



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

CORSO DI LAUREA IN TECNICHE DI LABORATORIO BIOMEDICO
Presidente: Chiar.ma Prof.ssa P. Rappelli

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
Direttore: Chiar.mo Prof. A. Montella

**DALLA CITOGENETICA CLASSICA
ALLE TECNICHE PIÙ AVANZATE DI
CITOGENETICA MOLECOLARE:
UN ITER DIAGNOSTICO PER LE ANOMALIE
CROMOSOMICHE COMPLESSE**

Relatore:
CHIAR.MO PROF. A. MONTELLA

Correlatori:
DOTT.SSA F. CAMBOSU
DOTT.SSA R. SANNA

Tesi di Laurea di:
ALESSIA PIRA

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag. 1
ANOMALIE DI STRUTTURA	Pag. 2
<i>ANOMALIE BILANCIATE</i>	Pag. 3
<i>ANOMALIE SBILANCIATE</i>	Pag. 3
PICCOLI CROMOSOMI MARCATORI SOVRANNUMERARI (sSMCs)	Pag. 6
<i>CARATTERIZZAZIONE DI UN sSMC</i>	Pag. 9
CITOGENETICA POST-NATALE	Pag. 10
CITOGENETICA CONVENZIONALE	Pag. 11
CITOGENETICA MOLECOLARE	Pag. 12
<i>IBRIDAZIONE IN SITU FLUORESCENTE (FISH)</i>	Pag. 14
<i>SPECTRAL KARYOTYPING (SKY)</i>	Pag. 16
2. MATERIALI E METODI	Pag. 20
CASO CLINICO	Pag. 20
METODICHE DI LABORATORIO	Pag. 21
<i>CITOGENETICA CONVENZIONALE</i>	Pag. 21
<i>Colture di sangue periferico</i>	Pag. 21
<i>Sincronizzazione cellulare e bandeggio ad alta risoluzione</i>	Pag. 21
<i>Allestimento dei vetrini</i>	Pag. 23
<i>Colorazione in bande QFQ e analisi citogenetica</i>	Pag. 25
<i>Osservazione al microscopio</i>	Pag. 25
<i>Colorazione DA/DAPI</i>	Pag. 25
<i>CITOGENETICA MOLECOLARE</i>	Pag. 27
<i>SKY</i>	Pag. 27

<i>Pretrattamento dei vetrini con tripsina</i>	Pag. 27
<i>Denaturazione del vetrino</i>	Pag. 27
<i>Denaturazione della sonda</i>	Pag. 28
<i>Lavaggi post ibridazione</i>	Pag. 28
<i>Osservazione al microscopio</i>	Pag. 29
<i>FISH</i>	Pag. 29
<i>Pretrattamento dei vetrini</i>	Pag. 29
<i>Allestimento della FISH</i>	Pag. 30
<i>Lavaggi post ibridazione</i>	Pag. 31
<i>Osservazione al microscopio</i>	Pag. 32
3. RISULTATI	Pag. 33
CITOGENETICA STANDARD	Pag. 33
CITOGENETICA MOLECOLARE	Pag. 35
4. DISCUSSIONE	Pag. 33
5. CONCLUSIONI	Pag. 38
GLOSSARIO	Pag. 42
BIBLIOGRAFIA	Pag. 43

INTRODUZIONE

L'analisi citogenetica, detta anche cromosomica o del cariotipo, è la branca della genetica umana che studia l'assetto cromosomico degli individui valutando sia il numero che la struttura dei cromosomi.

L'analisi cromosomica costituzionale è volta a valutare l'assetto cromosomico che si stabilisce al momento del concepimento o nelle prime divisioni dell'ovulo fecondato, mentre l'analisi cromosomica eseguita su diversi tessuti tumorali è volta a valutare le modificazioni dell'assetto cromosomico che accompagnano la nascita e l'evoluzione di diverse neoplasie.

L'analisi cromosomica costituzionale può essere eseguita in diverse epoche della vita di un individuo.

- Epoca prenatale: l'analisi può essere eseguita su cellule provenienti da liquido amniotico o da villi coriali, con prelievo eseguito in età gestazionali diverse e consente di valutare se l'assetto cromosomico del nascituro è alterato nel numero o nella struttura;
- Epoca post-natale: l'analisi può essere eseguita in individui nati vivi su diversi tessuti quali linfociti da sangue periferico, fibroblasti da biopsia cutanea, cellule della mucosa orale, o su nati morti o aborti utilizzando in questi casi cellule provenienti dalla placenta o da biopsie di vari organi

Il cariotipo umano normale è costituito da 46 cromosomi, 22 coppie di autosomi e 2 cromosomi sessuali (due X per la femmina e XY per il maschio).

Le anomalie cromosomiche si distinguono in anomalie di numero, in cui il corredo cromosomico risulta essere in eccesso o in difetto rispetto al numero

normale di 46, e anomalie di struttura in cui il numero totale dei cromosomi rimane generalmente inalterato ed è modificata la struttura di uno o più cromosomi. In casi rari anomalie di numero possono essere associate ad anomalie di struttura.

Nel presente lavoro di tesi, dopo aver riportato le conoscenze essenziali nel campo della patologia cromosomica, si rivolge attenzione particolare ad alcuni aspetti tecnici che sono significativi in riferimento al ruolo del Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico in questo complesso campo della diagnostica di laboratorio.

ANOMALIE DI NUMERO

Attraverso l'applicazione rigorosa di specifiche metodiche di laboratorio, si giunge alla diagnosi delle anomalie di seguito descritte.

Si parla di anomalia di numero nei casi in cui il corredo cromosomico è in eccesso o in difetto rispetto al normale numero di 46. Le anomalie numeriche comportano variazioni di numero che possono interessare interi set aploidi (Poliploidie) o singoli cromosomi (Aneuploidie).

Le poliploidie comprendono: triploidia (69 cromosomi) frequente in aborti spontanei e raramente riscontrata in nati vivi ma con letalità precoce; tetraploidia (92 cromosomi) sempre letale.

Le aneuploidie comprendono:

- a) le monosomie, tutte letali in utero fatta eccezione per la monosomia X (cariotipo 45,X) che identifica la sindrome di Turner. Quest'anomalia cromosomica è caratterizzata da un tasso di abortività spontanea nel primo trimestre di gravidanza paria circa il 90%;

- b) Le trisomie, per lo più incompatibili con la vita extrauterina. Le uniche aneuploidie degli autosomi osservabili in nati vivi sono: la trisomia 21 (Sindrome di Down) la trisomia 18 (Sindrome di Edwards) e la trisomia 13 (Sindrome di Patau). Per quanto riguarda invece i cromosomi del sesso sono osservabili il cariotipo 47,XXY (Sindrome di Klinefelter), 48,XXX, 49,XXXXY (varianti della sindrome di Klinefelter di maggiore gravità clinica), femmine con triplo X e maschi 47,XYY.

ANOMALIE DI STRUTTURA

Le anomalie di struttura non implicano un cambiamento del numero ma modificano la struttura di uno o più cromosomi e originano da rotture e successivi ricongiungimenti che si verificano per lo più durante la profase meiotica, sia maschile che femminile. A scopo pratico, si distinguono anomalie cromosomiche bilanciate e sbilanciate. Le anomalie cromosomiche bilanciate pur non modificando la quantità finale del materiale cromosomico sono rilevanti riguardo al rischio riproduttivo. Infatti esse possono causare la formazione di gameti sbilanciati con conseguente concepimento di un individuo malato. Le anomalie cromosomiche sbilanciate causano generalmente un fenotipo patologico nel soggetto portatore.

ANOMALIE BILANCIATE

Le anomalie bilanciate comprendono:

- le traslocazioni reciproche bilanciate, originate dall'evento di due rotture su due cromosomi diversi (non omologhi) seguito dallo scambio delle porzioni cromosomiche interessate alla rottura;
- le traslocazioni robertsoniane, in cui si ha la fusione di due cromosomi acrocentrici che risultano pertanto uniti per i centromeri con

conservazione delle braccia lunghe e generalmente perdita delle braccia corte, fatta salva l'evenienza della formazione di un piccolo cromosoma generalmente bisatellitato costituito per l'appunto dalle braccia corte dei cromosomi coinvolti nella traslocazione robertsoniana

- le inserzioni, che derivano dalla traslocazione, non reciproca, di un tratto cromosomico all'interno di un cromosoma non omologo da cui si originano un cromosoma con un segmento aggiuntivo e uno con una delezione generalmente interstiziale;
- le inversioni, che originano da due rotture in un cromosoma e successiva rotazione di 180° del segmento cromosomico tra esse compreso. L'inversione può essere pericentrica o paracentrica a seconda che coinvolga o meno il centromero.

ANOMALIE SBILANCIATE

Le anomalie sbilanciate, nelle quali si ha perdita o acquisto di materiale genetico, comprendono:

- le delezioni, originate da distacco e perdita di un segmento cromosomico che può essere terminale a seguito di una rottura, o interstiziale, a seguito di due rotture;
- le duplicazioni, causate da ripetizione, diretta o invertita, di un segmento cromosomico;
- i cromosomi ad anello (*ring*) dovuti alla circolarizzazione di un cromosoma o di un segmento cromosomico a seguito, generalmente, di una duplice rottura (sul braccio corto e sul braccio lungo di un cromosoma), con perdita dei due frammenti terminali privi di

centromero e fusione delle due estremità del cromosoma delemo contenente il centromero [1].

- Gli isocromosomi, formati da due braccia identiche (corte o lunghe) derivati da una divisione trasversale anziché longitudinale del centromero, che si verifica all'anafase 2 della meiosi o nel corso delle divisioni mitotiche post-zigotiche [2]
- I cromosomi marcatori (*markers o mar*), piccoli cromosomi soprannumerari non identificati, dotati di centromero, che non sempre hanno un significato patologico.

PICCOLI CROMOSOMI MARCATORI SOVRANNUMERARI (sSMCs)

I piccoli cromosomi marcatori soprannumerari (supernumerary small marker chromosomes o sSMCs anche noti come extra structurally abnormal chromosomes ESACs) sono un gruppo eterogeneo di cromosomi strutturalmente anormali, generalmente di dimensioni uguali o inferiori a quelle di un cromosoma n°20. Essi possono assumere diverse forme: piccolissimi cromosomi, cromosomi doppi invertiti (invdup), e cromosomi ad anello (ring).

La denominazione di questi cromosomi come “markers”, o marcatori (mar), deriva dal fatto che con la citogenetica classica la loro derivazione rimaneva per lo più sconosciuta, tuttavia continua ad essere mantenuta anche oggi che la citogenetica molecolare consente nella maggior parte dei casi la loro identificazione.

Secondo dati di letteratura gli sSMC sono riportati nello 0.044% dei neonati e nello 0.075% dei casi prenatali, nello 0.288% dei pazienti con ritardo mentale e nel 0.125% di individui sub-fertili [3].

Nel 70-80% dei casi essi derivano da un cromosoma acrocentrico, prevalentemente il cromosoma 15, per duplicazione invertita (invdup) [2]. Le duplicazioni invertite si formano in seguito ad uno scambio ad U, durante il crossing-over tra cromosomi omologhi [4]. Si tratta dello stesso meccanismo da cui originano gli isocromosomi sia nelle cellule somatiche che nelle germinali.

Il 13% dei marcatori è rappresentato da cromosomi neocentrici nei quali la funzione di centromero è esercitata da strutture prive di sequenze alfoidi, tipiche del centromero. Tali neocentromeri originano da siti già presenti nel cromosoma ma senza la funzione di centromero. [5]. Il meccanismo di origine è basato su uno scambio ad U come per gli invdup.

Un'altra categoria di cromosomi marcatori è rappresentata dai ring soprannumerari (sSRC) la cui origine può essere legata alla delezione di parte del cromosoma in corrispondenza di entrambe le braccia con formazione di due frammenti acentrici che si perdono e ricongiunzione delle estremità libere che danno origine al ring. Le correlazioni cariotipo-fenotipo nel caso di riscontro nel cariotipo di un cromosoma ad anello sono legate alla presenza o meno nel ring di sequenze attivamente trascritte, cioè di porzioni più o meno estese del braccio corto e/o del braccio lungo del cromosoma da cui origina il ring. In generale la presenza di cromosomi ad anello soprannumerari implica un rischio di ritardo psicomotorio pari al 60%. [2].

Gli sSMC possono rappresentare un problema nella citogenetica clinica in quanto:

- Spesso sono troppo piccoli perché si possa caratterizzare la loro origine cromosomica con le convenzionali tecniche di colorazione e di bandeggio, per cui è necessario l'ausilio di tecniche di citogenetica molecolare, peraltro non sempre risolutive, per la loro definizione.
- In un gran numero di casi rappresentano un riscontro casuale nel corso di analisi citogenetica eseguita senza indicazione specifica, per esempio nel corso di indagini di controllo per l'accesso a procedure di fecondazione assistita.
- Anche in pazienti sintomatici, per la maggior parte dei casi gli sSMC non sono correlati con specifiche sindromi cliniche. Infatti, nonostante l'ampia varietà di origine, dimensione e struttura degli sSMCs sinora descritti solo un terzo circa dei casi correla con quadri clinici specifici, quali la sindrome da isocromosoma per le braccia corte di un n. 18, i(18p); la sindrome da derivative(22), der(22), o sindrome di Emanuel; la sindrome da isocromosoma per le braccia corte di un n. 12, i(12p), o sindrome di Pallister Killian la sindrome da duplicazione invertita di un

n. 22, invdup(22), o sindrome dell'occhio di gatto (Cat eye syndrome); Nella maggior parte dei casi rappresentano un reperto inatteso, difficilmente correlabile con la clinica del paziente .[6 Liehr T et al 2004 ,7 Starke H et al 2003, 8 Liehr T et al 2010].

- possono creare problemi legati a disordini genomici, quali la disomia uniparentale.

La maggior parte dei casi di sSMC sono sporadici, tuttavia sono descritti anche casi familiari [6]; nella maggior parte di questi, generalmente identificati in corso di diagnosi prenatale, non vi è un aumento del rischio di anomalie fetali se il genitore identificato come portatore della stessa anomalia risulta fenotipicamente normale.

Grossi problemi di consulenza insorgono però quando il genitore ha l'anomalia in mosaico e il feto presenta cariotipo omogeneo. Si ritiene infatti che una frequenza del mosaicismo inferiore al 35% non abbia conseguenze cliniche, sebbene sia importante valutare i singoli casi in funzione della derivazione del sSMC.

Quando per la definizione del sSMCs si utilizzano metodi di studio di citogenetica molecolare, che offrono la possibilità di analizzare non solo le metafasi ma anche un gran numero di nuclei interfasicci, si può riscontrare un mosaico più complesso rispetto a quello inizialmente evidenziato dalla citogenetica convenzionale.

Gran parte degli sSMCs sono instabili e tendono a riarrangiarsi o a ridursi di dimensione o a perdersi nel corso delle divisioni cellulari durante l'evoluzione del cariotipo e come conseguenza si può riscontrare:

- Nel caso di cromosomi ad anello, la formazione di un ring doppio o triplo;

- Un ulteriore riarrangiamento dello stesso piccolo cromosoma in una sub-popolazione di cellule;
- La formazione di differenti varianti e di un mosaico complesso;
- La scomparsa dei cromosomi marcatori in alcuni tessuti e la persistenza in altri come accade, ad esempio, nel caso del iso(9p), che dopo la nascita si riscontra nel sangue periferico ma non nei fibroblasti e del iso(12p) che al contrario è presente soltanto nei fibroblasti.

CARATTERIZZAZIONE DI UN sSMC

Secondo le “Linee Guida per la Diagnostica Citogenetica 2013 - Sezione Note Operative” della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) [9, 10], quando all’analisi del cariotipo viene riscontrato un sSMC è necessario (Fig. 1):

1. caratterizzarne morfologia e struttura con le tecniche di bandeggio e con colorazioni differenziali che possano indirizzare le eventuali analisi di FISH successive. Nell’accertamento di un’ipotetica origine familiare, è importante richiedere un campione di sangue dei genitori in eparina, per l’allestimento l’esame del cariotipo e un campione di sangue in EDTA per l’estrazione del DNA per eventuali studi di Disomia Uniparentale (UPD)
2. Identificarne l’origine con analisi di ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) con opportune sonde, seguendo uno schema (di seguito riportato) che considera situazioni diverse:
 - Riscontro di un cariotipo 46,X,+mar o di un mosaico 45,X/46,X,+mar. A questo punto con la FISH è necessario identificare l’eventuale origine cromosomica del marker da uno dei cromosomi sessuali (X o Y);

- Riscontro di un cariotipo 47,+mar o di un mosaico 47,+mar/46,XX o XY. In questo caso è necessario un comportamento diverso a seconda che il marcatore sia dotato o meno di satelliti e quindi valutare che origini da un acrocentrico (13, 14, 15, 21 o 22) o diversamente, se non è satellitato, valutare se si è in presenza di un ring o di un isocromosoma.

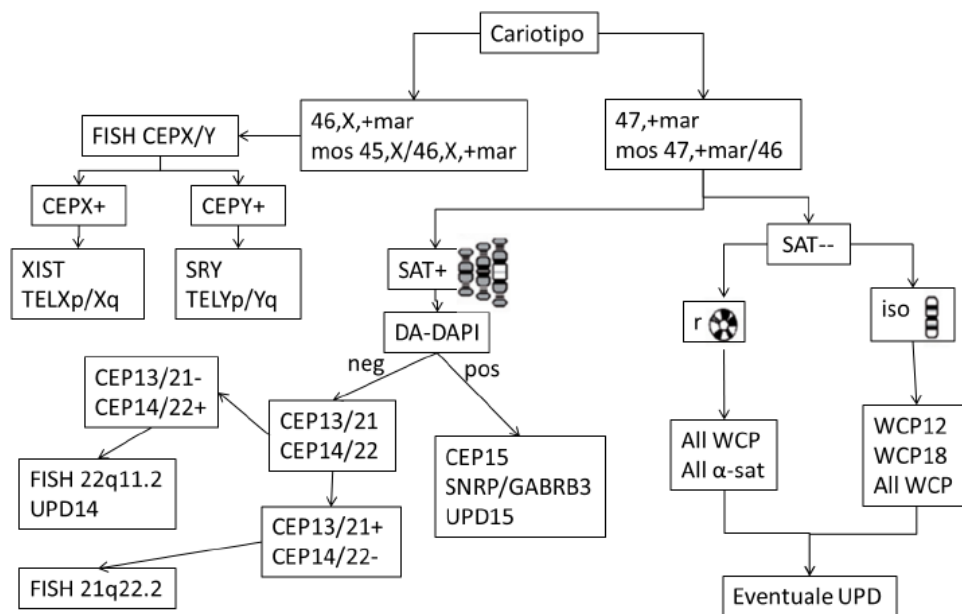


Fig. 1: Schema riassuntivo per la corretta caratterizzazione di un sSMC/ESAC [10]

3. Se il cromosoma marcatore origina dai cromosomi 7, 11, 14, 15 è necessario valutare la presenza di UPD;
4. se il *mar* viene riscontrato in almeno il 30% delle cellule, è preferibile, invece, eseguire un'analisi microarray. [10]

CITOGENETICA POST-NATALE

La citogenetica post-natale comprende analisi cromosomiche eseguite su soggetti nati vivi e nati morti (compresi gli aborti) ed è indicata in [9]:

- Presenza di una sospetta sindrome cromosomica
- Presenza di difetti congeniti e/o ritardo mentale
- Presenza di ritardo di accrescimento
- Soggetti con sospetto clinico di sindrome da microdelezione/microduplicazione
- Soggetti con sospetto di sindrome da instabilità cromosomica
- Soggetti con genitali ambigui
- Genitori o familiari di un soggetto con anomalie cromosomiche
- Genitori di soggetti malformati o con sospetta sindrome cromosomica, deceduti senza diagnosi
- Genitori con feto portatore di un riarrangiamento cromosomico
- Coppie con poliabortività
- Coppie con infertilità a causa non nota
- Femmine con amenorrea primaria, secondaria, o menopausa precoce
- Femmine con malattie recessive legate all' X
- Decessi perinatali in presenza di dimorfismi o malformazioni
- Prodotti da aborti spontanei

CITOGENETICA CONVENZIONALE

L'analisi del cariotipo prevede l'allestimento di colture cellulari e di preparati cromosomici da cellule bloccate in metafase, che è la fase del ciclo cellulare nella quale i cromosomi si presentano come strutture ben definite e facilmente individuabili. Segue la colorazione con sostanze che si legano selettivamente a determinate regioni cromosomiche dando il caratteristico aspetto a bande (G, Q, R in base al tipo di colorazione e di pretrattamenti utilizzati).

- BANDE G: con pretrattamento con tripsina è uno dei bandeggi più largamente utilizzati. Consiste nel trattare i cromosomi con un enzima proteolitico, la tripsina, che somministrata per un tempo limitato digerisce le proteine istoniche. In seguito si immergono i vetrini in una soluzione di Giemsa, una miscela di coloranti che consentono la visualizzazione delle bande cosiddette G. Le bande G positive corrispondono ad eterocromatina dispersa ricca di A-T (Adenina-Timina). [11]
- BANDE Q: prevede l'uso di un colorante fluorescente Chinacrina (Quinacrine moustard), che lega prevalentemente le coppie A-T del DNA distribuite in modo non uniforme lungo il cromosoma, il risultato è analogo al bandeggio G e fornisce una colorazione selettiva per le regioni eterocromatiche dei cromosomi 1, 9,16 e braccio lungo del cromosoma Y. Lo svantaggio di questa tecnica deriva dal fatto che la fluorescenza decade rapidamente e quindi il bandeggio è temporaneo [11]
- BANDE R: i cromosomi vengono denaturati ad alte temperature ($\leq 85^{\circ}\text{C}$) in una soluzione salina o altre soluzioni denaturanti e poi vengono colorati con Giemsa. Le coppie A-T si denaturano più facilmente rispetto alle C-G (Citosina-Guanina) in quanto legate da 2 legami idrogeno (e non 3 come le coppie C-G) ciò consente di evidenziare le regioni ricche di C-G. Per questo motivo le bande R sono il negativo delle bande G (Reverse G bands)

La fase successiva comprende l'osservazione al microscopio: i cromosomi vengono contati, analizzati e fotografati. Dalle fotografie i cromosomi vengono poi appaiati a due a due in base alle dimensioni, alla posizione del centromero e al bandeggio. Il centromero divide il cromosoma in 2 braccia:

braccio corto (p). e braccio lungo (q) Il rapporto tra q/p è definito “indice brachiale” mentre il rapporto tra il braccio p e la lunghezza dell'intero cromosoma è definito “indice centromerico”. La lunghezza dei cromosomi decresce progressivamente passando dalla coppia 1 alla 22 (fanno eccezione la coppia 21 e 22 dove l'ordine di grandezza è invertito). Considerando la posizione del centromero è possibile distinguere 4 classi di cromosomi:

- METACENTRICI: con centromero a metà del cromosoma e braccia p e q della stessa lunghezza comprendono i cromosomi 1, 3, 16, 19, 20;
- SUBMETACENTRICI: con centromero più prossimale ad una delle estremità e braccia superiori (p) più piccole rispetto a quelli inferiori (q);
- ACROCENTRICI: con centromero all'estremità sub-terminale, braccia superiori forniti di satelliti (cromosomi 13, 14, 15, 21, 22);
- TELOCENTRICI: con centromero terminale per cui il cromosoma è costituito solo da un paio di bracci. Questi non fanno parte del cariotipo umano normale. [11].

L'analisi citogenetica convenzionale ha un limite di risoluzione 5-10 Mb (risoluzione media bandeggio ≤ 550 bande e 4-8 Mb) per cui ha difficoltà a distinguere tra di loro tratti cromosomici molto vicini o molto simili per colorazione. Questi limiti oggi sono in gran parte superati dall' utilizzo di tecniche di citogenetica molecolare.

CITOGNETICA MOLECOLARE

Le tecniche di citogenetica molecolare si basano sulla capacità delle sequenze nucleotidiche di riconoscere le sequenze complementari e di legarsi ad esse formando molecole *ibride*. I primi esperimenti risalgono al 1969, sono stati condotti su sequenze geniche ribosomiali e utilizzavano come sonde isotopi

radioattivi. Il metodo di rilevazione dell'avvenuta ibridazione era l'autoradiografia. Oggi si è passati all'utilizzo di metodiche di ibridazione che si basano sulla fluorescenza e metodi enzimatici, molto più rapide, sensibili, specifiche rispetto alle precedenti. [11]. Grazie alle tecniche di citogenetica molecolare è possibile diagnosticare anomalie strutturali quantitative dei cromosomi di piccolissime dimensioni, fino a 3,5-100 kb, associate spesso a sindromi costituzionali con disabilità e anomalie fenotipiche multiple. Sono tecniche di citogenetica molecolare l'ibridazione in situ fluorescente (FISH) e l'arrayCGH (Comparative Genomic Hybridization) [2].

IBRIDAZIONE IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

L'ibridazione in situ è una tecnica che si basa sulla capacità delle sequenze nucleotidiche di legarsi reversibilmente a sequenze ad esso complementari, dando origine a molecole ibride, questo fenomeno è reso possibile dalla capacità che hanno le molecole nucleotidiche di denaturarsi e rinaturarsi in condizioni apposite.

Con il termine *in situ* ci si riferisce al fatto che la tecnica permette di visualizzare il frammento di DNA d'interesse nella sua "sede naturale," preservando la struttura cromosomica del preparato è quindi possibile localizzare visivamente un gene o una qualsiasi sequenza genomica d'interesse, sia su cromosomi metafasici che su nuclei in interfase. In quest'ultimo caso è possibile analizzare anche tipi di cellule che difficilmente vanno incontro a divisione cellulare o incluse in paraffina e, come tali, non più coltivabili in vitro.

Le sequenze nucleotidiche che si legano al preparato cromosomico su vetrino sono costituite da DNA di una sonda molecolare nota che subisce un processo

di “marcatura”, la quale spesso si avvale di un sistema enzimatico che funziona come un “taglia e cuci” (Nick-translation) attraverso il quale DNA della sonda viene “tagliato” dall’enzima DNAsi e “ricucito” dall’enzima DNA polimerasi, in presenza, di un nucleotide direttamente fluorescente o di uno specifico nucleotide contenente una molecola reporter (aptene), come la biotina (o digoxigenina), che sarà poi riconosciuta da uno specifico anticorpo fluorescente, per esempio antibiotina (avidina).[2] Le sonde di DNA utilizzate su preparati cromosomici possono essere:

- SONDE ALFOIDI, costituite da brevi sequenze di DNA ripetute in tandem (alfa-satellite), specifiche per le regioni centromeriche. Tali sonde generano un segnale intenso sia in cromosomi in metafase che in nuclei interfasic;
- SONDE PER PAINTING, costituite da DNA proveniente da ciascun cromosoma. I cromosomi vengono isolati tramite la citometria di flusso, oppure da ibridi di cellule somatiche contenenti un solo cromosoma umano. Le sonde hanno la funzione di “dipingere per intero il cromosoma”, di qui il nome di painting;
- SONDE LOCUS SPECIFICHE, di dimensioni variabili da meno di una chilo base (kb) a più di una mega-base (Mb), utili per evidenziare aberrazioni che coinvolgono un gene o parte di esso. Sono ottenute mediante clonaggio di segmenti di DNA contenenti il gene in esame in fagi o YAC (Yeast Artificial Chromosomes), oppure amplificando il DNA con la PCR.
- SONDE TELOMERICHE, utili nell’identificazione di riarrangiamenti che coinvolgono i telomeri [11].

Per la definizione di anomalie cromosomiche complesse o la presenza di piccoli marcatori soprannumerari, come quella descritta in questa tesi, può

essere necessario ricorrere, oltre alla citogenetica convenzionale, a più sonde di citogenetica molecolare ma anche alla spectral karyotyping (SKY).

SPECTRAL KARYOTYPING (SKY)

Questa tecnica, ideata da Schrock nel 1996, nasce dall'applicazione alla citogenetica della Spectral imaging (combinazione di imaging e spettroscopia). Essa si basa sull'analisi di FISH e consente, con un singolo esperimento, la simultanea identificazione di ciascuna coppia di cromosomi in metafase in 24 colori differenti. Il colore dei cromosomi è dato dalla combinazione di sonde painting cromosoma specifiche marcate con vari fluorocromi (ottenute tramite Polymerase Chain Reaction da cromosomi isolati con citometria a flusso).

Dalla combinazione di almeno un paio di fluorocromi tra cinque tipi diversi (Rodamina, Texas Red, Cy5, FITC, Cy5.5 - Fig:2 Tab I) si può ottenere un nuovo colore, le diverse miscele fanno in modo che ogni cromosoma, dopo ibridazione, abbia un colore proprio. Le fluorescenze vengono esaminate da un interferometro, anziché con l'interposizione dei filtri ottici specifici per i singoli fluorocromi. L'interferometro (strumento che consente di evidenziare le figure che risultano dalla composizione delle onde) determina lo spettro della lunghezza d'onda per ogni pixel (regione) dell'immagine assegnando la stessa classificazione di colore a tutti i pixel che hanno lo stesso spettro (si ottiene una immagine con i cromosomi "classificati" per colore (Fig. 3). La conversione degli spettri di emissione in immagine visualizzata è raggiunta con l'assegnazione dei colori (verde, rosso e blu) a specifici spettri. Quindi a spettri uguali viene assegnato lo stesso pseudocolore. In questo modo con un minimo di 5 fluorocromi con differente lunghezza d'onda non sovrapponibile è possibile ottenere 2ⁿ colori differenti, uno per ogni coppia di cromosomi (22

autosomi e 2 cromosomi sessuali) [13, 14, 15]. Questa tecnica consente quindi, con un approccio rapido e non ambiguo, di determinare la presenza e l'origine di:

- Cromosomi in eccesso e in difetto
- Traslocazioni cromosomiche complesse
- Cromosomi marcatori
- Riarrangiamenti criptici
- Inserzioni di materiale cromosomico in un altro cromosoma.

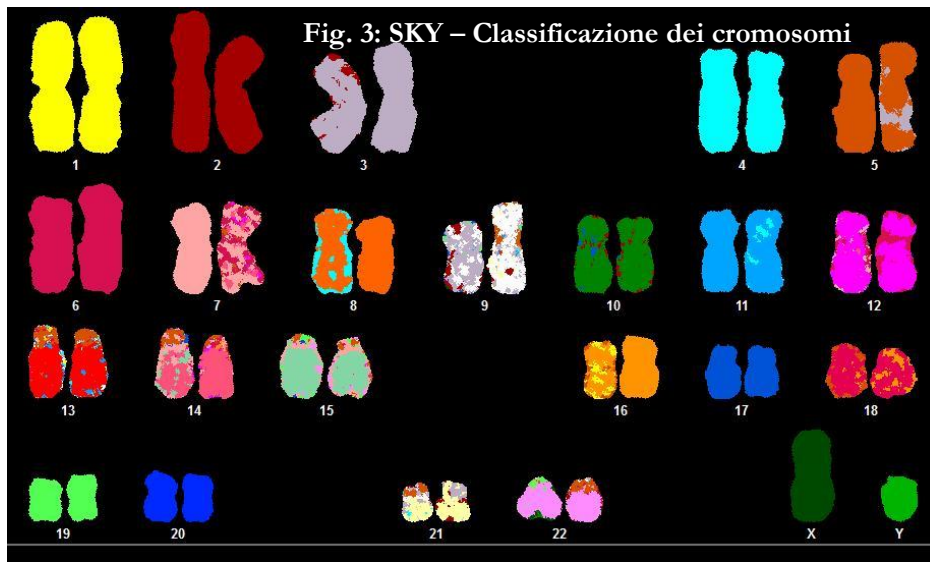
Tuttavia questa metodica presenta delle limitazioni in quanto, non è possibile evidenziare i riarrangiamenti intracromosomici (inversioni, delezioni o duplicazioni) perché mostrano il cromosoma ha un unico colore, nè le anomalie che riguardano il braccio corto degli acrocentrici e le regioni cromosomiche ricche di DNA altamente ripetitivo (es.: le regioni Q-positive). Il limite di risoluzione della metodica è di 1-2 Mb e non possono essere rilevate anomalie strutturali inferiori a 1 banda. [11, 14]

Combinatorial Table										
Name	A	B	C	D	E	F	G	H	Color	Comment
1		✓	✓	✓					Yellow	
2					✓				Red	
3	✓		✓	✓	✓				Cyan	
4		✓	✓	✓					Magenta	
5	✓	✓	✓	✓					Orange	
6		✓	✓	✓	✓				Green	
7	✓	✓							Blue	
8				✓					White	
9	✓		✓	✓					Black	
10		✓	✓	✓					Dark Green	
11	✓		✓	✓					Light Blue	
12		✓		✓	✓				Pink	
13	✓	✓		✓					Red	
14		✓							Light Green	
15	✓	✓	✓						Light Blue	
16		✓	✓						Orange	
17			✓						Blue	
18	✓	✓	✓	✓					Red	
19	✓		✓	✓					Light Green	
20	✓								Blue	
21				✓	✓				Yellow	
22	✓	✓	✓	✓	✓				Pink	
X	✓		✓	✓	✓				Dark Green	
Y			✓	✓	✓				Dark Green	

Label	Abs. (nm)	Em. (nm)
A-Rodhamine	550	570
B-Texas Red	596	620
C-Cy5	650	670
D-FITC	495	525
E-Cy5.5	675	694

Tab. I: Fluorocromi relative lunghezze d'onda

Fig. 2: SKY – combinazione di fluorocromi e classificazione dei colori



Lo studio presentato in questa tesi è stato eseguito su una paziente proveniente dall'Istituto di Neuro-Psichiatria Infantile dell'AOU di Sassari, con l'indicazione di Ritardo Psicomotorio.

Tutte le attività descritte sono state messe a punto e vengono utilizzate di routine nel Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Sassari, Unità Operativa di Genetica Clinica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Sassari.

Si ringrazia tutto il personale dell'U.O. di Genetica Clinica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Sassari, in particolare del Laboratorio di Citogenetica Convenzionale e Molecolare.

MATERIALI E METODI

CASO CLINICO

PAZIENTE

Bambina figlia di genitori non consanguinei, nata il 23/03/2014 da gravidanza normo-decorsa con parto spontaneo alla 39^a settimana gestazionale.

Giunta alla nostra osservazione all'età di 16 mesi con un peso di 10 Kg, altezza di 77 cm e circonferenza cranica di 43 cm. L'analisi cromosomica veniva richiesta nel corso di accertamenti in paziente con ritardo psicomotorio, alterazione dell'esame neurologico e dismorfismi.

All'esame obiettivo la bambina mostrava fenotipo chiaro con presenza di macchie ipercromiche (una su un fianco e una su un braccio) e un angioma piano nucale, dismorfismi facciali, asimmetria del tono, motilità caotica e afinalistica.

Al momento della richiesta la paziente non aveva ancora acquisito il completo controllo del tronco né la deambulazione autonoma, non aveva mai gattonato. Era capace di vocalizzare e gorgheggiare.

Sulla paziente in esame sono state eseguite analisi cromosomiche convenzionale e di citogenetica molecolare (SKY e FISH).

Sui genitori sono state eseguite analisi di cromosomiche di routine (cariotipo costituzionale)

METODICHE DI LABORATORIO

Nell'esecuzione dei vari stadi dell'analisi citogenetica il tecnico di laboratorio svolge un ruolo importante in quanto direttamente coinvolto nelle fasi di gestione dell'intero processo del campione.

CITOGNETICA CONVENZIONALE

Coltura di sangue periferico

L'evidenziazione dei cromosomi è realizzabile mediante la messa in coltura del campione di sangue periferico. Presso il laboratorio dell'U.O di Genetica Clinica dell'AOU di Sassari il terreno di coltura di routine utilizzato è il Chromosome medium P (Celbio Euroclone) che, essendo pronto all'uso, non necessita dell'aggiunta degli antibiotici (penicillina e streptomina) e della fitoemoagglutinina (una mucoproteina estratta da *Phaseolus vulgaris*, che induce la blastizzazione dei linfociti T attraverso la stimolazione del fattore di crescita interleuchina 2) [11].

A 8 ml di terreno viene aggiunto 1 ml di campione e messo ad incubare a 37°C per 72 ore in atmosfera satura di umidità e addizionata di CO₂ al 5%.

Sincronizzazione cellulare e bandeggio ad alta risoluzione

Oltre la normale coltura a 72 ore si allestisce anche una coltura sincronizzata, (cosiddetta in Synchro) con lo scopo di ottenere un maggior numero di mitosi e cromosomi più allungati. L'introduzione di questa metodica consente di evidenziare, in cromosomi profasici o prometafasici, un numero di bande per set aploide compreso tra 400 e 850.

Rispetto alle tecniche usuali, questa tecnica può consentire di identificare anomalie strutturali non identificabili altrimenti, ad esempio microdelezioni, o di definire più finemente i punti di rottura in riarrangiamenti già identificati con le tecniche standard.

Per ottenere cromosomi allungati e disporre di un alto indice mitotico, è necessario *sincronizzare* la crescita delle cellule ed arrestarle in profase-prometafase. I tempi di esposizione alla colchicina devono poi essere molto brevi. Si utilizza una soluzione di *blocco*, contenente Fluorodeossiuridina, antagonista della timidilato sintetasi, che converte la Deossiuridina monofosfato in Deossitimidina monofosfato arrestando così il ciclo cellulare. Successivamente si passa alla soluzione di *sblocco*, ricca di timidina, che determina la ripresa del ciclo cellulare. Con questa tecnica le cellule vengono “sincronizzate”, entrano in mitosi quasi contemporaneamente e mostrano quindi cromosomi di dimensioni simili. Si assiste ad un aumento del numero delle bande visibili e di conseguenza ad una migliore risoluzione per l’analisi cromosomica. [12]

Trascorso il periodo di incubazione, alla coltura viene aggiunta una sostanza che previene la formazione del fuso arrestando le cellule in mitosi: il Colcemid (sostanza correlata alla colchicina ma meno tossica, ha la funzione di inibire l’assemblaggio dei microtubuli e promuovere la depolimerizzazione di quelli preesistenti). Dopo circa un’ora di incubazione a 37°C, il campione viene processato secondo la seguente metodica:

- Raccolta delle cellule mediante centrifugazione a 1800 rpm per 5 minuti
- Trattamento con soluzione ipotonica KCl 0,56% per 15 minuti a temperatura ambiente per lo spostamento dei cromosomi dal centro alla periferia della cellula;

- Centrifugazione a 1800 rpm per 5 minuti ed eliminazione del surnatante
- Trattamento con acido acetico al 5% per lisare le emazie e lavorare così su un sedimento costituito da soli linfociti;
- Centrifugazione a 1800 rpm per 5 minuti ed eliminazione del surnatante
- Trattamento con fissativo etanolo/acido acetico 3:1
- Ripetizione dell'ultimo passaggio fino all'ottenimento di un pellet biancastro

I passaggi in fissativo servono per conservare la struttura dei cromosomi ed allentare i legami alla rete nucleo-citoscheletrica favorendo così l'apertura di questi nelle piastre metafasiche.

Allestimento del vetrino

Il pellet, ottenuto alla fine del processo, viene sospeso in fissativo etanolo/metanolo e acido acetico. Due-tre gocce della sospensione cellulare vengono fatte cadere da un'altezza di 1-2 cm al centro del vetrino precedentemente pulito e sgrassato. L'espansione della goccia viene assecondata muovendo delicatamente il vetrino. L'alcool inizia ad evaporare prima dell'acido acetico permettendo, ad un certo punto, a quest'ultimo di entrare a contatto con l'acqua presente nell'umidità atmosferica. L'acido acetico, quindi, libera ioni H^+ che, aggredendo le proteine del citoplasma e dei cromosomi, rompono i legami salini e idrogeno responsabili della loro struttura terziaria e quaternaria. L'acqua penetra negli spazi inter-catena ed interagisce con i gruppi polari, ora esposti, delle catene polipeptidiche,

provocandone un ulteriore allontanamento. Questo effetto si manifesta macroscopicamente con il:

- Rigonfiamento delle proteine citoplasmatiche che spostano i cromosomi, allontanandoli gli uni dagli altri, dando vita al fenomeno dello *Spreading* ;
- Rigonfiamento delle proteine dei cromosomi i quali si allungano e danno vita, lungo il loro asse, a zone più o meno condensate che, dopo colorazione, si presenteranno come bande (*Chromosome banding*).

NB.: È essenziale tenere sotto controllo l'evaporazione del fissativo mediante il controllo della temperatura (che influisce sulla durata dell'evaporazione stessa) e dell'umidità relativa al fine di allestire preparati cromosomici di buona qualità.

Quando il fissativo è evaporato, il vetrino viene asciugato agitandolo vicino alla fiamma del becco Bunsen, quindi viene osservato al microscopio in contrasto di fase. In base a questa osservazione la densità cellulare, se non è ottimale, viene aggiustata concentrando o diluendo la sospensione cellulare utilizzata per lo striscio e la qualità può essere migliorata ripetendo i passaggi in fissativo.

I vetrini utilizzati per la FISH, allestiti secondo la metodica descritta, vengono inondati, dopo la completa espansione della goccia, con pochi ml di una miscela di metanolo/acido acetico nel rapporto di 4:1. Questo passaggio addizionale consente di eliminare eventuali residui di citoplasma che, sul vetrino ibridato e successivamente rilevato con fluorocromi, possono dar luogo a una fluorescenza aspecifica che costituisce, nella fase di osservazione, un fastidioso “rumore di fondo”.

Colorazione in bande Q (QFQ)

Dopo almeno 24 ore dall'allestimento il vetrino viene colorato in una soluzione di mostarda di chinacrina (Quinacrine moustard) alla concentrazione dello 0,005% in tampone fosfato 0,068 M a pH 6,8 per 25 minuti, quindi lavato e montato nel medesimo tampone con vetrino coprioggetto saldato lungo i margini con smalto per unghie.

Osservazione al microscopio

L'osservazione viene effettuata su fotomicroscopio BX 41 o BX61 Olympus, utilizzando il filtro per la chinacrina.

Dopo avere eseguito l'analisi su 15-20 metafasi, come avviene di routine, viene eseguito l'allestimento del kariogramma servendosi del software in dotazione sul microscopio (GenASIs BandView Applied Spectral Imaging). che consente l'analisi dell'immagine (dall'acquisizione al montaggio) e l'esecuzione automatica del cariotipo.

Colorazione DA/DAPI

Il DAPI (4,6-diamino-2 phenyl-indolo) è un colorante fluorescente con affinità per le basi A-T del DNA, così come l'antibiotico dystamycina A (DA). La colorazione DA/DAPI è una colorazione elettiva per le regioni eterocromatiche dei cromosomi 1, 9, 16, Y e per il braccio corto del cromosoma 15.

Procedimento: Vengono deposte alcune gocce di soluzione di Dystamycina A (concentrazione finale di 0.2 µg/ml concentrazione McIlvaine a pH 7) sul

vetrino in esame che viene poi coperto con un coprioggetto e lasciato a temperatura ambiente per circa 15 minuti.

Successivamente si toglie il coprioggetto e si sciacqua in tampone McIlvaine.

Si pone poi sul vetrino una goccia di DAPI (concentrazione finale di 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in acqua) si copre con un vetrino coprioggetto e si tiene al buio per circa mezz'ora. Dopo tale periodo il vetrino viene lavato con H_2O distillata e fatto asciugare al buio. Dopo aver montato i vetrini in apposito mounting antifade (prodotto commerciale), si procede all'osservazione al microscopio.

CITOGENETICA MOLECOLARE

SKY

Per l'esecuzione dell'analisi viene utilizzato il kit SKYPaint™ (GenASIs), contiene cinque provette (*Vial 1-5) ciascuna utile allo svolgimento dell'intera procedura dall'ibridazione con la miscela di sonde painting per tutti i 24 cromosomi (Vial 1) fino alla colorazione con DAPI (contro colorante per la visualizzazione dei cromosomi Vial 5).

Pretrattamento dei vetrini con Tripsina

- lavaggio in PBS 1X per 15' a temperatura ambiente,
- aggiungere 0,2-0,4 ml (200-400 µl) di Trypsin/EDTA (5g/l Trypsin e 2 gr/l EDTA) in 50 ml di PBS
- Incubare il vetrino nella soluzione per 20-40''
- Lavare in H₂O
- Disidratare attraverso una serie ascendente di alcoli:
 - Etanolo 70% 2' Temperatura Ambiente (T.A.)
 - Etanolo 85% 2' T.A.
 - Etanolo Abs. 2' T.A.
 - Asciugare all'aria (se non utilizzati immediatamente conservare a -20°C in freezer).

Questo passaggio può essere evitato se le metafasi sono pulite e non si osserva citoplasma e si può procedere direttamente alla denaturazione.

Denaturazione del vetrino

N.B: è consigliato l'utilizzo di vetrini strisciati da non più di due settimane.

- Immergere i vetrini per 1' e 30''-2' in una soluzione di Formamide al 70% in 2X SSC a pH 7,0
- Trasferire rapidamente in alcool etilico al 70% freddo per 2'(tenuto in ghiaccio) quindi disidratare nella serie crescente degli alcoli freddi (85% e Assoluto per 2' ciascuno)
- Asciugare all'aria

Denaturazione della sonda

- Prelevare dal Vial 1 del Kit 10 µl di sonda e trasferirli in nuovo tubo
- Denaturare a 80°C in bagno termostato per 7'
- Incubare a 37° per 10 (preannealing)'
- caricare i 10 µl di sonda in corrispondenza dell'area sulla quale è la sospensione cellulare
- Coprire la goccia con "coprioggetto" di vetro di [2×2 cm] e far espandere premendo delicatamente, quindi chiudere con rubber cement.
- Incubare a 37°C per 24-36 ore in Camera Umida (C.U.)

Lavaggi post ibridazione

(*) Vial 3 e 4- anticorpi specifici: rispettivamente Cy5 staining reagent e Cy5.5 staining reagent Concentrated Antibodies Detection (CAD)

- lavaggio a 72°C ± 2° in 0,4X SSC 2-5';
- lavaggio in 4X SSC addizionato di Tween 20 allo 0.1% T.A.1';
- passaggio facoltativo: sgrondare il vetrino e versarvi 80 µl di Blocking solution (Vial 2) coprire con coprioggetto di parafilm e incubare a 37°C in camera umida per 40';

- sgrondare il vetrino e versarvi 80 µl di Cy5 staining reagent (Vial 3: diluire 1:100 in 4XSSC) coprire con coprioggetto di parafilm e incubare a 37°C in camera umida per 40’;
- lavaggio in 4X SSC/Tween 20 allo 0.1% a 45°C per 2’;
- applicare 80 µl di Cy5.5 staining reagent (Vial 4: diluire 1:200 (0,5:100) in 4XSSC) coprire con coprioggetto di parafilm e incubare in camera umida per 40’;
- lavaggio in 4X SSC/Tween 20 allo 0.1% a 45°C per 2’;
- lavaggio rapido in H₂O
- montaggio del vetrino asciugato all’aria nell’apposito DAPI/Mounting 0,125 µg/ml fornito dalla ditta che colora di blu i cromosomi e rende più fluorescente l’eterocromatina.

Osservazione al microscopio

L’Osservazione dei vetrini viene eseguita utilizzando un fotomicroscopio a fluorescenza Olympus BX61, le mitosi e i nuclei interfasicci, selezionati a piccolo ingrandimento (20x), vengono osservati a maggior ingrandimento (100x) con l’obiettivo ad immersione e con l’interposizione dell’interferometro capace di leggere le diverse lunghezze d’onda emesse dalle diverse combinazioni dei fluorocromi, e un software dedicato (HiSKY spectral imaging System ASI - Applied Spectral Imaging).

FISH

Pretrattamento dei vetrini

Questo passaggio serve a minimizzare il background e ad assicurare l’adesione dei cromosomi sul vetrino. I vetrini vecchi di 1-3 giorni, oppure invecchiati su

piastra riscaldata a 60°C per 1h, vengono trattati mediante un passaggio in 2X SSC per 15' a temperatura ambiente, disidratati attraverso una serie ascendente di alcoli (da alcool etilico al 50% ad alcool etilico assoluto), quindi asciugati all'aria e utilizzati immediatamente.

Allestimento della FISH

Per gli esperimenti di FISH venivano utilizzate le sonde indicate nel seguente elenco:

- Whole Chromosome Painting (WCP) ASI (Applied Spectral Imagin) del cromosoma 1 ;
- Sonde per le regioni centromeriche del cromosoma 1: Chromosome Enumeration Probes(CEP)/alphoid probes Vysis (D1Z5) e XCE1 MetaSystems (regione sat II/III).

Di norma tutte le sonde commerciali vengono utilizzate secondo la metodica consigliata dalla ditta produttrice.

Sui vetrini vengono caricati 5 µl di sonda in corrispondenza dell'area sulla quale è stata depositata la sospensione cellulare. La goccia viene ricoperta con "coprioggetto" di vetro di [2×2 cm] e fatta espandere premendo delicatamente, quindi chiusa con rubber cement.

L'ibridazione avviene, nell'apposito dispositivo Thermobryte (Iris sample Processing) in ambiente umido creato utilizzando spugna bagnata inserita negli appositi canali; mediante co-denaturazione di sonda e vetrino per:

- 5' a 74°C e successiva incubazione a 37°C overnight (per le sonde painting WCP ASI);
- 5' a 73°C e successiva incubazione a 37°C overnight (per le sonde painting CEP Vysis);
- 2' a 75°C e successiva incubazione a 37°C overnight overnight (per le sonde XCE MetaSystems).

Lavaggi post ibridazione

I lavaggi post ibridazione applicati secondo le indicazioni della ditta produttrice e sono diversi per ciascun tipo di sonda, servono per eliminare l'eccesso di fluorescenza e quindi le sonde non appaiate. Consistono in:

1. lavaggio stringente a $72^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ in 0,4X SSC per 2'-5' (a seconda della sonda utilizzata)
2. lavaggio rapido in SSC a concentrazioni diverse e addizionato come segue:
 - a. 4X SSC addizionato di Tween 20 allo 0.1% a T.A. per 2', per i WCP ASI ;
 - b. 2X SSC Nonidet P40 allo 0.1% a T.A. per 30"-1' per le sonde Vysis;
 - c. 2X SSC Tween 20 allo 0.05% a T.A. per 30"-1', per le sonde MetaSystems;
3. lavaggio rapido in PBS 1X (facoltativo)
4. lavaggio rapido in H₂O
5. montaggio del vetrino asciugato all'aria nell'apposito DAPI/Mountig 0,125 µg/ml

N.B in tutti i processi post-ibridazione (compresi quelli della SKY) le concentrazioni ed il pH (7,00-7,5 delle soluzioni di lavaggio sono di fondamentale importanza, in quanto condizioni di bassa stringenza possono favorire legami aspecifici mentre, condizioni di stringenza troppo elevata, possono condurre alla perdita del segnale. È raccomandato inoltre, l'utilizzo di termometri calibrati per la misurazione della temperatura delle soluzioni, del bagno termostato e dell'incubatore in quanto queste temperature sono fondamentali per il raggiungimento di un risultato ottimale.

Osservazione al microscopio

Utilizzando il un microscopio a Olympus BX61 e il software dedicato (GenASIs FISHView) le mitosi e i nuclei interfasici, selezionati a piccolo ingrandimento (20x), vengono osservati a maggior ingrandimento (100x) con l'obiettivo ad immersione e l'interposizione dei filtri per RED/GREEN, FITC, TEXAS RED, ORANGE, AQUA.

RISULTATI

CITOGENETICA STANDARD

L'analisi cromosomica di routine eseguita su linfociti da sangue periferico evidenziava nella paziente un cariotipo a mosaico, costituito da due linee cellulari, una a cariotipo normale (46,XX) e una a 47 cromosomi, con la presenza di un piccolo cromosoma soprannumerario (sSMC) di dimensioni notevolmente inferiori rispetto a un n° 20. (Figg. 4, 5, 6). L'assetto cromosomico complessivo veniva così indicato: 47,XX,+mar[25]/46,XX[92]

L'analisi cromosomica condotta sui genitori evidenziava l'origine "de novo" dell'anomalia (genitori a cariotipo normale).

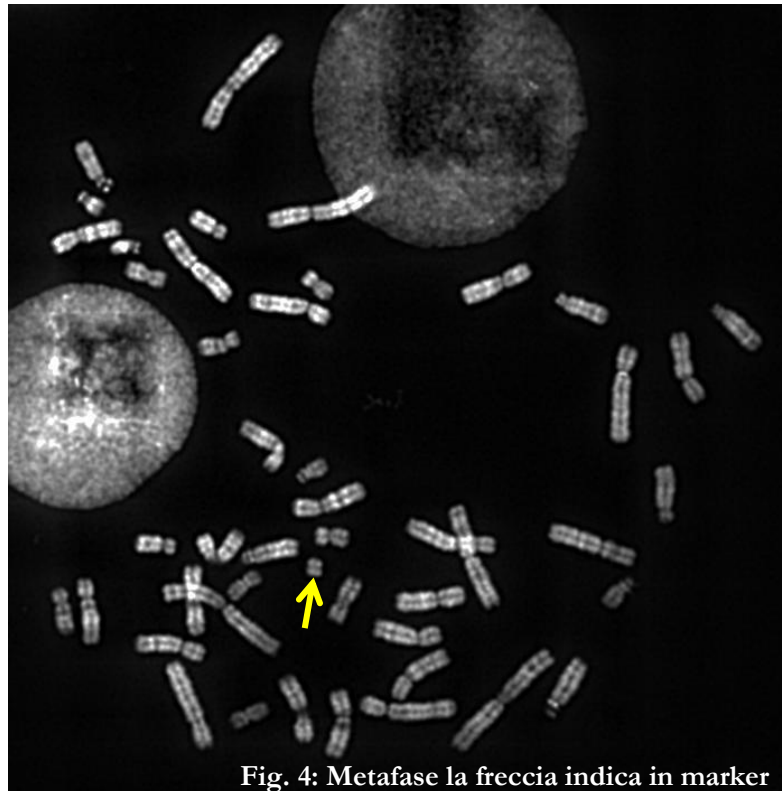
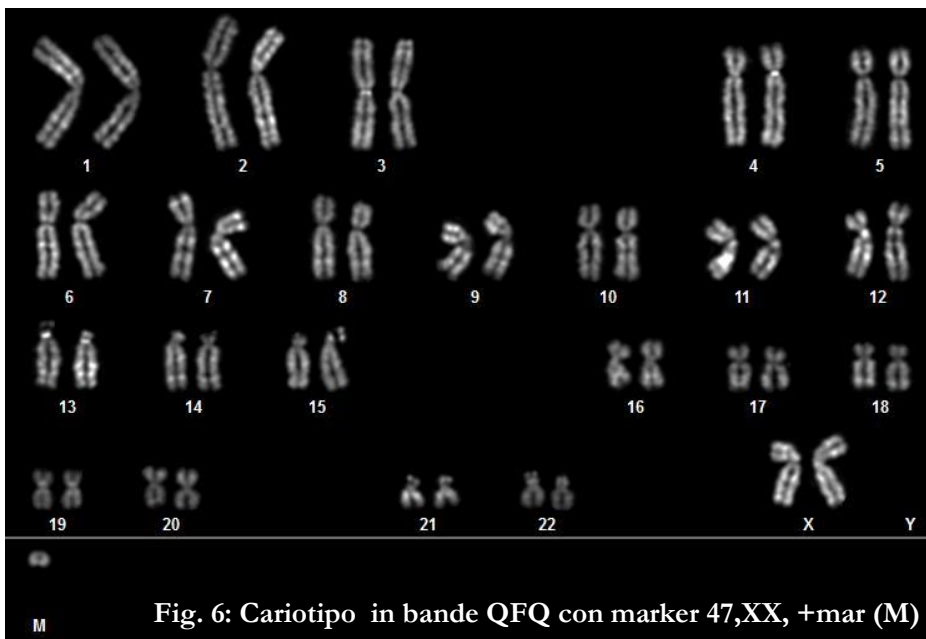
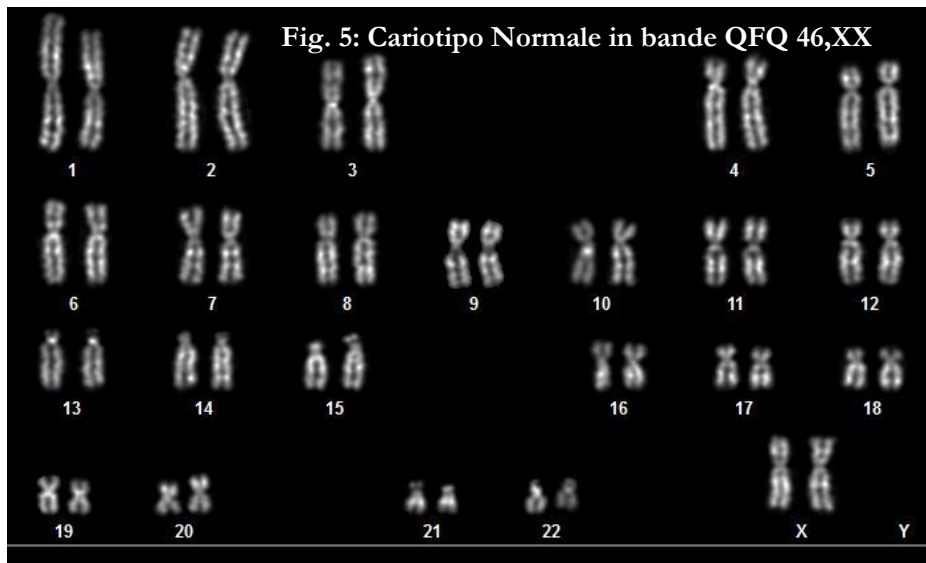


Fig. 4: Metafase la freccia indica in marker



La morfologia del cromosoma soprannumerario, come evidenziata dall'analisi convenzionale in bande QFQ, non consentiva di formulare ipotesi sulla sua derivazione, mancando qualunque pattern specifico di bande, né sulla sua reale costituzione, compatibile, ma non dimostrabile con la colorazione standard, con cromosoma ad anello. È altamente probabile che si tratti di un

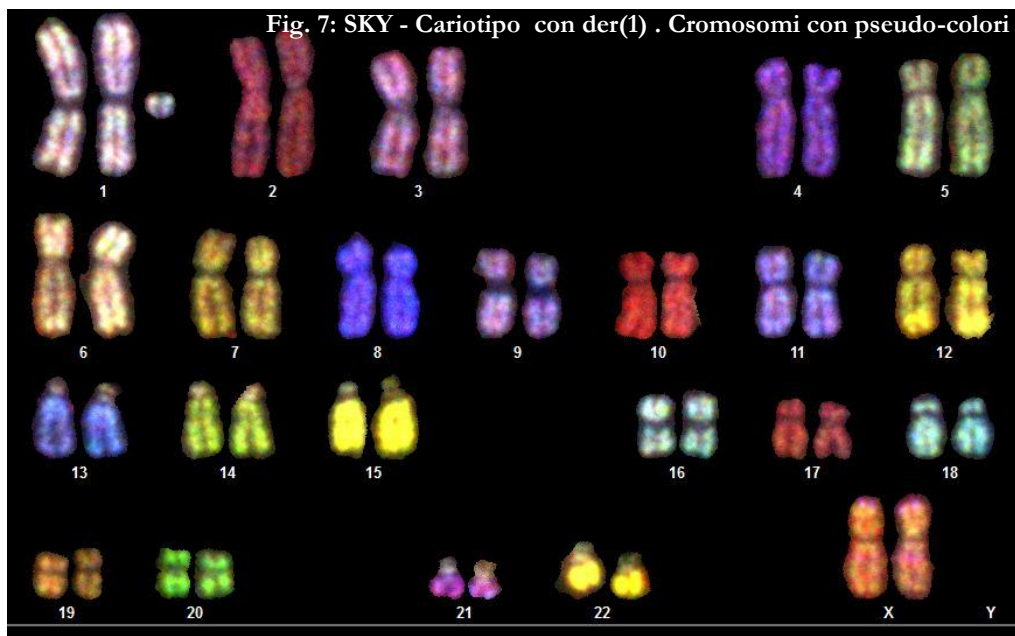
cromosoma ad anello, poiché i rings sono generalmente instabili e quindi presenti in mosaico, come è il caso della nostra paziente:

Per meglio caratterizzare il marker si proceduto a effettuare analisi di citogenetica molecolare.

CITOGENETICA MOLECOLARE

Le analisi di citogenetica molecolare sono state eseguite in maniera sequenziale in base ai risultati ottenuti passo per passo.

Come primo approccio è stata effettuata una ibridazione con SKY paint, miscela di sonde che in un solo esperimento evidenziano tutti i 24 cromosomi in colori diversi. L'analisi ha indicato nel cromosoma n°1 l'origine del marcatore (Fig. 7)



Una volta ottenuta questa informazione sono state eseguite analisi di FISH con whole chromosome painting del cromosoma 1 (wcp1) a conferma del risultato della SKY, sonde per le regioni alfoidi centromeriche (D1Z5 - 1p11.1-q11.1) e sonde per le regioni peri-centromeriche del braccio lungo, costituite da DNA satellitato (XCE 1 - 1q12). Tali analisi hanno consentito di caratterizzare il marker come originato dal cromosoma 1, dotato di centromero e di sequenze ripetute sotto-centromeriche.

In una sola delle metafasi analizzate, tra citogenetica convenzionale e molecolare, le dimensioni del marcatore sembrano compatibili con un cromosoma ad anello duplicato, ma tale riscontro è insufficiente per definire il cromosoma soprannumerario come ring (Fig. 8).

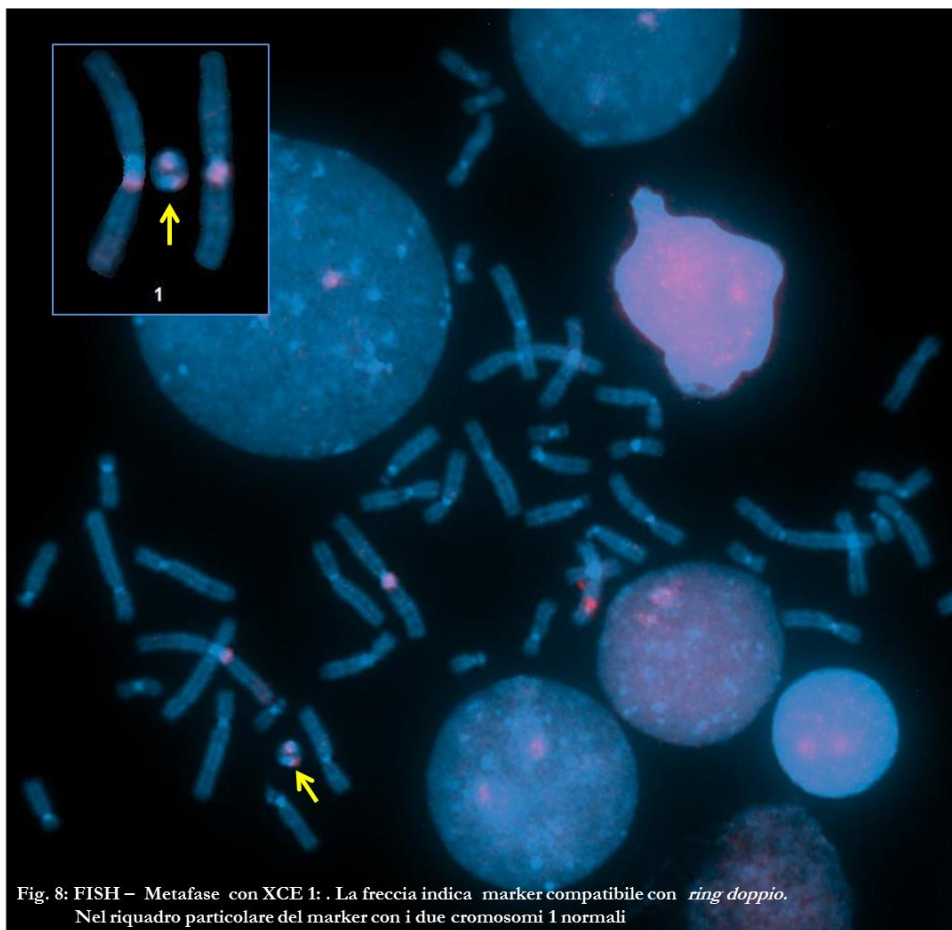
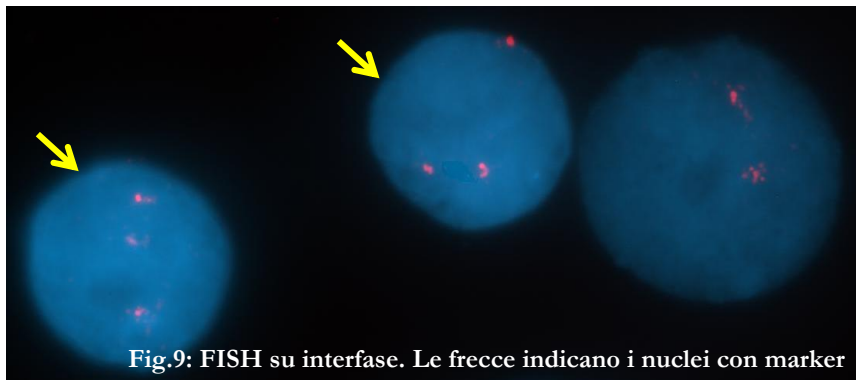


Fig. 8: FISH – Metafase con XCE 1. La freccia indica marker compatibile con *ring doppio*.
Nel riquadro particolare del marker con i due cromosomi 1 normali

Dall'esame dei nuclei in interfase (Fig. 9) si è potuto meglio definire il mosaico cellulare, che alla citogenetica convenzionale era stato valutato pari al 21,4% (25/117 metafasi), alla FISH su un più alto numero di cellule (710 in totale) il dato è stato rivalutato al 14% (45/310 con sonda D1Z5 e 56/400 con sonda XCE1, per un totale di 101/710 nuclei)



DISCUSSIONE

L'iter diagnostico per un campione per cui è richiesta l'analisi citogenetica, sia in diagnosi pre-natale che in diagnosi post-natale, prevede diverse fasi:

- Prelievo del campione
- Consegna e accettazione del campione presso il laboratorio (nel caso particolare l'U.O. di Genetica Clinica AOU di Sassari)
- Coltura cellulare
- Analisi dei preparati al microscopio
- Refertazione

Il protocollo per la caratterizzazione di un sSMC che viene applicato presso il nostro Centro (U.O. di Genetica Clinica dell'AOU di Sassari) segue le più recenti indicazioni della letteratura e le linee guida suggerite da tutte le Società di Genetica, in particolare dalla Società Italiana di Genetica Umana. (SIGU) come da schema (Fig. 9)

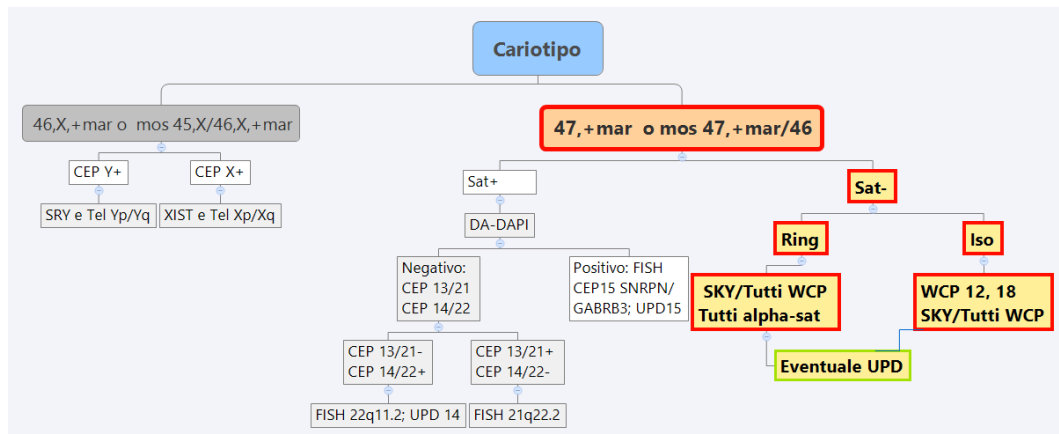


Fig. 10: caratterizzazione di un sSMC – in evidenza l'iter seguito

Come si può vedere, la prima distinzione è fra marcatori che originano da un cromosoma sessuale e marcatori che originano da un autosoma. Nel caso da

noi studiato e illustrato in questa tesi la presenza di entrambi i cromosomi sessuali deponere per un'origine del marker da un autosoma.

La tappa successiva è la distinzione fra marcatori satellitati e non satellitati. Questa distinzione può essere effettuata anche solo con l'analisi standard, in quanto qualunque colorazione convenzionale (Giemsa o Chinacrina) è in grado di evidenziare i satelliti.

Se il marcatore è dotato di satelliti: origina da uno dei cromosomi acrocentrici (13, 14, 15, 21 e 22), si fa quindi una colorazione Da/DAPI (Distamicina/DAPI) che per i cromosomi acrocentrici è specifica per il cromosoma 15. Se il cromosoma marcatore è DA-Dapi negativo è necessario procedere ad analisi di FISH con sonde alfoidi (centromeriche) per i cromosomi 13/21 e 14/22. In questo modo il cromosoma marcatore satellitato può essere caratterizzato come derivativo di un cromosoma 15 o di un 13/21 o di un 14/22. Nel caso di derivate (15) si valuta l'eventuale presenza della regione Prader Willi-Angelman, in quanto la presenza in un sSMC di questa regione si associa a un quadro clinico caratterizzato da grave ritardo mentale. Se invece il marker risulta positivo alla sonda centromerica dei cromosomi 13/21 si procede a eseguire un'analisi di FISH con una sonda specifica per la porzione 21q22.2 (regione critica per la sindrome di Down). Se il marker risulta positivo alla sonda centromerica 14/22 si valuta mediante FISH con sonda specifica l'eventuale presenza della regione Di George, che mappa in 22q11.2. Come si può notare tutte queste indagini sono volte a escludere la presenza nel sSMC di regioni associate a patologie note, ma l'eventuale assenza di queste regioni non comporta necessariamente l'assenza di alterazioni fenotipiche, probabilmente minime o non associate a sindromi note.

Se il marcatore non è satellitato: esso può essere un isocromosoma o un cromosoma ad anello. Nel primo caso si procede ad analisi di FISH con sonde “painting” per i cromosomi 12 e 18, al fine di escludere le ben note sindromi da isocromosoma 12p, o sindrome di Pallister-Killian, e da isocromosoma 18p. Nel caso di risultato negativo si procede all’analisi dei painting di tutti i cromosomi o meglio a una SKY paint.

Nel caso in cui il sSMC sia un cromosoma ad anello è indicato l’utilizzo dei painting di tutti i cromosomi o di una SKY paint e delle sequenze centromeriche (alfoidi) di tutti i cromosomi fino a definire l’origine del marker.

La procedura illustrata prevede, in casi selezionati, l’utilizzo di analisi molecolari volte a individuare l’eventuale presenza di disomia uniparentale (UPD), situazione nella quale entrambi i cromosomi di una coppia originano dallo stesso genitore. La disomia uniparentale è frequentemente associata a sSMC ed è importante diagnosticarla, soprattutto nelle indagini prenatali, in quanto spesso responsabile di patologie ben più gravi di quelle associate alla presenza di sSMCs, spesso di per sé del tutto innocui.

CONCLUSIONI

L’iter diagnostico illustrato, può talora apparire limitato in quanto non prevede ulteriori indagini volte a caratterizzare il sSMC, cioè a individuare le sequenze presenti in soprannumero ed eventualmente correlare il cariotipo al fenotipo.

Dal punto di vista dello studio citogenetico tali indagini richiedono l’utilizzo di sonde “casalinghe” ricavate da YACs (yeast artificial chromosomes) e/o BACs (bacterial artificial chromosomes), non validate per la diagnostica.

Nel caso presentato in questa tesi tali analisi sono in corso a fini di ricerca.

Ulteriori indagini di tipo molecolare, quale la a-CGH (array comparative genomic hybridization), eseguita su DNA della paziente ibridato a campioni di controllo, potranno meglio definire la natura del cromosoma marcatore presente nella paziente da noi studiata.

GLOSSARIO

BAC: Bacterial Artificial chromosome

CGH: ibridazione genomica comparativa

Der: cromosoma derivativo

ESACs: extra structurally abnormal chromosomes

FISH: ibridazione in situ fluorescente

Invdup: duplicazione invertita

SKY: Spectral Karyotyping

sSMCs: supernumerary small marker chromosomes

sSRC: ring soprannumerari

UPD: disomia uniparentale

WCP: Whole Chromosome Paint

YAC: Yeast Artificial Chromosome

BIBLIOGRAFIA

1. Schuffenhauer S, Murken J, Meitinger T. Interstitial deletion 5p accompanied by dicentric ring formation of the deleted segment resulting in trisomy 5p13-cen. *Am J Med Genet* (1996) 65:56-59
2. Neri G, Genuardi M. *Genetica umana e medica* 2014 terza edizione. Ed Masson
3. Jafari-Ghahfarokhi H, Moradi-Chaleshtori M, Liehr T, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Teimori H, Ghasemi-Dehkordi P. Small supernumerary marker chromosome and their correlation with specific syndromes. *Adv Biomed Res.*(2015) Jul 27;4:140. doi: 10.4103/2277-9175.161542. eCollection 2015
4. Schreck RR, Breg WR, Erlanger BF, Miller OJ. Preferential derivation of abnormal human G-group-like chromosomes from chromosome 15. *Hum Genet* (1977) 36:1-12
5. Choo KH. Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation. *Am J Human Genet* (1997) 61:1225-1233
6. Liehr T, Claussen U, Starke H . Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res* (2004):107:55-67.
7. Starke H, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Beitz B, Kelbova C, Volleth M, Albrecht B, Mitulla B, Bartels I, Adolph S, Dufke A, Singer S, Stumm M, Wegner RD, Seidel J, Schmidt A, Kuechler A, Schreyer I, Claussen U, von Eggelin F, Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. *Hum Genet* (2003) Dec: 114(1):51-67. Epub 2003; Sep 16. PMID: 13680362
8. Liehr T, Karamysheva T, Merkas M, Brecevic L, Hamid AB, Ewers E, Mrasek K, Kosyakova N, Weise A. Somatic mosaicism in cases with small supernumerary marker chromosomes. *Curr Genomics.*(2010) Sep;11(6):432-9. doi: 10.2174/138920210793176029.
9. “Linee Guida per la Diagnostica Citogenetica 2013” della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) Febbraio 2014

10. “Linee Guida per la Diagnostica Citogenetica 2013- Sezione Note Operative” della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) Febbraio 2014
11. Ventruto V, Sacco G, Lonardo F. Testo-atlante di citogenetica umana. 2001 Ed:Springer
12. G.Terzoli, C.Botta, M Di Segni, La sincronizzazione dei cicli cellulari, La pratica dell'analisi citogenetica classica pre e post natale Ferrara 2008
13. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. (1996) Science 273:494-497
14. Imataka G, Arisaka O, Chromosome analysis using Spectral Karyotyping (2012). Cell Biochem Biophys 62:13-17
15. Garini Y, Young IT, McNamara G. Spectral Imaging: Principles and applications. (2006). Cytometry Part A 69:735-747.

