



Centro Università degli Studi di Milano - Scuola per la diffusione delle Bioscienze

LE ANALISI CROMOSOMICHE



Università degli Studi di Milano

Introduzione

La **citogenetica** è la branca della genetica che studia i cromosomi. Ogni specie è caratterizzata da un determinato **assetto cromosomico**, vale a dire da un insieme specifico di cromosomi, il cui numero e struttura vengono mantenuti costanti attraverso le generazioni.

Lo scopo di questo laboratorio è di rendere familiari le metodologie usate in citogenetica umana per lo studio dei cromosomi, guidando gli studenti nell'osservazione e nell'interpretazione di assetti cromosomici normali o patologici.

Sono necessarie alcune conoscenze propedeutiche e, in particolare, è opportuno tener presente:

- la struttura della doppia elica del DNA
- la modalità di replicazione del DNA
- il ciclo cellulare delle cellule eucariotiche
- l'organizzazione strutturale della cromatina
- i processi di divisione cellulare (mitosi e meiosi), con particolare attenzione al comportamento dei cromosomi durante tali eventi.

Patologia cromosomica

Nel corso degli anni le tecniche citogenetiche per lo studio del cariotipo si sono sempre più raffinate ed oggi, grazie alle colorazioni specifiche, è possibile verificare non soltanto la presenza di un corretto numero di cromosomi nelle cellule, ma anche di individuare alterazioni strutturali anche di piccole dimensioni. Si è sviluppata così una branca della patologia umana denominata **patologia cromosomica**.

Alcune applicazioni dell'analisi citogenetica nella patologia cromosomica sono:

- diagnosi pre e post natale di sindromi associate ad anomalie cromosomiche
- diagnosi post natali di alterazioni cromosomiche strutturali bilanciate ereditate da persone portatrici fenotipicamente normali o verificatesi "de novo"
- diagnosi post natali di alterazioni cromosomiche strutturali bilanciate
- studio citogenetico delle cellule tumorali. Molti tumori sono caratterizzati da un numero anormale di cromosomi.

Variabilità cromosomica normale

Il genoma umano presenta una grande variabilità genetica a livello molecolare, variabilità che ha riscontri anche a livello citogenetico quando coinvolge tratti di DNA dell'ordine di milioni di basi.

Molta di questa variabilità riguarda l'eterocromatina, regione condensata ricca di sequenze di DNA ripetute (satelliti) e inattiva dal punto di vista della trascrizione. Generalmente le sequenze di DNA satellite si trovano localizzate nella cromatina associata alle regioni centromeriche dei cromosomi.

Si tratta quindi di una variabilità normale che può manifestarsi sotto forma di varianti morfologiche:

- variazioni di lunghezza di zone pericentromeriche, soprattutto dei cromosomi 1, 9, 16, Y
- variazioni di lunghezza dei bracci corti dei cromosomi acrocentrici

Variabilità cromosomica patologica

D'altra parte, una qualsiasi anomalia del cariotipo umano normale ha di norma come conseguenza una patologia, di gravità variabile.

Le anomalie sono generalmente il risultato di errori durante la gametogenesi (non-disgiunzione dei cromosomi omologhi o rotture cromosomiche seguite da una riorganizzazione degli stessi in combinazioni anomale), ma possono verificarsi anche al momento della fecondazione o nelle prime fasi dello sviluppo embrionale. Le rotture dei cromosomi si verificano in modo casuale, pertanto a livello teorico sono possibili numerosissime anomalie; di fatto solo in piccola parte sono compatibili con la vita.

Le anomalie cromosomiche si possono distinguere in due gruppi: **anomalie numeriche** e **di struttura**.

Anomalie numeriche

L'euploidia è una condizione in cui il numero dei cromosomi di una cellula è quello aploide (n) o un multiplo intero di questo ($2n$, $3n$, $4n$, ecc.). L'essere umano ha un assetto cromosomico $2n$ quindi diploide, ad eccezione dei gameti che sono pari a n cioè aploidi. Gli assetti superiori a $2n$ sono detti poliploidi (triploidi $3n$, tetraploidi $4n$, ecc.) (Fig.1).

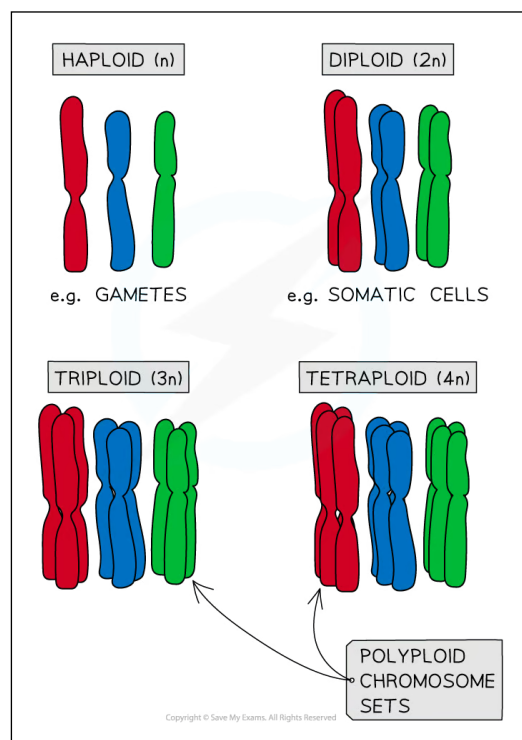


Fig. 1. Tipi di assetti cromosomici.

Nell'uomo la presenza di una triploidia (Fig.2) è di fatto incompatibile con la vita, in quanto determina nel 99% dei casi un aborto spontaneo, e nell'1% dei casi la morte precoce dei neonati entro il primo mese di vita (l'incidenza della triploidia nei nati vivi è di 1:10.000 diagnosi).

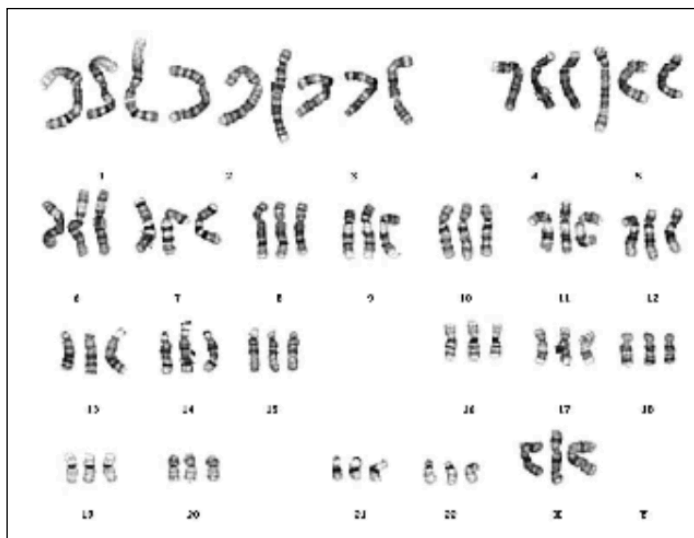


Fig. 2. Esempio di triploidia.

Le aneuploidie sono anomalie cromosomiche caratterizzate da alterazioni del numero dei cromosomi, cioè da un numero maggiore o minore di cromosomi rispetto al numero standard: i casi più comuni sono rappresentati dalle trisomie, con presenza di un cromosoma soprannumerario, vale a dire un corredo cromosomico $2n + 1$ (es. trisomie del cromosoma 13, 18, 21), e dalle monosomie, mancanti di un cromosoma, vale a dire un assetto cromosomico $2n - 1$ (es. sindrome di Turner: 45, X0) (Tab. 1).

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, XYY	Sindrome del doppio Y	47,XX o XY, +13	Patau
				47,XX o XY, +8	Trisomia 8

Tab.1. Schema riassuntivo delle più comuni aneuploidie dei cromosomi sessuali e degli autosomi.

Anomalie di struttura

I cambiamenti di struttura possono coinvolgere uno, due o più cromosomi e sono il risultato di rotture ed eventuali ricongiungimenti errati di porzioni cromosomiche. In alcuni casi le rotture sono ricomposte in modo da ripristinare la struttura originaria, ma nella maggior parte dei casi sono alla base di un riarrangiamento cromosomico anomalo.

Le più importanti modificazioni sono (Fig. 3):

(a) **delezione**: perdita di un frammento di cromosoma. La delezione può essere terminale, causata da una singola rottura cromosomica all'estremità, più frequentemente, interstiziale, come conseguenza di due rotture all'interno del cromosoma

(b) **inversione**: rottura del cromosoma in due punti con formazione di un segmento cromosomico che si reinserisce nel cromosoma dopo rotazione di 180°

(c) **uplicazione**: raddoppiamento di un tratto di un cromosoma. Le duplicazioni sono più frequenti e meno dannose delle delezioni

(d) **traslocazione**: spostamento di un tratto o di un intero cromosoma su di un altro cromosoma non omologo; quando, in seguito al riarrangiamento, la quantità totale del materiale genetico non risulta alterata si parla di traslocazione bilanciata e non si hanno effetti sul fenotipo. Le traslocazioni possono però causare la produzione di gameti con corredo genico sbilanciato e quindi essere responsabili di gravi sindromi polimalformative nella prole.

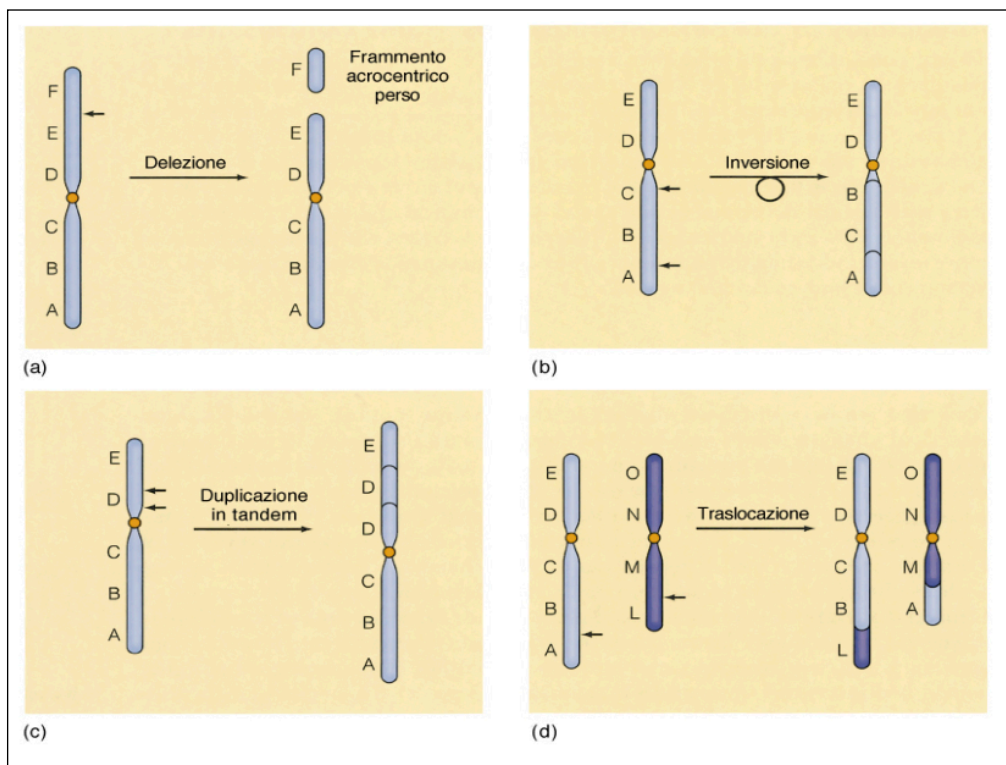


Fig. 3. Anomalie cromosomiche strutturali.

Origine delle anomalie cromosomiche

Anomalie numeriche

Poliploidie

Le *triploidie* ($3n$) si originano in seguito alla fecondazione di un singolo ovulo da parte di due spermatozoi (Fig. 4 A) o ad errori della meiosi sia femminile sia maschile con formazione di gameti in cui non è avvenuta la riduzione del numero (Fig. 4 B e C) o ancora, meno frequentemente, per la mancata espulsione del globulo polare durante la gametogenesi femminile.

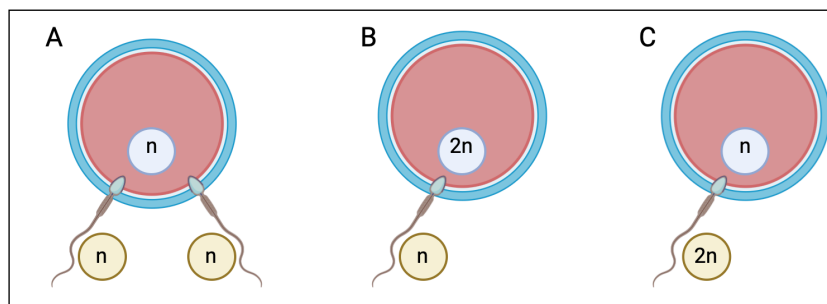


Fig. 4. Triploidie.

Le *tetraploidie* (Fig. 5) sono invece causate da un errore nelle prime segmentazioni dello zigote, per cui il corredo cromosomico diventa $4n$.

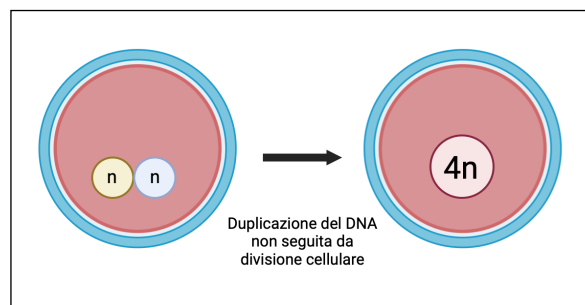


Fig. 5. Tetraploidie.

Aneuploidie

Durante ciascuna delle due divisioni cellulari che caratterizzano la meiosi, può verificarsi un errore nella segregazione (non-disgiunzione) di una coppia di cromosomi omologhi (nella prima divisione) (Fig. 6 A) o dei cromatidi fratelli di un cromosoma (nella seconda) (Fig. 6 B). Ne consegue la formazione di gameti con un cromosoma in più ($n + 1$) o un cromosoma in meno ($n - 1$). Generalmente, il rischio aumenta con l'aumentare dell'età materna. La non-disgiunzione può interessare tutte le coppie di cromosomi, così come evidenziato dagli studi di citogenetica condotti sugli aborti spontanei.

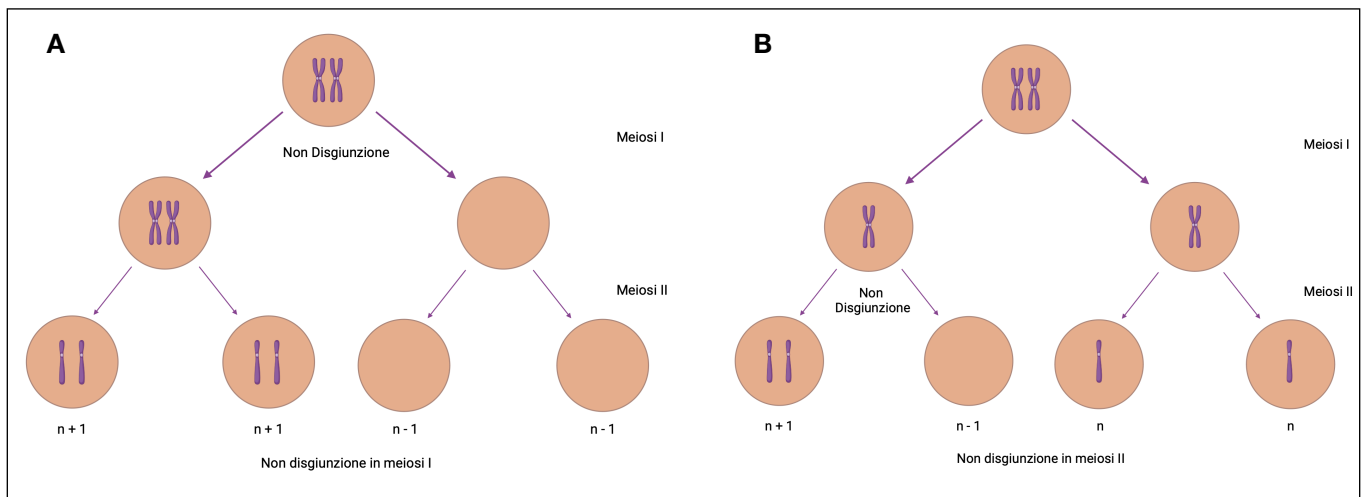


Fig. 6. Aneuploidie. Nella prima divisione meiotica (A) e nella seconda divisione meiotica (B).

Anomalie di struttura

Derivano da rotture e successivi riarrangiamenti nell'ambito dello stesso cromosoma (delezioni, inversioni), o di due o più cromosomi non omologhi (traslocazioni) o ancora da ripetizioni di un tratto di un cromosoma (duplicazioni).

Mosaici

Un individuo viene definito mosaico cromosomico quando presenta almeno due linee cellulari diverse, derivate da uno stesso zigote, a seguito di un'anomalia in una delle cellule formatasi in un

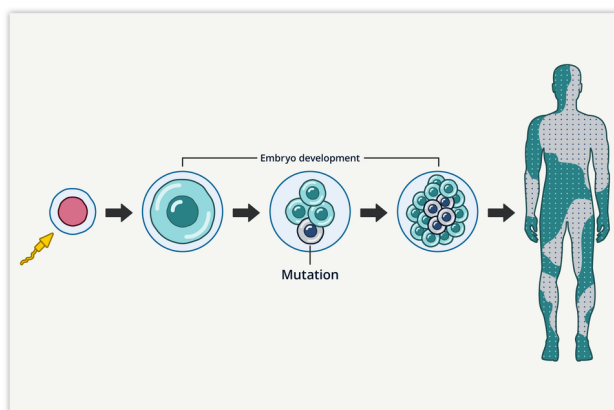


Fig. 7. Mosaicismo.

In un mosaico, la gravità dello sbilanciamento dipende dal numero di cellule che compongono ciascuna linea cellulare, vale a dire dal momento in cui è avvenuto l'evento anomalo (ampiezza del settore anomalo tanto maggiore quanto più precocemente si è verificato l'evento).

Aspetti clinici delle anomalie degli autosomi

Anomalie numeriche

L'incidenza totale delle anomalie degli autosomi e dei cromosomi sessuali fra i nati vivi è di circa lo 0,3%, per quanto riguarda quelle che comportano un effetto fenotipico (trisomie totali e parziali e delezioni); a ciò va aggiunto uno 0,2% di portatori di traslocazioni bilanciate. Pertanto, lo 0,5% dei nati vivi presenta un cariotipo anormale.

In generale, uno sbilanciamento genico conseguente ad un'anomalia numerica o strutturale dei cromosomi provoca sempre un danno nello sviluppo. Se lo sbilanciamento è esteso, questo può compromettere lo sviluppo embrionale (con conseguente aborto spontaneo) oppure determinare la nascita di bambini con gravi malformazioni, generalmente associate a ritardo mentale. Se esso è modesto, come nel caso di delezioni e duplicazioni di lieve entità, potranno non essere presenti malformazioni gravi e quadri dismorfici accentuati, mentre è probabile un ritardo psicomotorio, anche se limitato.

Le trisomie complete fra i nati vivi si riscontrano a carico solo di pochi autosomi, mentre negli aborti spontanei ne sono state descritte per tutti i cromosomi.

Trisomie

Trisomia del cromosoma 21 o sindrome di Down

Fu Langdon Down nel 1866 a descrivere per primo la sindrome caratteristica di questa malattia, in seguito attribuita alla presenza del cromosoma 21 in triplice dose.

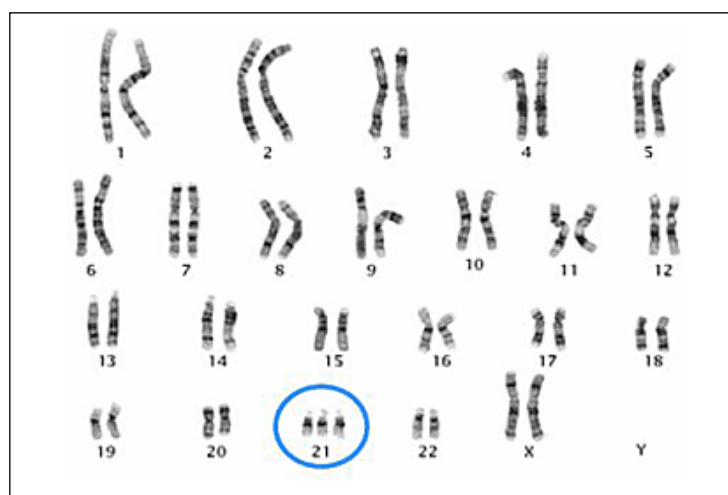


Fig. 8. Cariotipo di un individuo di sesso femminile affetto da sindrome di Down.

L'individuo affetto deriva dall'unione tra un gamete normale e un gamete con un cromosoma 21 soprannumerario. L'incidenza della trisomia 21 è nella popolazione di 1 su 600-700 nati, ma i valori aumentano in modo esponenziale se si mettono in relazione con l'età della madre (ad es. se la madre ha 37 anni l'incidenza è di circa 1/100): la spiegazione dell'incremento risiede nella

maggior probabilità che durante la meiosi materna si verifichino errori nella segregazione dei cromosomi dell'oocita quando l'età materna supera i 35 anni (Fig.9).

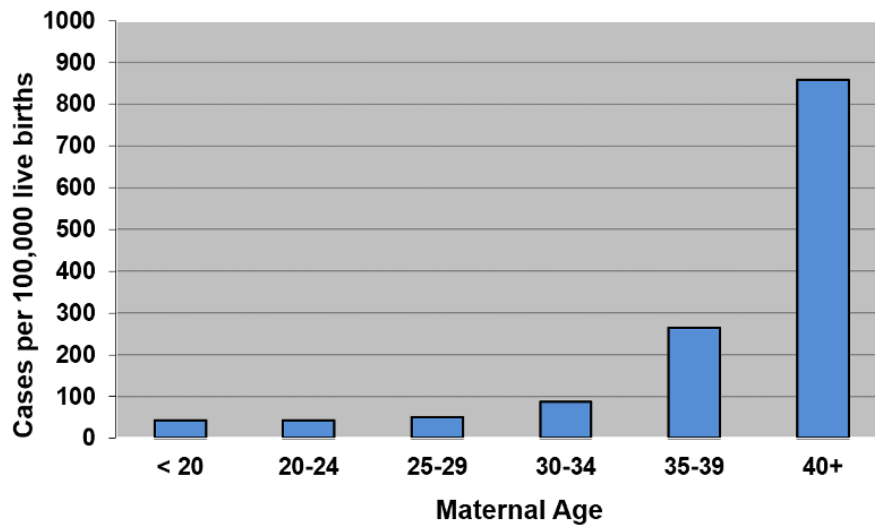
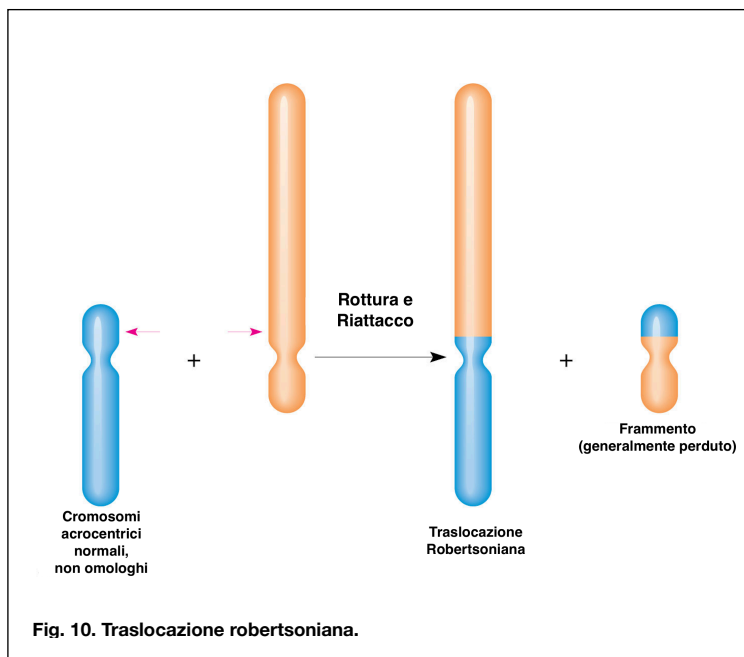


Fig. 9. Incidenza della trisomia del cromosoma 21

Quasi tutti i soggetti affetti da sindrome di Down sono trisomici (95% circa) a causa di una non-disgiunzione e presentano la cosiddetta sindrome di Down da trisomia primaria.



Il 3,5% circa degli affetti presenta invece un cariotipo con 46 cromosomi, uno dei quali è anomalo perchè risultato di una traslocazione robertsoniana (dal nome del ricercatore Robertson) che ha coinvolto il cromosoma 21 e un cromosoma acrocentrico, più frequentemente il 14. Si definisce traslocazione robertsoniana (Fig. 10), la traslocazione tra due cromosomi acrocentrici non omologhi, con punti di rottura a livello dei centromeri e fusione dei bracci lunghi a formare un unico cromosoma. Il piccolo cromosoma risultante dalla fusione dei

bracci corti va generalmente perduto senza conseguenze; l'individuo portatore risulta perciò avere 45 cromosomi e non ha alcuna anomalia fenotipica. D'altra parte, l'individuo portatore fenotipicamente normale può produrre dei gameti anomali sbilanciati e dalla fusione di uno di questi (avente un cromosoma 21 e il cromosoma risultante dalla fusione dei bracci lunghi del 14 e del 21) può nascere un figlio affetto da sindrome di Down. In questi casi si parla anche di trisomia secondaria, nel senso che non è originata da una non-disgiunzione, ma è secondaria a una situazione preesistente in un genitore (Fig. 11).

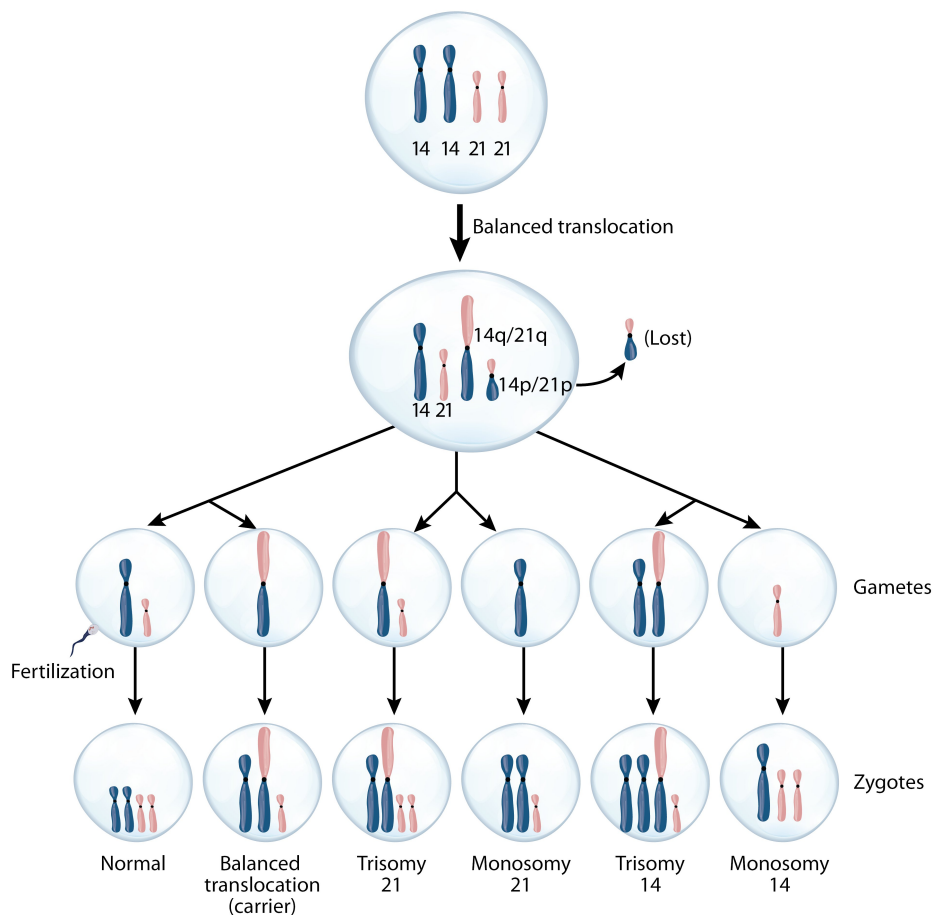


Fig. 11. Traslocazione robertsoniana.

Il rimanente 1,5% dei casi è rappresentato da mosaici.

Il fenotipo caratteristico della sindrome di Down presenta una serie di anomalie fisiche e una costante presenza di ritardo cognitivo, il sintomo funzionale più grave e drammatico. Sono anche frequenti malformazioni scheletriche e cardiovascolari, diminuita resistenza ad agenti infettivi ed aumentata suscettibilità alle leucemie.

La prognosi di vita è molto aumentata negli ultimi anni ed oggi si possono osservare anche individui adulti con sindrome di Down.

Trisomia del cromosoma 18 o sindrome di Edwards (Fig.12)

Fu descritta per la prima volta da Edwards nel 1960. L'incidenza fra i nati vivi è di 1/4.000 e la prognosi è infausta con sopravvivenza media di 2 mesi, a causa delle numerose malformazioni, cardiache, cerebrali, scheletriche e muscolari.

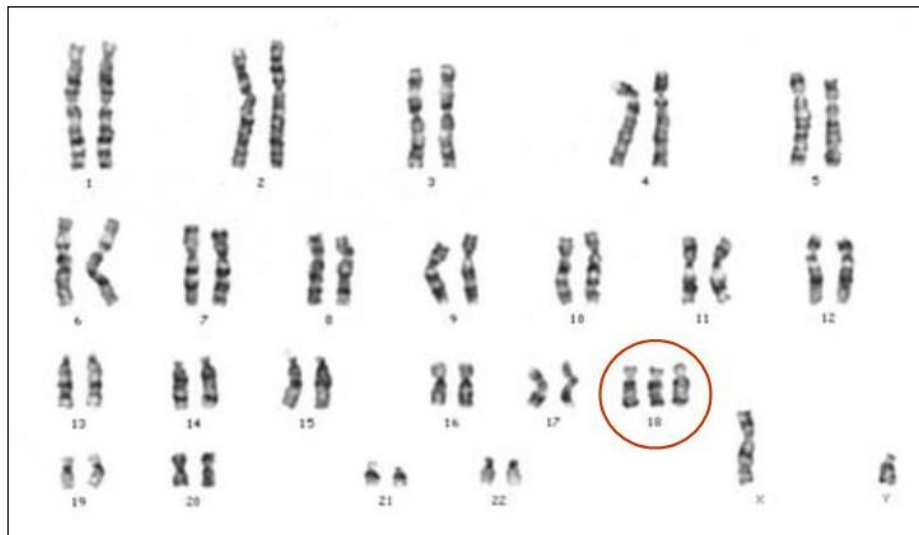


Fig. 12. Cariotipo di un individuo di sesso maschile affetto da sindrome di Edwards.

Trisomia del cromosoma 13 o sindrome di Patau (Fig. 13)

Descritta da Patau nel 1960; ha un'incidenza fra i nati vivi di 1/6.000 ed una prognosi molto infausta (la metà dei malati muore entro il primo mese di vita).

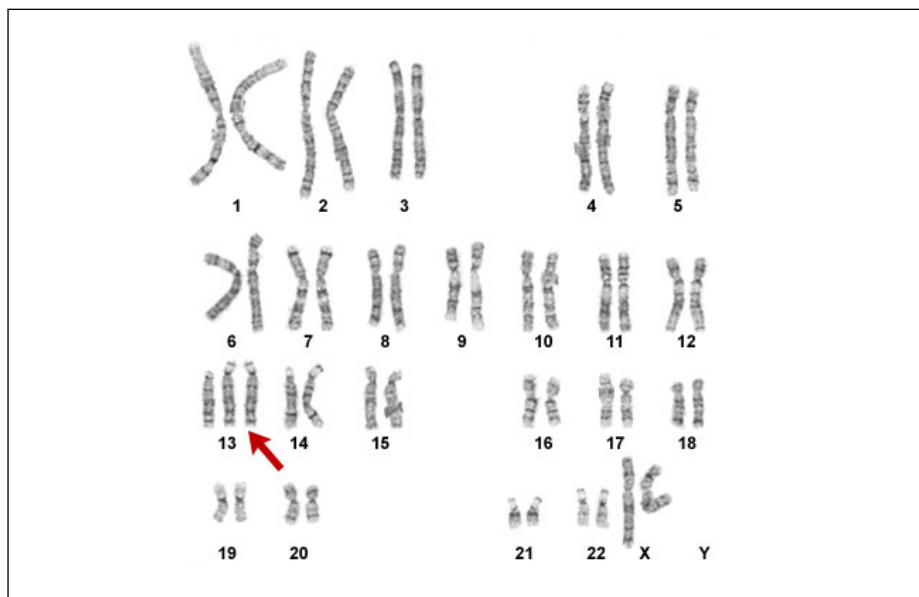


Fig. 13. Cariotipo di un individuo di sesso femminile affetto da sindrome di Patau.

Monosomie

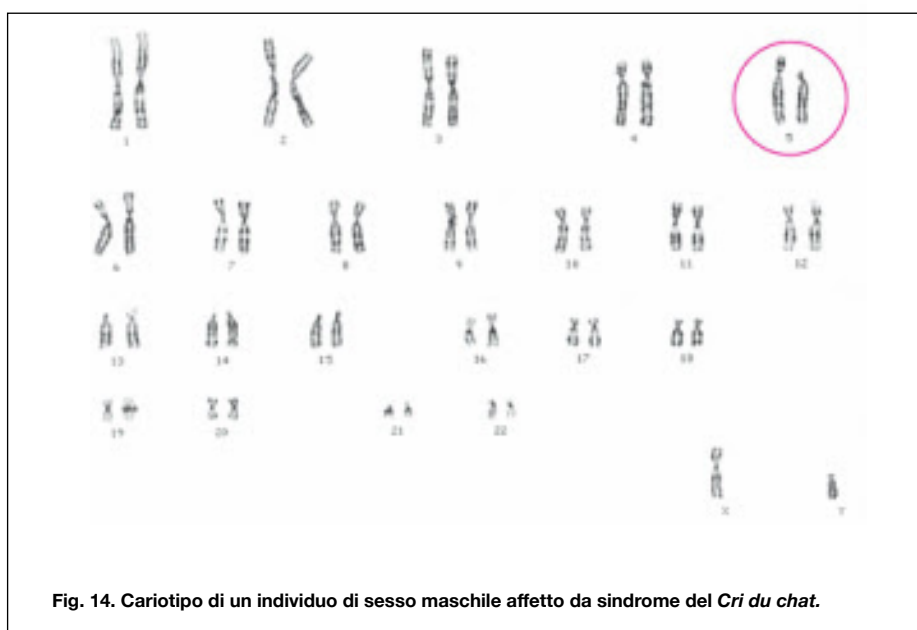
Le monosomie degli autosomi possono essere considerate una condizione letale; infatti, si riscontrano molto raramente negli aborti spontanei perchè la maggior parte degli embrioni vengono persi molto precocemente, spesso quando la gravidanza non è ancora stata accertata.

Anomalie di struttura

Delezioni

Sindrome del Cri du chat (Fig. 14)

Nel 1963 fu descritto per la prima volta un bambino con una delezione di parte del braccio corto del cromosoma 5. Questa sindrome ha un'incidenza di 1/100.000 nascite. Il fenotipo patologico è determinato dalla perdita dei geni associati alla porzione di cromosoma deleta, ed è caratterizzato da ritardo mentale e varie malformazioni; tuttavia, non essendo associata a malformazioni cardiache, questa sindrome permette una sopravvivenza prolungata. I bambini affetti hanno un pianto caratteristico che assomiglia al miagolio di un gatto, da cui il nome della sindrome.



Aspetti clinici delle anomalie dei cromosomi sessuali

Nelle cellule somatiche dei soggetti di sesso femminile, durante lo sviluppo embrionale, si verifica il fenomeno dell' inattivazione precoce di uno, a caso, dei due cromosomi X. Quindi, nei soggetti normali "46, XX" in ogni cellula uno solo a caso dei due X è attivo, per cui le femmine risultano funzionalmente emizigoti, come i maschi. Il cromosoma X inattivato è visualizzabile citologicamente nei nuclei femminili come corpo di Barr o eterocromatina sessuale e fu scoperto a seguito di un'ipotesi del 1961, proposta da una genetista inglese di nome Mary Lyon.

Nei soggetti con cromosomi X sovrannumerari (XXX, XXXX, XXY, XXXY, ecc.), rimane sempre attivo un solo X, indipendentemente dal numero di X presenti. Da questo deriva la minor gravità delle sindromi dovute ai cromosomi sessuali, rispetto alle anomalie numeriche degli autosomi.

Monosomia dell'X o sindrome di Turner (45, X0)

La definizione clinica della sindrome risale al 1938 mentre la sua associazione con il cariotipo "45, X0" è del 1959. L'incidenza è di 1/2.500 neonate femmine e molto alta è l'incidenza negli aborti spontanei.

La diagnosi viene di solito fatta alla pubertà, in quanto alla nascita non vi sono segni evidenti, salvo l'aspetto generale di un neonato piccolo. Alla pubertà invece si riscontra soprattutto amenorrea primaria ed assenza dei caratteri sessuali secondari.

Sindrome di Klinefelter (47, XXY)

L'incidenza è di 1/1.000 neonati maschi; nel 20% dei casi è associato a mosaicismo. Il fenotipo è normale fino alla pubertà e pertanto la sindrome non è diagnosticabile a livello clinico. Alla pubertà si rilevano ipogonadismo associato a normale sviluppo del pene; talvolta, dato che provoca azospermia, viene diagnosticato durante analisi svolte per sterilità di coppia.

Sindrome del doppio Y (47, XYY e 48, XXYY)

Il cariotipo ha una frequenza di 1/1.000 neonati maschi ed il fenotipo è in realtà assolutamente normale. Questi maschi sono solo più alti della media.

Considerazioni finali

Si sa che una percentuale delle gravidanze (circa il 15%) si arresta spontaneamente prima del termine naturale. Lo studio degli aborti spontanei si è rivelato interessante dal punto di vista citogenetico, poiché in circa metà degli aborti vi è un'anomalia cromosomica. In essi si ritrovano tutte le anomalie dei cromosomi, anche se alcune come le monosomie degli autosomi hanno incidenza molto bassa poiché comportano un'alterazione tanto grave da arrestare lo sviluppo dello zigote in stadi precocissimi.

Si verificano trisomie per tutti i cromosomi, anche se con frequenze diverse. Pertanto, i nati vivi con trisomia rappresentano solo "la punta di un iceberg". Ad esempio, i trisomici 21 nati vivi sono solo il 20% dei concepiti con questa anomalia, poiché la maggior parte viene abortita spontaneamente prima della ventottesima settimana. Il cromosoma 21 non è più soggetto di altri ad errori meiotici ma, poiché la sua presenza in triplice copia non sempre provoca l'arresto dello sviluppo embrionale, è quello percentualmente più rappresentato nei nati vivi trisomici.

Anche la monosomia dell'X presenta questo andamento: solo un quarto delle femmine con cariotipo "45, X0" concepite arriva alla nascita, mentre gli altri embrioni sono abortiti a stadi molto precoci. Relativamente ai cromosomi sessuali, con l'aumentare del numero di cromosomi soprannumerari aumenta la gravità della sintomatologia; questo dimostra che il dosaggio genico di questi cromosomi deve essere perfettamente equilibrato per il normale sviluppo sia nel maschio che nella femmina.

ANALISI DEL CARIOTIPO UMANO IN LABORATORIO

Culture cellulari e terreni di coltura

Per poter effettuare un'analisi cromosomica è necessario utilizzare cellule in mitosi che possono essere ottenute da campioni prelevati espressamente per questa analisi (sangue periferico, liquido amniotico, villi coriali) o da colture cellulari.

I tessuti che più si prestano a essere coltivati in vitro sono quelli che già in vivo mostrano attività proliferativa. Essi comprendono tessuti embrionali, adulti e tumorali. In linea teorica è possibile allestire preparati cromosomici a partire da qualsiasi tessuto purché si usino i metodi adatti per ciascun tipo di cellule da esaminare. Nell'uomo, la maggior parte delle procedure diagnostiche citogenetiche utilizzano colture di linfociti, cellule del midollo osseo, cellule embrionali sospese nel liquido amniotico, villi coriali e fibroblasti cutanei. Come terreni di coltura cellulari, per la proliferazione, sono stati sintetizzati soluzioni a composizione chimica nota. Nella maggior parte delle colture abbiamo la presenza di siero di origine animale intero o dializzato, costituito da numerose componenti proteiche.

Un terreno di coltura contiene: ioni inorganici (sodio, potassio, cloro, calcio, magnesio, solfato, carbonato, fosfato), amminoacidi, carboidrati, vitamine e proteine del siero.

Coltura di linfociti per ottenere cromosomi metafasici

Per le analisi cromosomiche in particolare, le colture cellulari sono in genere ottenute da linfociti, cellule del sangue della serie bianca, utilizzate a questo scopo data la facilità con cui questo tessuto è prelevabile dall'organismo. Si deve ricordare che i globuli rossi non si prestano per l'analisi cromosomica, essendo privi di nucleo.

Le cellule vengono messe in coltura in una provetta a 37°C in presenza di fitoemoagglutinina (PHA, dall'inglese phytohaemoagglutinin, una sostanza che induce i linfociti ad entrare in mitosi); raggiunta una fase di crescita esponenziale, viene aggiunta per 1 ora la colchicina, una sostanza che inibisce la formazione del fuso mitotico bloccando le mitosi in metafase.

Le cellule vengono raccolte mediante centrifugazione (e scarto del surnatante) e trattate con una soluzione ipotonica per determinarne il rigonfiamento e la rottura della membrana cellulare. Segue un trattamento con fissativo che stabilizza la struttura dei cromosomi, altrimenti fragili, e rende più duraturo il preparato, ritardando l'azione degli agenti ossidanti.

Il sedimento cromosomico è mantenuto in una soluzione di fissativo (costituita da etanolo: acido acetico in rapporto 3:1). Il citoplasma, in cui sono immersi i cromosomi, risulta disidratato dall'alcool e ridotto dall'acido acetico; i cromosomi mantengono la medesima posizione che presentavano prima della fissazione nel citoplasma. Il passaggio in fissativo viene ripetuto almeno una seconda volta, dopo di che la sospensione cromosomica può essere conservata in provetta alla temperatura di -20°C anche per qualche anno, prima di venire strisciata su vetrino. La figura 15 illustra schematicamente i diversi passaggi descritti.

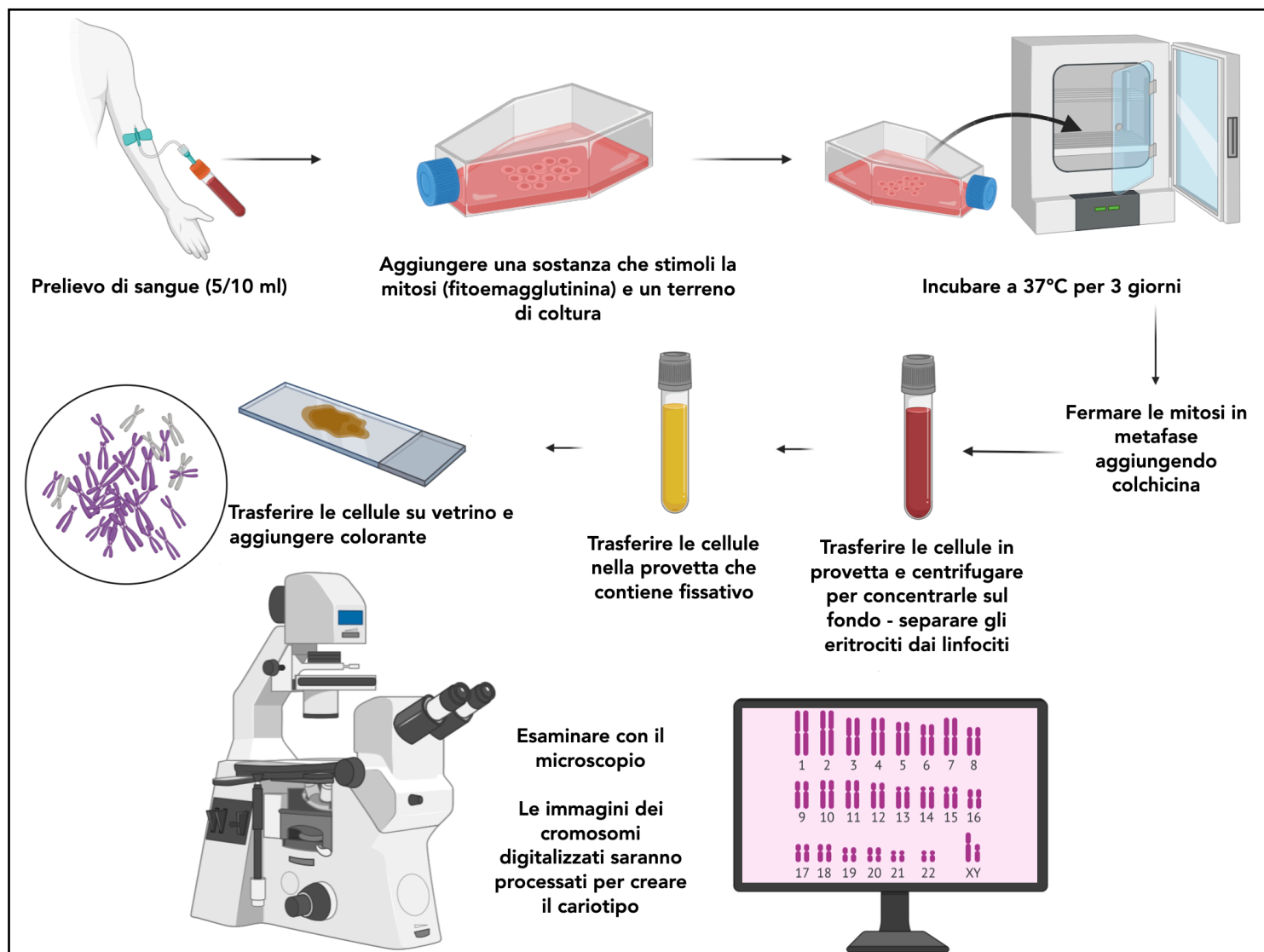


Fig. 15. Procedura per l'analisi di un cariotipo.