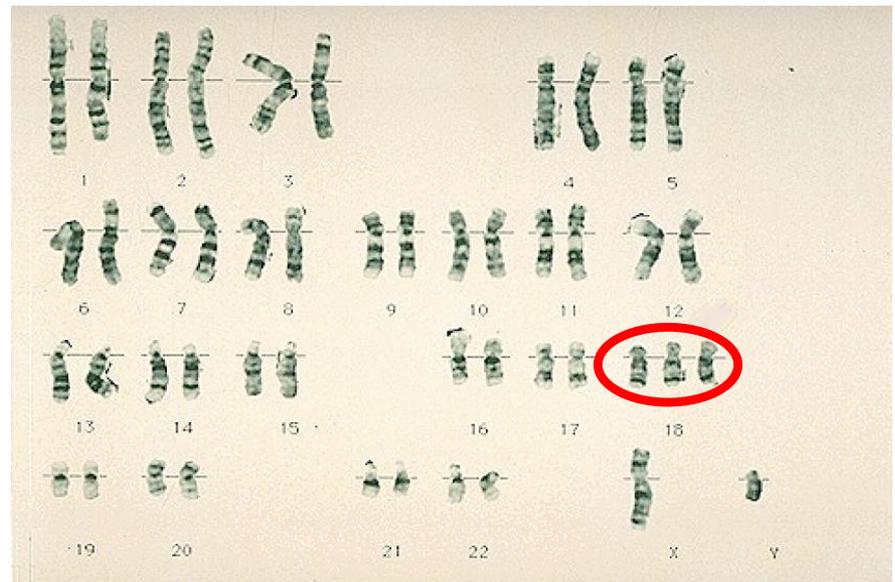
## Trisomia 18



*Frequenza:* 1/6.000 - 1/8.000 nati

*Fenotipo:* fronte stretta, mento e bocca piccoli, mani serrate e piedi a “picozza”.

*Età media di sopravvivenza:* generalmente letale nel primo anno di vita.



# Sindrome di Patau

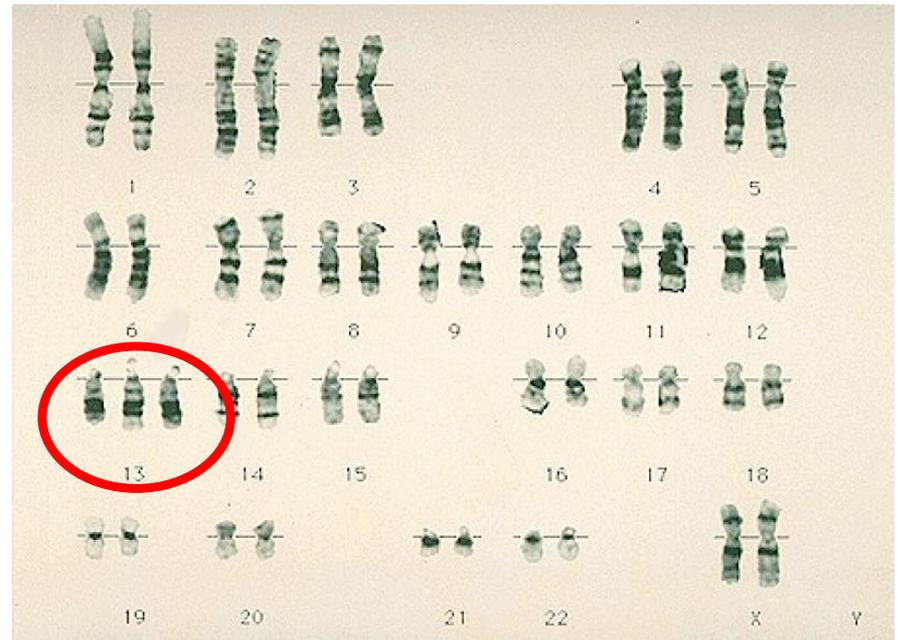
## Trisomia 13

*Frequenza:* 1/8.000 - 1/15.000 nati



*Fenotipo:* Labbro leporino con palatoschisi, pliche cutanee a livello della nuca, polidattilia.

*Età media di sopravvivenza:* generalmente letale nel primo anno di vita.

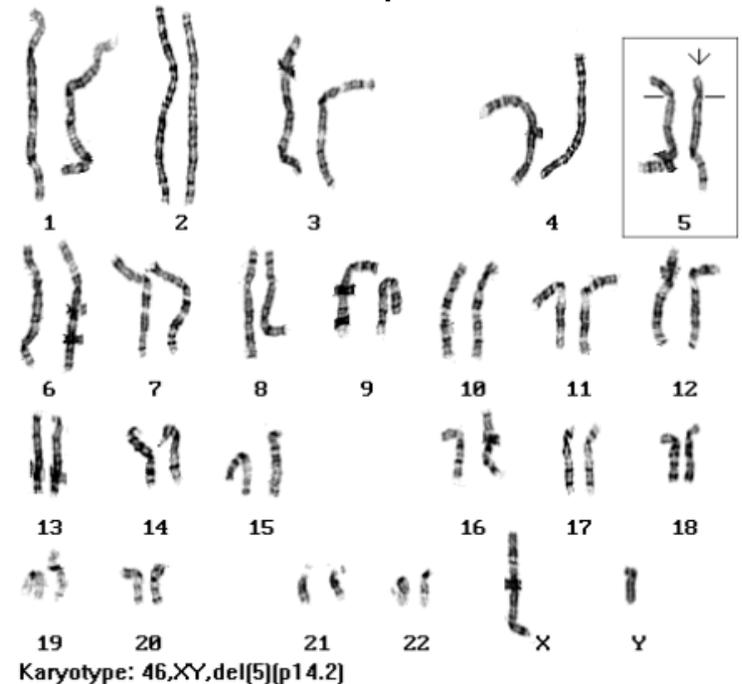


# Sindrome del CRI DU CHAT (delezione del braccio corto del cromosoma 5)



*Frequenza:* 1/15.000 - 1/50.000 nati

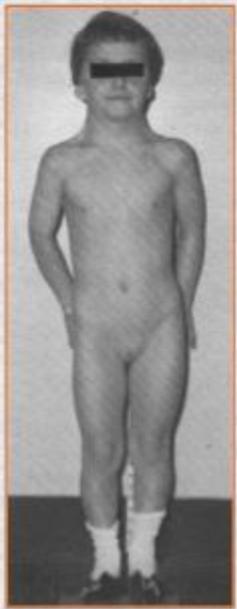
*Fenotipo:* caratterizzata da pianto flebile simile al miagolio del gatto soprattutto nei primi anni di vita, ritardo psicomotorio, malformazioni dell'apparato gastrointestinale, aspettativa di vita non significativamente ridotta.



**Tab. 2.10** Aneuploidie del cromosoma X numeriche e strutturali negli uomini

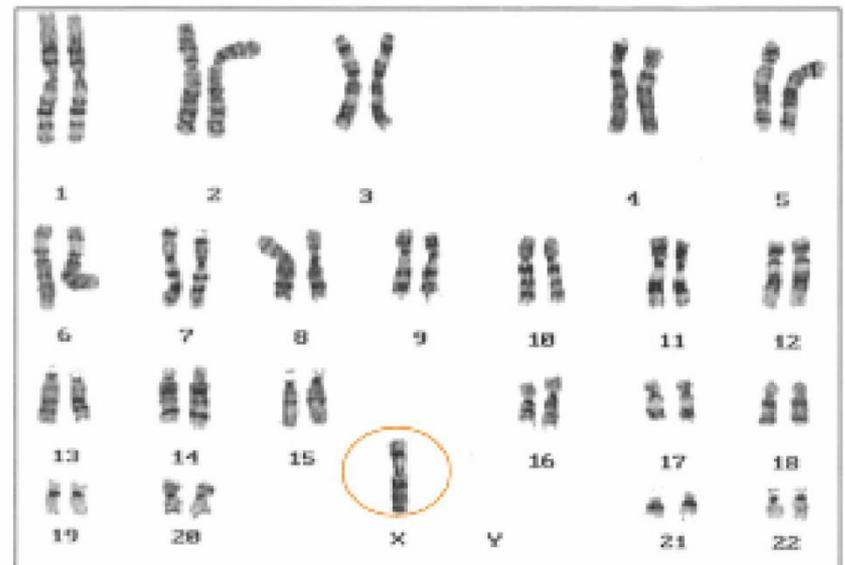
Cariotipo	Fenotipo	Frequenza approssimativa
XXY	Sindrome di Klinefelter	1/700 ♂
XXXY	Variante della sindrome di Klinefelter	~ 1/2500 ♂
XXXXY	Deficienza mentale di grado lieve; grave ipoplasia genitale; sinostosi radioulnare	Molto rara
XXX	Talvolta oligofrenia; occasionalmente anomalie della funzione ovarica	1/1000 ♀
XXXX XXXXX	Fisicamente normale; grave ritardo mentale	Rara
mosaici XXY/XY e XXY/XX	Tipo Klinefelter, talvolta con una sintomatologia più lieve	~5-15% di tutti i pazienti con fenotipo Klinefelter
mosaici XXX/XX	Tipo XXX	Rara
XO	Sindrome di Turner	~1/2500 alla nascita
mosaici XO/XX e XO/XXX	(Turner); grado di manifestazione molto differente	Non rare
Varie anomalie strutturali del cromosoma X		Non rare
XYY	Alta statura; anomalie comportamentali occasionali	1/800 ♂
XXYY	Alta statura; per il resto rassomiglia alla sindrome di Klinefelter	Rara

# Sindrome di Turner (45,X0)



*Frequenza:* 1/5.000 nati

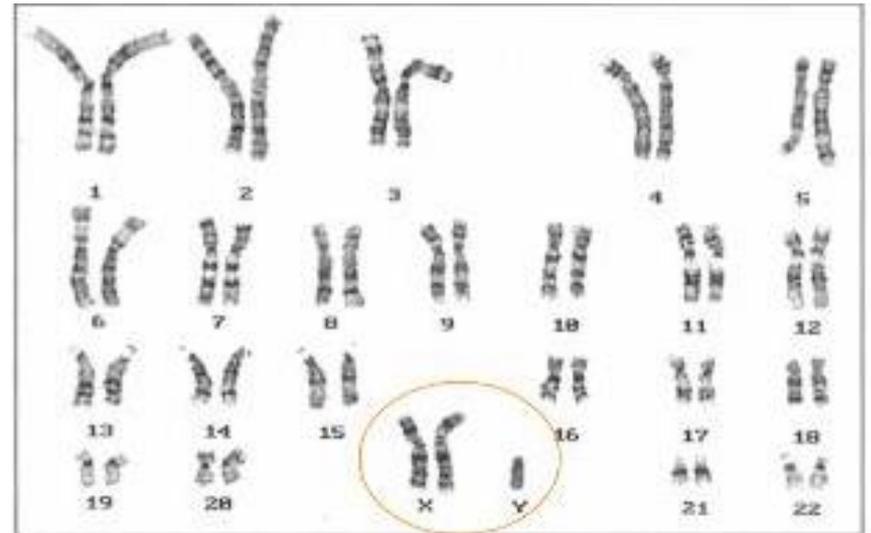
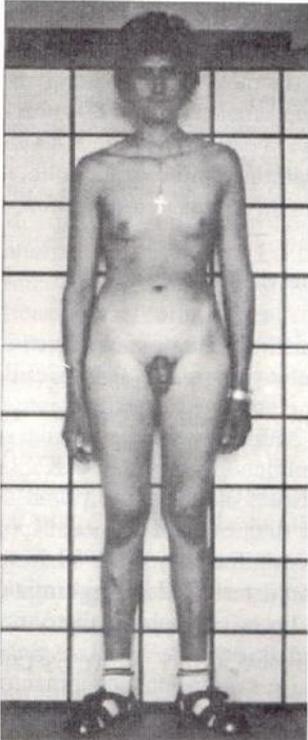
*Fenotipo:* bassa statura, collo corto e largo con presenza di pliche cutanee, ipoplasia ovarica, amenorrea primaria e sterilità, malformazioni renali e cardiache.



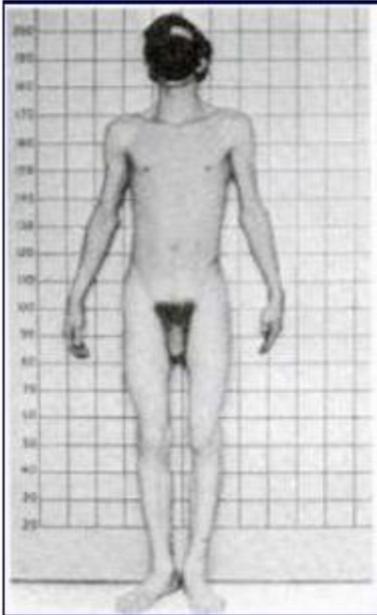
# Sindrome di Klinefelter (47,XXY)

*Frequenza:* 1/700 nati

*Fenotipo:* aspetto ginoide e longilineo con arti lunghi e altezza superiore alla media, ginecomastia, ipogonadismo, azospermia e frequente infertilità, occasionalmente QI inferiore alla media.

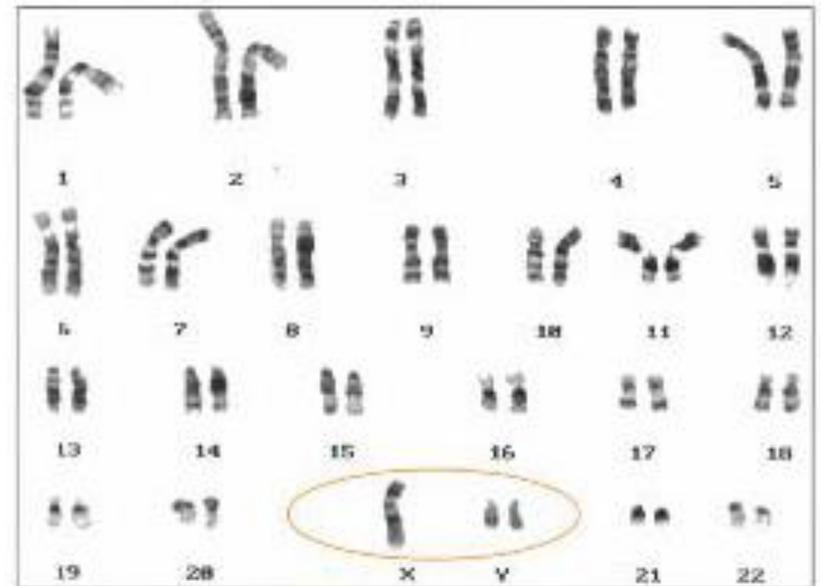


# Sindrome del supermaschio (47,XYY)



*Frequenza:* 1/1.000 nati

*Fenotipo:* normale con tendenza all'alta statura, fertilità normale, occasionalmente QI inferiore alla media e disturbi di personalità.



# Aneuploidie

Monosomie		Polisomie			
Degli eterocromosomi		Degli eterocromosomi		Degli autosomi	
cariotipo	sindrome	cariotipo	sindrome	cariotipo	sindrome
45, X0	Turner	47, XXX 48, XXXX 49, XXXXX	Polisomie del cromosoma X, “superfemmine”	47,XX o XY, +21	Down
		47, XXY 48, XXXY 49, XXXXY	Sindrome di Klinefelter	47,XX o XY, +18	Edwards
		47, XYY e 48, XXYY	Sindrome del doppio Y	47,XX o XY, +13	Patau
				47,XX o XY, +8	Trisomia 8

**CROMATINA**

**EUCROMATINA** - dispersa durante la fase S, costituita di DNA non ripetitivo (sequenze uniche), Replica precocemente.

**ETEROCROMATINA** - condensata durante la fase S. Si distingue in: Replica tardivamente.

**costitutiva**

(a) sequenze altamente ripetitive di DNA, circa 1000000 di copie, localizzate nel centromero;

(b) sequenze moderatamente ripetitive di DNA, circa 100-10.000 copie.

**facoltativa: uno dei due cromosomi X nelle femmine dei mammiferi (corpo di Barr, inattivazione, compensazione genica)**

#### **FUNZIONI DELL'ETEROCROMATINA COSTITUTIVA**

(a) sequenze altamente ripetitive: DNA di riserva per l'evoluzione, protezione da agenti mutageni, controllo e/o regolazione delle sequenze non ripetitive, attracco delle fibre del fuso, spaziatori, struttura portante del cromosoma;

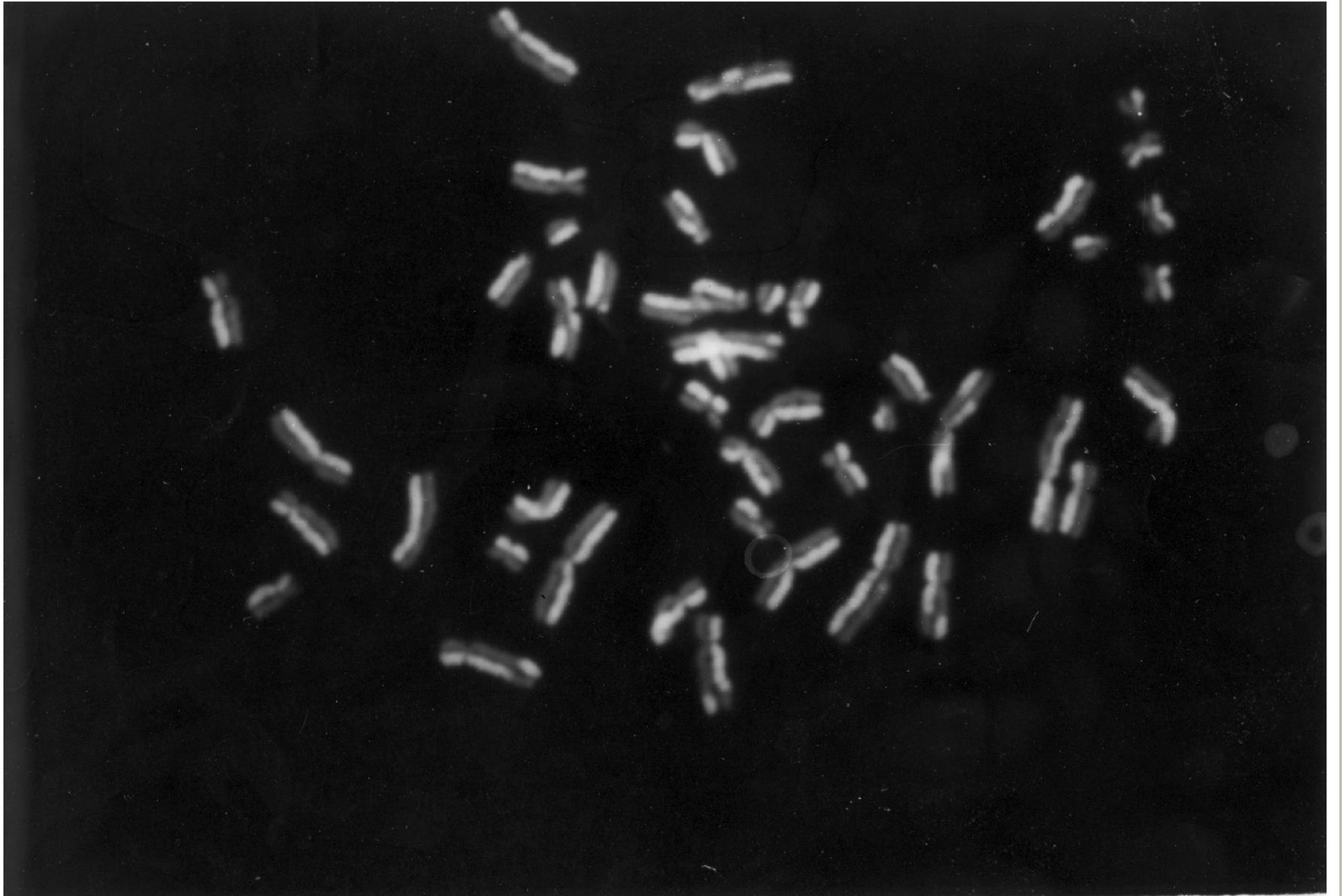
(b) sequenze moderatamente ripetitive: codificano per l'RNA ribosomiale, l'RNA transfer, istoni. Comprendono anche il DNA satellite.

#### **DNA SATELLITE**

Moderatamente ripetitivo (fino a 400 copie); non codifica per alcuna proteina. Pare sia implicato nel processo di appaiamento dei cromosomi in meiosi, nel loro impacchettamento e nel mantenimento della loro integrità strutturale.

Viene distinto in : (a) leggero, se ricco di basi A-T

(b) pesante, se ricco di basi G-C





**UNIVERSITA' DEGLI STUDI  
DELLA BASILICATA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE**

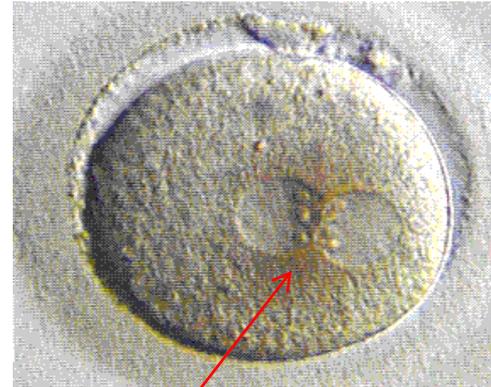
# **Manipolazione embrionale**

**Prof.ssa Maria Brigida Lioi**

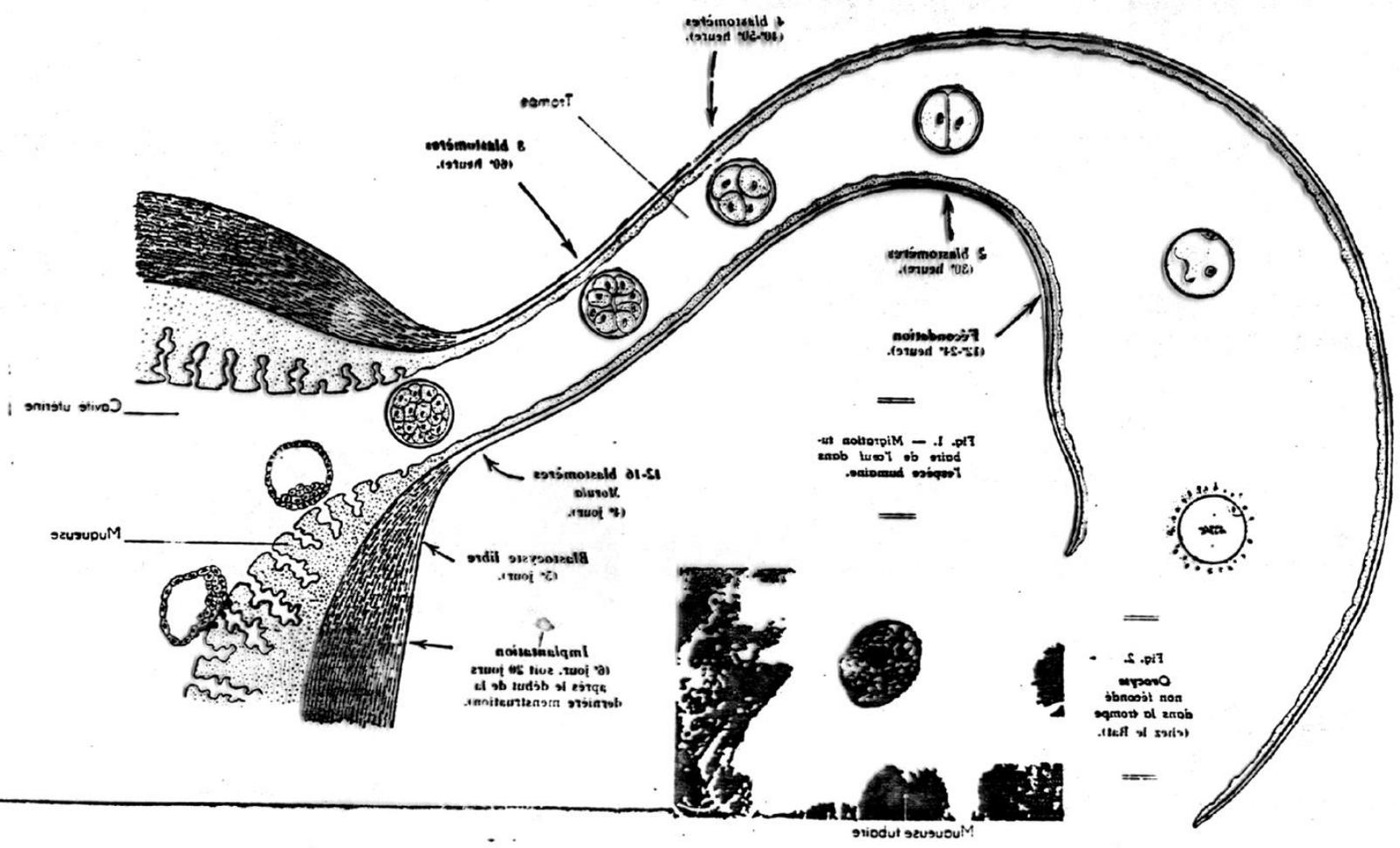
**Potenza, 17 maggio 2017**

# Fecondazione

*Processo in cui il pronucleo maschile (aploide,  $n$ ) penetra nell'ovocita II femminile per formare lo **ZIGOTE** (cellula diploide,  $2n$ ).*



cariogamia



## FASI OPERATIVE

· 1<sup>a</sup>. SUPEROVULAZIONE DELLE DONATRICI

· 2<sup>a</sup>. INSEMINAZIONE STRUMENTALE

· 3<sup>a</sup>. RACCOLTA

· 4<sup>a</sup>. VALUTAZIONE BIOLOGICA

MICROMANIPOLAZIONE

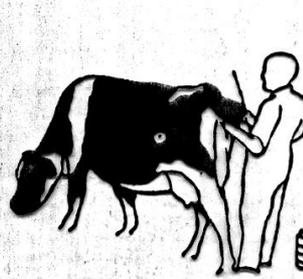
· 5<sup>a</sup>. TRASFERIMENTO IN RICEVENTE

· 6<sup>a</sup>. CONGELAMENTO

FASI OPERATIVE



Superevulazione



Inseminazione



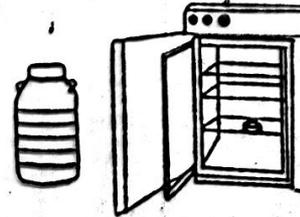
Raccolta di embrioni



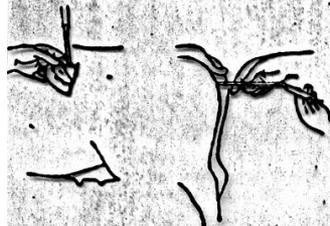
Catetere Foley  
per la raccolta



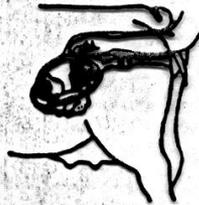
Isolamento e valuta-  
zione biologica  
degli embrioni



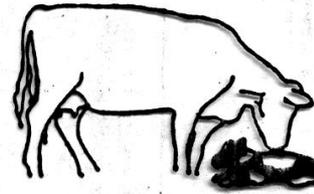
Congelamento o cultura  
in vitro a 37°C



Trasferimento chirur-  
gico o non chirurgico



Diagnosi di  
gravidanza



Nascita (9 mesi dopo il  
trasferimento)

# **MICROMANIPOLAZIONE**

## **SULL'EMBRIONE:**

- GEMELLAGGIO STRUMENTALE: SPLITTING

-SESSAGGIO

-CHIMERE

## **SULL'OVULO FECONDATO:**

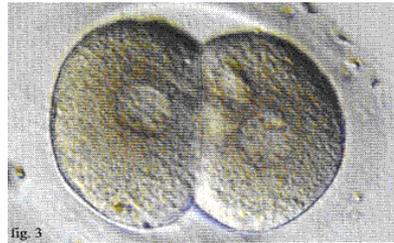
-CLONAZIONE

-TRASFERIMENTO DI GENI

-PARTENOGENESI: GINOGENESI E ANDROGENESI

# PRODUZIONE DI GEMELLI MONOZIGOTICI

-SEPARAZIONE DI BLASTOMERI



-BISEZIONE DELLA MORULA





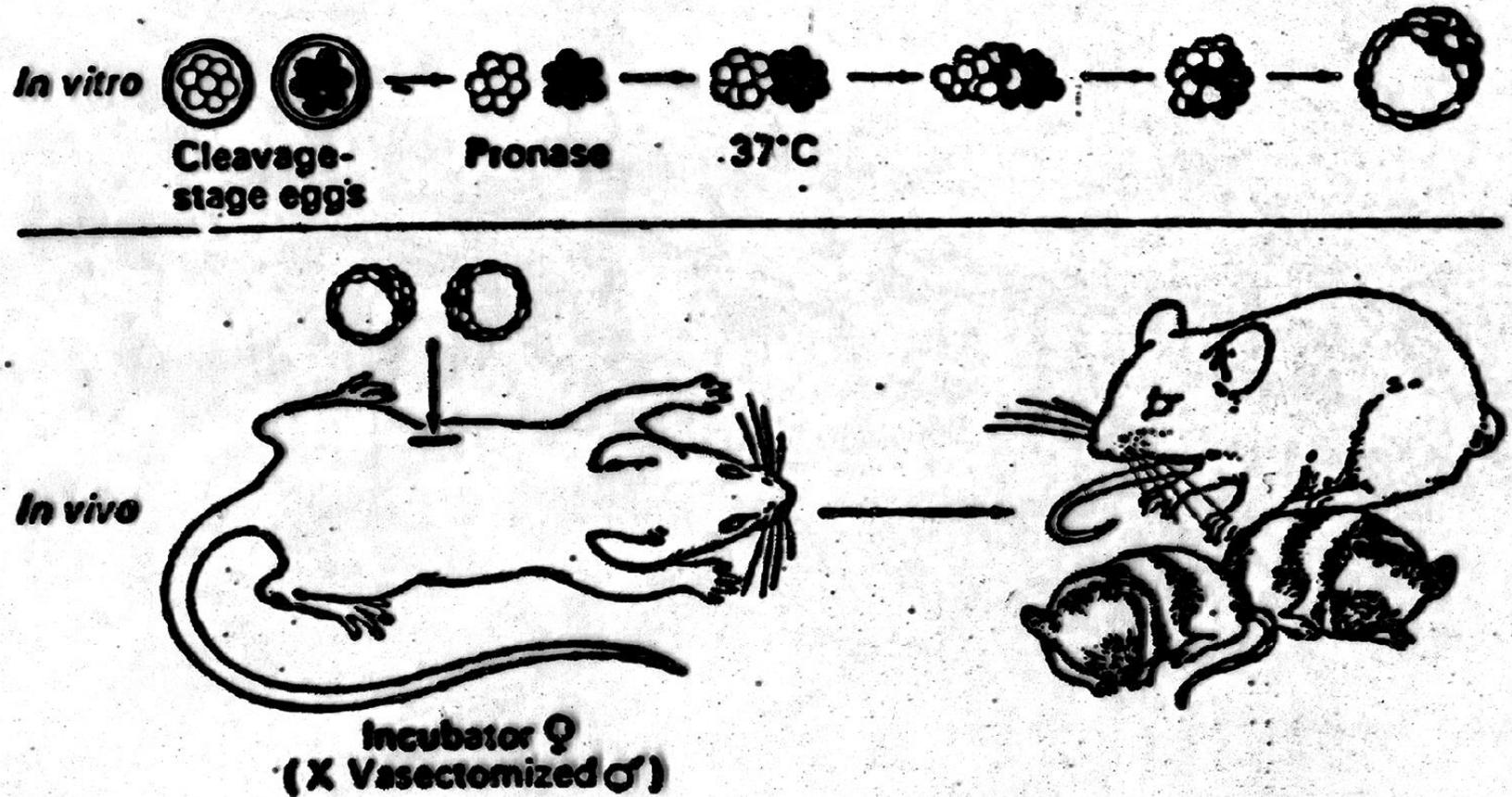
## IMPRONTA DIGITALE DEL DNA (DNA FINGERPRINTS)

QUESTA TECNICA CONSENTE DI OTTENERE UN TRACCIATO ELETTROFORETICO DI FRAMMENTI DI DNA ALTAMENTE SPECIFICO PER OGNI INDIVIDUO.

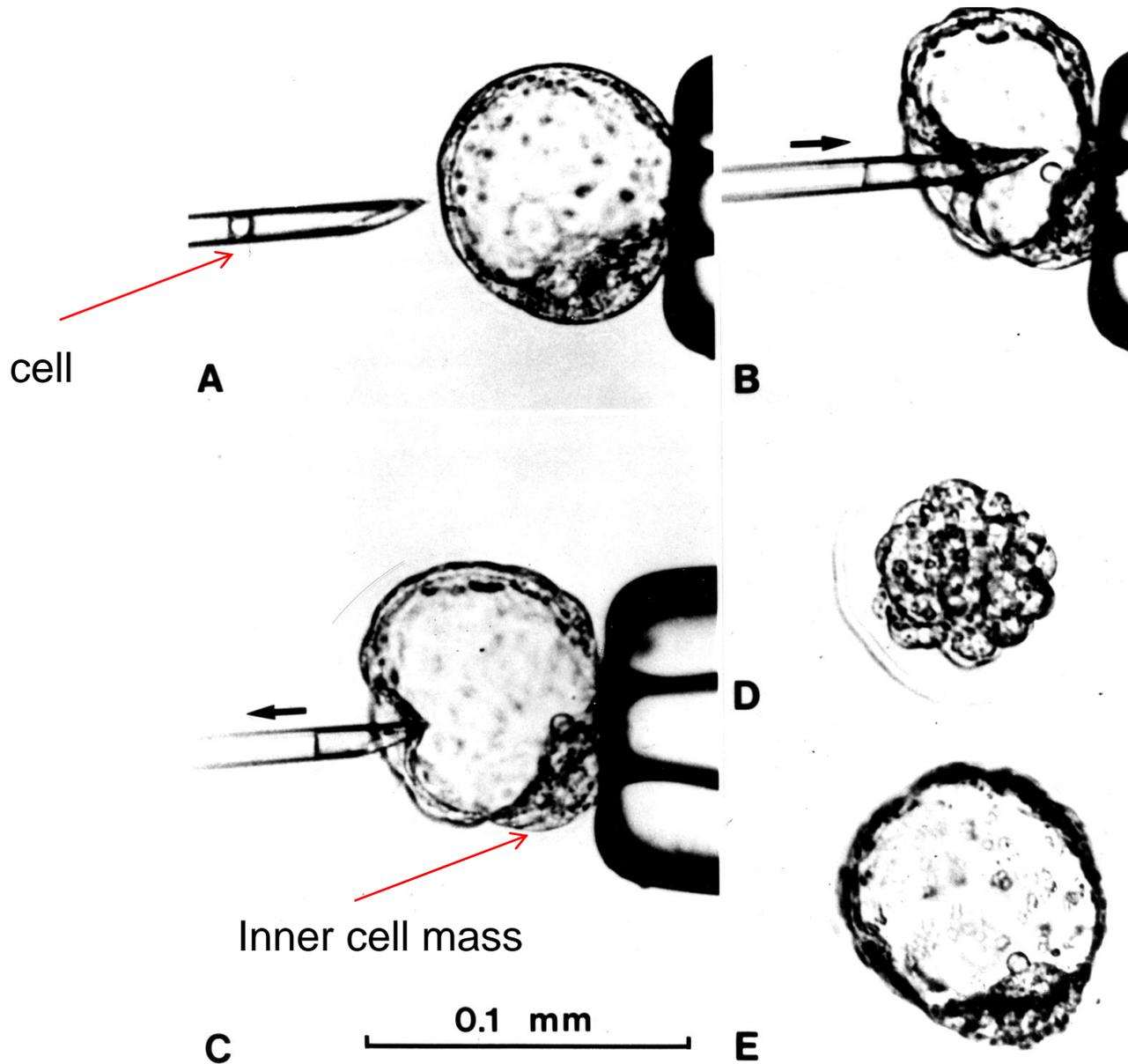
LA METODICA UTILIZZATA (METODO DI SOUTHERN) E' LA SEGUENTE:

1. ESTRAZIONE DEL DNA DAI LEUCOCITI;
2. ISOLAMENTO DEL DNA GENOMICO;
3. FRAMMENTAZIONE DEL DNA MEDIANTE ENZIMI DI RESTRIZIONE;
4. SEPARAZIONE DEI FRAMMENTI DI DNA MEDIANTE ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO;
5. DENATURAZIONE DEI FRAMMENTI E TRASFERIMENTO DEGLI STESSI DAL GEL SULLA MEMBRANA DI NITROCELLULOSA;
6. IBRIDAZIONE CON SONDE MARCATE CON ISOTOPI RADIOATTIVI ( $^{32}\text{P}$ );
7. AUTORADIOGRAFIA (CONTATTO DEL FILTRO CON UNA LASTRA RADIOGRAFICA)
8. LA LASTRA RADIOGRAFICA VERRA' IMPRESSIONATA SOLO IN CORRISPONDENZA DEI FRAMMENTI DI DNA AI QUALI SI E' LEGATA LA SONDA RADIOATTIVA.

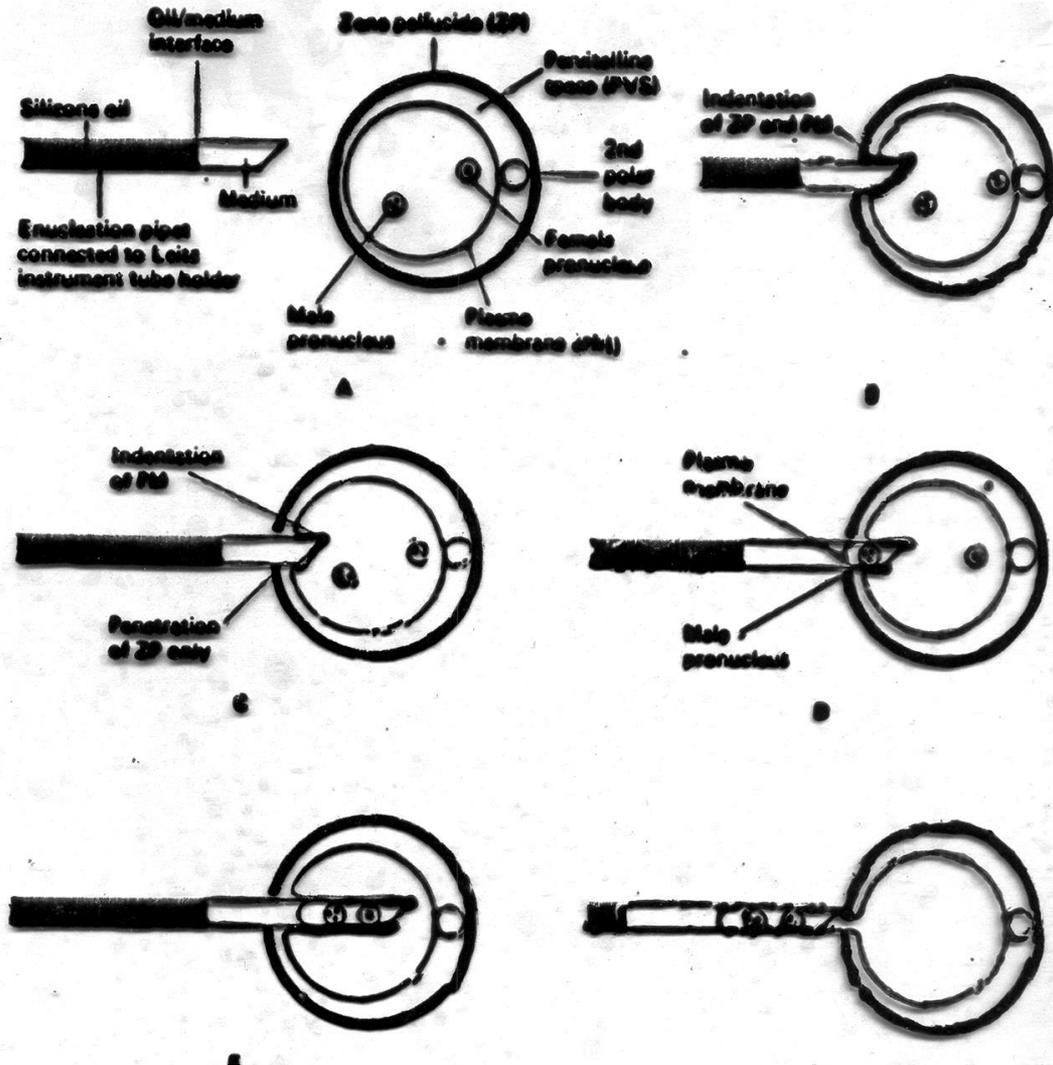
# PRODUZIONE DI CHIMERE PER AGGREGAZIONE DI GIOVANI MORULE



# PRODUZIONE DI CHIMERE MEDIANTE MICROINIEZIONE IN BLASTOCISTI



# PROCESSO DI ENUCLEAZIONE PER IL TRASFERIMENTO NUCLEARE



## **TRANSGENICI**

**OBIETTIVO: MODIFICAZIONE DELL'ASSETTO GENETICO DI UN INDIVIDUO**

**SCOPI: 1. MODIFICAZIONE DEI PRINCIPALI PROCESSI BIOLOGICI**

**(accrescimento, lattazione, ecc.)**

**2. MODIFICAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA**

**(aumento della capacità di resistenza alle malattie, ecc.)**

**3. APERTURA DI NUOVE VIE METABOLICHE**

**(produzione di ormoni, enzimi, amminocidi, ecc.)**

**METODI:**

**1. MICROINIEZIONE DI DNA;**

**2. INFEZIONE DA RETROVIRUS;**

**3. MICROINIEZIONE DI CELLULE TRASFORMATE.**

**LIMITI ATTUALI DELLA TECNOLOGIA TRANSGENICA:**

**1. INTEGRAZIONE A RANDOM DEL GENE TRASFERITO IN UNO O PIU' SITI;**

**2. ESPRESSIONE SCARSA O ADDIRITTURA ASSENTE DEL GENE TRASFERITO**

**A CAUSA DELLA MANCANZA DI 'PROMOTERS' O DELLA PRESENZA DI 'REPRESSORS';**

**3. VARIABILITA' DI ESPRESSIONE DEL GENE TRASFERITO, NON SOLO ENTRO MA ANCHE FRA LE LINEE TRANSGENICHE;**

**4. LA FERTILITA' DEI SOGGETTI TRANSGENICI PUO' RIDURSI DRASTICAMENTE;**

**5. L'INTEGRAZIONE DEL DNA PUO' DETERMINARE MUTAZIONI NEL DNA OSPITE**

# TRASFERIMENTO DI GENI MEDIANTE MICROINIEZIONE

