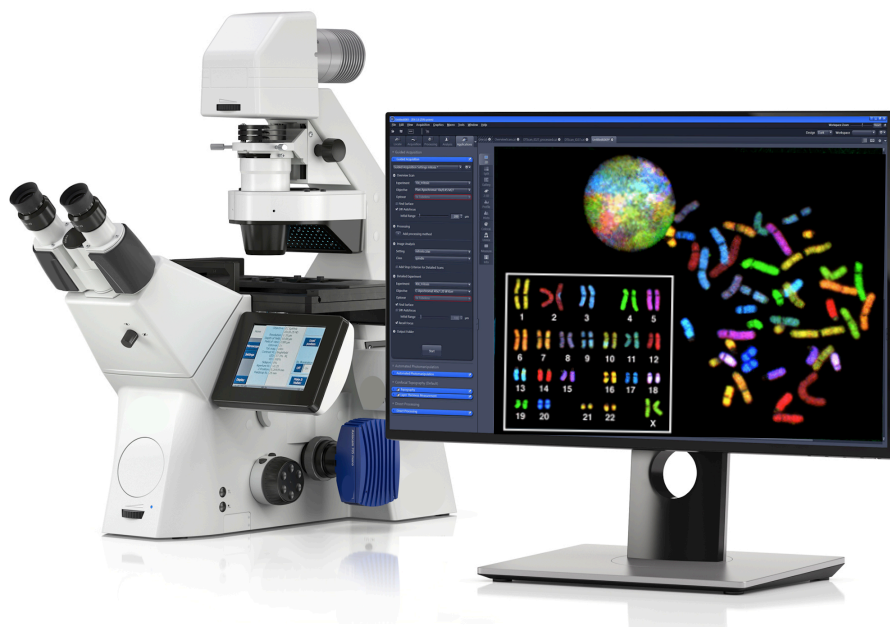




Centro Università degli Studi di Milano - Scuola per la diffusione delle Bioscienze

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, agli studenti, l'uso del microscopio ottico e le metodologie usate in citogenetica umana per lo studio dei cromosomi, guidandoli 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.

I cromosomi

Ogni filamento di DNA umano è composto da circa 3,2 miliardi di paia di basi e poiché un doppio filamento di tali dimensioni deve essere contenuto all'interno di un nucleo delle dimensioni di 5 μm viene compattato mediante il legame a proteine, tra cui gli istoni: l'avvolgimento del DNA attorno ad un ottamero di istoni forma la struttura del nucleosoma, e più nucleosomi formano la struttura a "collana di perle" che costituisce il primo livello di impacchettamento (fibra da 10 nm); i nucleosomi a loro volta si avvolgono su se stessi formando la fibra cromatinica da 30 nm. Le fibre si ripiegano a formare anse su un'impalcatura proteica e nel loro massimo grado di spiralizzazione formano i cromosomi, i quali sono osservabili durante la mitosi e in particolare massimamente condensati durante la metafase (Fig. 1).

Per questo motivo lo studio del cariotipo e l'analisi di eventuali anomalie cromosomiche vengono effettuate mediante l'osservazione dei cromosomi in metafase.

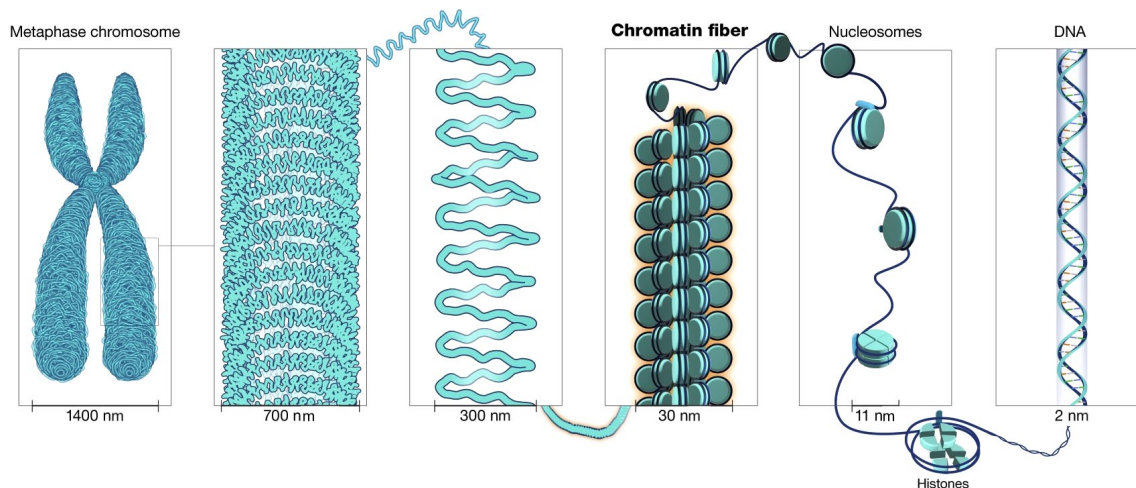


Fig. 1. Illustrazione dei gradi di compattamento del DNA.

ANALISI DEL CARIOTIPO UMANO IN LABORATORIO

Colture 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), i quali vengono posti in coltura al fine di ottenere metafasi cromosomiche.

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, che vengono prelevati e coltivati in vitro in condizioni controllate di temperatura, umidità e sterilità e l'utilizzo di appositi terreni di coltura.

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

Coltura di linfociti per ottenere cromosomi metafasici

Per le analisi cromosomiche 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 una volta raggiunta la maturazione.

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 trattate con una soluzione ipotonica per determinarne il rigonfiamento e la rottura della membrana cellulare. Segue un trattamento con fissativo (etanolo e acido acetico in rapporto 3:1), che stabilizza la struttura dei cromosomi, altrimenti fragili, e rende più duraturo il preparato, ritardando l'azione degli agenti ossidanti.

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 2 illustra schematicamente i diversi passaggi descritti.

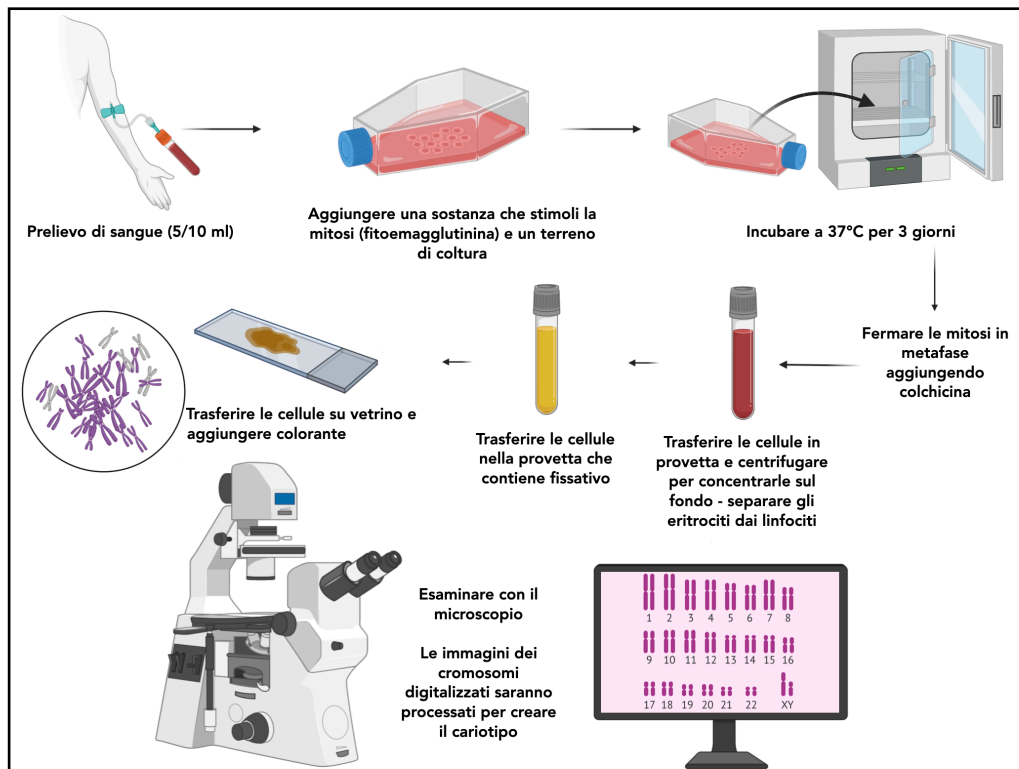


Fig. 2. Schema riassuntivo di allestimento di un cariotipo da linfociti di sangue periferico.

Nel corso degli anni le tecniche citogenetiche per lo studio del cariotipo si sono sempre più raffinate ed oggi esse consentono non solo di verificare la presenza di un corretto numero di cromosomi nelle cellule, ma anche di individuare alterazioni.

Si distinguono alterazioni cromosomiche **numeriche** e **strutturali**.

Le anomalie cromosomiche sono generalmente il risultato di errori durante la gametogenesi (come la non-disgiunzione dei cromosomi omologhi che è alla base delle aneuploidie), ma possono verificarsi anche al momento della fecondazione, nelle prime fasi dello sviluppo embrionale o nel corso della vita.

Tra le più importanti applicazioni dell'analisi del cariotipo mediante tecniche citogenetiche vi sono:

- diagnosi pre- e post-natale di sindromi associate ad anomalie cromosomiche
- studio citogenetico delle cellule tumorali; infatti, molti tumori sono caratterizzati da un numero anomalo di cromosomi.

Anomalie numeriche

L'euploidia è una condizione in cui il numero dei cromosomi di una cellula è corretto. L'essere umano ha un assetto cromosomico $2n$ quindi diploide, ad eccezione dei gameti che sono aploidi (n). Le **poliploidie** sono pertanto anomalie numeriche caratterizzate da presenza sovrannumeraria di uno o più interi set cromosomici (triploidi $3n$, tetraploidi $4n$, ecc.), tipiche del mondo vegetale (Fig. 3).

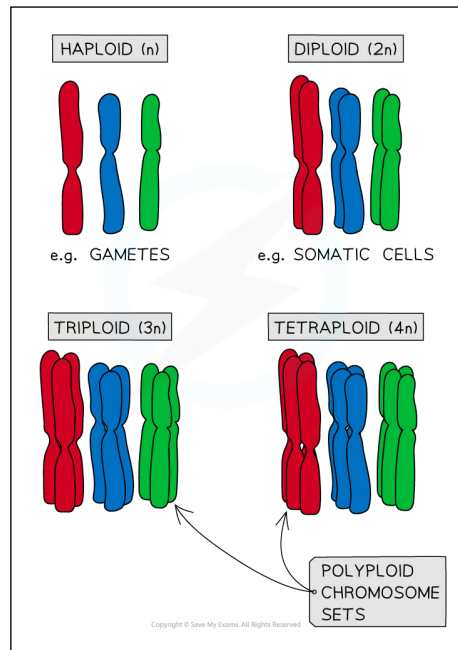


Fig. 3. Tipi di assetti cromosomici.

Nell'uomo le poliploidie non sono compatibili con la vita: la presenza di una triploidia ($3n$) 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. 4).

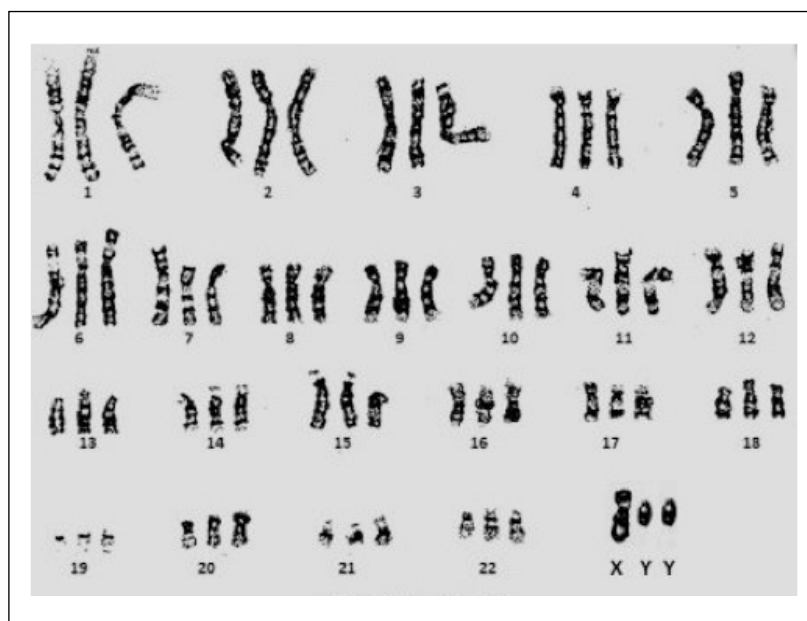


Fig. 4. Esempio di cariotipo umano triploide.

Le triploidie ($3n$) si originano in seguito alla fecondazione di un singolo ovulo da parte di due spermatozoi (Fig. 5A) o ad errori nella meiosi o femminile o maschile con formazione di un gamete diploide, in cui non è avvenuto il dimezzamento del numero di cromosomi (Fig. 5B e C) o ancora, meno frequentemente, per la mancata espulsione del globulo polare durante la gametogenesi femminile.

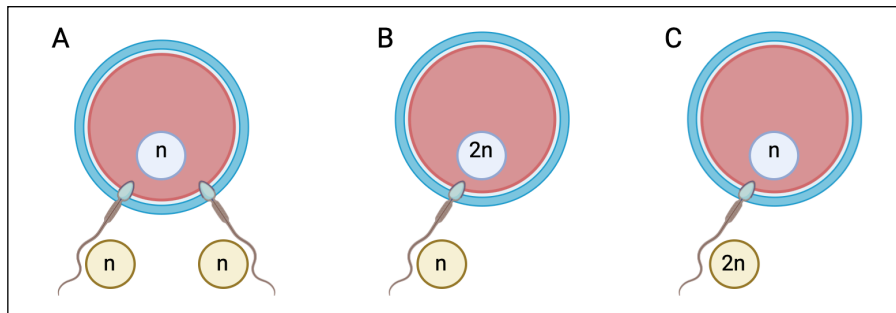


Fig. 5. Diverse origini alla base delle triploidie.

Le tetraploidie (Fig. 6) sono invece causate da un errore nelle prime segmentazioni dello zigote, per cui il corredo cromosomico diventa $4n$.

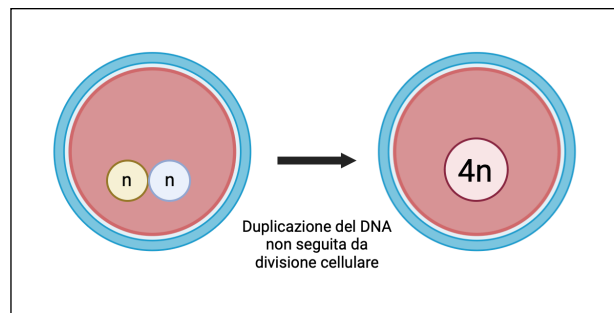


Fig. 6. Origine alla base delle tetraploidie.

Le **aneuploidie** sono invece anomalie cromosomiche caratterizzate da alterazioni del numero di singoli 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, X), e dalle monosomie, con set mancanti di un cromosoma, vale a dire un assetto cromosomico $2n - 1$ (es. sindrome di Turner: 45, X0) (Tab. 1).

Aneuploidie degli autosomi		Aneuploidie dei cromosomi sessuali	
Cariotipo	Sindrome	Cariotipo	Sindrome
47, XX, +21 47, XY, + 21	Trisomia 21 o sindrome di Down	45, X	Monosomia X o sindrome di Turner
47, XX, +13 47, XY, +13	Trisomia 13 o sindrome di Patau	47, XXX	Trisomia X
47, XX, + 18 47, XY, +18	Trisomia 18 o sindrome di Edwards	47, XXY (o varianti 48, XXXY 49, XXXXY)	Sindrome di Klinefelter
		47, XYY	Sindrome XYY
		48, XXXX 49, XXXXX	Tetrasomia del cromosoma X Pentasomia del cromosoma X (rare polisomie del cromosoma X)

Tab.1. Tabella riassuntiva delle più comuni 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. 7A) o dei cromatidi fratelli di un cromosoma (nella seconda)(Fig. 7B). 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.

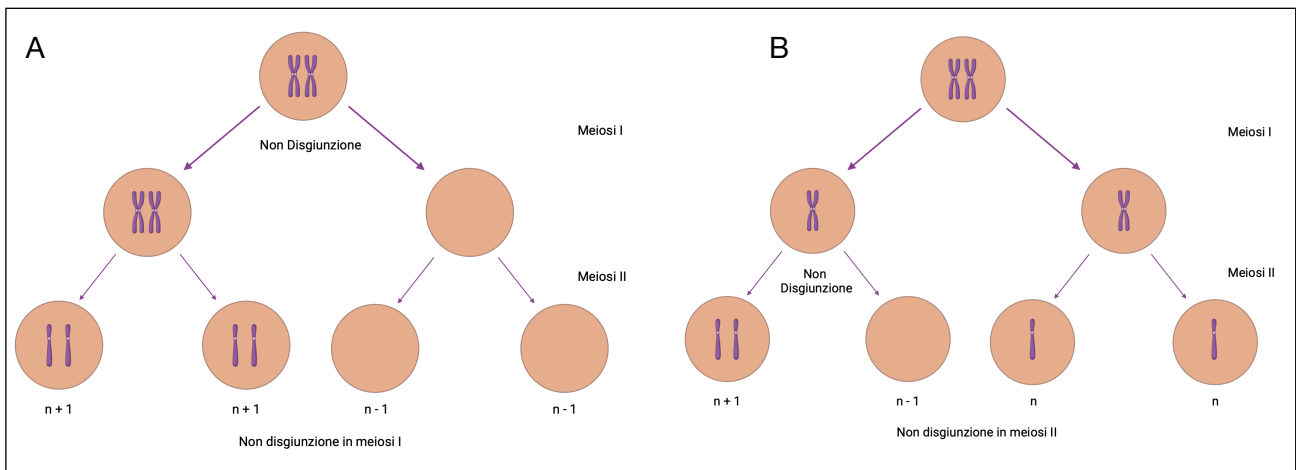


Fig. 7. Origine alla base delle aneuploidie, nella prima divisione meiotica (A) o nella seconda (B).

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. 8):

(a) **delezione**: perdita di un frammento di 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, che può portare alla sintesi di proteine di fusione legate a trasformazione cellulare (es. bcr/abl 9;22). Le traslocazioni possono causare la produzione di gameti con corredo genico sbilanciato e quindi essere responsabili di gravi sindromi nella prole.

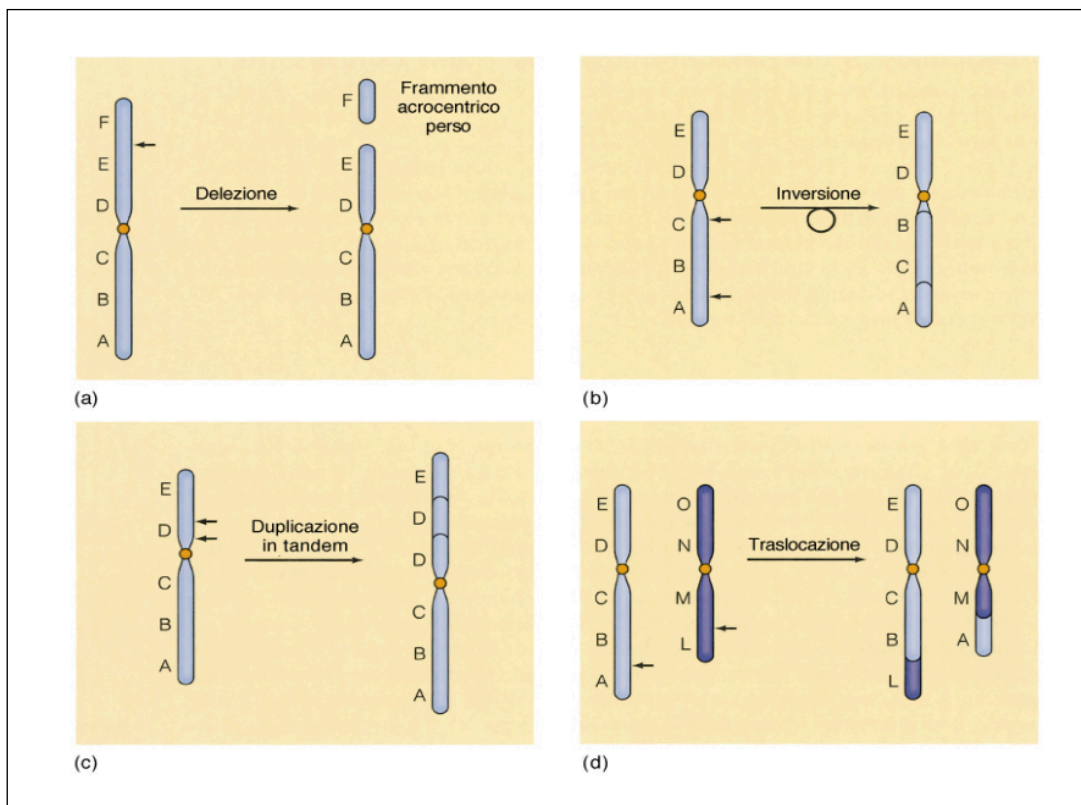


Fig. 8. Anomalie cromosomiche strutturali.

La **traslocazione robertsoniana** è un riarrangiamento frequente, legato a manifestazioni fenotipiche caratteristiche della sindrome di Down; è una 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 (Fig. 9).

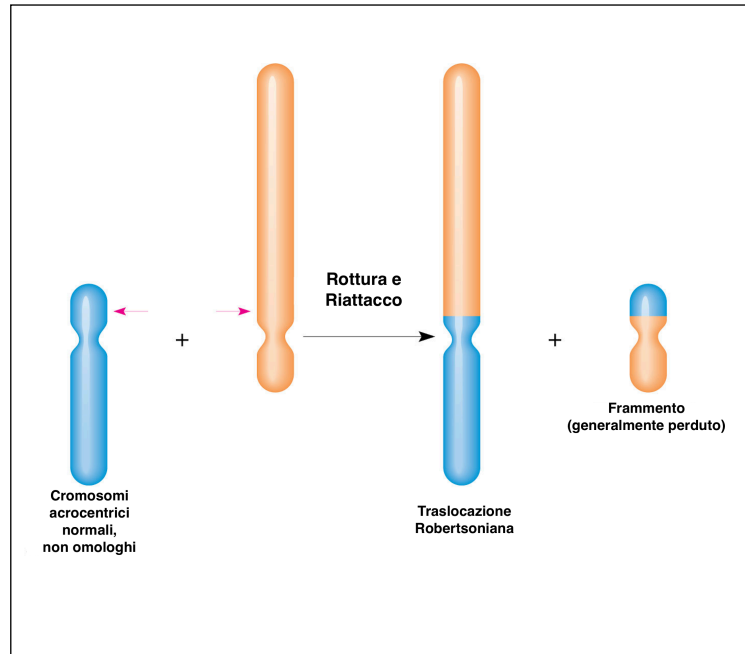


Fig. 9. Schema di una traslocazione robertsoniana.

Mosaicismo

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 formatesi in un qualunque momento dello sviluppo embrionale; tutte le cellule che derivano da questa presenteranno la stessa anomalia. L'anomalia nei mosaici può essere sia strutturale che numerica (Fig. 10).

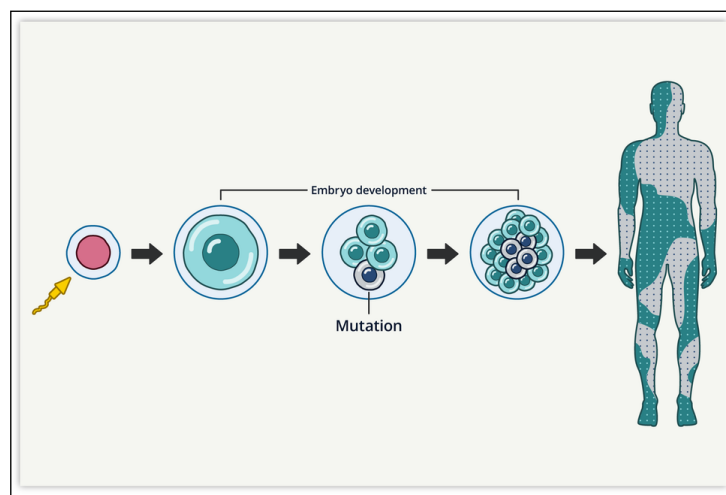


Fig. 10. Mosaicismo.

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.

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%; a ciò va aggiunto uno 0,2% di portatori di traslocazioni bilanciate. Pertanto, lo 0,5% dei nati vivi presenta un cariotipo anomalo.

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 copia (Fig. 11).

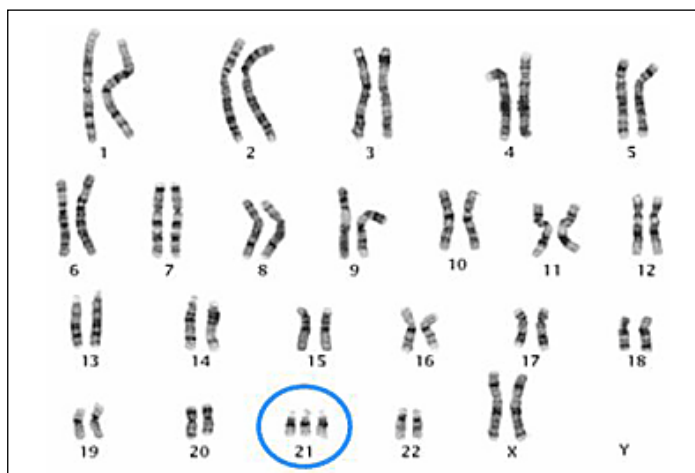


Fig. 11. Cariotipo di un individuo di sesso femminile affetto dalla sindrome di Down.

L'individuo affetto deriva dall'unione tra un gamete normale e un gamete con un cromosoma 21 soprannumerario. La percentuale di sopravvivenza in casi di trisomia 21 è pari al 20%.

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 perché risultato di una traslocazione robertsoniana, in cui il materiale genetico del cromosoma 21 non è libero, ma è fuso (traslocato) con un altro cromosoma acrocentrico (solitamente il 14).

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 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. 12).

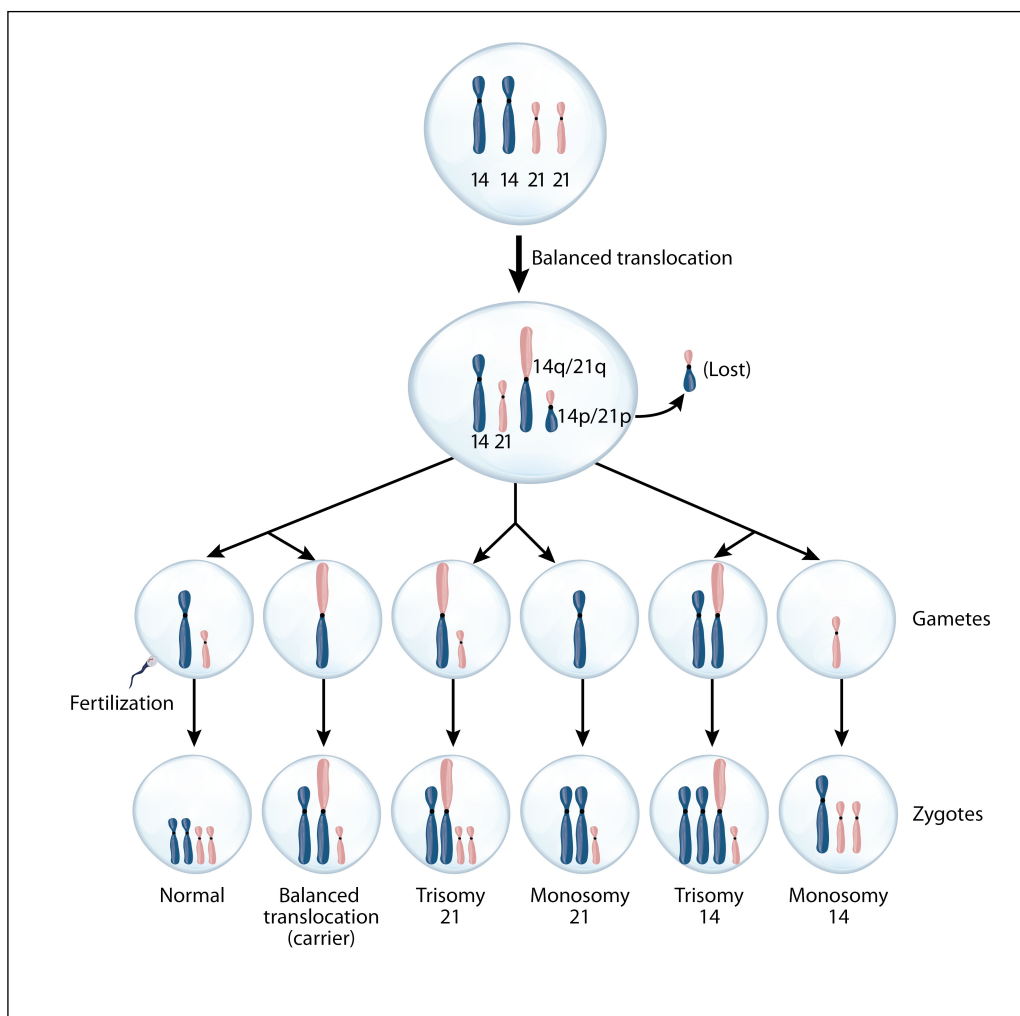


Fig. 12. Esempio di formazione di gameti sbilanciati a seguito di traslocazione robertsoniana.

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.13)

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.

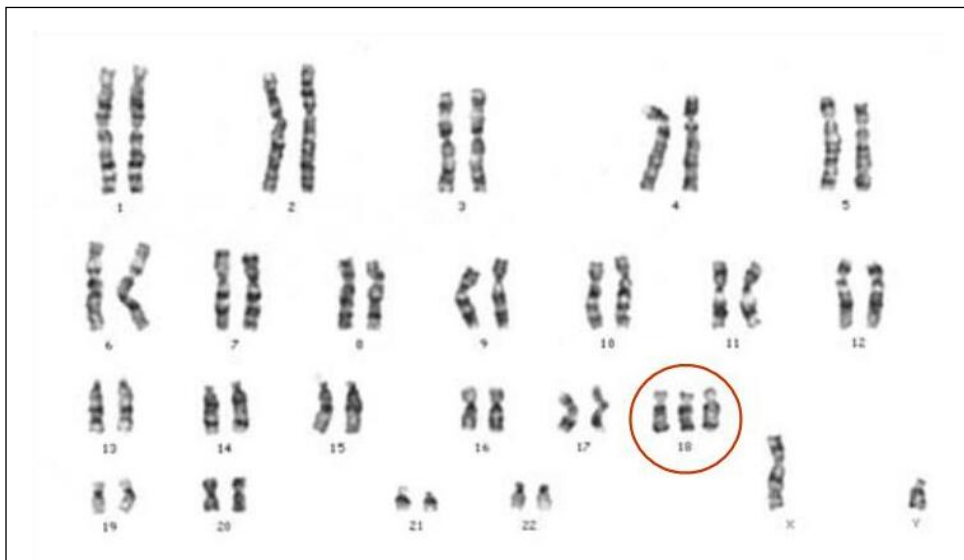


Fig. 13. Cariotipo di un individuo di sesso maschile affetto dalla sindrome di Edwards

Trisomia del cromosoma 13 o sindrome di Patau (Fig. 14)

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).

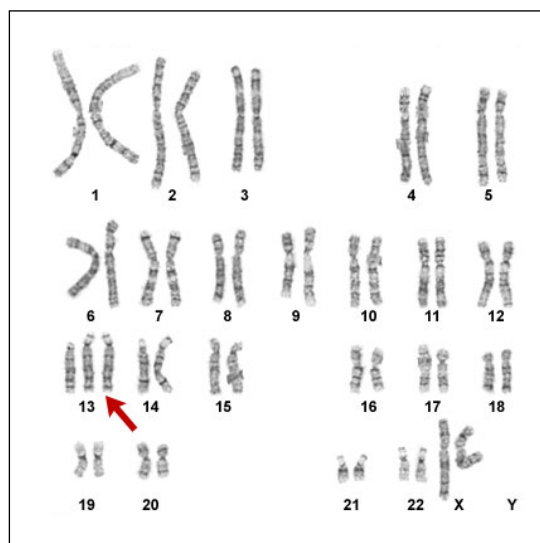


Fig. 14. Cariotipo di un individuo di sesso femminile affetto dalla sindrome di Patau.

Monosomie

Le monosomie degli autosomi possono essere considerate una condizione letale; infatti, si riscontrano molto raramente negli aborti spontanei perché 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. 15)

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.

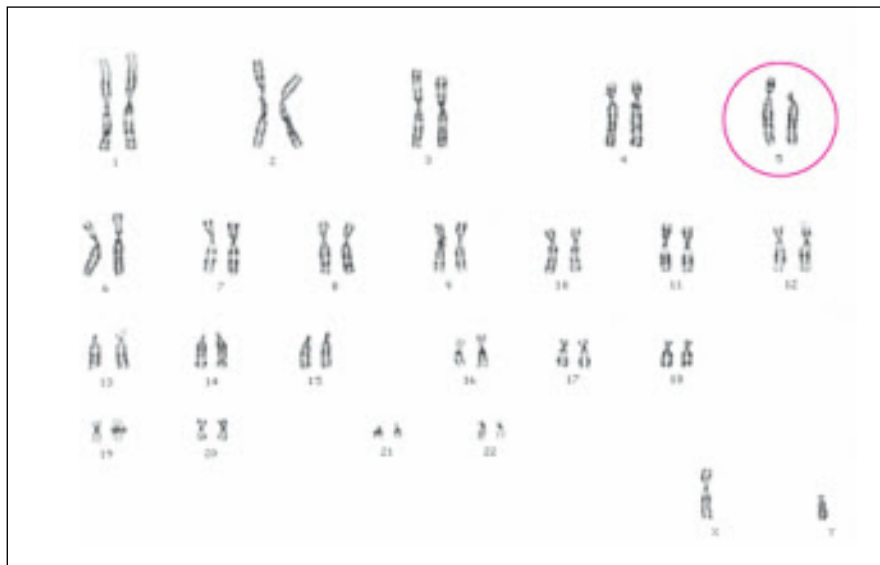


Fig. 15. Cariotipo di un individuo di sesso maschile affetto dalla sindrome del cri du chat

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, pari al 25%.

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 azoospermia, viene diagnosticato durante analisi svolte per sterilità di coppia.

Sindrome XXY (47, XYY)

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.

Relativamente ai cromosomi sessuali, con l'aumentare del numero di cromosomi sovrannumerari 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.