

***“La diagnosi genetica della sindrome di  
Rubinstein Taybi”***



**Bambino Gesù**  
OSPEDALE PEDIATRICO

**Francesca Lepri**  
Laboratorio di Genetica Medica

# Un po' di storia....

**1865 Leggi di Mendel**



**1953: Watson e Crick pubblicano struttura DNA su Nature**



**1975 Sequenziamento Sanger**



**2003 Progetto Genoma Umano**

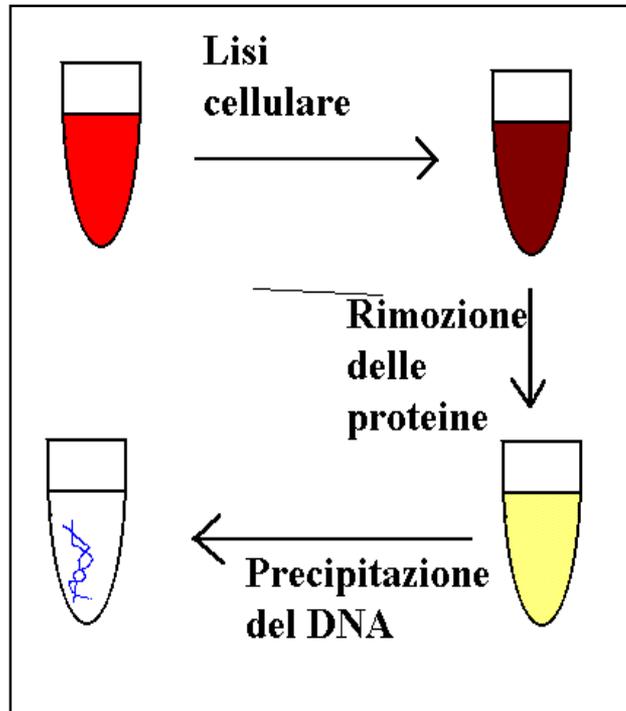




➤ **Prelievo di sangue in EDTA non a digiuno**



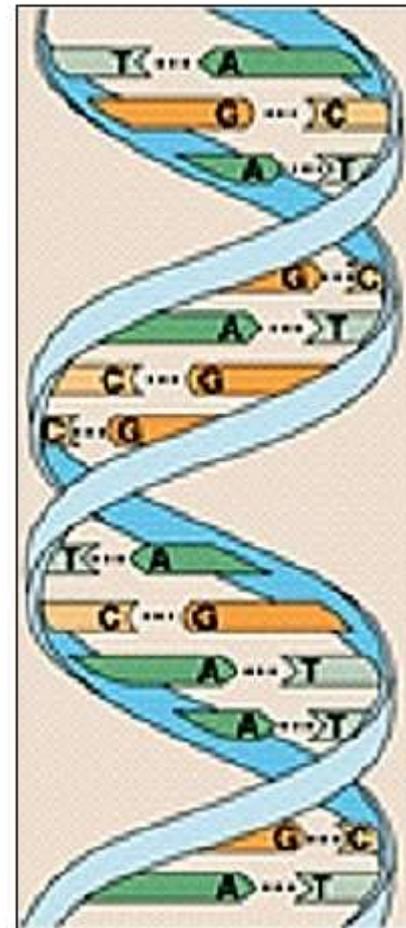
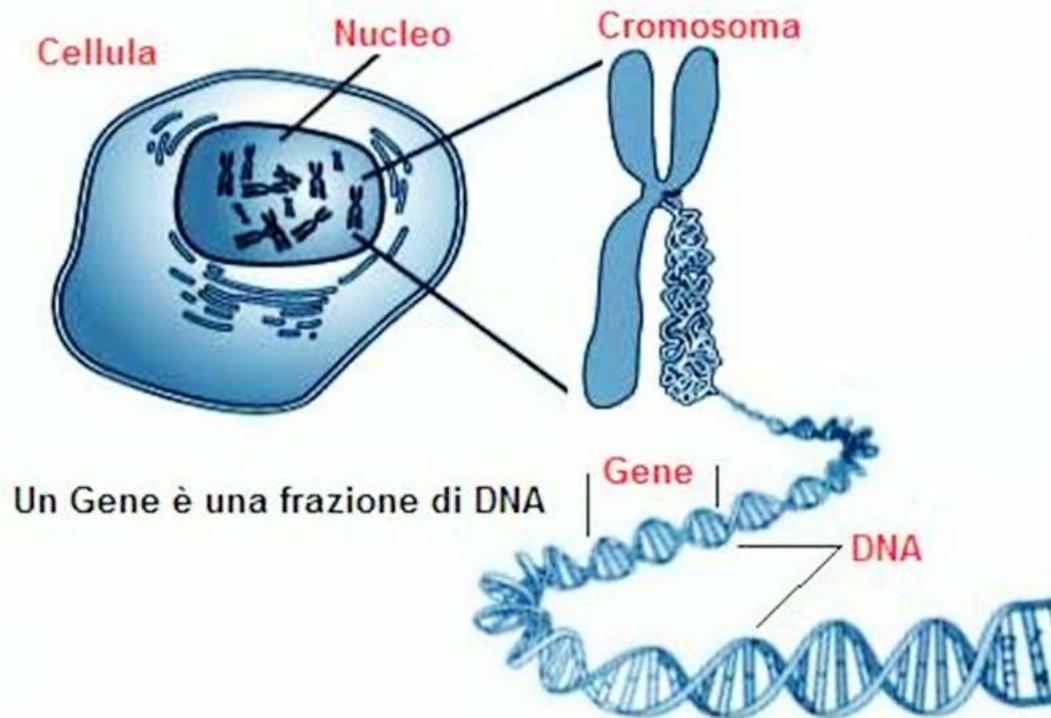
# ESTRAZIONE DEL DNA



➤ **DNA da globuli bianchi**



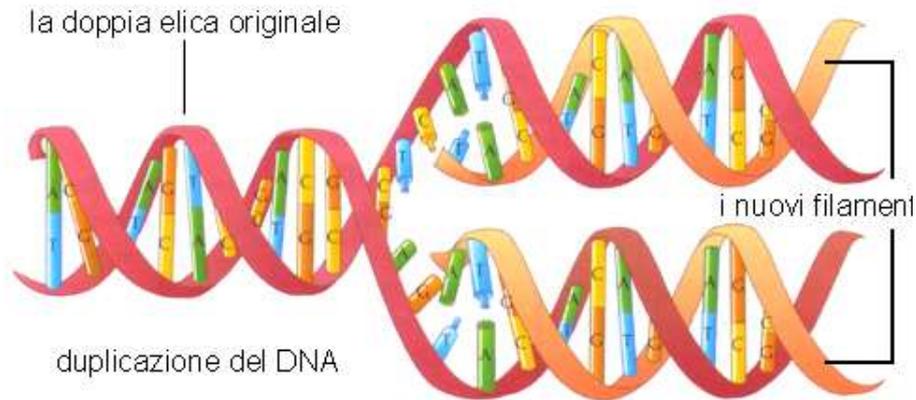
# IL DNA



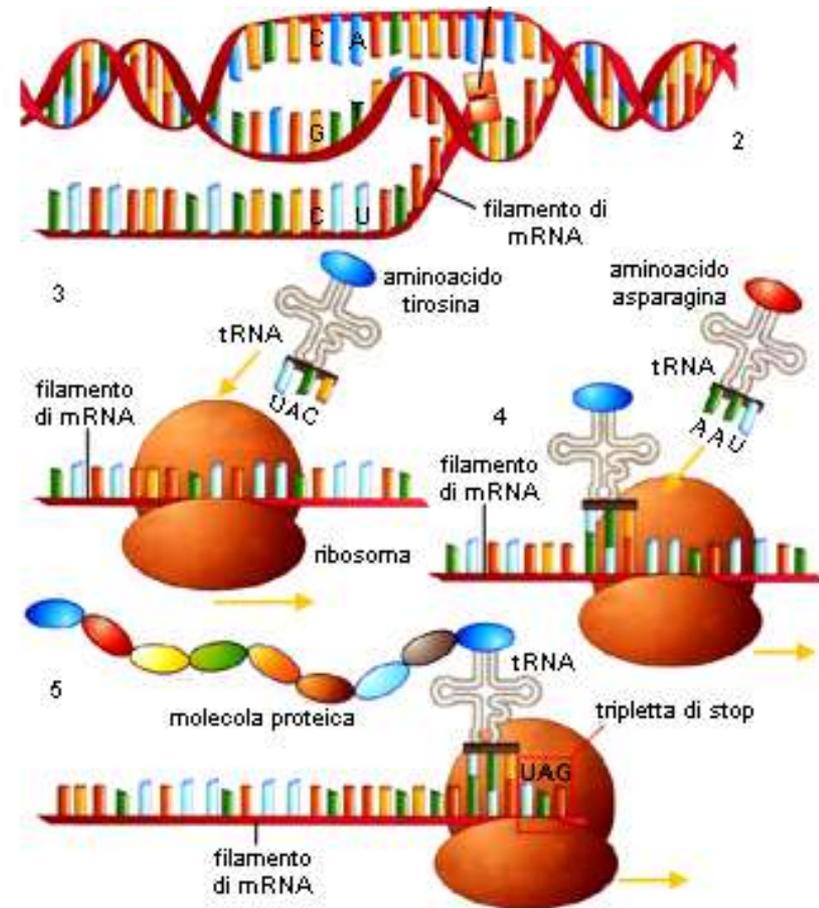
DNA è l'abbreviazione di acido desossiribonucleico; è la molecola che costituisce il patrimonio genetico di ogni organismo.



## IL DNA



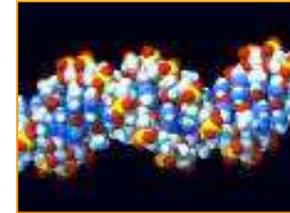
- ✓ E' IN GRADO DI TRASMETTERSI INALTERATO, IN CONDIZIONI NORMALI, DA UNA GENERAZIONE CELLULARE ALL'ALTRA NEL CORSO DELLA DIVISIONE
- ✓ E' RESPONSABILE DELLA TRASMISSIONE DEI CARATTERI EREDITARI
- ✓ CONTIENE L'INFORMAZIONE PER LA SINTESI DELLE PROTEINE



# CLASSIFICAZIONE DELLE MUTAZIONI

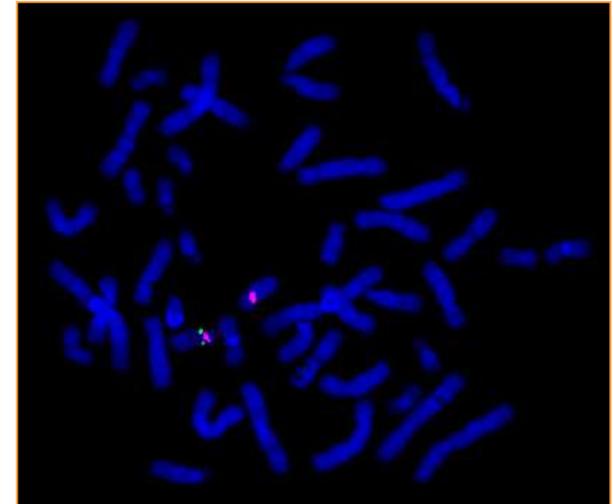
## Tipo di alterazione:

- Cromosomiche
  - numeriche
  - strutturali
- Geniche (Puntiformi)
  - sostituzioni
  - Delezioni
  - inserzioni



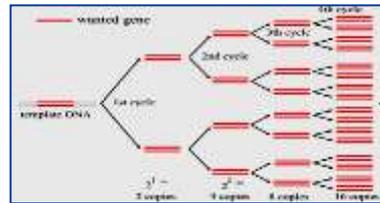
## Effetto:

- Con effetto fenotipico (note in letteratura)
- Con effetto fenotipico sconosciuto
- Senza effetto fenotipico

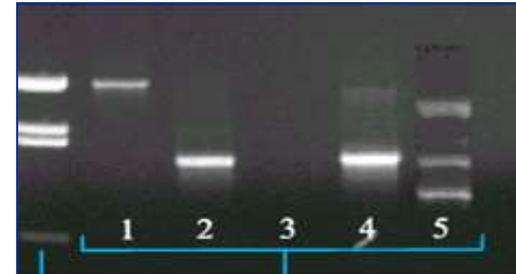


# Amplificazione e sequenziamento

## 1. Polymerase Chain Reaction



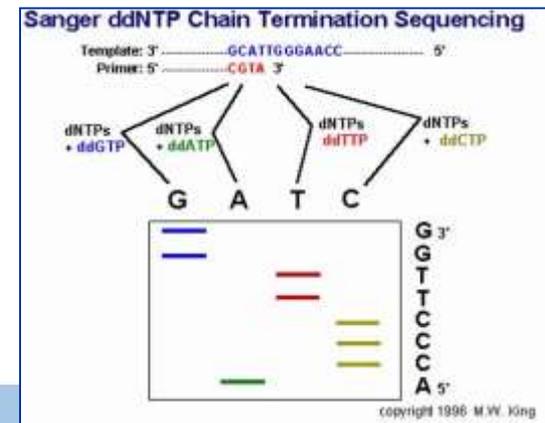
## 2. ANALISI PRODOTTI DI PCR (Corsa elettroforetica + analisi uv)



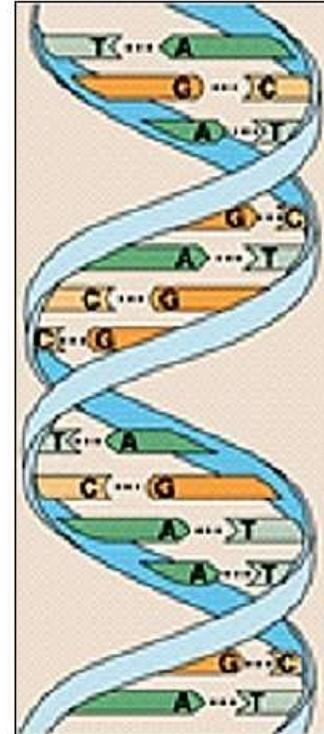
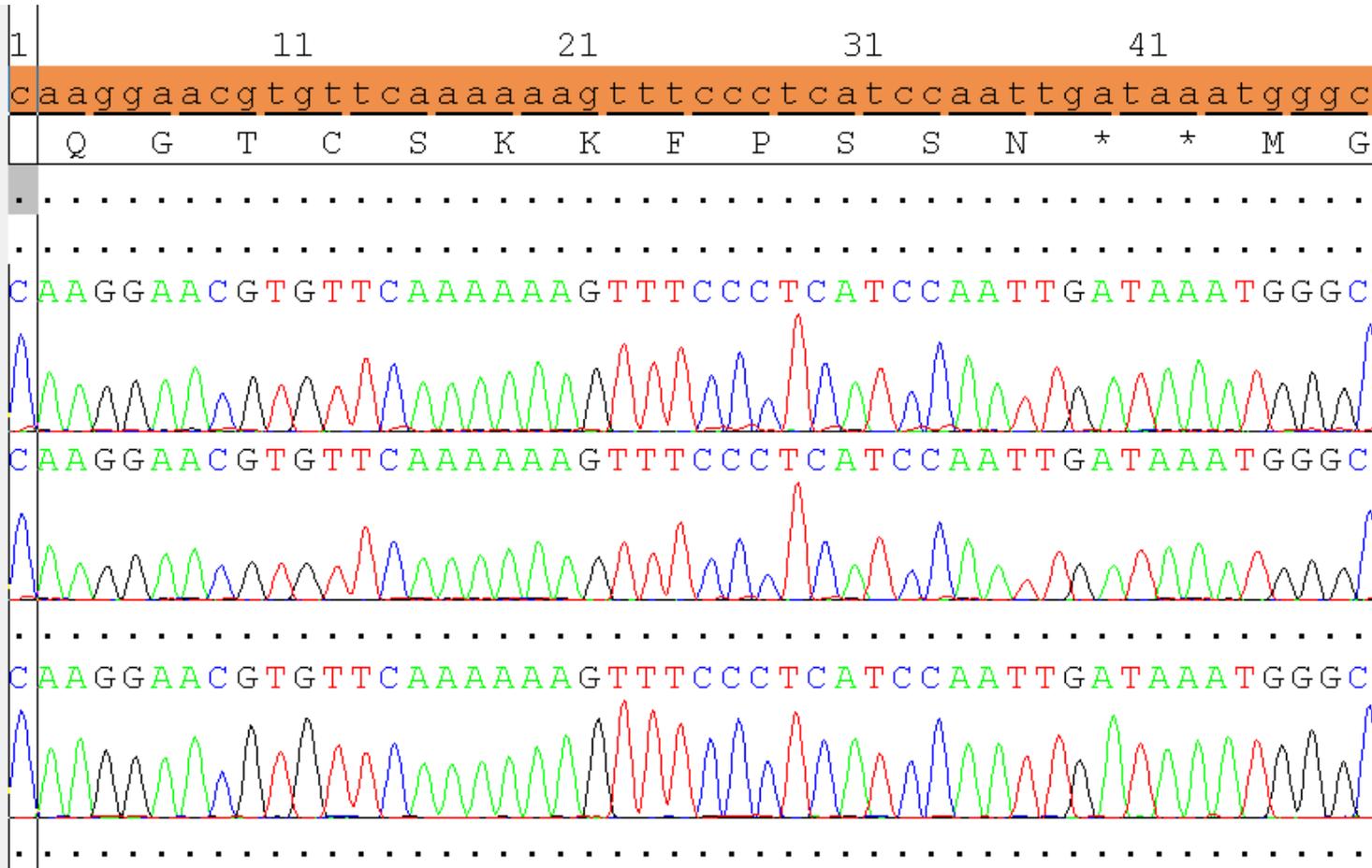
## 4. Purifica di PCR



## 4. PCR di sequenza



# Analisi della sequenza del DNA



## La genetica della Rubinstein-Taybi

### **Quali sono le cause genetiche della sindrome di Rubinstein-Taybi?**

La sindrome può essere causata da mutazioni in alcuni geni come CREBBP e EP300 entrambi codificanti per proteine che modulano il tasso di trascrizione globale del Dna delle cellule oppure da piccole delezioni del cromosoma 16, nella regione 16p13.3.

**Come si trasmette la sindrome di Rubinstein-Taybi?** La sindrome si trasmette con modalità autosomica dominante: un genitore malato ha il 50% di probabilità di trasmettere la malattia a ciascuno dei propri figli. Nella maggior parte dei casi, tuttavia, la sindrome è sporadica per cui il paziente non ha famigliari affetti.



# La genetica della Rubinstein-Taybi

Nature. 1995 Jul 27;376(6538):348-51.

## **Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP.**

Petrij F<sup>1</sup>, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ, et al.

⊕ Author information

*Am. J. Hum. Genet.* 76:572–580, 2005

## **Genetic Heterogeneity in Rubinstein-Taybi Syndrome: Mutations in Both the *CBP* and *EP300* Genes Cause Disease**

Jeroen H. Roelfsema,<sup>1</sup> Stefan J. White,<sup>1</sup> Yavuz Ariyürek,<sup>1</sup> Deborah Bartholdi,<sup>2</sup> Dunja Niedrist,<sup>2</sup> Francesco Papadia,<sup>3</sup> Carlos A. Bacino,<sup>4</sup> Johan T. den Dunnen,<sup>1</sup> Gert-Jan B. van Ommen,<sup>1</sup> Martijn H. Breuning,<sup>1</sup> Raoul C. Hennekam,<sup>5</sup> and Dorien J. M. Peters<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Human and Clinical Genetics, Leiden University Medical Center, Sylvius Laboratory, Leiden, The Netherlands; <sup>2</sup>Institute of Medical Genetics, University of Zurich, Zurich; <sup>3</sup>Department of Metabolic Diseases and Clinical Genetics, Pediatric Hospital Giovanni XXIII, Bari, Italy; <sup>4</sup>Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston; and <sup>5</sup>Department of Clinical Genetics, Academic Medical Center, Amsterdam



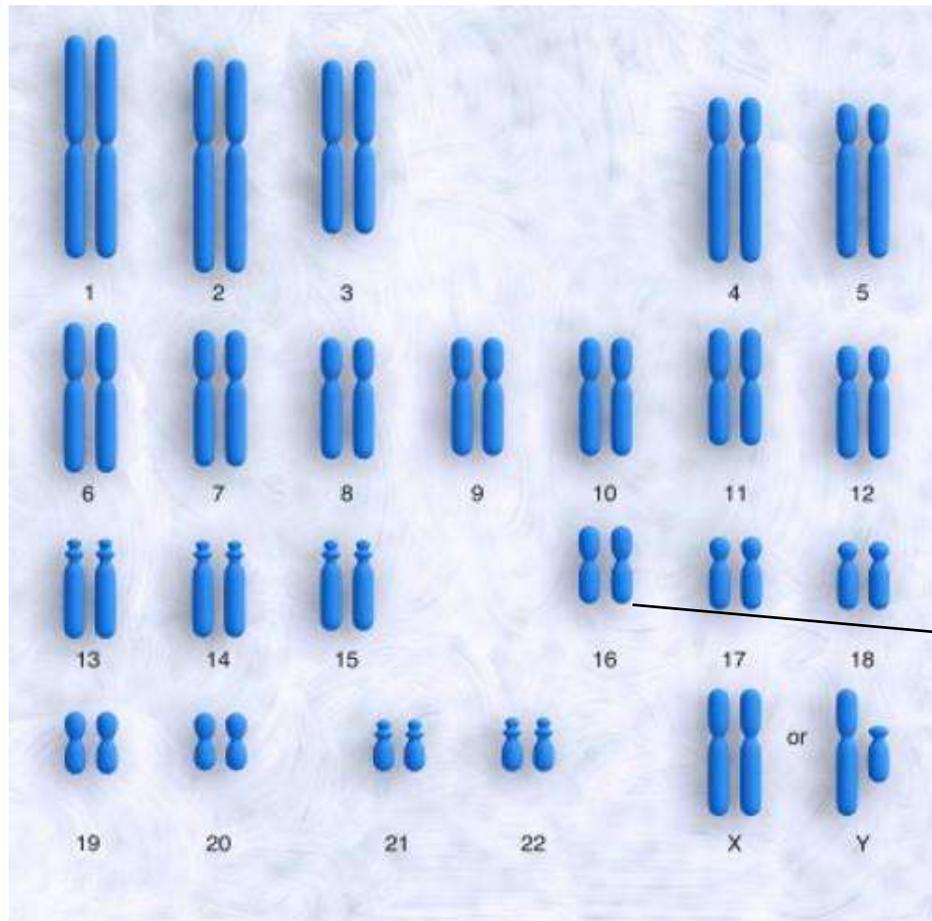
# La genetica della Rubinstein-Taybi

## Summary of Molecular Genetic Testing Used in Rubinstein-Taybi Syndrome

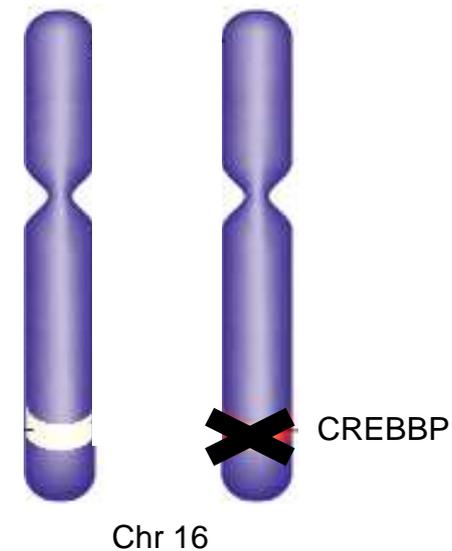
| Gene <sup>1</sup> | Proportion of Rubenstein-Taybi Syndrome Attributed to Mutation of This Gene | Test Method  |
|-------------------|---|--|
| <i>CREBBP</i>     | 50%-60%   | Sequence analysis <sup>2, 3</sup>                              |
|                   |   | <a href="#">FISH</a> <sup>4</sup>                              |
|                   |   | Deletion/ <a href="#">duplication</a> analysis <sup>5, 6</sup> |
| <i>EP300</i>      | 3%-8% <sup>7</sup>  | Sequence analysis <sup>2</sup>                                 |
|                   |   | Deletion/ <a href="#">duplication</a> analysis <sup>5, 8</sup> |
| Unknown           | 30% <sup>9</sup>  | NA   |



# La genetica della Rubinstein-Taybi



**Malattia autosomica dominante :**  
1 sola mutazione su uno dei due cromosomi



# La genetica della Rubinstein-Taybi



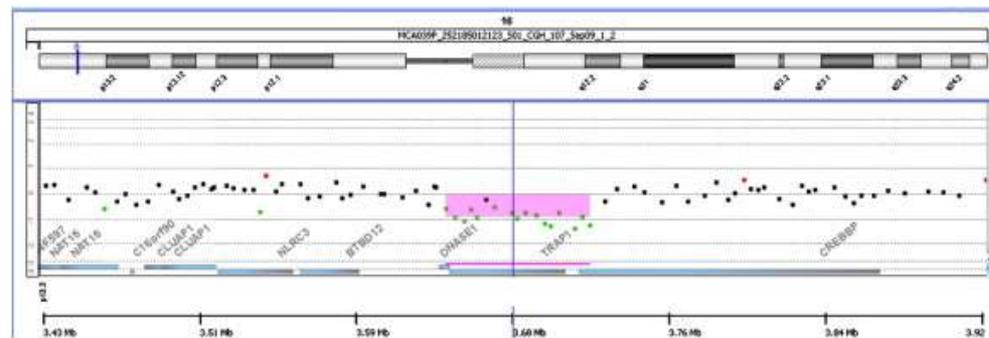
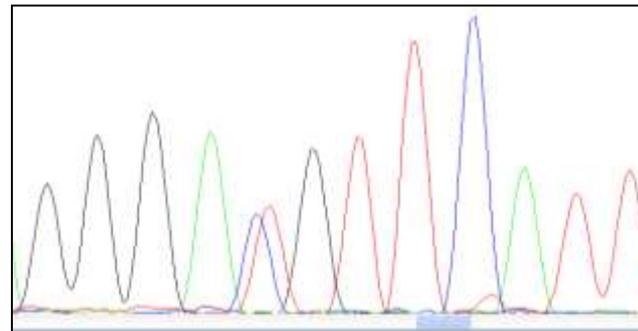
Chr 16



CREBBP

Delezione nella  
regione del gene  
CREBBP

Errore di  
sequenza



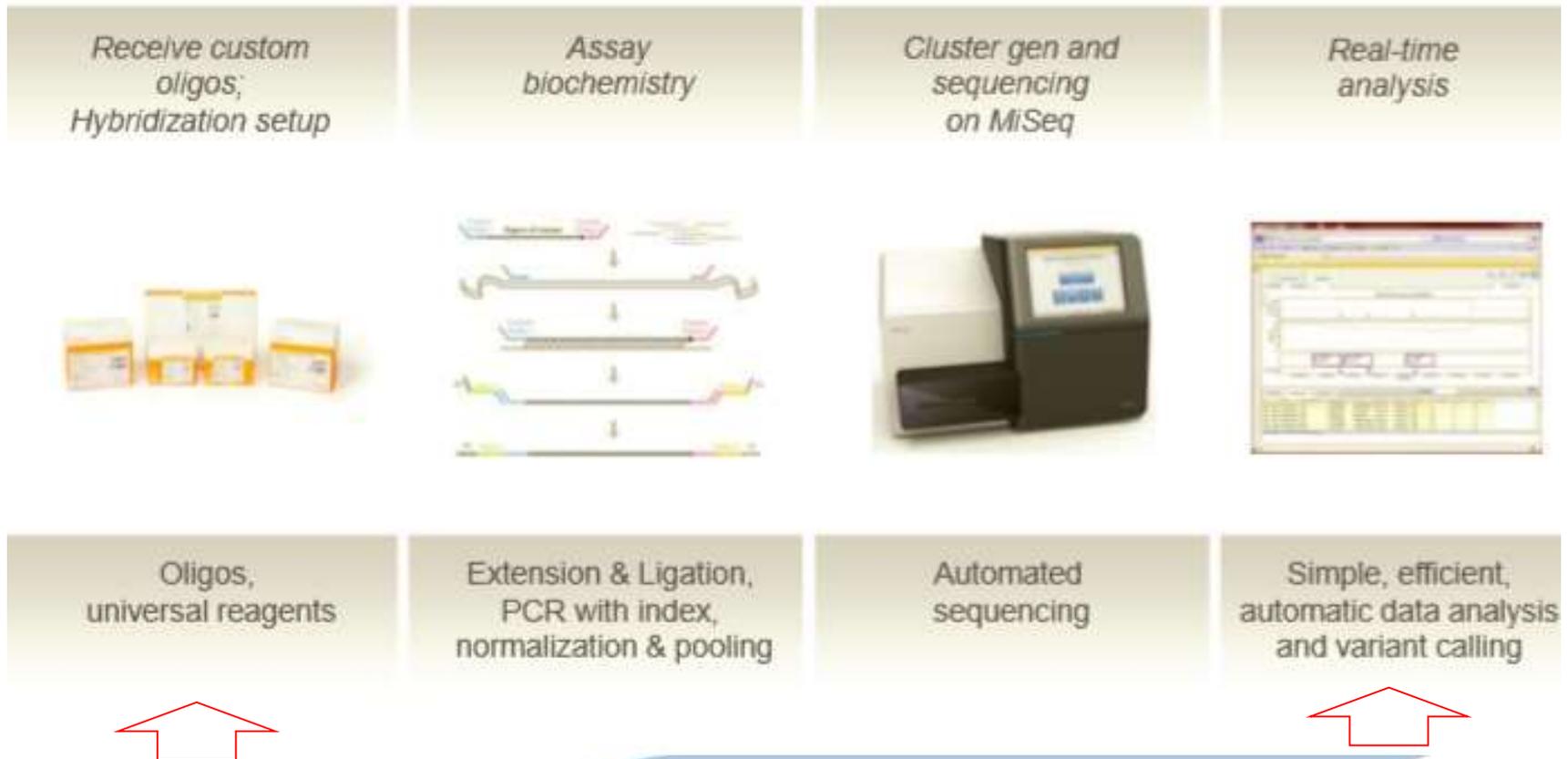
## In laboratorio.....

- 1) Accettazione del campione con sospetta sindrome di Rubinstein Taybi, dopo avere effettuato consulenza genetica e firmato consenso informato
  - 2) Estrazione del DNA da Sangue periferico del paziente
  - 3) Analisi di sequenziamento del gene CREBBP
  - 4) Analisi di sequenziamento del gene EP300
  - 5) Ricerca delezioni gene CREBBP ed EP300 (MLPA-aCGH)
- } NGS



## In laboratorio: NGS

- ✓ Sequenziamento massivo che permette di studiare contemporaneamente tante regioni di DNA per più campioni



# In laboratorio: NGS

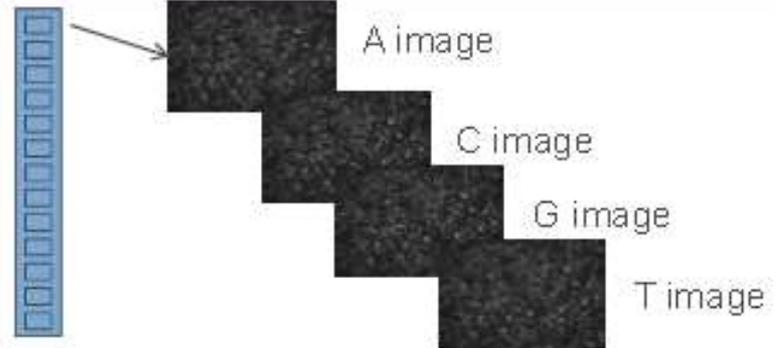
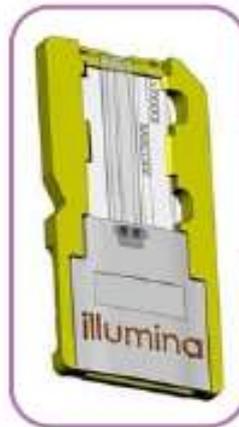
## Sequencing



Clusters are images using LED and filter combinations specific for each fluorescently-labeled nucleotide

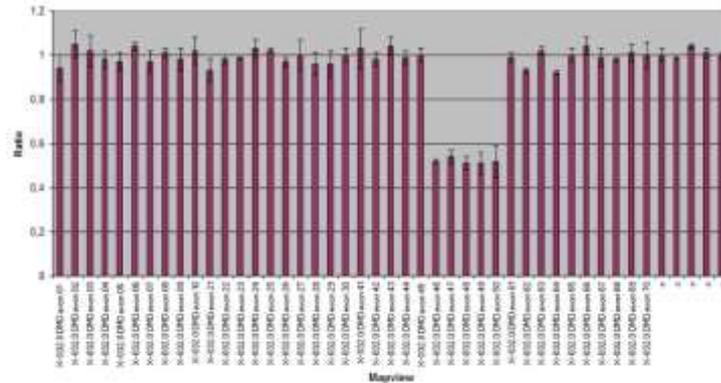
After imaging is complete for one section (tile), the flow cell is moved to the next tile and the process is repeated

Imaging for the 1<sup>st</sup> cycle takes ~3 min., including focusing routines

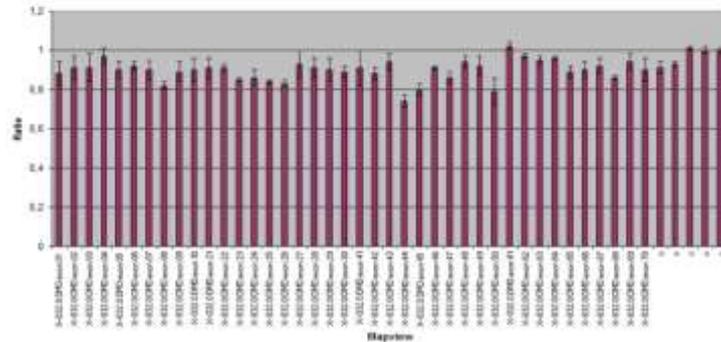


# In laboratorio: ricerca delezioni

## ✓ Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

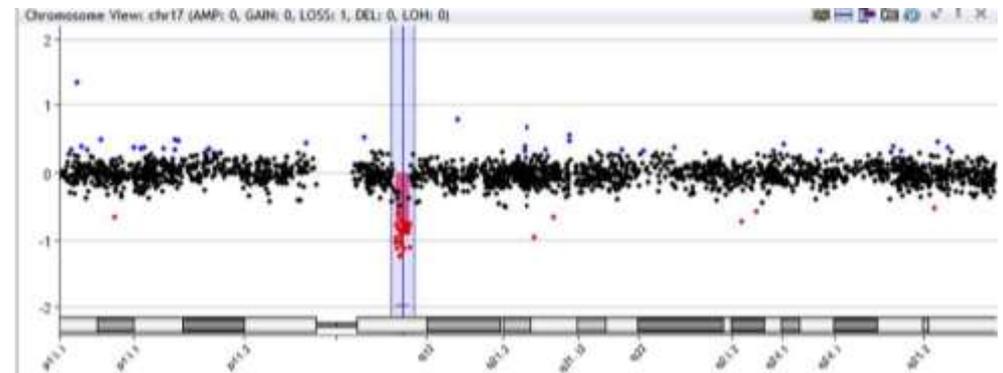


(a)



(b)

## ✓ Array comparative genomic hybridization (CGH)



## In laboratorio.....

### ❖ Risultato positivo:

- A. Analisi dei genitori
- B. Studio della letteratura
- C. Confronto clinico

### ❖ Risultato negativo:

- A. Confronto clinico
- B. Ricerca



