

CGH array parte prima

Un nuovo e potente strumento diagnostico per la rilevazione di sbilanciamenti cromosomici.

a cura del Prof. Walter Taccone



Anomalie dovute alla variazione del numero di copie di geni sono eventi comuni nei tumori solidi e nei disordini costituzionali. Spesso però le delezioni e/o le duplicazioni sono criptiche perché la loro dimensione risulta essere inferiore al limite di risoluzione di un bandeggio cromosomico convenzionale (10 MB).

La tecnica tradizionale per la rilevazione di tali anomalie è l'indagine CITOGENETICA che, tramite i bandeggi dei cromosomi, consente la ricostruzione della mappa di tutti i cromosomi (morfologia) e la messa in evidenza di eventuali aberrazioni (trisomie, traslocazioni, ecc.)

La limitazione principale di tale tecnica, che peraltro è estremamente diffusa per la **rilevazione di molteplici patologie pre e post-natali e neoplastiche**, risiede nella sua bassa

sensibilità diagnostica in quanto i bandeggi dei cromosomi hanno un limite di risoluzione assai alto. La Biologia Molecolare permette invece di arrivare a risoluzioni mai raggiunte dalle convenzionali tecniche di citogenetica.

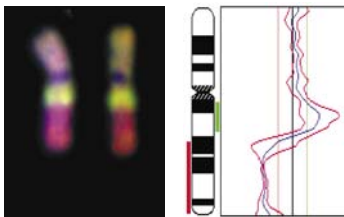
L'array CGH è una nuova tecnologia che permette infatti di superare questi limiti.

La CGH (Comparative Genomic Hybridization) convenzionale è una tecnica che è stata sviluppata per rilevare variazioni del numero di copie di geni specialmente in campioni oncologici, per i quali era difficile ottenere metafasi con risoluzione di bandeggio accettabile.

Il principio della tecnica si basa su una competizione per il legame su un supporto normale (cromosomi in metafase) di due DNA genomici marcati con fluorocromi diversi. Un DNA è estratto dal paziente in esame mentre l'altro DNA è un pool di DNA genomico di riferimento.

In questa competizione comparativa si leggerà in proporzione più DNA da testare in ogni locus se maggiore sarà il numero di copie presenti in quel locus rispetto al numero di copie presenti nel DNA genomico di controllo. Viceversa se ne leggerà meno se minore sarà il numero di copie presenti in quel locus rispetto al numero di copie presenti nel DNA genomico di controllo.

Il risultato viene espresso dal rapporto delle 2 fluorescenze. In caso di numero di copie normali avrò 2 copie di DNA da testare e 2 copie del DNA di controllo genomico, per cui il rapporto tra i 2 fluorocromi 2/2 è pari a 1. In caso di trisomia del DNA da testare il rapporto sarà pari a 1,5 e cioè 3/2. Viceversa in caso di monosomia il rapporto sarà pari a 0,5 e cioè 1/2.



Esempio di analisi di CGH con amplificazione in verde e delezione in rosso

La CGH tradizionale presenta alcuni problemi tra cui la variabilità della morfologia dei cromosomi che ne limitano la risoluzione a circa 3-7 Mb per le delezioni e 2 Mb per le amplificazioni). Inoltre è una tecnica piuttosto laboriosa. Questi problemi sono stati superati con l'applicazione a tale tecnica della tecnologia dei microarray.

L'array CGH è stato sviluppato sostituendo i cromosomi delle metafasi di riferimento con una matrice su cui sono spottati cloni YAC, BAC o PAC di ... ▶

futura diagnostica

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche

C.so V.Emanuele, 188 Avellino - tel. 0825.780981
www.futuradiagnostica.it - info@futuradiagnostica.it

Certificato
n. 143248
del 14/01/2004

...► circa 150 Kb (Yeast-Lievito, Bacterial, Plasmide Artificiali Cromosoma) corrispondenti a loci specifici del cromosoma. L'utilizzo di tali cloni permette l'immediata correlazione tra l'eventuale alterazione e una precisa posizione nel genoma. La risoluzione genomica dipende quindi dalla lunghezza dei cloni utilizzati e dalla distanza tra un clone e l'altro.

Inoltre il formato microarray ha permesso la standardizzazione della tecnica garantendo la ripetibilità e l'affidabilità del risultato portando così allo sviluppo di dispositivi diagnostici basati su CGH array. L'Array CGH è stato utilizzato con successo per tracciare il profilo genomico in una vasta gamma di tumori (Pinkel et al. 1998; Albertson et al. 2000; Forozan et al. 2000; Lichter et al. 2000; Wessendorf et al. 2002; Wilhelm et al. 2002) e recentemente la sua applicazione allo studio di anomalie cromosomiche costituzionali ha permesso di rilevare delezioni e duplicazioni in singola copia (Snijders et al. 2001; Veltman et al. 2002; Buckley et al. 2002).

Il principio su cui si basa la tecnica di Array CGH è la coibridazione del DNA in esame e del DNA di controllo, marcati con fluorocromi diversi, su un microarray di cloni genomici.

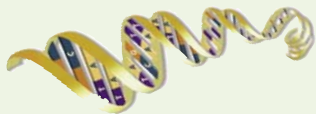


L'esperimento può essere eseguito in doppio invertendo la marcatura del campione e del controllo per eliminare le false positività (dye swap). Nel primo caso si marca con Cy3 il campione e con Cy5 il controllo mentre nell'esperimento specularmente è il contrario. Il microarray è costituito da un supporto solido, trattato chimicamente, su cui vengono spottati una serie di cloni il cui numero può variare da poche centinaia alle migliaia. Ogni clone è presente almeno in duplice copia per minimizzare i possibili errori. A seguito di questa co-ibridazione sia il DNA in esame che quello di controllo si legheranno ai cloni presenti su ciascun singolo spot.

Il risultato di questa co-ibridazione sarà l'emissione di due distinti segnali. Il rapporto tra le due emissioni normalmente è bilanciato per cui vale 1. Qualora vi siano nel DNA in esame delle delezioni o amplificazioni di materiale cromosomico il valore di questo rapporto cambia salendo o scendendo sotto tale valore.

La lettura di questi vetrini viene fatta da un apposito scanner che legge tali emissioni e fornisce l'immagine su cui verrà poi effettuata l'elaborazione dei dati. ■

CGH array: applicazioni



L'utilizzo di sequenze di DNA genomico clonate in BAC per la CGH array consente di ottenere segnali sufficientemente intensi per ottenere misure molto accurate della variazione del numero di copie: è possibile infatti identificare variazioni di una singola copia per ogni clone spottato sull'array.

Inoltre in base al numero di cloni coinvolti è possibile stabilire con molta accuratezza la localizzazione e l'estensione dell'anomalia.

Analisi di geni di cellule tumorali

L'utilizzo della CGH array per l'analisi di cellule tumorali ha permesso di aumentare notevolmente la risoluzione rispetto la CGH convenzionale: è stato infatti dimostrato che con questa tecnica si sono trovate variazioni nel numero di copie che in precedenza non erano state identificate con la CGH convenzionale.

L'analisi con questa tecnica su diversi tipi di tumore ha messo in evidenza che questi differiscono non solo dal punto di vista delle regioni interessate da tali anomalie ma anche per il tipo di aberrazioni del numero di copie riscontrate.

Sembra che queste diverse tipologie di variazione nel numero di copie (copy number phenotypes) possano dipendere sia da un fenomeno di selezione per un determinato cambiamento nel pattern di espressione sia dal grado di instabilità genetica che comportano.

Per esempio tumori del colon in cui è compromesso il meccanismo di riparazione dei mismatch (MMR) differiscono da tumori del colon in cui tale meccanismo non è alterato sia dal punto di vista istologico, che dei geni che vengono inattivati che dalla loro risposta alla terapia.

La CGH array ha permesso di evidenziare non solo che i tumori con il MMR compromesso hanno una variazione del numero di copie minore rispetto quelli in cui tale meccanismo è efficiente ma anche che tra i tumori con un deficit dell'MMR quelli in cui è coinvolto MSH2 hanno meno aberrazioni nel numero di copie rispetto a quelli in cui è coinvolto MLH1.

Inoltre la maggior risoluzione della CGH array ha permesso di mappare con maggior precisione le regioni amplificate e il loro grado di amplificazione.

Una volta che queste vengono definite con precisione è possibile identificare i potenziali oncogeni che si trovano in queste regioni.

L'analisi poi del livello di espressione di tali potenziali oncogeni può fornire indicazioni su quali sono i candidati più probabili nel determinare il fenotipo patologico.

