

IBRIDAZIONE IN SITU FLUORESCENTE E SUOI UTILIZZI DIAGNOSTICI IN CITOGENETICA

ELIANA DEMORI, DANIELA GAMBEL BENUSSI, ARIELLA LUCHESI, ANNA RACCANELLI, MICHELA MONTICOLO, BEATRICE PASTORE, VANNA PACILE
 Servizio di Genetica, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

L'analisi del cariotipo si avvaleva, fino a qualche anno fa, esclusivamente dell'evidenziazione di caratteristici bandeggi sui cromosomi dopo colorazione con intercalanti fluorescenti del DNA. Queste metodiche, però, oltre a richiedere l'impiego di cellule in grado di riprodursi al fine di ottenere cromosomi in metafase, presentavano una risoluzione piuttosto bassa: non potevano, quindi, essere visualizzate piccole alterazioni cromosomiche, quali microdelezioni o microriarrangiamenti. Recentemente, con lo sviluppo della citogenetica molecolare, si sono rese disponibili nuove tecniche per lo studio dei cromosomi applicabili sia a nuclei in interfase che a metafasi e che consentono un'analisi più fine della struttura cromosomica in tempi decisamente ristretti.

Nell'ambito della citogenetica molecolare, l'ibridazione in situ fluorescente (FISH: *Fluorescence In Situ Hybridization*) è la metodica che si presta al maggior numero di applicazioni ed è diventata uno strumento di indagine essenziale in molti campi della ricerca di base e della medicina quali la pediatria, l'ostetricia, l'oncologia e la genetica clinica.

METODI

La FISH è una tecnica di ibridazione che permette di localizzare sequenze specifiche negli acidi nucleici. A tale scopo si utilizzano, in genere, linfociti da sangue periferico ma anche fibroblasti e amniociti. Il DNA dei cromosomi viene messo a contatto con una "sonda specifica" ovvero un frammento di DNA, la cui sequenza è complementare al segmento cromosomico che interessa evidenziare. Questa sonda "riconosce", se presente, il frammento complementare, si lega a quel segmento, e si fa a sua volta riconoscere perché "marcata" da una molecola indicatrice (in genere biotina o digossigenina). Dopo l'ibridazione e il lavaggio per rimuovere l'eccesso di sonda, il preparato cromosomico viene incubato con una soluzione contenente una molecola marcata con fluorescenza, che si lega all'indicatore della

sonda ibridata. È così possibile individuare i segnali sfruttando la luce di fluorescenza emessa a una precisa lunghezza d'onda, avvalendosi di un microscopio dotato di appositi filtri (Figura 1).

UTILIZZI DIAGNOSTICI: LA FISH PER LA DIAGNOSI DI TRISOMIA E MONOSOMIA

A seconda del difetto cromosomico che interessa evidenziare risultano oggi

disponibili diversi tipi di sonde, il cui elenco viene riportato in *Tabella I*.

Tra le sonde che identificano sequenze ripetute, particolarmente utili risultano quelle che riconoscono sequenze centromeriche, dette alfoidi, che sono specifiche per la maggior parte dei cromosomi. È possibile, mediante l'impiego di queste sonde, riconoscere la presenza di un eccesso (trisomia) o di un difetto (monosomia) di un determinato cromosoma, "inviando" una sonda spe-

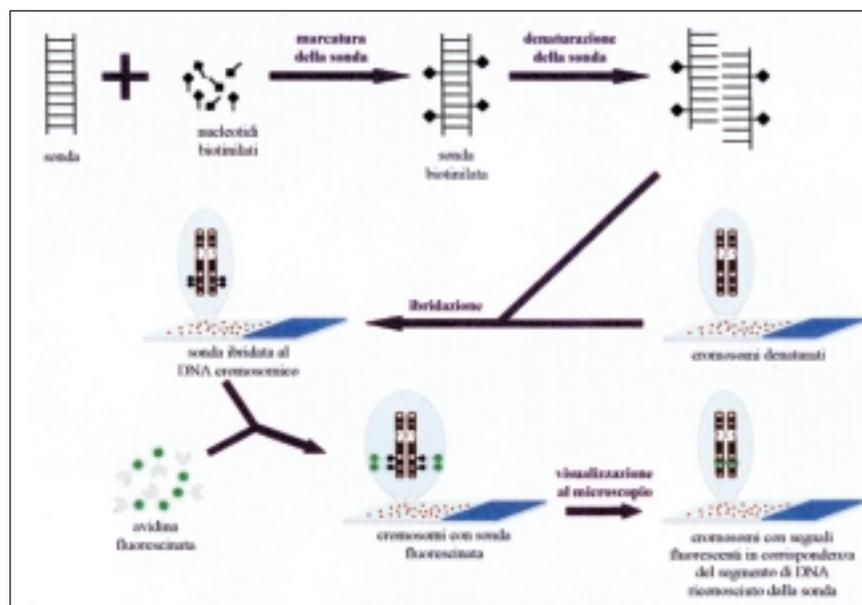


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'ibridazione in situ fluorescente.

TIPI DI SONDE IN GRADO DI EVIDENZIARE I DIVERSI DIFETTI CROMOSOMICI		
Tipi di sonde	Aberrazioni cromosomiche identificabili	Materiale impiegato
Sequenze ripetute	Trisomie Monosomie	Nuclei in interfase
Painting	Riarrangiamenti cromosomici Identificazione di cromosomi marcatori	Metafasi
Sequenze uniche	Microdelezioni e duplicazioni Riarrangiamenti cromosomici	Metafasi e nuclei in interfase

Tabella I

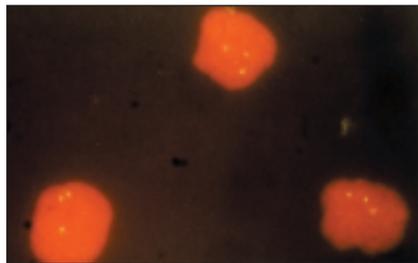


Figura 2. Immagine del nucleo di una cellula amniotica di un feto con sindrome di Down.

cifica sulla base del sospetto clinico. Si può così, in 24 ore, senza attendere lo sviluppo cellulare per l'analisi della metafase, diagnosticare o escludere una sindrome di Edward (trisomia 18) o di Turner (monosomia).

Sfortunatamente, la sequenza alfoide del cromosoma 21 è identica a quella del cromosoma 13; quindi, per poter identificare inequivocabilmente tali cromosomi in interfase, si impiegano sonde non mirate alle sequenze centromeriche, ma tuttavia in grado di riconoscere sequenze uniche. In questo modo è possibile individuare le altre due anomalie cromosomiche: la trisomia 21 (sindrome di Down) e la trisomia 13 (sindrome di Patau). In *Figura 2* viene riportata l'immagine del nucleo di una cellula amniotica di un feto con sindrome di Down: sono infatti visibili 3 segnali dopo ibridazione con la sonda specifica².

APPLICAZIONI DELLA FISH ALLO STUDIO DEL GENOMA

Fino ad ora sono state descritte le applicazioni in campo diagnostico della FISH, ma non va dimenticato che l'ibridazione in situ è ormai uno strumento essenziale per la ricerca in campo genetico, e in particolare è divenuto il metodo di elezione per la localizzazione e l'ordinamento di geni sui cromosomi, per lo studio della natura molecolare delle bande cromosomiche e per l'analisi della struttura e dell'organizzazione del cromosoma metafase. Applicata, poi, a nuclei in interfase, questa tecnica consente di indagare sulla struttura del nucleo e sulle interazioni funzionali tra differenti domini della cromatina.

Nell'ambito della citogenetica molecolare sono state sviluppate altre metodiche, tra cui la PRINS (*Primed In Situ Labeling*) e la PCR In Situ (*Polymerase Chain Reaction In Situ*), nelle quali le sonde specifiche impiegate nella FISH

vengono sostituite da corte sequenze di DNA (primer) estese sui cromosomi da opportuni enzimi, che nel far questo incorporano nucleotidi marcati con sostanze fluorescenti.

Teoricamente, queste metodiche dovrebbero consentire un più rapido e fine riconoscimento di sequenze su metafasi e nuclei in interfase, ma le difficoltà di esecuzione che spesso si incontrano ne limitano per ora l'uso ad alcuni settori della ricerca.

LA FISH PER LA DIAGNOSI DI SINDROMI DA MICRODELEZIONI CROMOSOMICHE

Come già anticipato, l'ibridazione in situ consente di mettere in evidenza tutta una serie di alterazioni cromosomiche che per le loro piccole dimensioni sfuggono a un'analisi del cariotipo che si avvale della tecnica di bandeggio standard. È questo il caso di un gruppo di disordini dello sviluppo, spesso indicati con l'acronimo di CATCH 22 (*Cardiac Abnormality/abnormal facies, T cell deficit, Cleft palate, Hypocalcemia*), che includono la sindrome di DiGeorge, la sindrome velocardiofaciale e alcuni difetti conotruncali, sia familiari sia sporadici, che sono stati associati a microdelezioni della regione cromosomica 22q11.2³.

Analogamente, possono essere messe in evidenza la delezione in posizione 7q11.2 del gene per l'elastina nella sindrome di Williams⁴ e quella in 15q11 nelle sindromi di Prader-Willi e Angelman⁵.

L'analisi può essere estesa a tutte le sindromi da microdelezione per cui sia disponibile una sonda specifica. Oltre a quelle sopracitate, ve ne sono alcune disponibili in commercio per le sindromi di Miller-Dieker e Smith-Magenis^{6,7}.

In *Figura 3* e *4* vengono riportati, rispettivamente, il caso di una delezione della regione Prader-Willi/Angelman e Williams: in entrambi i casi il cromosoma con la microdelezione è quello in cui è presente un solo segnale relativo al cromosoma di controllo che serve a identificare il cromosoma d'interesse.

In *Tabella II* vengono riportate le principali sindromi da microdelezione con la relativa localizzazione cromosomica e la percentuale di casi in cui la delezione è rilevabile mediante tecniche di citogenetica molecolare. Infatti, l'assenza di microdelezione non può sempre escludere la presenza di mutazioni puntiformi responsabili di malattia.

LA FISH IN CITOGENETICA TUMORALE

L'impiego di sonde che riconoscono sequenze uniche nel genoma è di notevole utilità anche in citogenetica tumorale e in particolar modo nell'analisi interfase, poiché permette di individuare le modificazioni di struttura dei cromosomi e l'amplificazione di geni. Possono così essere identificate la delezione del braccio corto del cromosoma 1 e l'amplificazione del gene N-myc in cellule di neuroblastoma e ancora le traslocazioni reciproche che si osservano nel sarcoma di Ewing⁸ e nella leucemia mieloide cronica e acuta che coinvolgono rispettivamente i cromosomi 11 e 22 e i cromosomi 9 e 22⁹. Un ulteriore vantaggio è che questa metodica può essere applicata anche a materiale recuperato da archivi di tessuti inclusi in paraffina, consentendo l'effettuazione di studi retrospettivi.

LA TECNICA DEL CHROMOSOME PAINTING

Un'applicazione speciale della FISH consiste nell'uso di una miscela di sonde in grado di legarsi specificamente all'intera struttura di un unico cromosoma rendendolo, quindi, completamente fluorescente (*chromosome painting*). La verniciatura cromosomica sta trovando sempre maggiori applicazioni nella defi-



Figura 3. Caso di delezione cromosomica nella sindrome di Prader-Willi/Angelman.



Figura 4. Caso di delezione cromosomica nella sindrome di Williams.

PRINCIPALI SINDROMI DA MICRODELEZIONE

Sindrome	Localizzazione cromosomica	Soggetti con microdelezione
Prader-Willi/Angelman	15q11.13	70%
Williams	7q11.23	90%
Di George/ Velocardiofaciale	22q11.2	75%
Smith-Magenis	17p11.2	95%
Miller-Dieker	17p13.3	90%

Tabella II

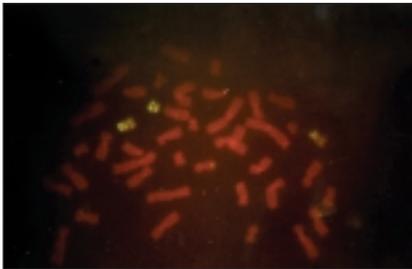


Figura 5. Esempio di cromosoma marcatore.

nizione dei riarrangiamenti de novo e dei cromosomi marcatori nella citogenetica clinica e dei tumori. Spesso, infatti, nei campioni tumorali sono presenti complessi riarrangiamenti cromosomici e i painting possono essere utilizzati in varie combinazioni per meglio riconoscere particolari segmenti cromosomici. In *Figura 5* viene riportato l'esempio di un cromosoma marcatore di cui non era possibile stabilire l'origine affidandosi alla sola analisi del cariotipo. Con l'impiego di un painting del cromosoma 18 si è potuto stabilire che tale cromosoma soprannumerario era un isocromosoma delle braccia corte di un cromosoma 18.

MESSAGGI CHIAVE

- La FISH è una tecnica per il riconoscimento mediante sonda di sequenze nucleotidiche cromosomiche.
- Non sostituisce la citogenetica: differenti problemi richiedono differenti strategie terapeutiche.
- La citogenetica classica permette l'analisi dell'intero cariotipo in un unico allestimento.
- La FISH è utilizzata per studiare una precisa regione cromosomica, la sua eventuale duplicazione o delezione, e il suo coinvolgimento in traslocazioni. Permette così di riconoscere le sindromi da delezione o duplicazione per le quali siano disponibili le sonde specifiche, in particolare le sindromi di Williams, Prader-Willi, Angelman, CATCH 22.
- La FISH inoltre permette di riconoscere gli errori cromosomici maggiori (21, 18, 13, Turner) in un tempo solo (senza aspettare lo sviluppo cellulare per l'analisi della metafase), e può essere utilizzata in oncologia per riconoscere cromosomi marcatori.

Bibliografia

1. Licher P, Cremer T. Chromosome Analysis by non Isotopic in situ Hybridization. In: A Practical Approach, Vol. I: Constitutional Analysis, II edizione, Oxford University press, cap. 6, pp 157-192, 1992.
2. Ried T, Landes G, Dackowski W, Klinger K, Ward DC. Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells. *Hum Mol Genet* 1992;1(5):307-13.
3. Matsuoka R, Kimura M, Scambler PJ, et al. Molecular and clinical study of 183 patients with conotruncal anomaly face syndrome. *Hum Genet* 1998;103(1):70-80.
4. Nickerson E, Greenberg F, Keating MT, McCaskill C, Shaffer LG. Deletion of the elastin gene at 7p11.23 occur in approximately 90% of patients with Williams syndrome. *Am J Hum Genet* 1995;56(5):1156-61.
5. Erdel M, Schuffenhauer S, Buchholz B, Barth-Witte U, Kochl S, Utermann B, Duba HC, Utermann G. Routine screening for microdeletions by FISH in 77 patients suspected of having Prader-Willi or Angelman syndromes using YAC clone 273A2 (D15S10). *Hum Genet* 1996;97:784-93.
6. Sakamoto M, Ono J, Okada S, Masuno M, Nakamura Y, Kurahashi H. Alteration of the LIS1 gene in Japanese patients with isolated lissencephaly sequence or Miller-Dieker syndrome. *Hum Genet* 1998;103(5):586-9.
7. Juyal RC, Figuera LE, Huage X, Elsea SH, Lupski JR, Greenberg F, Baldini A, I. Patel I. Molecular analyses of 17p11.2 deletions in 62 Smith-Magenis syndrome patients. *Am J Hum Genet* 1996;58:998-1007.
8. Monforte-Munoz H, Lopez-Terredá D, Afendie H, Rowland JM, Triche TJ. Documentation of EWS gene rearrangements by fluorescence in-situ hybridization (FISH) in frozen sections of Ewing's sarcoma-peripheral primitive neuroectodermal tumor. *Am J Surg Pathol* 1999;23(3):309-15.
9. Arnoldus EPJ, Wiegant J, Noordermeer IA, Wessels JW, Beverstock GC, Grosveld GC, van der Ploeg M, Raap AK. Detection of the Philadelphia chromosomes in interphase nuclei. *Cytogenet Cell Genet* 1990;54:108-11.



VIDEOCASSETTE CONFRONTI IN PEDIATRIA 1999

1. FANS: quali, quando, perché L. Lepore, D. Cohen, P. Macchia - 2. Il dolore nel neonato F. Benini, U. de Vonderweid - 3. Mal d'orecchi S. Renier, E. Zocconi - 4. Mal di denti M. Andolina, G. Clarich - 5. Il grande dolore fisico P. Tamaro, P. Busoni - 6. Il prurito E. Bonifazi, F. Longo - 7. La colica renale L. Peratoner, E. Guglia - 8. Le terapie alternative del dolore N. Levi, P. Parietti - 9. Mal di schiena, mal di gambe G. Tagliavolano, G. Maranzana - 10. Mal di pancia A. Messineo, S. Martellosi, G. Torre, V. Bruni - 11. Gli antileucotrieni un anno dopo F. Marchetti, F. de Benedictis, G. Longo - 12. Il piccolo dolore F. Arcangeli, G. Zanazzo - 13. Novità verso il 2000: le letture che ci hanno cambiato G. Bartolozzi, A. Ventura, F. Panizon - 14. Il bambino nel dramma G. Tamburlini, P. Di Blasio

Il costo di una videocassetta è di lire 60.000 (comprensivo di IVA e spese postali)

Modalità di pagamento: Assegno bancario non trasferibile intestato a Quickline. Bonifico bancario presso la Banca di Roma, Agenzia Trieste 3, L.go Barriera Vecchia 6, c/c 670839. Versamento su c/c postale n. 12128344 (specificando la causale) intestato a Quickline. e-mail: quick@trieste.com Quickline sas, via Santa Caterina 3, 34122 Trieste - Tel 040 / 773737 - 363586 Fax 040 / 7606590