

**SEMINARIO DI CITOLOGIA  
E CITOGENETICA**

**"ASPETTATIVE E PROSPETTIVE  
PER UN BIOLOGO"**



**23 ottobre 2013  
ROMA**

# **La Storia della Citogenetica**

*Girolama Casile*

**A.O. BMM Reggio Calabria  
U.O. Genetica Medica  
Direttore Dr. Carmelo Laganà**

# La Storia della Citogenetica

Nel ripercorrere brevemente le principali tappe della storia della citogenetica, è necessario tenere presenti due aspetti importanti:

il **contesto scientifico e storico** nel quale la citogenetica si è sviluppata e come la sua evoluzione sia dipesa fortemente dal **progresso delle tecniche** utilizzate.



# La Scoperta dei Cromosomi

**XV secolo** – primi microscopi ottici

Nei secoli che seguirono gli osservatori sono diventati gradualmente più esperti nello studio della morfologia della cellula



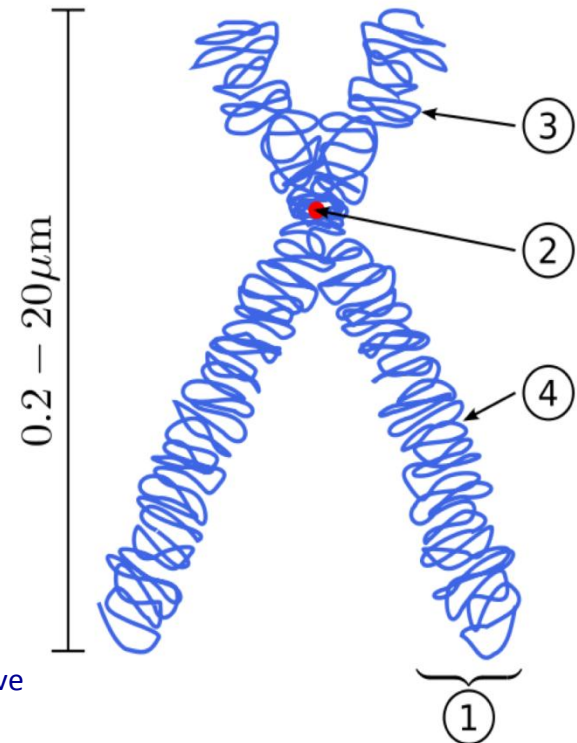
**1840** – **Karl Wilhelm von Nägeli** botanico svizzero che ha descritto per primo le strutture filamentose nel nucleo delle cellule vegetali. Quelli che lui ha chiamato “citoblasti transitori” sono oggi conosciuti come cromosomi.

Cromosoma eucariote duplicato e in metafase

(1) Cromatidio – una delle due parti identiche dopo la fase S

(2) Centromero – il punto di contatto dei due cromatidi e dove

si legano i microtubuli (3) Braccio corto (4) Braccio lungo



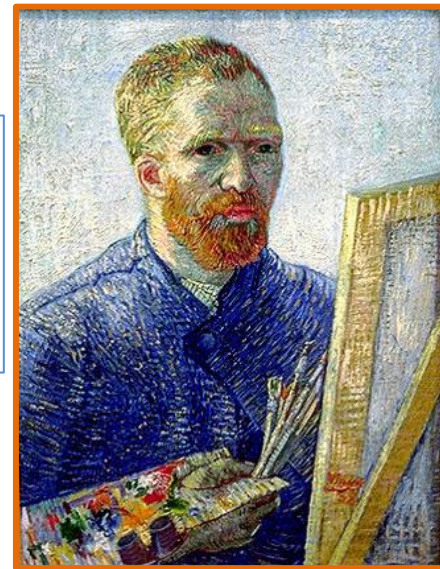
# La scoperta dei Cromosomi

## Era l'anno 1888...

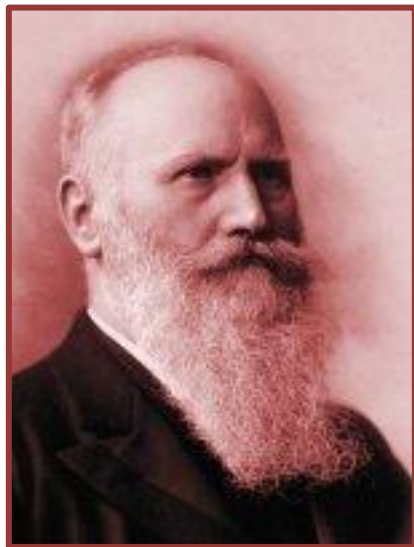
...*Heinrich Hertz* produceva per la prima volta radiazioni ad alta frequenza, dimostrando la loro somiglianza con la luce

...la malinconia del *Night Café ad Arles* è stata catturata su tela di *Paul Gauguin*

...*Vincent van Gogh* dipingeva il suo celebre *Autoritratto davanti al cavalletto*



Il termine ***cromosoma*** apparve per la prima volta in letteratura in una review di **Gottfried Wilhelm Waldeyer**



Waldeyer propose che la parola cromosoma dovesse essere usata per i *corpi colorati* visti durante la divisione nucleare. Nell'illustrare il processo mitotico, Waldeyer sostenne che una soddisfacente teoria della cariocinesi dovesse essere ancora costruita. Questo era in contrasto con i suoi contemporanei che sostenevano che le caratteristiche essenziali del processo erano già note.

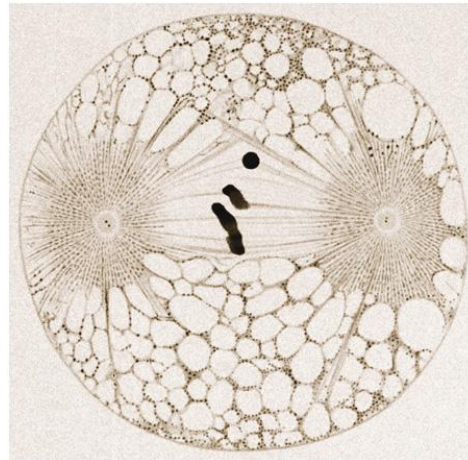
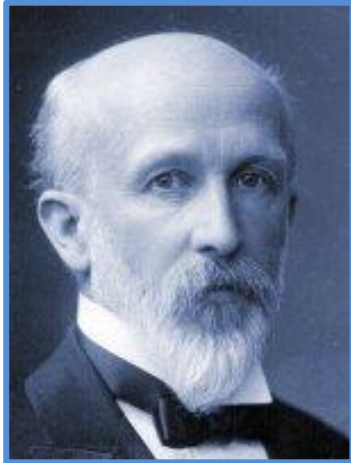
**χρῶμα (chroma) e σῶμα (soma)**



# La Scoperta dei Cromosomi

Prima si pensava che i cromosomi costituissero un'impalcatura all'interno del nucleo, fondendosi in entità casuali durante la divisione cellulare

**1890** – **Oscar Hertwig** scrisse in una review che i cromosomi sono **entità individuali**



I cromosomi sono elementi indipendenti che mantengono la loro indipendenza anche nel nucleo a riposo.

Sulla base di questo presupposto, **Theodor Boveri** formulò la **teoria dell'ereditarietà**: L'impalcatura di ogni nucleo è costituito da un certo numero di *elementi*, una metà dei quali sono discendenti dei cromosomi paterni e l'altra sono discendenti dei cromosomi materni della cellula uovo.

Concluse, come Van Beneden e Weismann fecero prima, che una riduzione della metà nel numero degli elementi nucleari deve avvenire prima della fecondazione.

# Mitosis: a history of division

**Walther Flemming** (1843-1905)  
descrisse delle strutture fibrillari  
nel fuso.

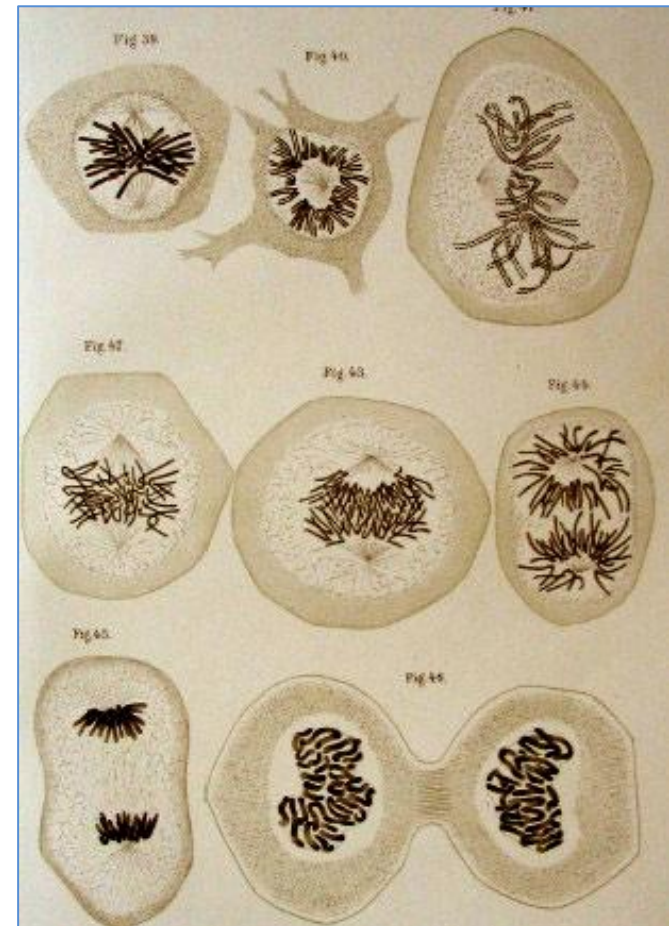


Agli inizi del **1880** coniò il  
termine **mitosi**



**Shinya Inoue** utilizzò il  
microscopio polarizzato per  
confermare l'esistenza delle fibre  
del fuso birifrangente nelle  
cellule viventi, dimostrando che  
queste fibre erano simili o  
identiche a quelle osservate nei  
campioni fissati.

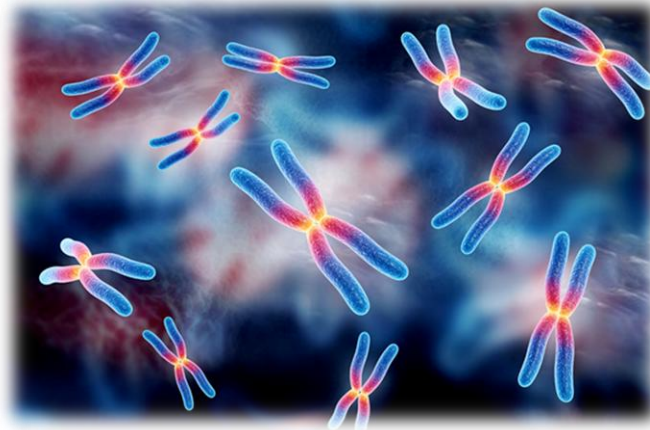
*Illustrations of cells with chromosomes and  
mitosis, from Flemming's book Zellsubstanz,  
Kern und Zelltheilung, 1882*



# 1903 – Citogenetica



**1903** – **Sutton** introdusse per la prima volta il termine **Citogenetica** (citologia e genetica)



La **Citogenetica** studia

- la struttura e le proprietà dei cromosomi
- il loro comportamento durante la divisione delle cellule somatiche, durante la crescita e lo sviluppo (mitosi)
- la divisione delle cellule germinali durante la riproduzione (meiosi)
- la loro influenza sul fenotipo
- i fattori che causano alterazioni cromosomiche

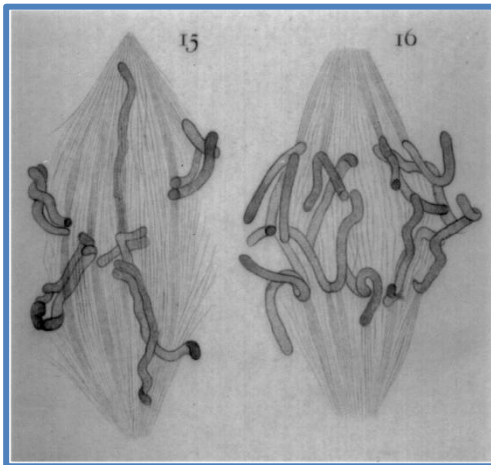
# La Storia della Citogenetica

**1909 – Johanssen** coniò il termine gene

Questi eventi determinarono la nascita della citogenetica moderna, ma negli anni successivi il progresso si è mosso molto lentamente



Eppure, erano in corso studi per trovare l'esatto numero di cromosomi, che diventò un serio problema e motivo di grande preoccupazione tra i vari ricercatori. La qualità dei cromosomi era scarsa ed i numeri variavano ogni volta. Anche la determinazione del numero diploide dei mammiferi è stato considerato un risultato difficile.



I cromosomi erano “affollati” nella metafase e considerazioni sulla funzione biologica dei cromosomi e, in particolare, della genetica moderna, erano oltre la portata della ricerca citologica nel 19° secolo.

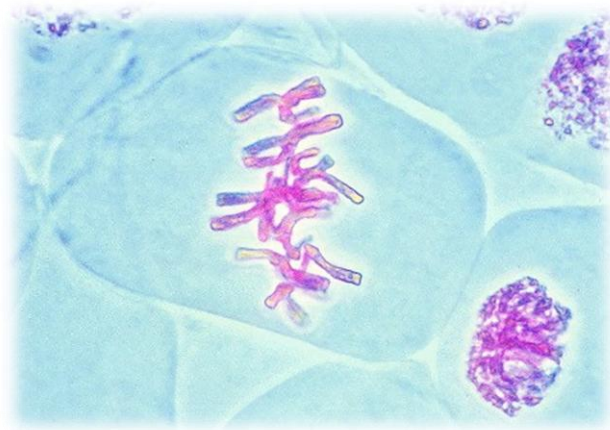
È stato abbastanza difficile ottenere belle immagini con buone metafasi per un facile conteggio.



# XX secolo – Il numero dei cromosomi

**1912** – **Hans von Winiwarter** ha stimato la presenza di 47 cromosomi nell'uomo e 48 nella donna

**1921** – **Theophilus Painter** scoprì il cromosoma Y nelle cellule germinali umane, concludendo per la presenza di un totale di 48 cromosomi anche nell'uomo



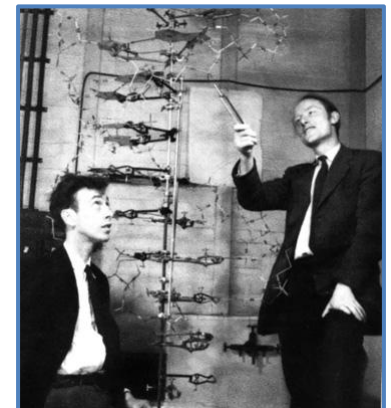
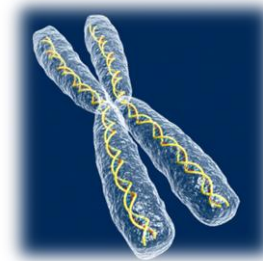
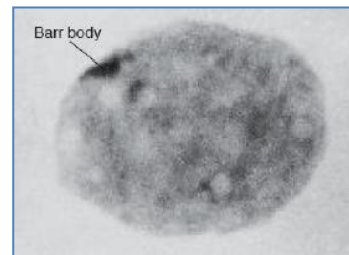
Una coppia di ricercatori, **Eva Hansen-Melander** e **Yngve Melander**, abbandonarono la loro ricerca sugli embrioni umani perchè non erano capaci di trovare 48 cromosomi nelle loro colture, bensì ne vedevano “solo” 46!!

# Gli anni '50 ...*the hypotonic revolution*

Gli **anni '50** sono stati anni estremamente produttivi per la citogenetica umana grazie ad una successione di eventi che hanno permesso l'osservazione della mitosi con tecniche più semplici.

**1952** – **T.C. Hsu**, a Houston, quasi per caso, notò che una soluzione ipotonica aggiunta alla coltura cellulare prima della fissazione, ha determinato la separazione dei cromosomi l'uno dall'altro

**1953** – **Murray Barr**, a London (Ontario, Canada) ha localizzato il corpo di Barr in tutti i nuclei femminili



Nello stesso anno (**1953**) **Watson e Crick** descrissero la struttura a doppia elica del DNA

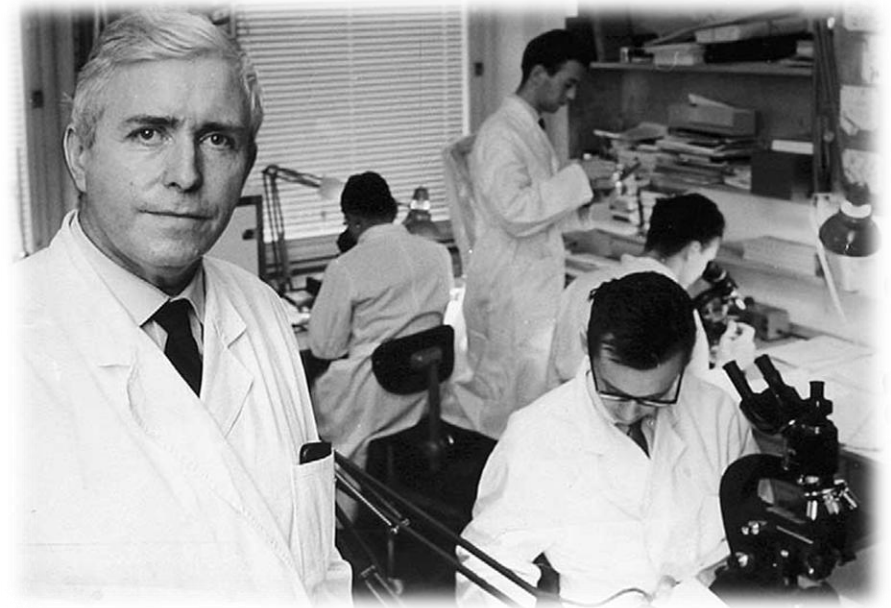
# Gli anni '50 ...dopo più di 50 anni...

È stato a Lund, nel laboratorio di **Albert Levan**, il 22 Dicembre 1955 alle 2 a.m., dopo molte ore di lavoro, che **Joe Hin Tjio**, ha ottenuto un'eccellente mitosi dalle cellule embrionali umane in coltura...

...tutte le cellule avevano **46** cromosomi!



*Institute of Genetics*

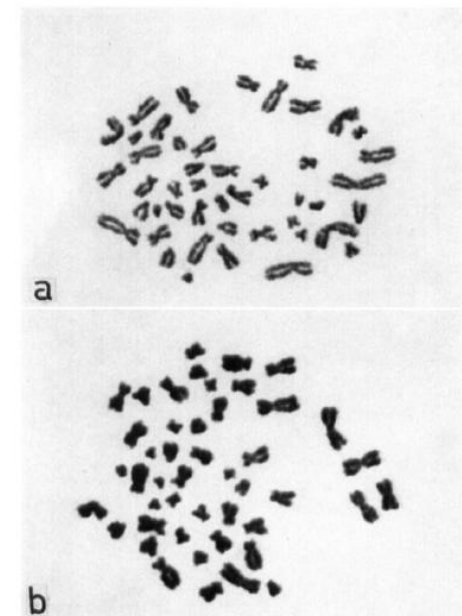
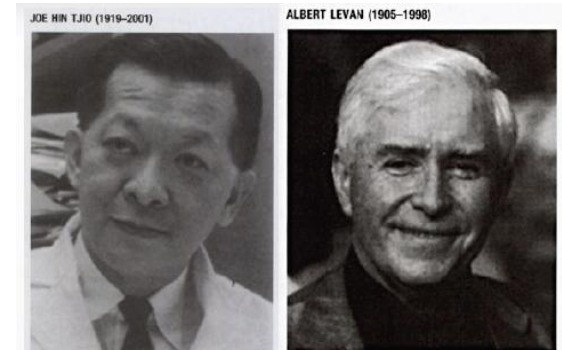
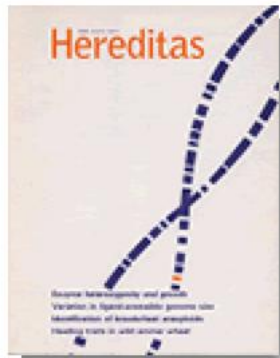


*Albert Levan's laboratory*

# THE CHROMOSOME NUMBER OF MAN

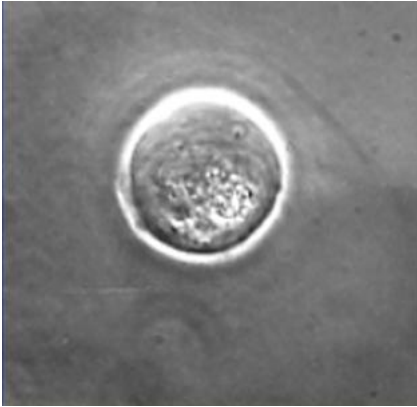
By *JOE HIN TJIO* and *ALBERT LEVAN*

ESTACION EXPERIMENTAL DE AULA DEI, ZARAGOZA, SPAIN, AND CANCER CHROMOSOME LABORATORY, INSTITUTE OF GENETICS, LUND, SWEDEN

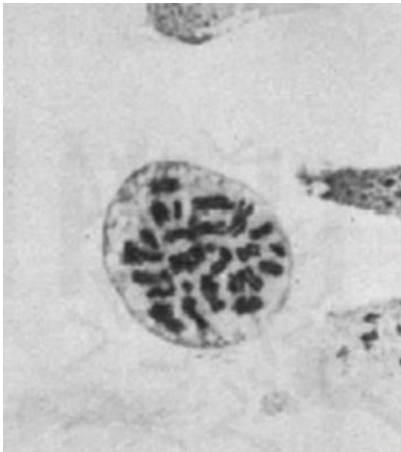




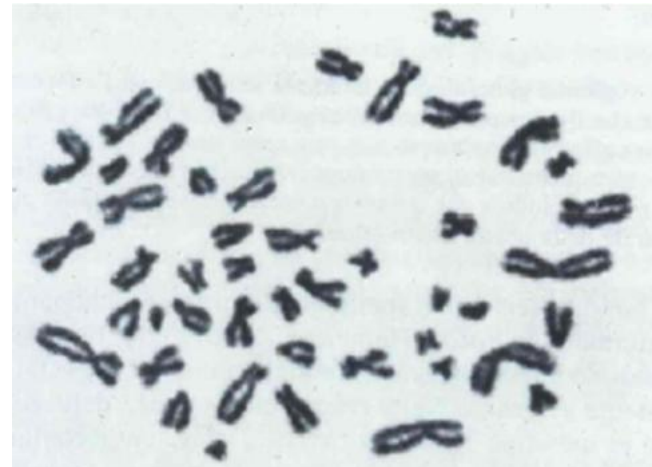
# Chromosome Spreading



Ipotonica  
Fissativo  
Evaporazione

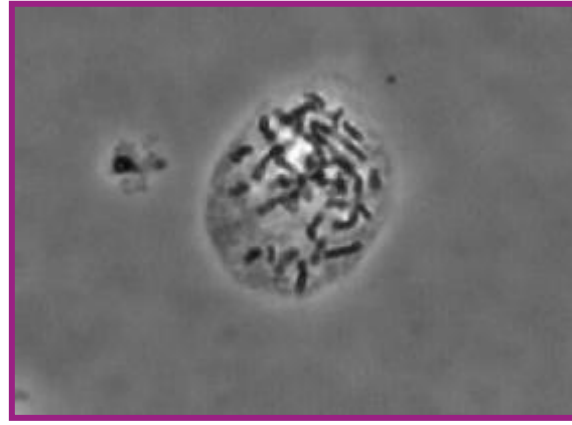
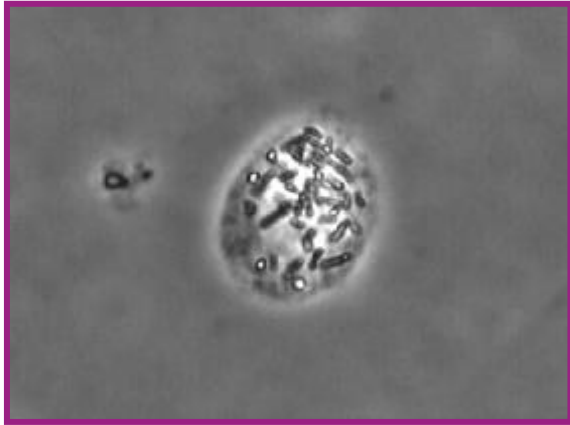


*Metafase ottenuta da Hsu nel 1952*



*Metafase ottenuta da Tjio nel 1956*

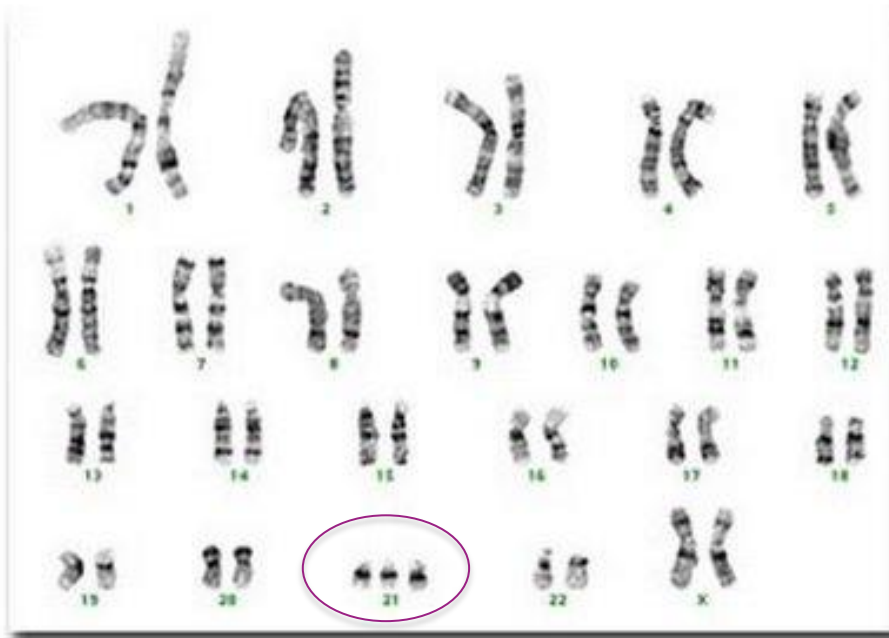
# Chromosome Spreading



# The Clinical Revolution

Stabilito il numero corretto di cromosomi e grazie a questi semplici progressi tecnologici alla fine degli anni '50 sono state fatte molte associazioni tra anomalie cromosomiche e malattie e velocemente si stabilì il **ruolo centrale della citogenetica in medicina**

**1958** – **Jerome Lejeune** annuncia la presenza di un cromosoma sovrannumerario nella Sindrome di Down



Jerome Lejeune (1926–1994).



# Anomalie di numero 1959

**Ford** → 45,X nella Sindrome di Turner

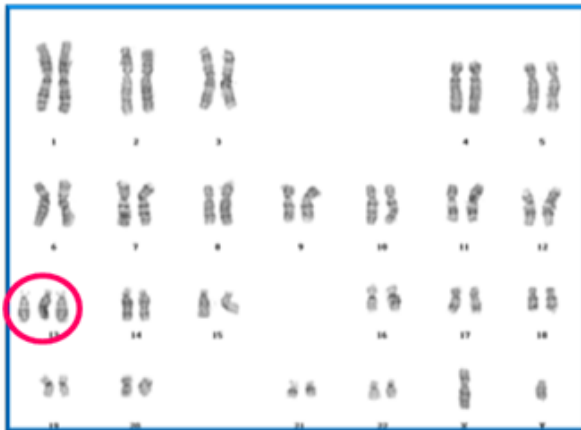
**Jacobs** → 47,XXY nella Sindrome in Klinefelter

47,XXX

47,XYY



# 1960



**Patau** → trisomia 13



**Edwards** → trisomia 18

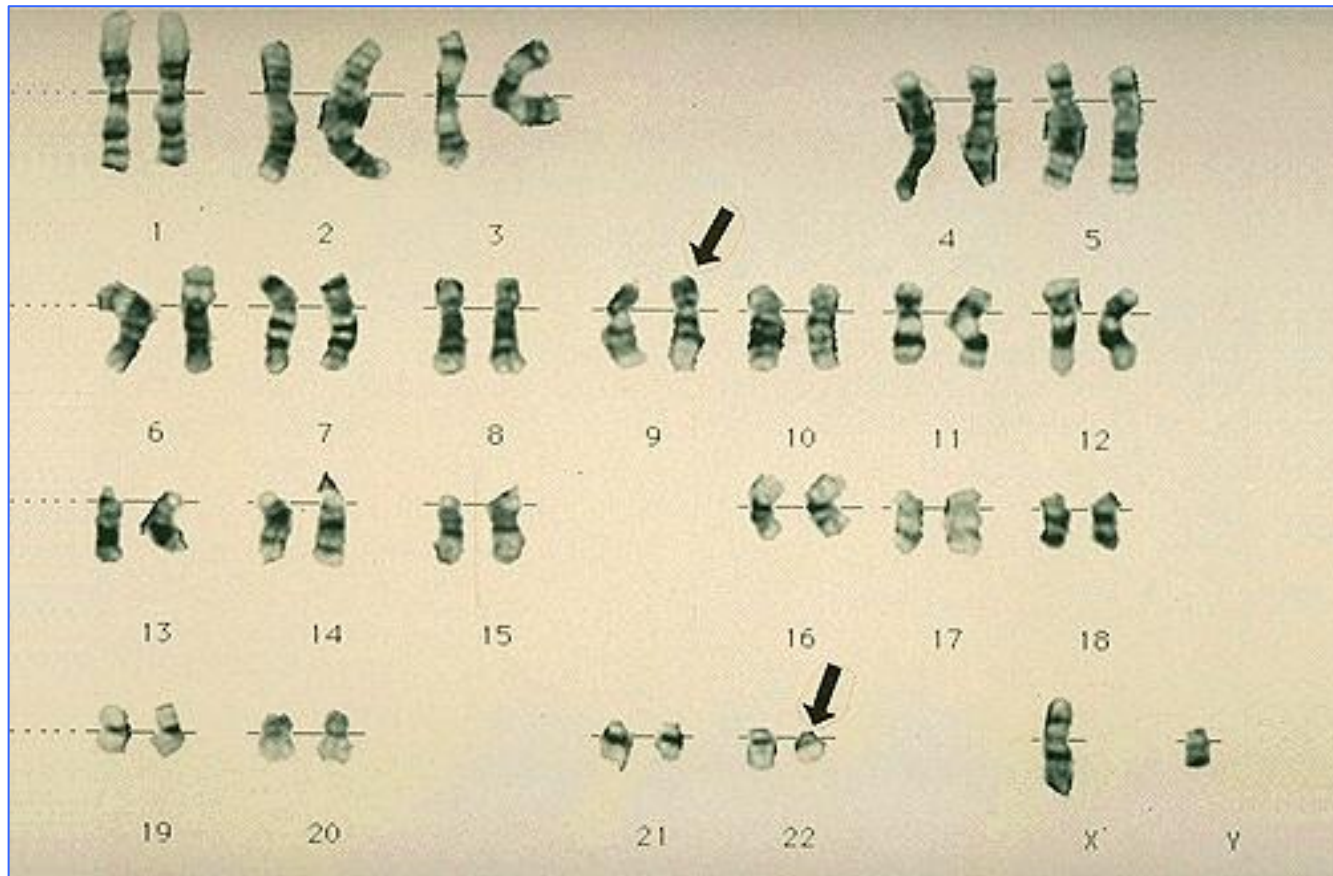




## Anomalie di struttura

**1960** – Nowel e Hungerford Philadelphia chromosome in CML

**1973** – Rowley  $t(9;22)(q34;q11)$  in CML

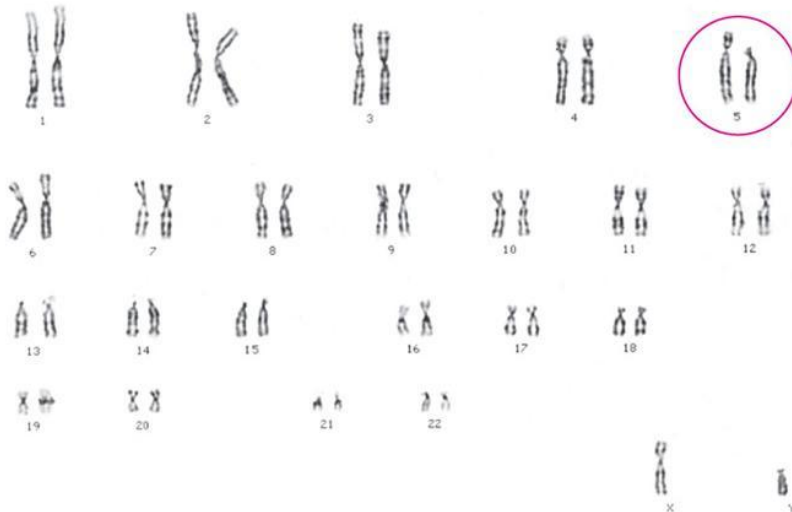




NEW CHROMOSOMAL SYNDROMES, 1961-1970

Abnormality	Researcher
4p- (Wolf-Hirschhorn syndrome)	Wolf <i>et al.</i> , 1965; Hirschhorn <i>et al.</i> , 1965
5p- (cri du chat syndrome)	Lejeune <i>et al.</i> , 1963
5p trisomy	Lejeune <i>et al.</i> , 1963
13q monosomy	Lejeune <i>et al.</i> , 1968
18p- syndrome	de Grouchy <i>et al.</i> , 1963
18q- syndrome	de Grouchy <i>et al.</i> , 1964
21 partial monosomy	Lejeune <i>et al.</i> , 1964

a) Karyotype (G banding)



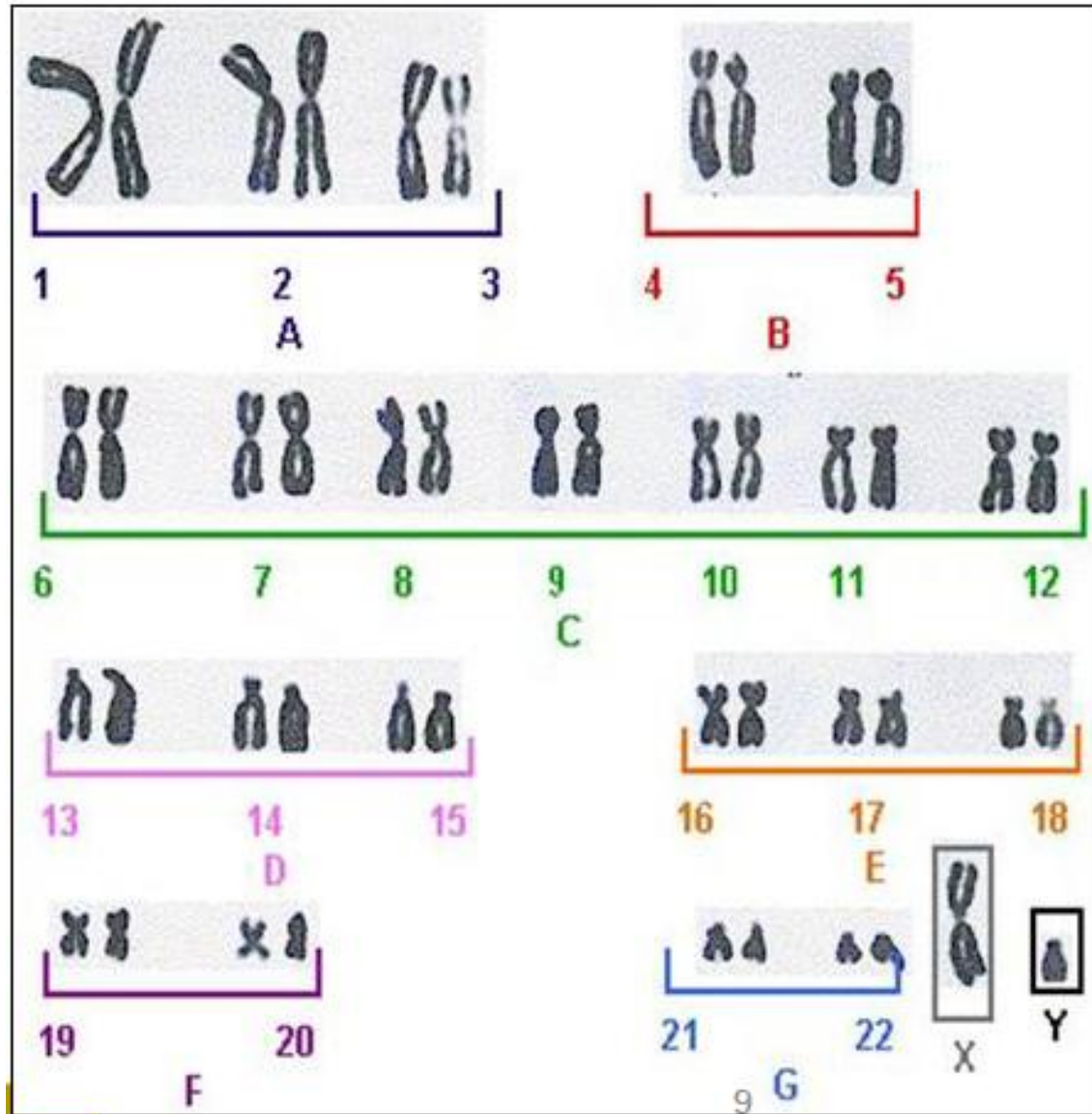
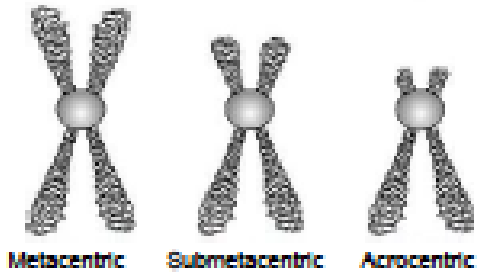
b) Individual with Cri-du-chat syndrome



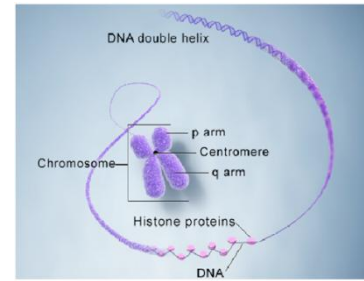
# 1963 – London Conference

classificazione dei cromosomi non bandeggiati in 7 gruppi

Posizione del centromero



# “Mind your P’s and Q’s”



**Come è stato deciso di chiamare il braccio corto ed il braccio lungo dei cromosomi ‘p’ e ‘q’?**

La decisione è stata presa durante la **Conferenza di Chicago: Standardization in Human Cytogenetics, 1966**

Questo report è stato pubblicato dalla National Foundation (*March of Dimes in its Birth Defects Original Article Series, Vol II, No 2, December, 1966*)

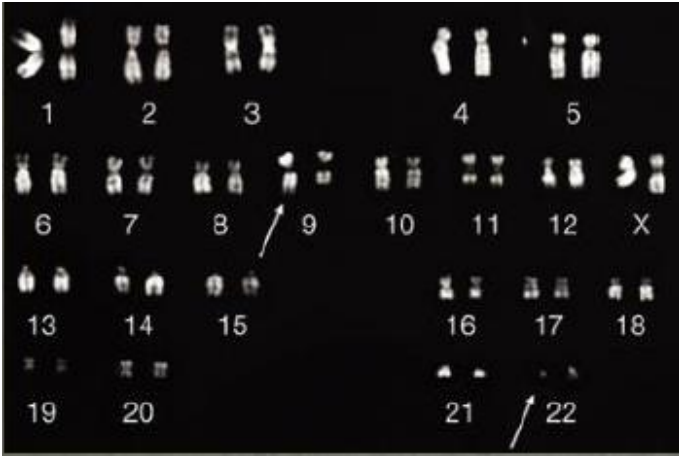
**Kurt Hirshhorn:** “Since I chaired that session, I remember it very well, because I had to intervene in several angry fights, particularly between **Lejeune** and **Patau** (World War 2 ½). The first suggestion was ‘s’ and ‘l’ (short and long). Patau objected and said if we use ‘l’, short must be ‘k’ (kurz). This of course didn’t result in anything except an outburst from Lejeune. He and others, including me then urge the use of ‘p’ for short, since petit (or petite) are used in several languages, and we all agreed. Then the fight began about the long arm. ‘l’ seemed ok (in several languages), but I and others worried about confusion with ‘1’. This went on until 1.00 am, when **Lionel Penrose** came in to see what was taking so long. After hearing the problem, he immediately resolved it with ‘q’ for long, since it was linguistically neutral, and, as was pointed out, ‘p+q=1’ (short+long) = the whole unit.”

*Peter Benn*

*In English pubs, ale is ordered by pints and quarts... so in old England, when customers got unruly, the bartender would yell at them “mind your pints and quarts and settle down”*



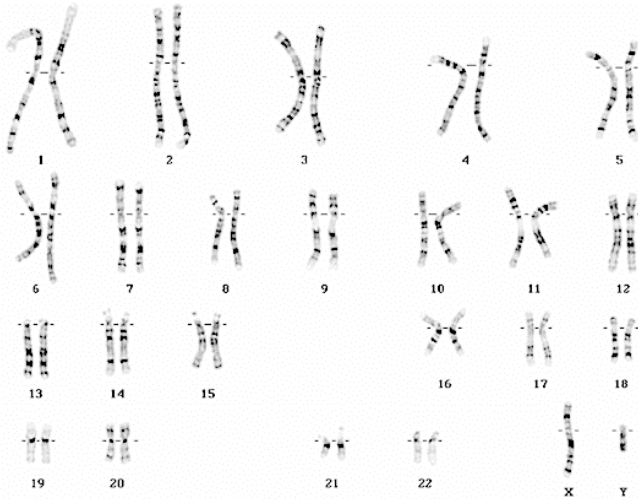
# Anni '70 – *The Banding Revolution*



1970 – Caspersson Q-banding



1971 – Seabright G-banding by trypsin



1975 – Yunis High Resolution G-banding

# Diagnosi prenatale

**1956** – **Fritz Fuchs** e **Povl Riis** determinarono il sesso del feto dalle cellule trovate nel liquido amniotico, in base alla presenza o assenza del corpo di Barr



Primo lavoro sull'esame del liquido amniotico nella diagnosi prenatale

letters to nature

nature

*Nature* 177, 330 (18 February 1956); doi:10.1038/177330a0

## Antenatal Sex Determination

FRITZ FUCHS & POVL RIIS

Department A, Royal Maternity Hospital, Rigshospitalet, Copenhagen. Nov. 23.  
Department F, Copenhagen County Hospital, Hellerup.

**1956** – **John Edward** in Inghilterra discusse per la prima volta la possibilità della “diagnosi prenatale dei disordini ereditari”

La determinazione del sesso del feto ha consentito il management prenatale di pazienti con Emofilia A nel **1960** e Distrofia muscolare di Duchenne nel **1964**



# Diagnosi prenatale



## THE LANCET

Lancet. 1966 Feb 19;1(7434):383-5.

### **Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells.**

Steele MW, Breg WR Jr.



The NEW ENGLAND  
JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

ARCHIVE

## Role of Amniocentesis in the Intrauterine Detection of Genetic Disorders

Henry L. Nadler, M.D., and Albert B. Gerbie, M.D.

N Engl J Med 1970; 282:596-599 | [March 12, 1970](#) | DOI: 10.1056/NEJM197003122821105

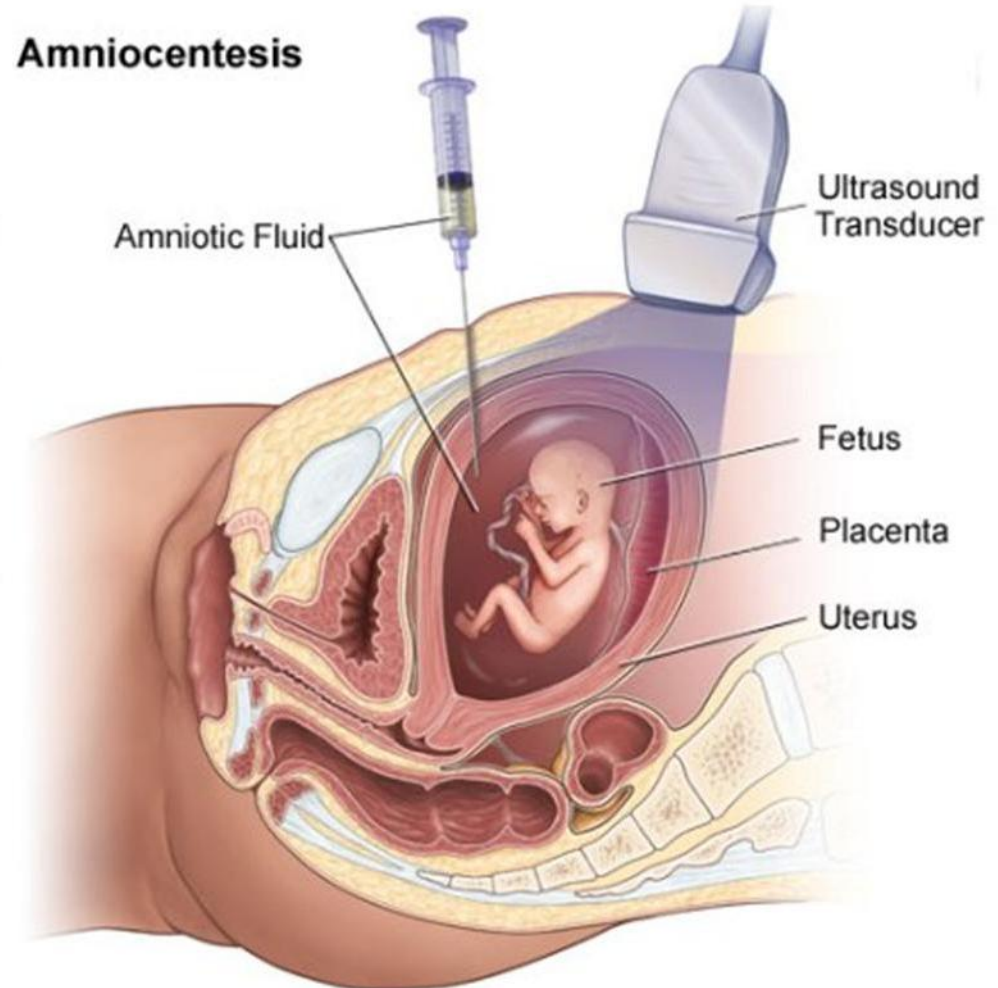
# Diagnosi prenatale



Single operator 2-hands technique

1972

Jens Bang e Allen Northved a Copenaghen nel 1972 eseguirono la prima amniocentesi ecoguidata



# Diagnosi prenatale

**1983**

**Giuseppe Simoni e Bruno Brambati**  
a Milano descrissero una tecnica  
per l'analisi diretta dei cromosomi  
nel primo trimestre dai **Villi Coriali**  
senza coltura preliminare



**Giuseppe Simoni**

**Bruno Brambati**

## THE LANCET

Volume 321, Issue 8324, 12 March 1983, Pages 585–586

Originally published as Volume 1, Issue 8324

Letters to the Editor

### DIAGNOSIS OF FETAL TRISOMY 21 IN FIRST TRIMESTER

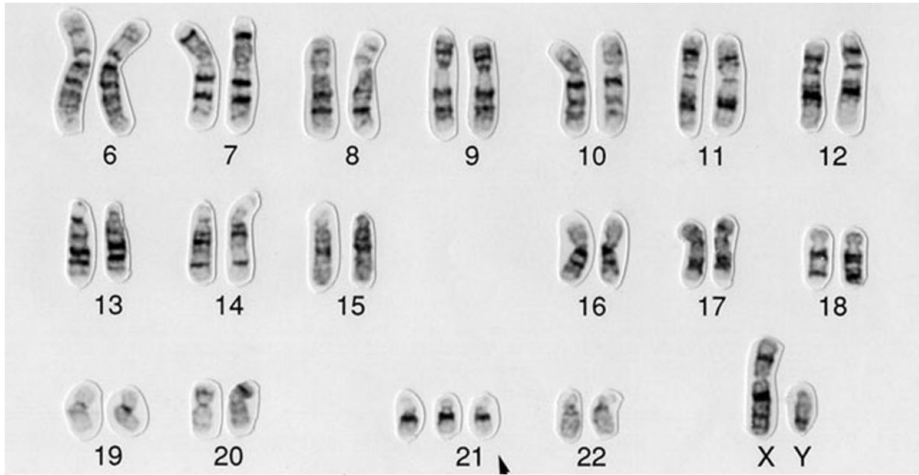
**B. Brambati, G. Simoni**

Perinatal Unit and Cytogenetic Laboratory, First Clinic of Obstetrics and Gynaecology, University of Milan, 20122 Milan, Italy





# Anni '80 – The Imaging Revolution

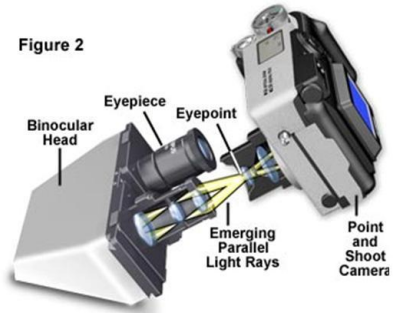


Photomicrography with an Integral Lens Camera

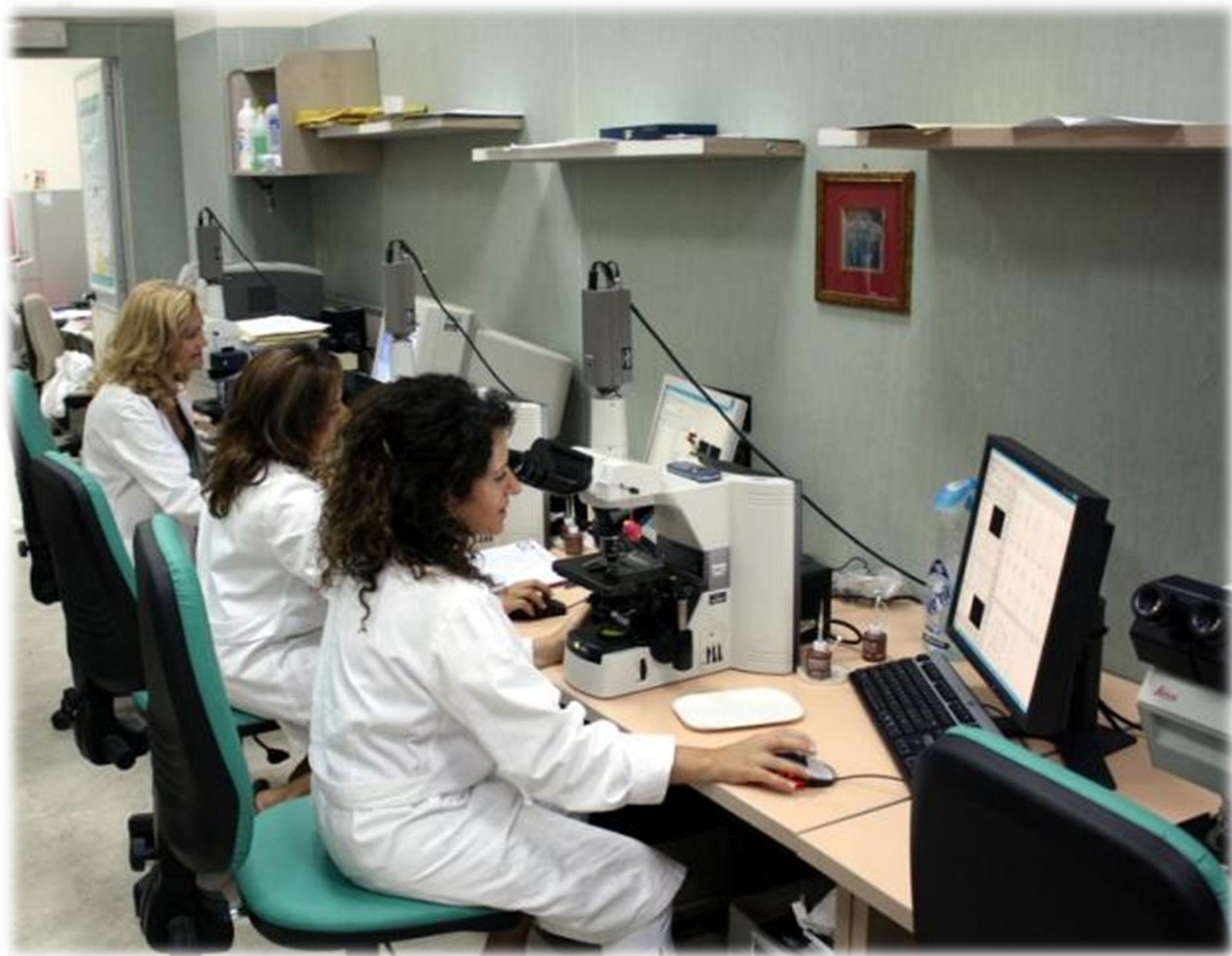


Jérôme Lejeune (1926–1994).

Figure 2



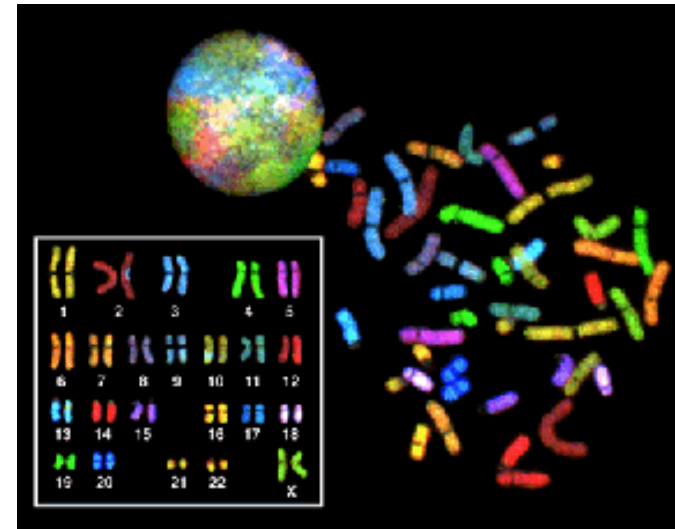
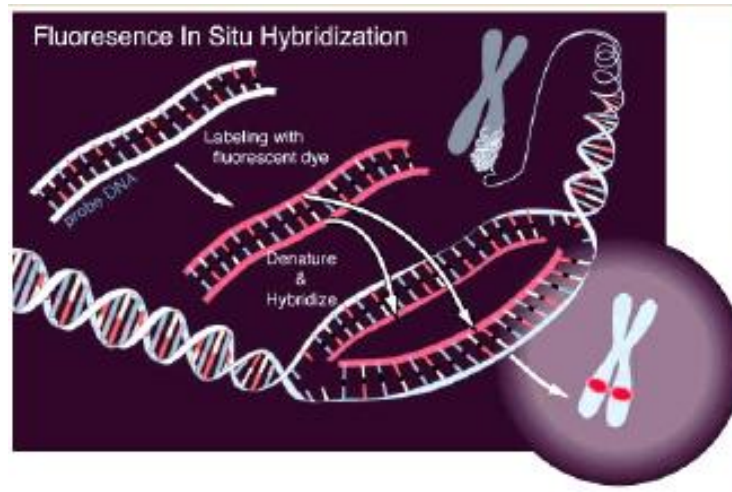
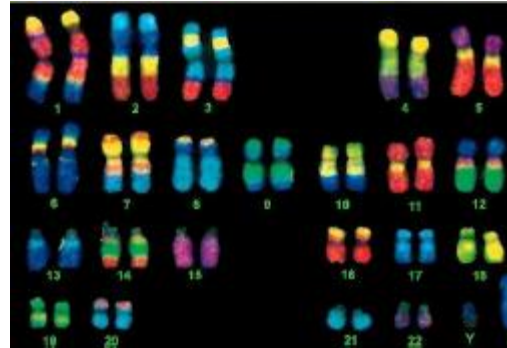






# Anni '90 – The Colour Revolution

Whole Chromosome Painting  
Fluorescent In Situ Hybridisation (FISH)  
Spectral Karyotyping (SKY)  
Multicolor FISH  
Unique Locus Probe



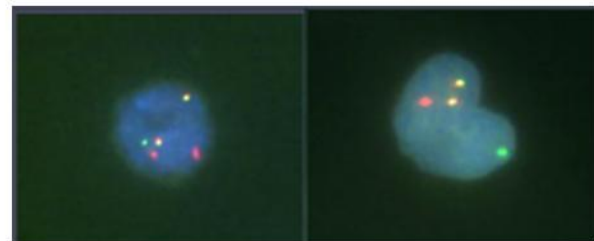
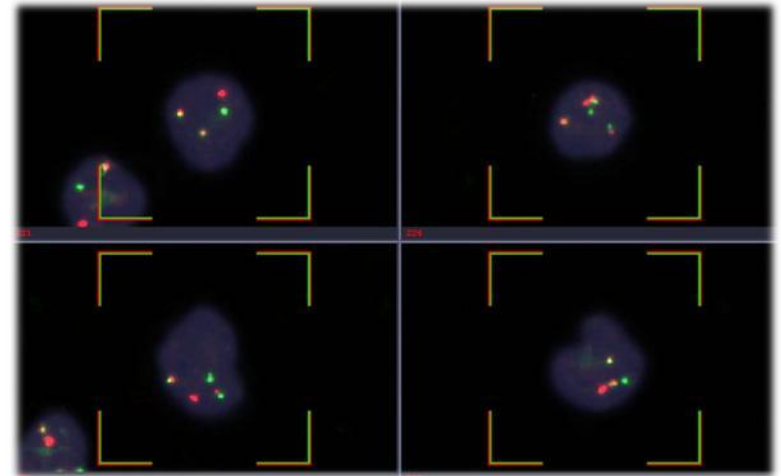
# 2000 – Automazione in Citogenetica



**Chromosome Spreading**



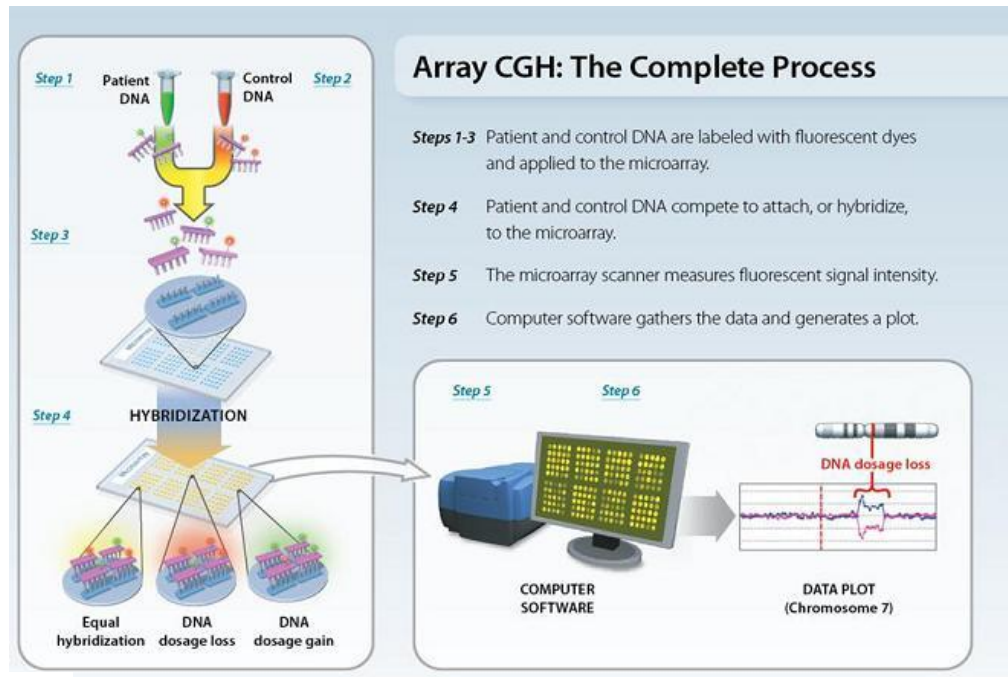
# 2000 – Automazione e FISH



# 2000 – The Genomic Revolution

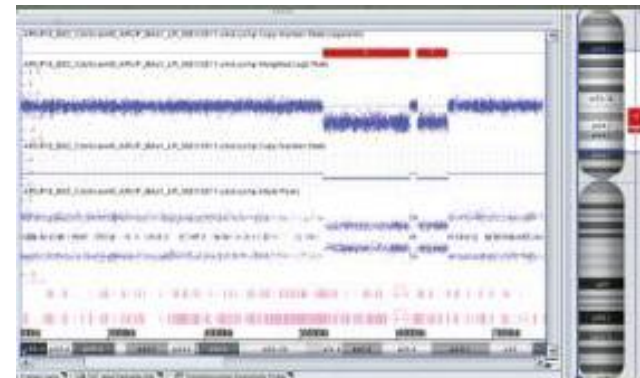
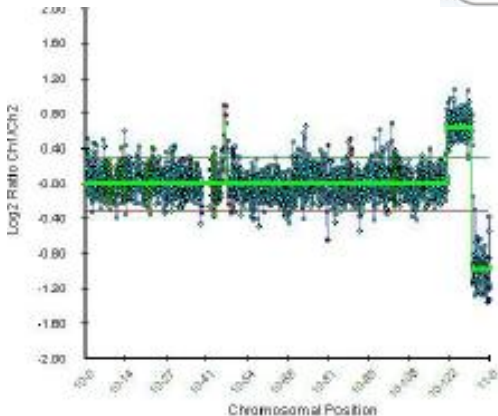
## Citogenetica Molecolare

### Array-CGH (Comparative Genomic Hybridisation)

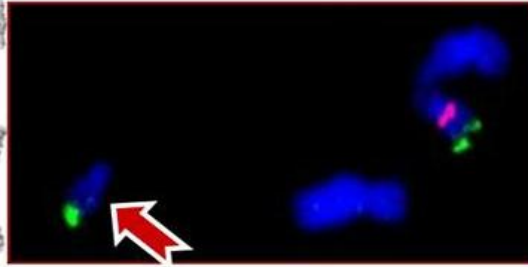
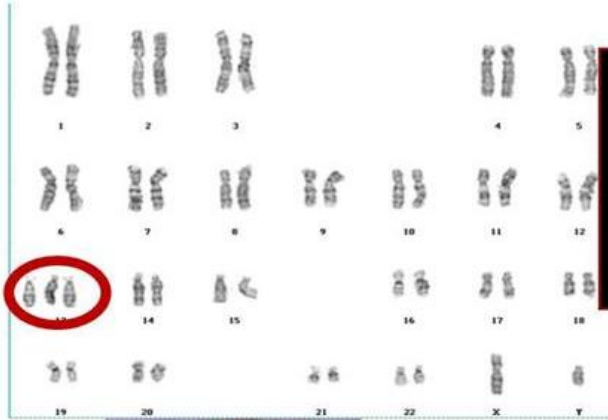


SNP Arrays

BAC and Oligo Arrays



# Increased Resolution



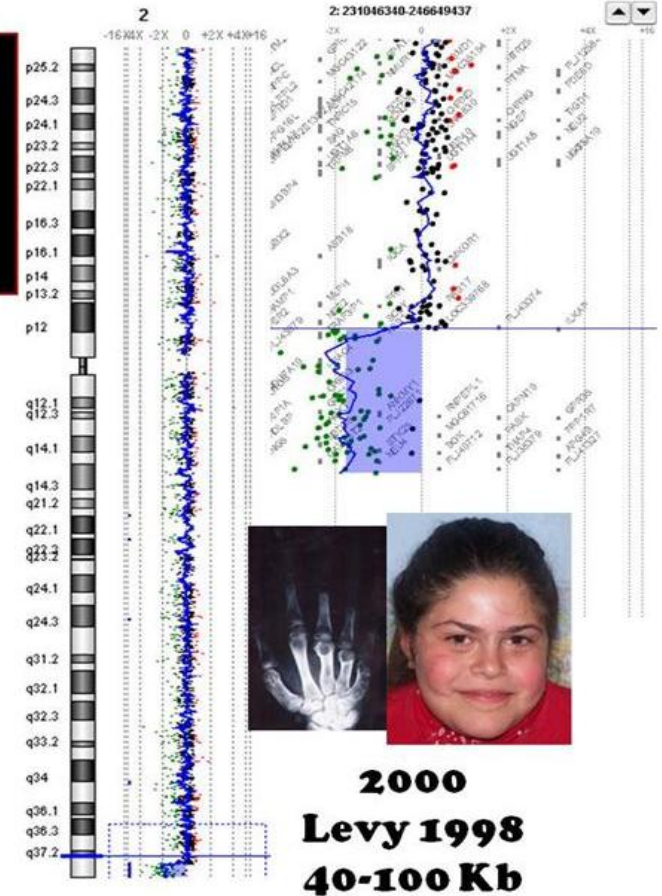
**1959 Down**  
**1961 Patau**  
**3-5 Mb**



**90'**  
**Trask 1991**  
**500 Kb - 1Mb**

Visione d'insieme dell'intero genoma,  
ma bassa risoluzione

Elevata risoluzione,  
ma l'analisi diventa locus-specifica



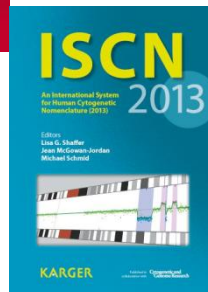
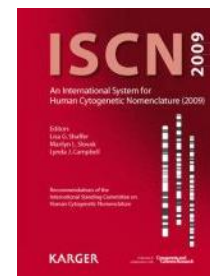
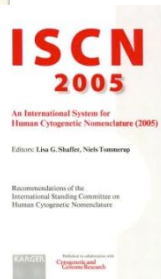
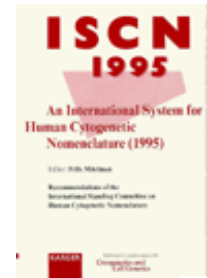
**2000**  
**Levy 1998**  
**40-100 Kb**

“cariotipo molecolare”

**100x increased resolution**

# History of Nomenclature

- 1956 human 46 chromosomes (not 48!)
- 1959 variety of classification and nomenclature systems
- 1960 Denver Conference: basis for all subsequent nomenclature reports
- 1963 London Conference: classification of chromosomes in 7 groups (A-G)
- 1966 Chicago: improvement of nomenclature non-banded chromosomes
- 1968 banding techniques in plants
- 1970 first banded human karyotype
- 1971 Paris: nomenclature for chromosomal regions and bands
- **1976** Mexico: 1<sup>o</sup> international standing committee of human cytogenetic nomenclature
- ISCN (1978) 1<sup>o</sup> book!
- ISCN (1981) High resolution, separate book
- ISCN (1985) combination of 1<sup>o</sup> and HR
- ISCN (1991) Cancer cytogenetic, separate book
- ISCN (1995) combination of 1985 and 1991 into one document
- ISCN (2005) + G and R banding, + FISH
- ISCN (2009) + large expansion of cancer nomenclature, + array, + MLPA
- ISCN (2013) + large expansion of nomenclature array, FISH, cancer, rsa





# ISCN (2013)

## International System of Human Cytogenetics Nomenclature

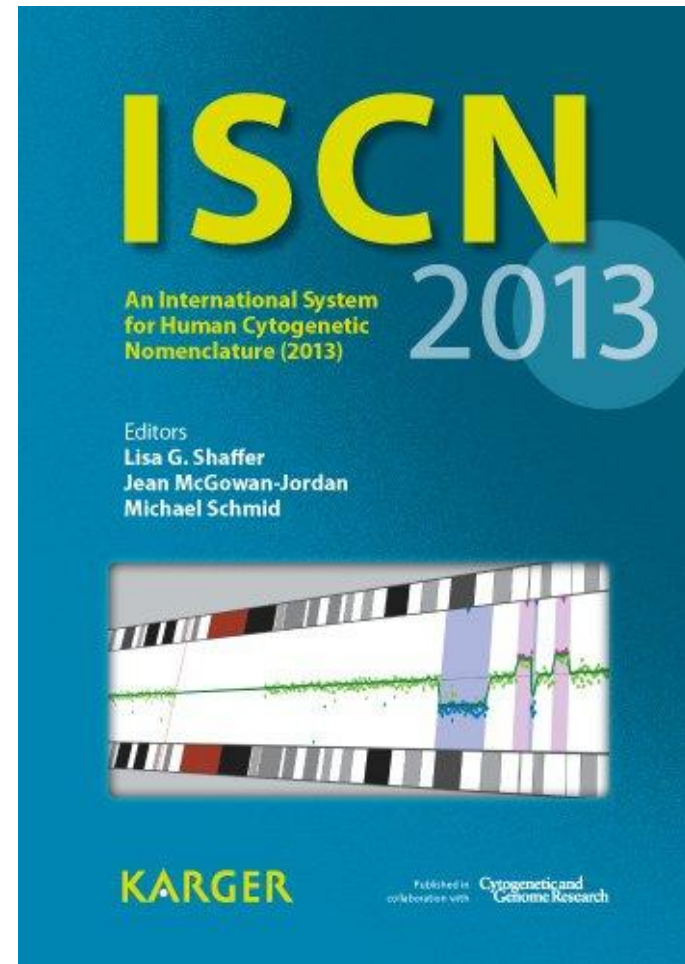
Published in November 2012

Labs are expected to use ISCN 2013

**EQA: ISCN 2013 must be used after July 1, 2013**

Purpose of the book

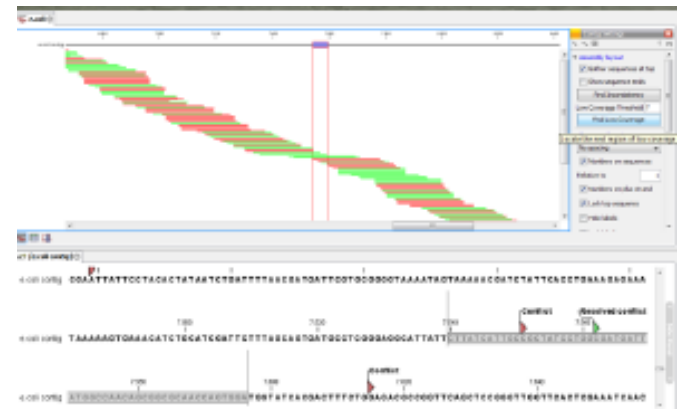
- Only guidelines for nomenclature!
- Practical or clinical guidelines are NOT in the book





# 2000 – The Genomic Revolution

## Next Generation Sequencing



# Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study

Rossa W K Chiu, professor,<sup>1</sup> Ranjit Akolekar, clinical research fellow,<sup>3</sup> Yama W L Zheng, student,<sup>1</sup> Tak Y Leung,

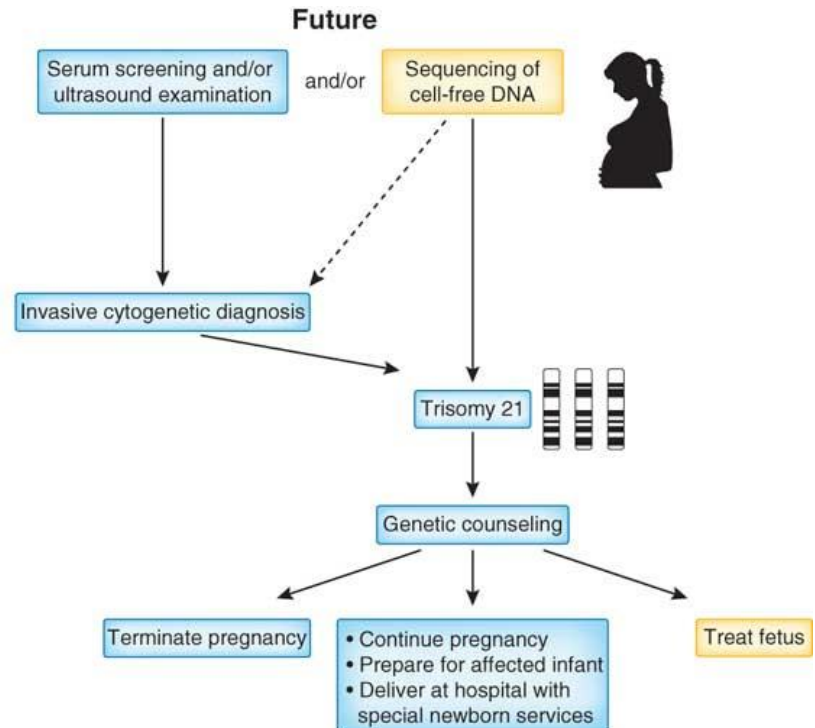
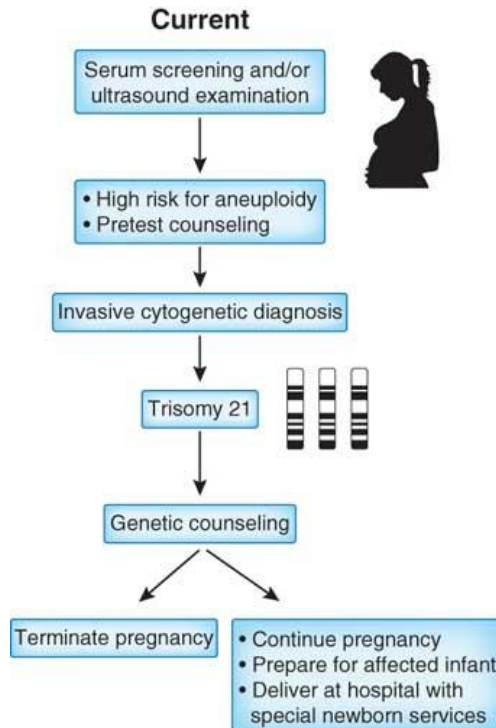
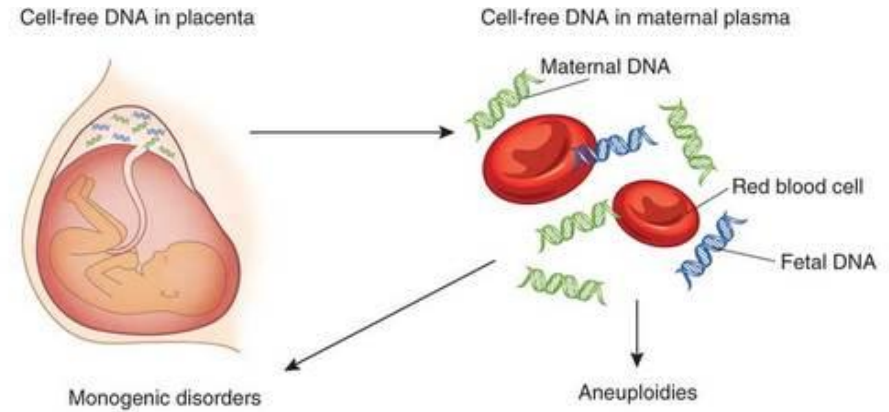
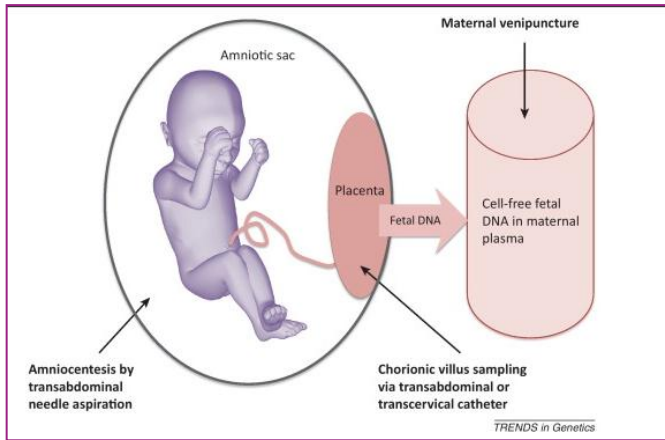
[BMJ 2011;342:c7401](#)



## Noninvasive Detection of Fetal Subchromosome Abnormalities via Deep Sequencing of Maternal Plasma

Anupama Srinivasan,<sup>1</sup> Diana W. Bianchi,<sup>2</sup> Hui Huang,<sup>1</sup> Amy J. Sehnert,<sup>1</sup> and Richard P. Rava<sup>1,\*</sup>

# From prenatal genomic diagnosis to fetal personalized medicine: progress and challenges

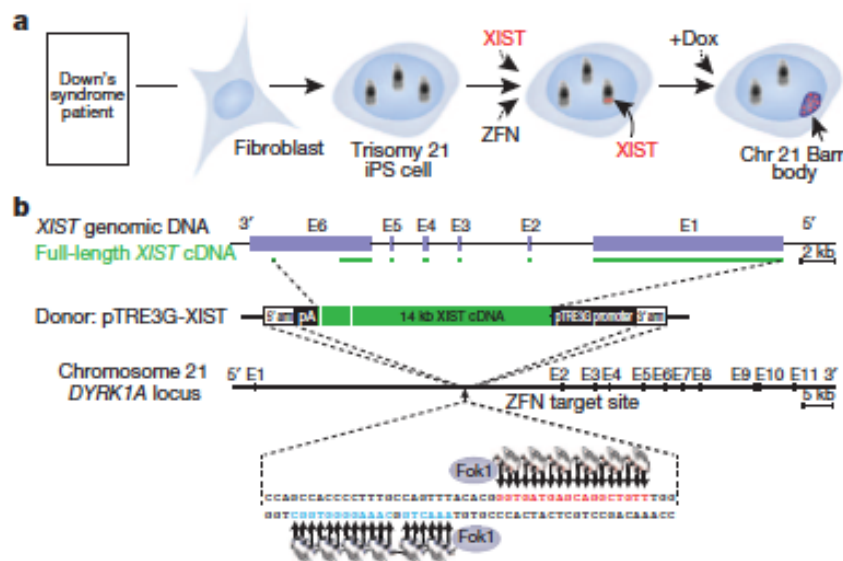


## ARTICLE

doi:10.1038/nature12394

# Translating dosage compensation to trisomy 21

Jun Jiang<sup>1</sup>, Yuanchun Jing<sup>1</sup>, Gregory J. Cost<sup>2</sup>, Jen-Chieh Chiang<sup>1</sup>, Heather J. Kolpa<sup>1</sup>, Allison M. Cotton<sup>3</sup>, Dawn M. Carone<sup>1</sup>, Benjamin R. Carone<sup>1</sup>, David A. Shivak<sup>2</sup>, Dmitry Y. Guschin<sup>2</sup>, Jocelynn R. Pearl<sup>2</sup>, Edward J. Rebar<sup>2</sup>, Meg Byron<sup>1</sup>, Philip D. Gregory<sup>2</sup>, Carolyn J. Brown<sup>3</sup>, Fyodor D. Urnov<sup>2</sup>, Lisa L. Hall<sup>1</sup> & Jeanne B. Lawrence<sup>1</sup>







When I grow up,  
I want to be a  
Clinical  
Cytogeneticist

**Grazie**