

CGH array

Permette un'analisi completa e precisa delle variazioni del numero di copie delle sequenze di DNA.

a cura del Prof. Walter Taccone



Variazione del numero di copie nelle patologie costituzionali

Le aberrazioni cromosomiche sono associate a un gran numero di anomalie congenite caratterizzate da vari diformismi e/o ritardi mentali.

L'analisi del cariotipo è la tecnica citogenetica utilizzata per rilevare tali anomalie. Il bandeggio G è in grado di rilevare tali aberrazioni (delezioni, duplicazioni, inversioni) qualora queste siano di entità superiori al limite di risoluzione (10 MB). La FISH può aumentare la risoluzione ed è il metodo di riferimento per rilevare variazioni del numero di copie.

Questa tecnica però va utilizzata in modo mirato il che significa l'analisi di un numero limitato di loci alla volta.

L'impiego della CGH array offre il vantaggio di poter screenare tutto il genoma per individuare eventuali variazioni del numero di copie in un unico esperimento con un notevole aumento della risoluzione nella mappatura dell'anomalia.

Esiste un'applicazione che utilizza un DNA microarray ad alta densità costituito da 3200 cloni BAC non sovrapposti (tutti validati in FISH per escludere cloni con segnali aspecifici) spottati su un chip di silicio in quadruplicato, in due aree separate.

Questi cloni rappresentano regioni specifiche di tutti i cromosomi umani e coprono l'intero genoma con una risoluzione di 0,8 Mb, sufficiente per individuare delezioni o duplicazioni di piccole dimensioni (DNA GENOMICO).

L'aggiunta periodica di nuovi cloni non polimorfici, selezionati e validati da più laboratori prima di essere inseriti nel chip, permette di raggiungere una risoluzione

sempre più alta. Grazie alla presenza di spot in quadruplicato, non è necessario il "dye swap" ed è possibile usare un solo vetrino per determinazione anziché due, diminuendo così i costi, soprattutto negli studi in cui si vogliono studiare/confrontare numerosi DNA diversi.

Sono stati così eseguiti numerosi studi di aberrazioni...▶



futura diagnostica
Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche

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

Certificato n. 142348 del 14/01/2004

► cromosomiche utilizzando la CGH array. I dati ottenuti sono concordanti con quelli ottenuti in precedenza con il bandeggio G e la FISH. La CGH array ha però consentito di definire in modo più preciso le aberrazioni riscontrate e in alcuni casi ha permesso di individuare altre che non erano state trovate con il bandeggio e la FISH (Rauen et al 2002, Veltman et al 2003, Gunn et al 2003).

Sono stati messi a punto anche array per lo studio delle variazioni del numero di copie a livello delle regioni subtelomeriche cioè delle estremità dei cromosomi: queste estremità sono molto reattive e sono soggette a frequenti riarrangiamenti tra loro con scambio di materiale genetico che possono portare a patologie cromosomiche caratterizzate da dismorfismi facciali, ritardo mentale o a tumori ematologici.

Anche qui si tratta di riarrangiamenti che sfuggono alle tecniche convenzionali di citogenetica. Tali riarrangiamenti sono associati con ritardo mentale idiopatico. L'array è costituito in questo caso da 200 cloni BAC e permette l'analisi simultanea di tutte le regioni subtelomeriche mediante una singola ibridazione. In uno studio condotto in cieco su 20 pazienti con anomalie cromosomiche conosciute, la CGH array oltre a confermare tali anomalie ha permesso di individuare delle variazioni di numero di copie

aggiuntive che non erano state rilevate in precedenza (Flint et al 2003, Van Karnebeek et al 2002, Knight et al 2000).

È stato infine predisposto un array per la diagnostica pre e post natale costituito da cloni che coprono le regioni critiche interessate da microdelezioni associate a un gran numero di sindromi che non possono essere diagnosticate con un cariotipo tradizionale, come la Sindrome di DiGeorge (VCS), la Sindrome di Williams, la Sindrome di Prader-Willi/Angelman. Questo microarray può essere utilizzato anche in diagnosi prenatale, qualora ci sia una familiarità con queste patologie cromosomiche. Oltre ai cloni per sindromi da microdelezione, nel chip sono compresi anche cloni per le regioni subtelomeriche. Questo array permette l'analisi simultanea di tutte queste regioni mediante singola ibridazione e consente di valutare anche le duplicazioni telomeriche.

Particolare importanza riveste questa applicazione pre-natale nell'esame del liquido amniotico o dei villi coriali in quanto con una sola determinazione è possibile rilevare circa 35 patologie subdole e non diagnosticabili diversamente che provocano ritardo mentale e patologie correlate nel bambino.

La CGH array permette un'analisi completa e precisa delle variazioni del numero di copie delle sequenze di DNA.

Tali alterazioni sono uno dei numerosi meccanismi che possono causare una variazione dell'espressione genica che può essere alla base di anomalie nello sviluppo o del cancro. La sua applicazione permette di ottenere una rapida analisi di tutto il genoma in un unico esperimento e il formato microarray permetterà la possibile automazione di tale tecnica.

Lo sviluppo di array dedicati inoltre rappresenta un'ulteriore possibilità per fruire di strumenti diagnostici sempre più semplici e dettagliati per l'analisi di diverse patologie.

Ovviamente le tecniche citogenetiche convenzionali saranno sempre fondamentali e non potranno essere sostituite in toto, ma indubbiamente la CGH array apre le porte verso analisi sempre più accurate e precise a fronte di una maggiore semplicità e tempi di risposta molto più veloci.

L'applicazione poi di nuovi software di interpretazioni dei dati permetterà di gestire la mole di informazioni che si ottiene da questa tecnica in modo ottimale riducendo al minimo le possibilità di errore da parte dell'operatore. ■

Questa tecnologia è presente in pochissimi Centri pubblici e di ricerca Italiani ed oggi anche nella nostra Regione ed in particolare ad Avellino grazie la lungimiranza dei nostri ricercatori che investono nelle nuove tecnologie senza incidere sul Sistema Sanitario Pubblico, ma che dedicano tempo e risorse finanziarie personali per poter offrire ai pazienti una sanità sempre all'avanguardia in campo nazionale ed internazionale.

VANTAGGI

La possibilità di depositare su microarray qualsiasi tipo e numero di sequenze di DNA selezionate perché relative a geni che determinano l'insorgenza di specifiche patologie cromosomiche, consentirà a questa tecnica di arrivare a risoluzioni mai raggiunte prima d'ora dalle convenzionali tecniche di indagine citogenetica, come il cariotipo, che, come è noto, è una rappresentazione ordinata del corredo cromosomico di ogni individuo.

Oltre ad offrire una risoluzione molto maggiore rispetto alle tecniche convenzionali, la tecnica microarray - CGH è molto flessibile e si adatta bene alla routine del laboratorio di citogenetica, dal momento che i protocolli d'uso possono essere automatizzati con strumenti dedicati.

Finora, la disponibilità di array CGH ha permesso di

tracciare il profilo genomico in un'ampia gamma di tumori (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 consentito di rilevare delezioni e duplicazioni in singola copia (Snijders et al. 2001, Veltman et al. 2002; Buckley et al. 2002).

