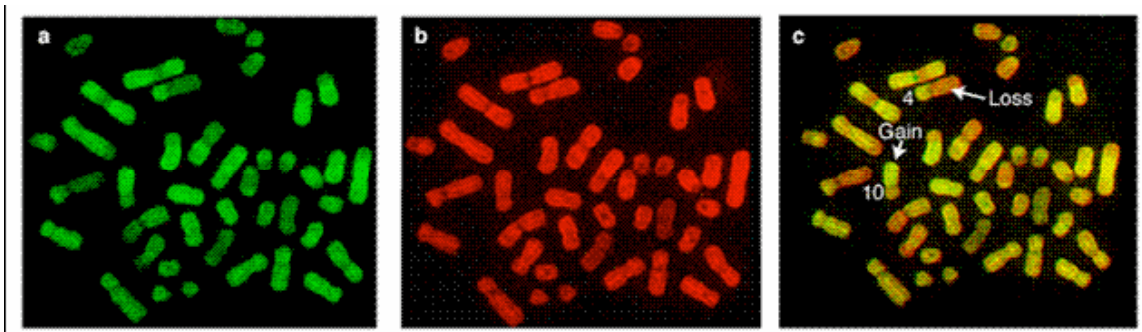


## Comparative Genomic Hybridization

L'ibridazione genomica comparativa (Comparative Genomic Hybridization, CGH) convenzionale è una tecnica di rilevazione che consente di analizzare l'intero genoma del soggetto che si vuole esaminare, grazie ad in un unico esperimento in grado di identificare anomalie del corredo genetico quali riarrangiamenti inter- ed intracromosomici, regioni di amplificazione genica e regioni con delezioni.

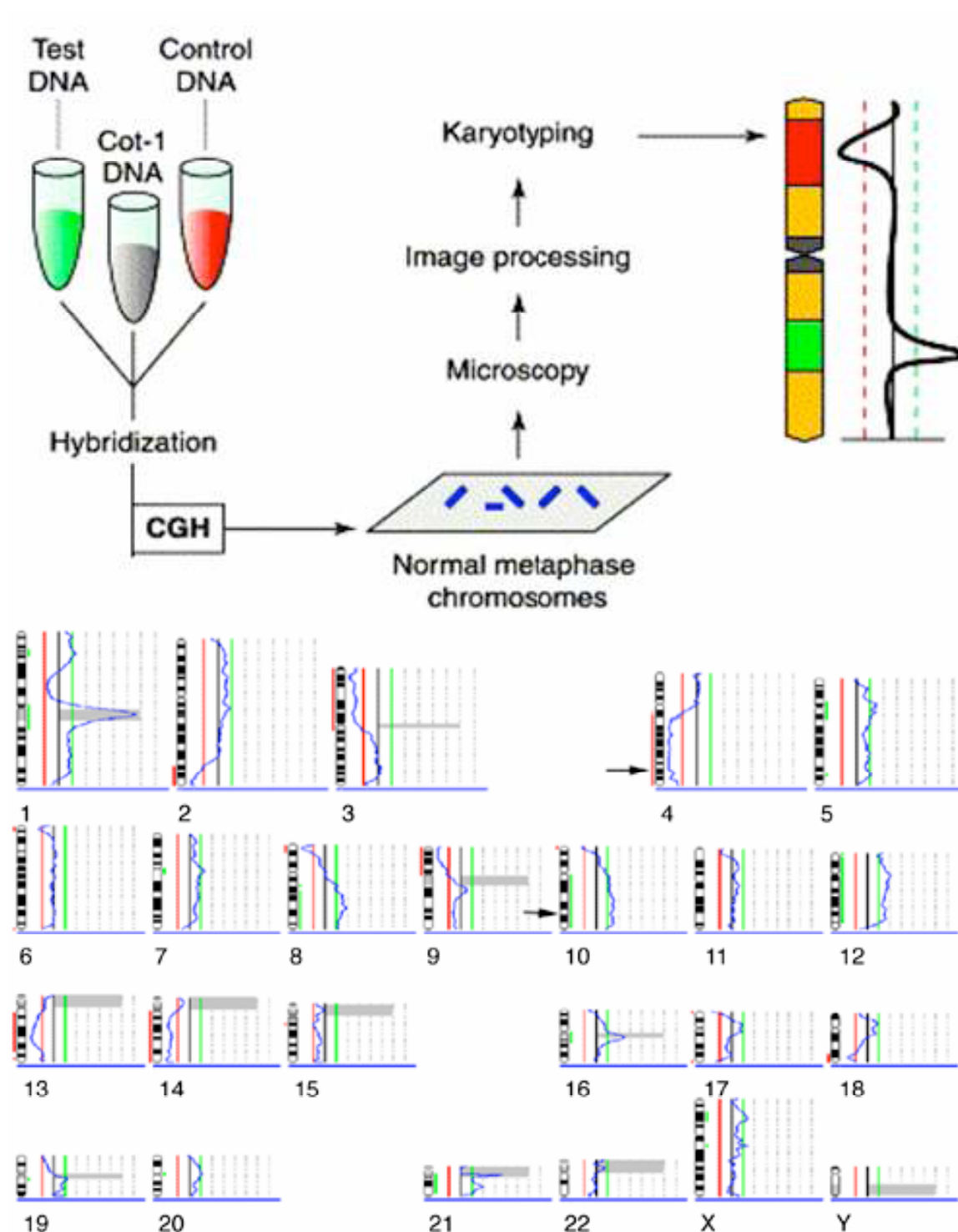
Il principio della tecnica si basa su una competizione per il legame di 2 DNA genomici, marcati con fluorocromi diversi, a cromosomi in metafase, non marcati e provenienti da un soggetto sano. Il primo DNA è estratto dal paziente in esame mentre l'altro costituisce il DNA genomico di riferimento proveniente da un soggetto sano. Tale processo prende il nome di *ibridazione in situ* su cromosomi e, grazie allo stato altamente condensato dei cromosomi metafisici, la risoluzione di questa tecnica (vale a dire la capacità di riconoscere alterazioni nelle sequenze del genoma) è nell'ordine delle 2-3 Mb (1 Mb = 1 milione di basi).

Nella figura 1 vengono illustrate le modalità con cui si visualizzano differenze di competizione del DNA in esame con quello riferimento.



**Figura 1.** Nelle immagini si vede la stessa preparazione di cromosomi (metafase) di un soggetto normale, fatta ibridare con (a) il DNA estratto da cellule tumorali marcate con uno specifico fluorocromo verde, e (b) il DNA delle cellule normali di riferimento marcati con uno specifico fluorocromo rosso. La sovrapposizione delle immagini (c) dimostra l'intensità relativa della fluorescenza verde e di quella rossa, riflettendo le variazioni del numero di copie di geni che si riscontra nel genoma tumorale. Una perdita di geni in aree più o meno estese del DNA tumorale conferisce al DNA di riferimento un vantaggio nella competizione per il legame al DNA normale. Proprio per questo motivo in tali aree il microscopio rileva un aumento della fluorescenza rossa. Viceversa, duplicazioni ed amplificazioni di geni del DNA tumorale corrispondono al prevalere della fluorescenza verde.

A questo punto, analizzatori d'immagine computerizzati quantificano l'intensità di fluorescenza emessa sull'intera lunghezza di ogni singolo cromosoma calcolando quanto il rapporto tra i segnali emessi dal campione e dal DNA di riferimento devia dai valori attesi (figura 2a e figura 2b).



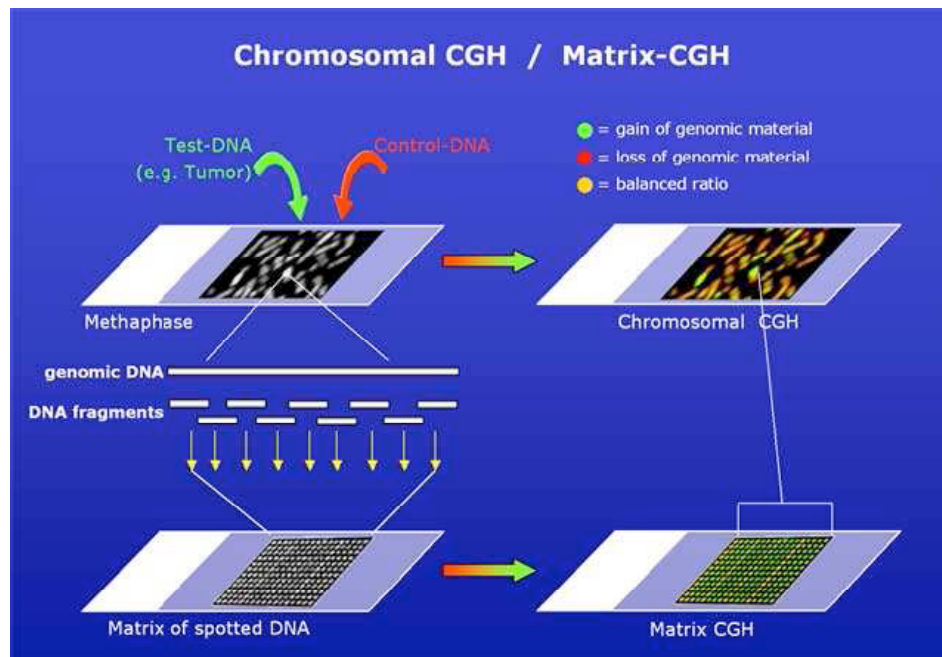
**Figura 2. Ibridazione genomica comparativa.** (a) Alla miscela di reazione, oltre al genoma del paziente in studio (test DNA) e al genoma di riferimento (Control DNA), si aggiunge del DNA altamente ripetitivo (Cot-1) allo scopo di saturare le sequenze ripetitive presenti in entrambi i genomi. Al termine dell'analisi, per ogni cromosoma del cariotipo si potranno individuare: regioni con delezioni, indicate come picchi che si spostano a sinistra rispetto al profilo normale, regioni con assetto genico normale, che non si discostano dal profilo di riferimento ed infine, regioni con duplicazioni o amplificazioni

geniche, indicate come picchi che si spostano a destra rispetto al profilo normale. A titolo di esempio viene riportata in **(b)** l'analisi CGH di cellule tumorali di un paziente affetto da Sindrome di von Hippel-Lindau (malattia monogenica caratterizzata dall'insorgenza di tumori renali). Il braccio lungo del cromosoma 4 e quello del cromosoma 10 rappresentano le aree rispettivamente con maggior perdita e con maggiore acquisizione di copie di geni.

La CGH convenzionale è stata sviluppata per rilevare variazioni del numero di copie di geni specialmente in campioni oncologici, per i quali risultava difficile ottenere metafasi con risoluzione di bandeggio accettabile. Il vantaggio di tale tecnica è che in un'unica ibridazione si possono ottenere informazioni sulla dimensione e sulla localizzazione di tutti gli sbilanciamenti cromosomici.

Tuttavia la CGH convenzionale presenta alcuni problemi tra cui la variabilità della morfologia dei cromosomi che ne limitano la risoluzione a circa 5-10 Mb per le delezioni e 2Mb per le amplificazioni. Inoltre, la CGH non è in grado di rilevare riarrangiamenti cromosomici bilanciati e non è sufficientemente sensibile per identificare anomalie presenti solo in alcune sub-popolazioni cellulari, ossia nei casi di mosaicismo.

Un'evoluzione della CGH è costituita dalla tecnica dell'**array CGH**, che è stata sviluppata sostituendo i cromosomi delle metafasi di riferimento con una matrice su cui sono disposti (*spottati*) cloni BAC (cromosomi batterici artificiali) o PAC (cromosomi artificiali di fago P1) di circa 150 Kb, corrispondenti a loci specifici di ogni singolo cromosoma (figura 3), fino a comprendere l'intero genoma umano. L'utilizzo di tali cloni permette l'immediata correlazione tra l'eventuale alterazione sospettata in un paziente e una precisa posizione del riarrangiamento nel genoma, grazie alla scomparsa di un segnale corrispondente al clone contenente la sequenza deleta, o, viceversa, all'aumento di segnale dovuto ad una duplicazione della sequenza. La risoluzione genomica dipende dalla lunghezza dei cloni utilizzati e dalla distanza tra un clone e l'altro.



**Figura 3.** Tecnica dell'array CGH.

## SONDE WCP e PCP

Le painting libraries cromosomiche sono di due tipi:

- libraries totali (*whole chromosome painting probes*, WCP)
- libraries parziali (*partial chromosome painting probes*, PCP).

Le PCPs e le WCPs colorano rispettivamente un frammento (composto da una o più bande) o l'intero cromosoma. La citogenetica in metafase le utilizza per caratterizzare anomalie sia numeriche che strutturali. Le sonde WCP colorano interamente i cromosomi e sono ottenute tramite l'impiego della FACS (Fluorescent Activated Cell/Chromosome Sorting) con l'ausilio del dual laser. Questa tecnica permette la selezione specifica di cromosomi tutti dello stesso tipo per la produzione di sonde specifiche per questi. Le sonde WCP possono essere ottenute anche tramite:

- creazione di ibridi somatici monocromosomici;
- microdissezione (Guan et al., 1993);
- PCR con primers degenerati (DOP, *Degenerate Oligonucleotide Primer*).

Per le WCP costruite a partire da cromosomi sortati viene utilizzata una particolare variante della tecnica di PCR detta *Degenerate Oligonucleotide Priming (DOP) -PCR* (PCR condotta con primers degenerati che si appaiano in corrispondenza di sequenze non specifiche del DNA cromosomico di partenza). Per le WCP costruite a partire da ibridi cellulari uomo-hamster monocromosomici, ossia contenenti un solo cromosoma umano, si effettua una reazione di *Alu-PCR* (una PCR condotta con primers specifici per le sequenze Alu), in modo tale da amplificare la sola componente umana dell'ibrido.

L'utilizzo di sonde WCP diversamente marcate in un saggio di coibridazione permette la visualizzazione di riarrangiamenti cromosomici che coinvolgono più cromosomi. Questo sistema, però, non è utilizzabile contemporaneamente per tutti i cromosomi umani a causa del numero relativamente limitato di fluorofori a disposizione. Per poter individuare un numero di bersagli superiore all'effettivo numero di fluorofori si sono utilizzate delle combinazioni di fluorofori anche in diversa percentuale (Lichter, 1997). Le combinazioni di colori sono inizialmente analizzate con la convenzionale microscopia a fluorescenza coadiuvata dall'uso di filtri, ma successivamente le immagini acquisite sono elaborate in modo da assegnare pseudocolori artificiali alle varie combinazioni di fluorofori. Solo in questo modo è stato possibile distinguere i 24 diversi cromosomi umani in un unico saggio di ibridazione.

Vantaggi. Le WCP consentono di identificare i cromosomi coinvolti e il tipo di riarrangiamento, mentre le PCP permettono di restringere la regione d'indagine.

Limiti. Sia le sonde WCP che quelle PCP possono essere impiegate in numero limitato nei saggi di ibridazione, limitando di molto la risoluzione e l'immediata identificazione del pattern cromosomico sconosciuto. Infatti, esperimenti di FISH con tali sonde danno conferma dei dati già ottenuti in Multicolor-FISH (sonde WCP) e permettono di continuare le indagini verso una regione subcromosomica più ristretta, ma non definita in modo preciso (sonde PCP).

## MULTICOLOR-FISH (E SUE VARIANTI)

Il "chromosome painting" è alla base dei diversi metodi della Multicolor-FISH: la *Multiplex-FISH* (M-FISH), la *COmbined Binary Ratio Analysis-FISH* (COBRA-FISH) e la *Spectral Karyotyping* (SKY), (Schrock et al., 1996). La Multicolor-FISH è particolarmente utile per identificare cromosomi markers e derivativi (Speicher et al., 1996).

La FISH multipla (M-FISH) si basa sull'acquisizione separata delle immagini, attraverso la CCD camera, per ciascuno dei fluorofori disponibili e sulla successiva elaborazione da parte di un software (es. Leica Multicolor) che genera un'immagine digitale composita. In questo modo, ad ogni cromosoma è associato un diverso pseudocolore, frutto della sua composizione di fluorofori.

La COBRA-FISH differisce dalla M-FISH per il numero di fluorofori a disposizione che si riduce a

quattro contro i cinque o i sette fluorofori della M-FISH a seconda dell'azienda produttrice della sonda utilizzata.

Invece, l'analisi spettroscopica (SKY) combina le immagini ottenute con la CCD camera con la spettroscopia di Fourier. Utilizzando un interferometro si determina "l'elemento dell'immagine" che corrisponde allo spettro delle lunghezze d'onda fluorescenti per ogni pixel dello schermo. Un apposito software assegna uno pseudocolore specifico in base al particolare spettro di fluorescenza indicato.

M-FISH, COBRA-FISH e SKY hanno il vantaggio di permettere di evidenziare anomalie cromosomiche con un solo esperimento. Il limite di queste tecniche è rappresentato dal fatto che non permettono di individuare piccole anomalie intracromosomiche, come le inversioni o di effettuare la determinazione dei breakpoints. Richiedono inoltre metafasi del campione di buona qualità e sono limitate nella risoluzione.

### ***M-FISH (Multiplex-FISH)***

La M-FISH è stata introdotta per la prima volta nel 1996 da Speicher. Il materiale necessario per la buona riuscita dell'esperimento consiste in un comune microscopio a fluorescenza dotato di una serie di filtri che spaziano nell'intervallo di spettri tra 350-770 nm, i quali permettono un alto grado di discernimento tra tutti i possibili fluorocromi e un'elevata sensibilità di acquisizione delle immagini da parte della CCD camera.

Al fine di incrementare il numero di cromosomi identificabili in uno stesso esperimento, sono state ideate regole combinatoriali tali da assegnare un diverso pseudocolore a ciascuna combinazione di fluorescenze emesse da ogni cromosoma. Poiché le combinazioni totali date da un numero di emissioni fluorescenti ( $n$ ) è pari a  $(2^n - 1)$ , basterebbero 5 diversi spettri di emissione per ottenere un numero soddisfacente di combinazioni e poter così assegnare 24 pseudocolori a tutti i cromosomi umani (fig. 1.22).

Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Colour																								
AQUA			X							X	X		X		X					X	X	X	X	X
GREEN				X		X						X	X	X		X	X		X		X	X		
GOLD	X				X				X	X		X		X	X			X	X		X			X
RED		X		X				X	X		X			X	X		X	X		X		X		
CY5					X		X	X		X						X	X	X	X	X			X	

Figura 1.22 Regole combinatoriali alla base della cariotipizzazione in Multicolor-FISH (Vysis Spectra Vision, Abbott).

Attualmente sono utilizzati due diversi protocolli di combinazione di fluorescenze emesse dai seguenti fluorocromi:

- 1) FITC, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy7;
- 2) Spectrum Green, Cy3, Texas Red, Cy5, Cy5.5, Laserpro Infrared 790.

Si è arrivati a condurre esperimenti a 42 colori che evidenziano non i cromosomi interi ma i bracci di questi. Ovviamente, le combinazioni di fluorescenze non sono riconoscibili dall'occhio umano, ma esistono dei software in grado di assegnare ad ogni combinazione uno pseudocolore e successivamente di classificare i cromosomi sulla base di tale colorazione (e non in funzione della morfologia o del bandeggio). Ciò rende necessario ed insostituibile l'apporto umano, in caso di ibridazione non eccellente o di artefatti dovuti all'esperimento o al software utilizzato.

Tale tecnica ha trovato largo impiego nel campo della ricerca soprattutto in ambito tumorale. Infatti è applicata largamente nello studio di molte emopatie maligne che presentano markers soprannumerari o cariotipi complessi (Jalal e Law, 1999; Lee et al., 2001a) e anche nello studio dei tumori solidi (Gunawan et al., 2001).

**Vantaggi.** Questa tecnica assicura un ottimo *rendimento* in quanto permette la simultanea osservazione di tutti i cromosomi metafasici in un singolo esperimento di ibridazione. La *facilità d'impiego* della tecnica e la *rapidità dei tempi di analisi* risultano essere le caratteristiche peculiari di tale metodica.

Limiti. La scarsa risoluzione della M-FISH non permette l'esatta determinazione della banda di origine di un marker cromosomico (se inferiore alle 3 Mb) né l'esatta identificazione dei breakpoints nei riarrangiamenti cromosomici. La tecnica, inoltre, *richiede una buona qualità delle metafasi* da analizzare (cromosomi con discreta morfologia e non sovrapposti) al fine di operare una corretta cariotipizzazione automatica. Un importante limite delle sonde "painting" riguarda *l'insufficiente sensibilità nella definizione dei riarrangiamenti intracromosomici* (duplicazioni e/o delezioni criptiche, inversioni paracentriche e alcune inversioni pericentriche di piccole dimensioni). Per porre rimedio alla scarsa risoluzione della tecnica, sono state sviluppate strategie alternative (cfr§1.10), in grado di evidenziare singole regioni subcromosomiche tramite pseudobandeaggio di bande e sottobande.

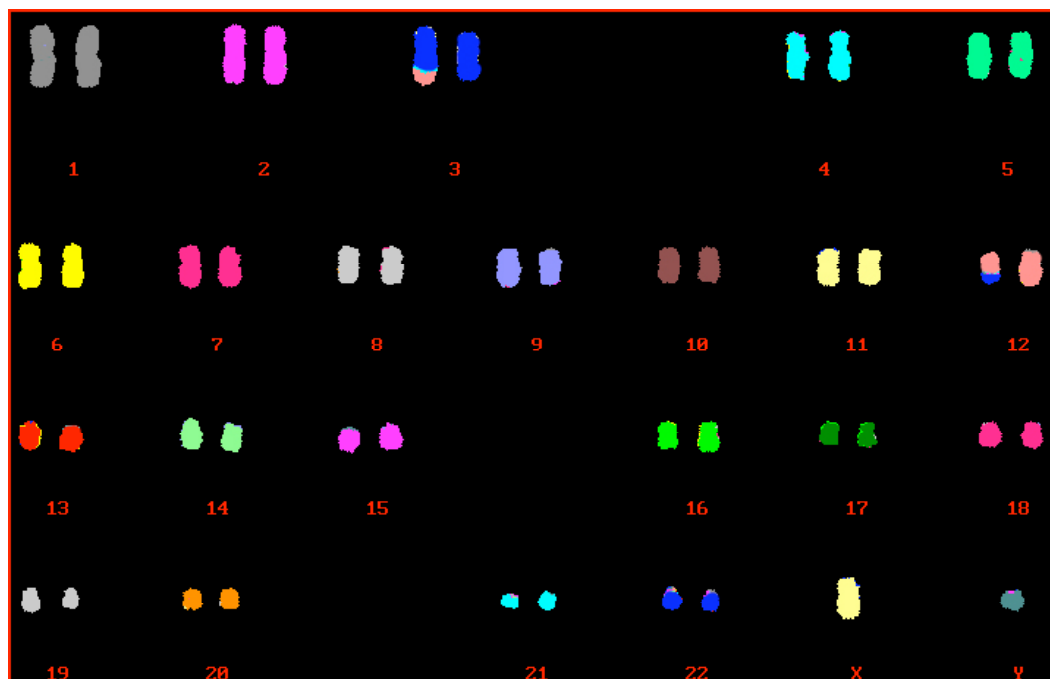


Figura 1.23 Esempio di cariotipo pseudocolorato in Multicolor-FISH con traslocazione t(3; 12).

### ***RX-FISH (cross species color banding)***

Si tratta di una variante della Multiplex FISH che presenta una minore complessità di colorazione ma una maggiore risoluzione del bandeaggio (Muller et al., 1997 e 1998). Le sequenze di DNA di uomo e di primati mostrano lunghe regioni di omologia, per es. il DNA di gibbono presenta più del 98% di omologia col DNA umano. I cromosomi derivanti da due specie di gibbono vengono marcati con 3 diversi fluorocromi e fatti ibridare su tutti i cromosomi umani, evidenziando così un pattern di bande nell'uomo che rivela i riarrangiamenti strutturali avvenuti nel corso dell'evoluzione.

I vantaggi che questa tecnica presenta sono quelli di potere individuare e caratterizzare riarrangiamenti intracromosomici e definire con più immediatezza e precisione eventuali punti di rottura (vantaggi di gran lunga superiori a quelli offerti dalla Multiplex-FISH e SKY-FISH). Ovviamente, complessi riarrangiamenti strutturali tipici dei tumori sono di difficile rilevazione anche attraverso l'impiego della RX-FISH. Aumentando il numero dei fluorocromi si otterrebbe anche un incremento della risoluzione e del numero delle bande. Nonostante questi limiti, la RX-FISH è applicata con successo nello studio di emopatie maligne (Zhao et al., 2000) e di tumori solidi (Micci et al., 1999) anche se questa metodica trova la sua piena realizzazione in studi evolutivi sui primati (Muller e Wienberg, 2001) (fig. 1.24).



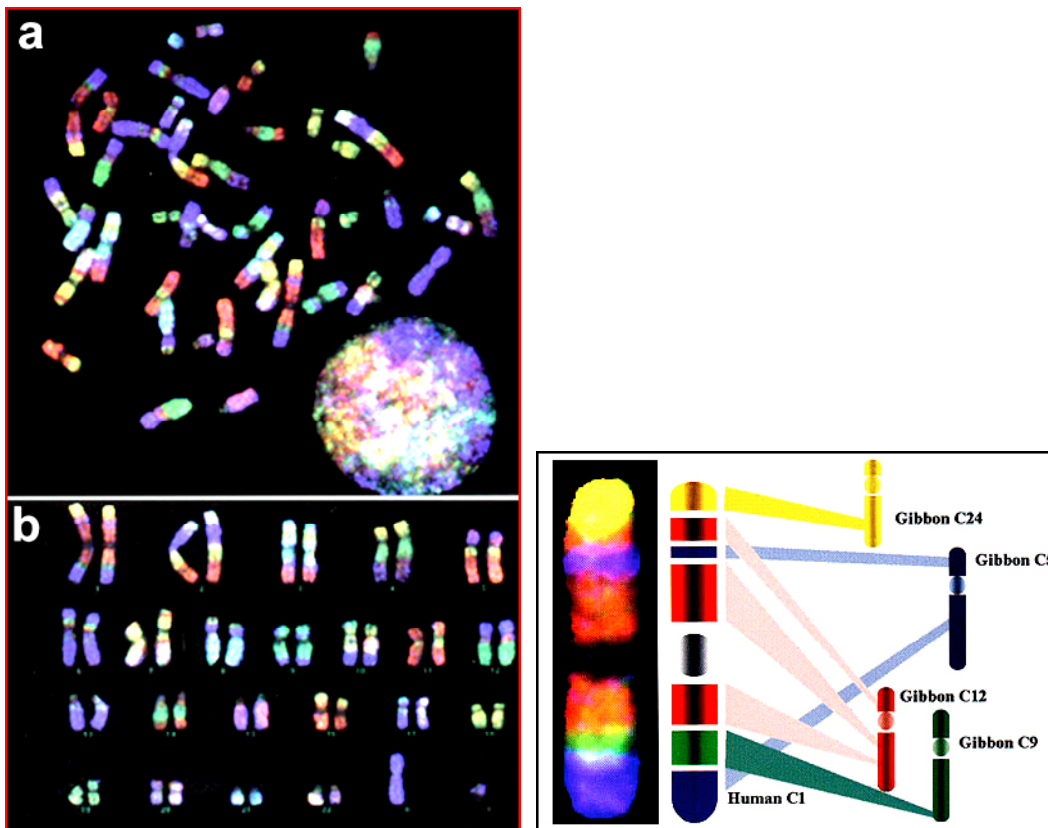


Figura 1.24 A sinistra: a) metafase e b) cariogramma di cromosomi umani pseudocolorati in bande; a destra: esempio di combinazione di sonde PCP di Gibbone su HSA.

### ***COBRA-FISH (Combined Binary Ratio labeling)***

Questa tecnica è una versione della Multiplex FISH leggermente modificata al fine di incrementare la sua molteplicità di funzioni. Essa si basa sull'uso simultaneo di colorazione combinatoriale (Nederlof et al., 1989) e rapporto di colorazione (Nederlof et al., 1990). Sono richiesti solo quattro fluorocromi, di cui tre (DEAC, Cy3, Cy5) utilizzati per definire il rapporto di colorazione in un primo gruppo di 12 sonde WCP umane. Il secondo gruppo, delle altre 12 sonde WCP umane, è marcato allo stesso modo del primo, ma in più è attribuito un colore binario, ossia un quarto fluorocromo (Fluoresceina) (fig. 1.26).

La COBRA-FISH è stata utilizzata con successo per pseudocolorare il cariotipo e mappare il sito di integrazione del virus umano del papilloma in una linea di cellule SiHa.

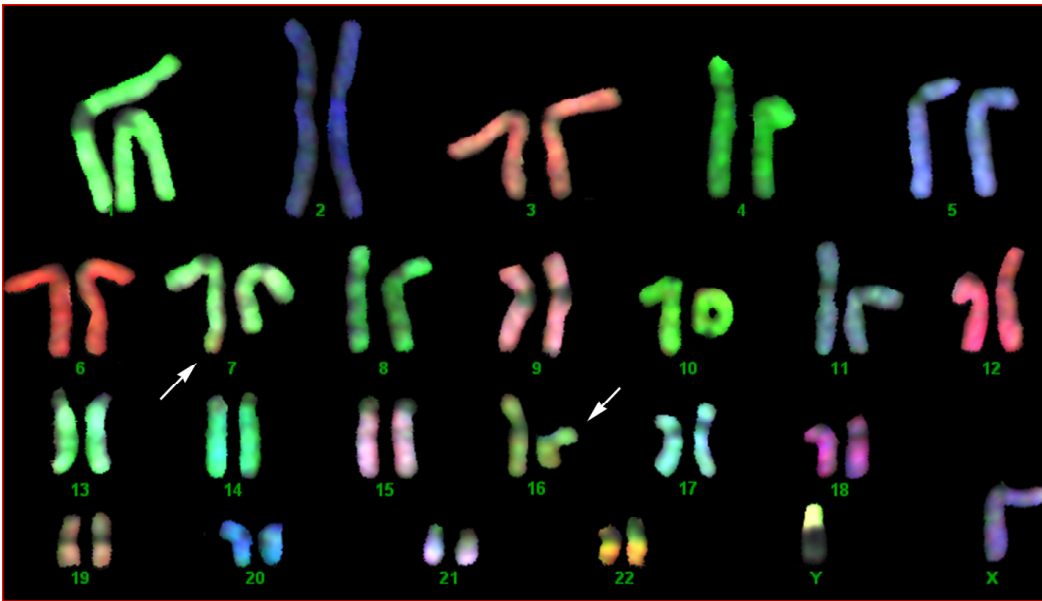


Figura 1.26 Esempio di cariotipo in COBRA FISH di una metafase con traslocazione t(7; 16).

### ***MCB (Multi Color high resolution Bar coding o Banding)***

L'approccio della multicolor-banding segue la differenziazione di regioni specifiche dei cromosomi in bande e sotto-bande ed è basata sull'utilizzo di librerie di sequenze specifiche, ottenute per microdissezione, le quali producono un rapporto di intensità di fluorescenza che cambia lungo tutto il cromosoma (Chudoba et al., 1999; Fauth et al., 2001). Le sonde PCP specifiche per i diversi cromosomi mostrano una graduale e decrescente intensità dal centro verso le estremità. Le intensità delle regioni di sovrapposizione tra sonde adiacenti sono tradotte in rapporti di colorazione che presentano variazioni lungo tutto il cromosoma. Tali rapporti e variazioni vengono quantificati da un software e successivamente le regioni dei cromosomi sono pseudocolorate a seconda delle diverse bande e sotto-bande.

Questo tipo di analisi permette una risoluzione maggiore delle regioni specifiche per ciascun cromosoma umano. Liehr e colleghi (2002) hanno caratterizzato un gruppo di 138 librerie di regioni specifiche ottenute per microdissezione per l'intero genoma umano. Come risultato, la MCB risolve il genoma in circa 450-550 livelli di bande. Sicuramente, più di altre tecniche la MCB permette di caratterizzare riarrangiamenti cromosomici complessi, soprattutto nei casi di tumori (fig.1.27).



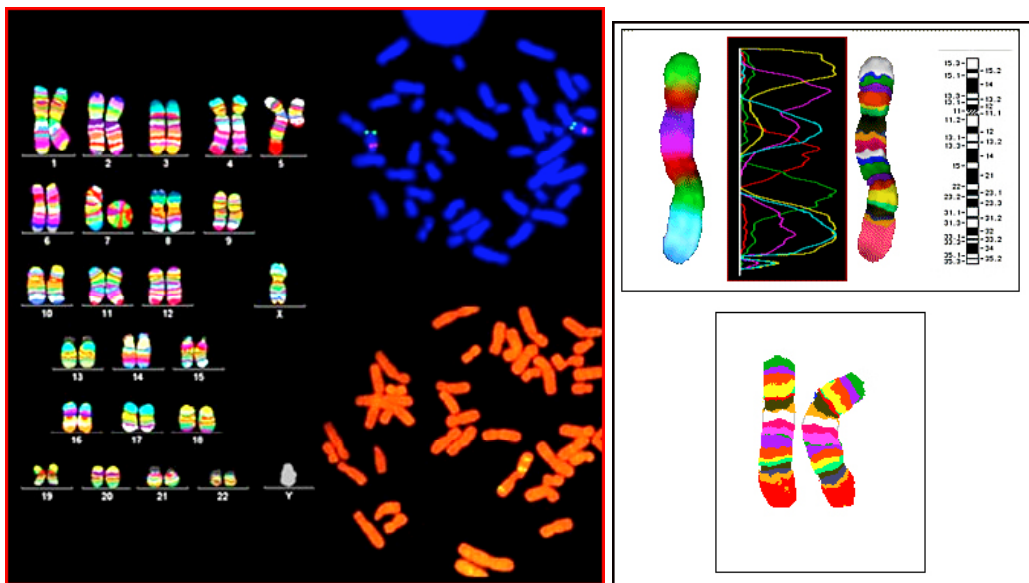


Figura 1.27 A sinistra metafase e cariogramma pseudobandegeggiato; a destra esempio di pseudocolorazione.

### ***SKY-FISH (Spectral Karyotyping)***

In contrapposizione agli approcci citogenetico-molecolari basati sull'uso di diversi filtri per l'emissione di fluorescenza (a seconda del fluorocromo utilizzato per marcare le sonde), nel 1996 Schröck e colleghi introdussero un nuovo ed innovativo metodo di analisi dei cromosomi, basato sulla costruzione di un'immagine spettrale che si realizza con l'applicazione della tecnica della spettroscopia e la simultanea misurazione dell'intero spettro di emissione di fluorescenza di ciascun pixel dell'immagine (Malik et al., 1996).

La luce di eccitazione è prima trasmessa attraverso un filtro, poi è riflessa attraverso il preparato e la fluorescenza emessa da questo viene collimata dal microscopio, deviata attraverso un interferometro Sagnac e acquisita mediante una CCD camera. L'immagine spettrale della metafase che se ne ricava è misurata con la SpectraCube<sup>TM</sup> ed analizzata con un apposito algoritmo SKY implementato nel software SkyView<sup>TM</sup>. Usando la PCR per amplificare il DNA delle sonde WCP umane, ognuna di queste viene marcata con un fluorocromo che emette un differente spettro di fluorescenza; il sistema SKY, ad alta risoluzione spettrale, può così identificare ed evidenziare tutti i pixels dell'immagine, attribuendo selettivamente a ciascuno di essi uno pseudocolore (fig.1.28).

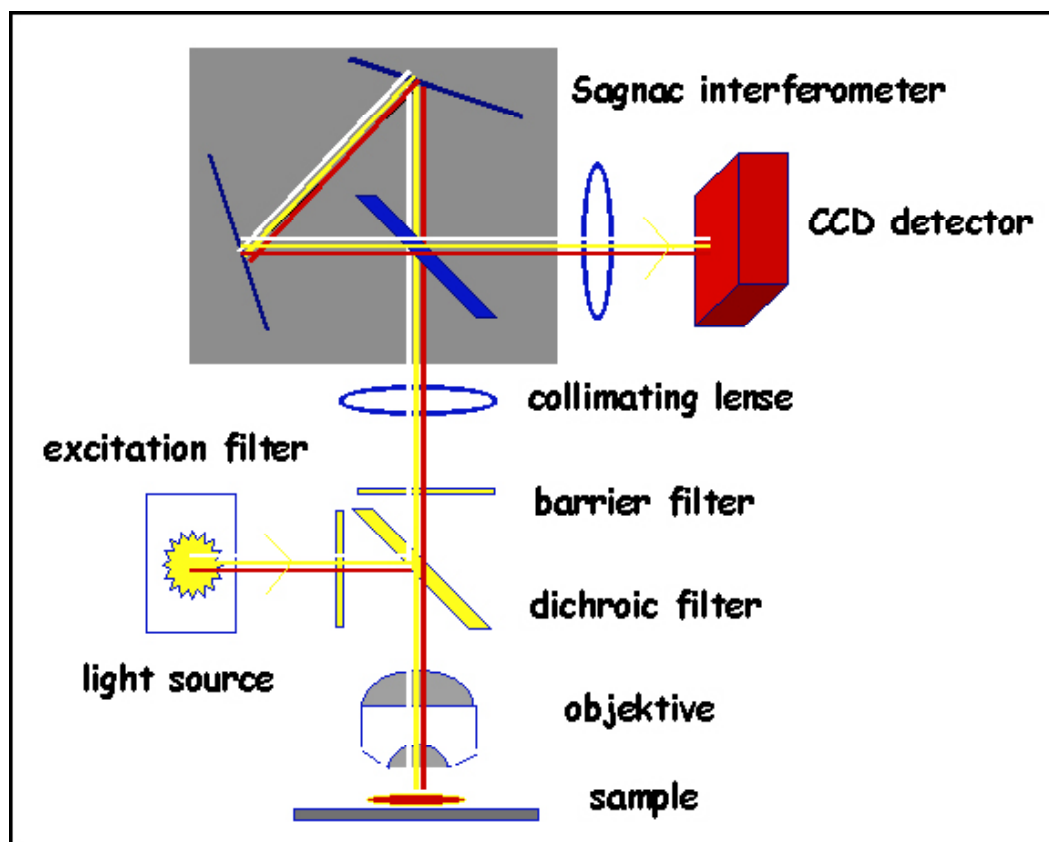


Figura 1.28 Rappresentazione schematica del meccanismo di acquisizione dell'immagine spettrale di una metafase tramite SKY.

Tale tecnica combina la risoluzione e la potenza della FISH con i vantaggi dei metodi di citogenetica classica di discriminare simultaneamente tutti e 24 i tipi di cromosomi umani in un singolo esperimento. Inoltre, la SKY-FISH può essere applicata a vari tipi di preparati cromosomici (non solo cellule fissate) ed è utilizzata in citogenetica clinica per determinare e caratterizzare aberrazioni numeriche e strutturali, traslocazioni complesse, dmin, hsr, piccoli markers sovranumerari, rings, etc. Nei casi di emopatie maligne, la SKY contribuisce al riconoscimento di riarrangiamenti nascosti, ma essa è utilizzata anche per lo studio di tumori solidi. I limiti che tale metodica presenta sono pressappoco gli stessi della Multiplex-FISH (fig. 1.29).

# PAINTING THE HUMAN CHROMOSOME (Spectral Karyotyping) NORMAL CELLS

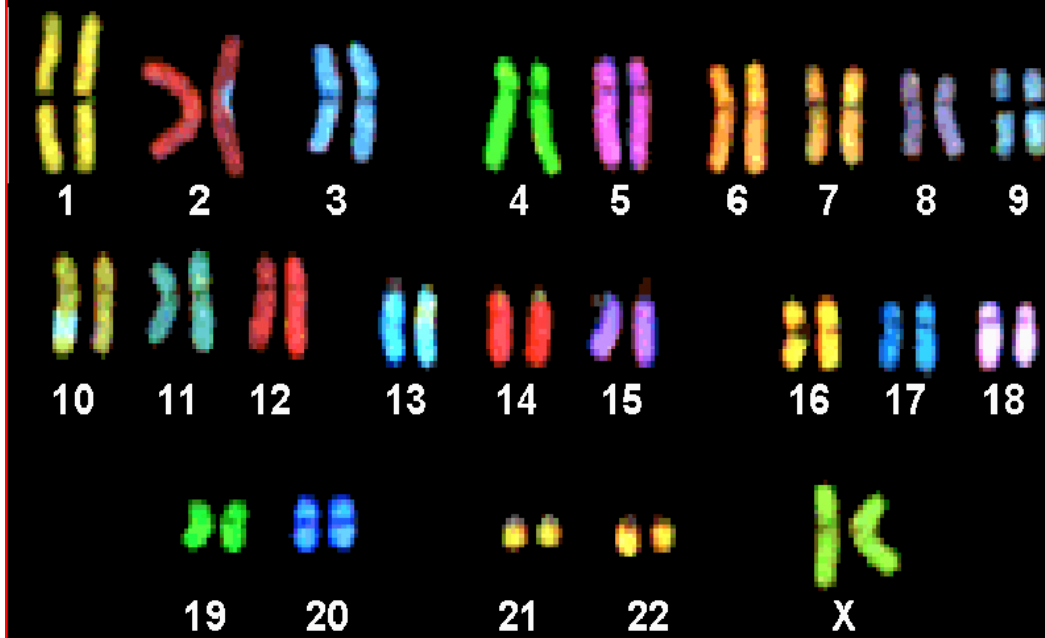


Figura 1.29 Esempio di un cariotipo di una metafase normale ottenuto con la tecnica SKY.

# ESEMPI DI CASI ANALIZZATI MEDIANTE MULTICOLOR-FISH E FISH CON SONDE PUNTIFORMI

## CASO #2

### *Caratterizzazione citogenetica mediante Multicolor-FISH*

L'analisi di M-FISH su cellule ottenute da prelievo midollare di questo paziente ha confermato la presenza di una traslocazione bilanciata  $t(3;12)$  (figg. 4.9 e 4.10), come già osservato dall'analisi di citogenetica classica eseguita nel laboratorio di provenienza del campione.

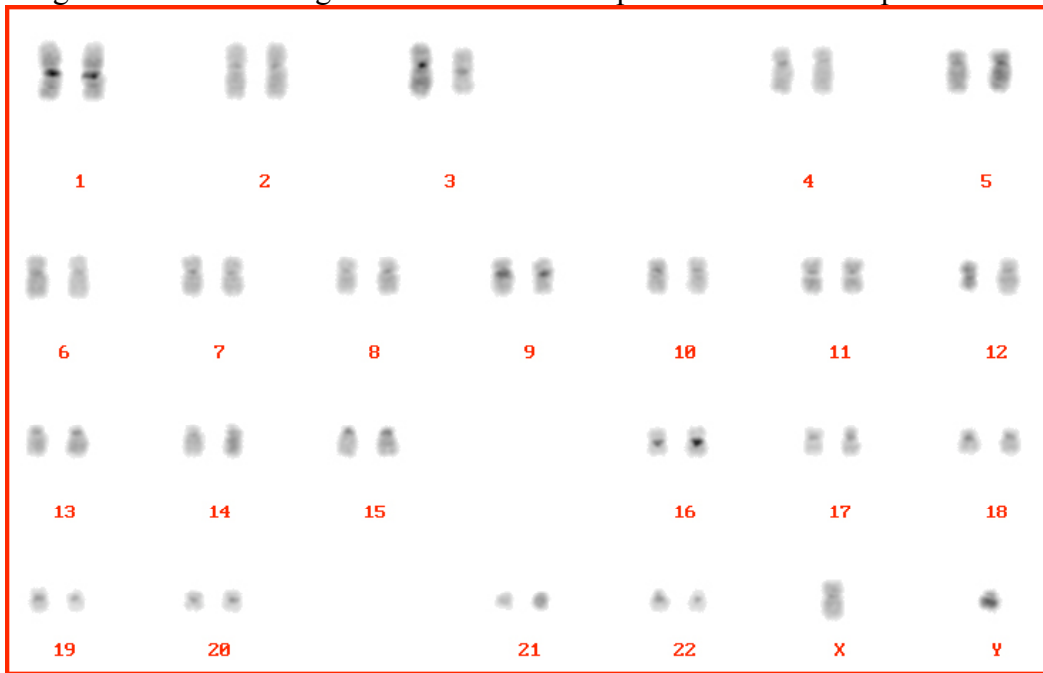


Figura 4.9 Metafase della figura 4.10 in DAPI invertito.

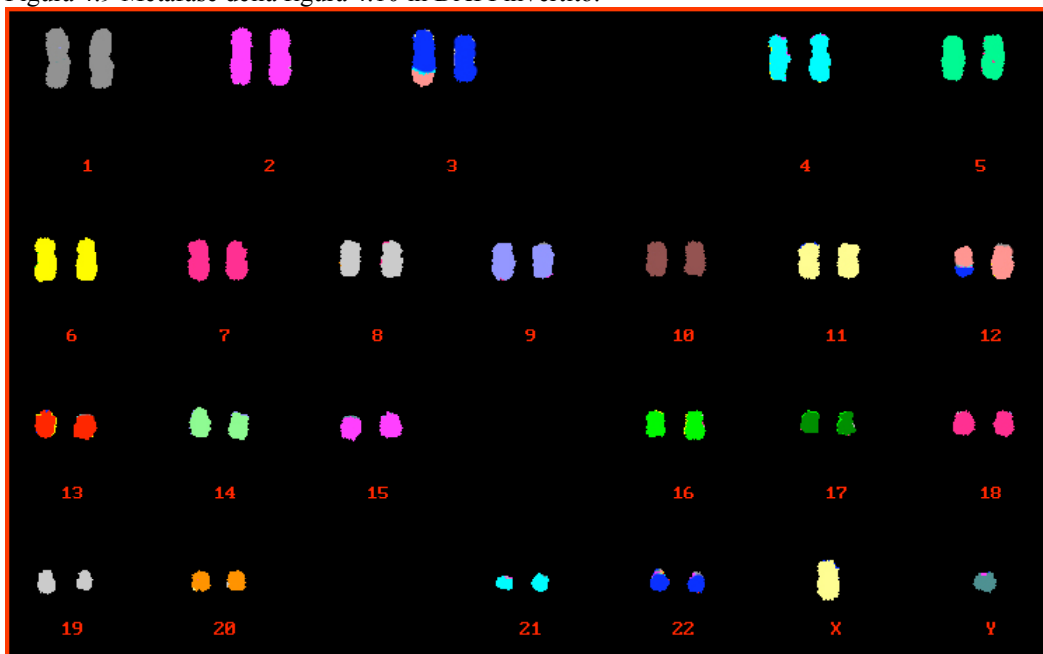


Figura 4.10 Cariotipo di una metafase del caso #2 con traslocazione  $t(3;12)$  pseudocolorato secondo le regole combinatoriali della sonda SpectraVysion (Abbott) usata nella Multicolor-FISH.

### ***Caratterizzazione citogenetica mediante FISH con sonde puntiformi***

Sulla base dell'indicazione del cariotipo fornito dal laboratorio in cui è stata eseguita l'analisi citogenetica classica, sono stati effettuati diversi esperimenti di FISH con cloni delle bande 12q14 e 3q26 (cfr. § tabelle 3.3 e 3.4).

Per brevit  riportero' di seguito i risultati piu' significativi.

I BAC che hanno dato segnale di splitting sia sul cromosoma der(3) che der(12), oltre ai segnali sui cromosomi 3 o 12 normali, sono stati rispettivamente RP11-466C5 e RP11-366L20 (fig. 4.11).

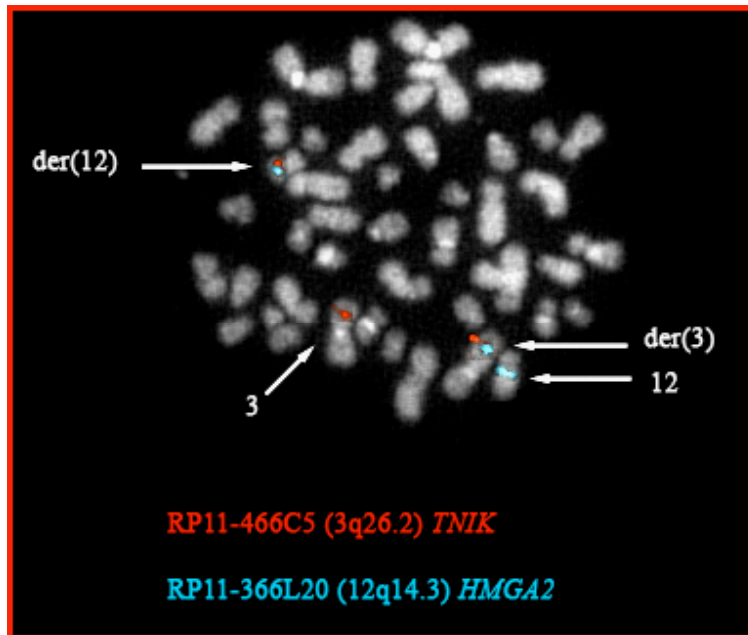


Figura 4.11 Coibridazione delle sonde che mostrano segnale di splitting sia sul braccio lungo del cromosoma 3 che sul braccio lungo del cromosoma 12: in rosso RP11-466C5 (che copre parte della sequenza del gene *TNIK*) e in blu RP11-366L20 (che copre parte del gene *HMGA2*).

Consultando il database UCSC è stato possibile evidenziare all'interno della sequenza dei cloni impiegati nella FISH i geni *TNIK* (*TRAF2 and NCK interacting kinase*) e *HMGA2* (*high mobility group AT-hook 2 isoform a*) rispettivamente sui cromosomi 3 (q26.2: 172,264,371-172,660,554) e 12 (q14.3: 64,504,506-64,646,335) (figg. 4.12-4.13).

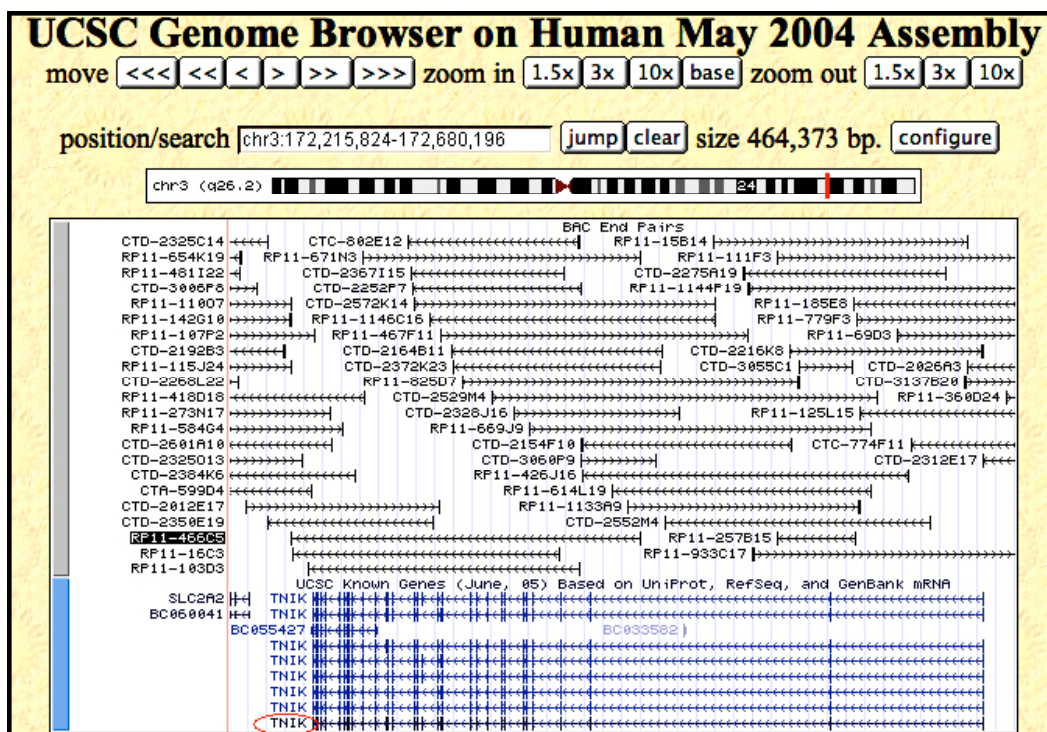


Figura 4.12 Immagine della pagina web di UCSC che indica la posizione di mappa del gene *TNIK* (cerchiato in rosso) sul cromosoma 3 e i BAC che coprono tale regione, tra cui RP11-466C5 (evidenziato in nero).

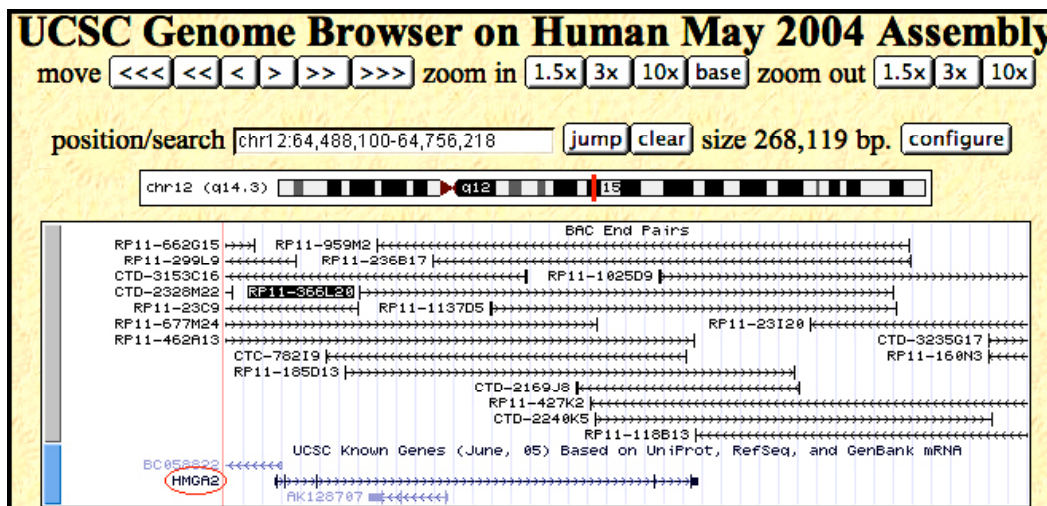


Figura 4.13 Immagine della pagina web di UCSC che indica la posizione di mappa del gene *HMG2* (cerchiato in rosso) sul cromosoma 12 e i BAC che coprono tale regione, tra cui RP11-366L20 (evidenziato in nero).

Ulteriori dati di conferma sulla posizione dei breakpoints si sono ottenuti mediante successivi esperimenti di FISH effettuati con cloni localizzati nelle regioni parzialmente sovrapposte a quelle in cui mappano i BAC RP11-466C5 e RP11-366L20 (fig. 4.14).



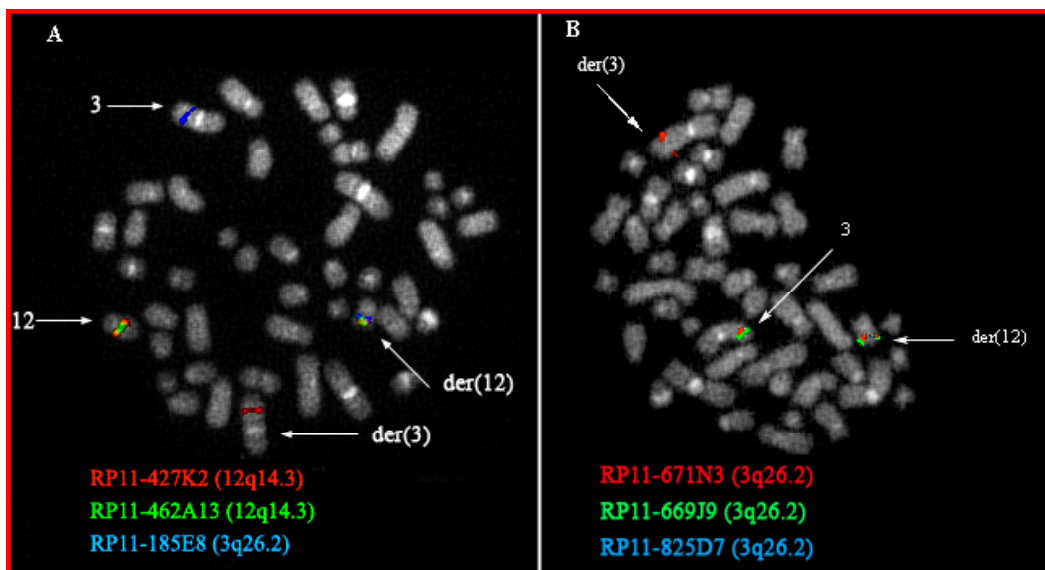


Figura 4.14 Esperimenti di coibridazione utilizzando BAC localizzati su 3q e 12q al fine di confermare i precedenti risultati ottenuti. In A: coibridazione dei BAC RP11-427K2, RP11-462A13 e RP11-185E8; in B: coibridazione dei BAC RP11-671N3, RP11-669J9 e RP11-825D7.

### ***Caratterizzazione citogenetica mediante FISH con sonde ottenute tramite LONG-PCR***

Al fine di mappare in maniera fine il punto di rottura all'interno del gene *TNIK*, nel nostro laboratorio sono stati ottenuti prodotti di LONG-PCR corrispondenti a frammenti contigui del clone RP11-466C5, da utilizzare successivamente in esperimenti di FISH sul campione del paziente in esame. Essendo questi frammenti di dimensioni non superiori a 20 Kb, per ottenere dei segnali visibili in FISH è stato necessario marcare in pool più prodotti di LONG-PCR. Infatti, poiché esperimenti preliminari di FISH eseguiti ibridando prodotti singoli di LONG-PCR avevano mostrato l'impossibilità di ottenere segnali chiaramente visibili, si è proceduto ibridando prima due pool di tre frammenti di LONG-PCR ciascuno e poi (in base ai risultati ottenuti e non mostrati qui di seguito) contemporaneamente da quattro frammenti denominati TN2, TN3, TN4, TN7 (dove TN sta per *TNIK*). Nella figura 4.15 sono riportati i sei frammenti ottenuti inizialmente per LONG-PCR e la corrispettiva posizione di mappa lungo il cromosoma 3.

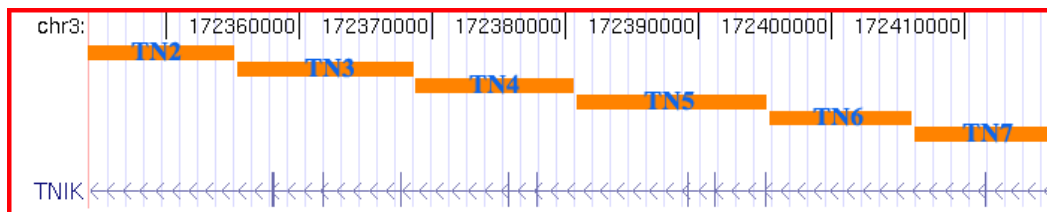


Tabella 4.15 Immagine rappresentativa della posizione di mappa sul gene *TNIK* dei frammenti ottenuti per LONG-PCR, tra cui i quattro marcati in pool grazie ai quali è stato possibile localizzare il punto di rottura sul cromosoma 3.

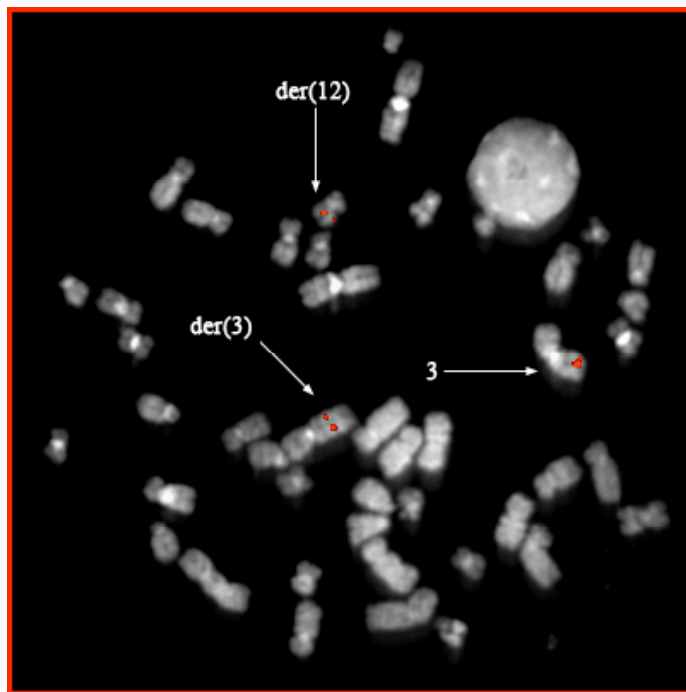


Figura 4.16 Esperimento di ibridazione con prodotti di LONG-PCR, corrispondenti a porzioni del gene *TNIK*, in pool.

Il risultato ottenuto ha permesso di localizzare il breakpoint sul cromosoma 3 all'interno della regione corrispondente ai prodotti di LONG-PCR.

#### ***Discussione dei risultati: CASO #2***

Il caso #2 è caratterizzato dalla traslocazione bilanciata e reciproca  $t(3;12)$ . I cromosomi coinvolti nel riarrangiamento si scambiano una porzione del braccio lungo. I punti di rottura cadono all'interno delle bande 3q26.2 e 12q14, rispettivamente nei loci in cui mappano i geni *TNIK* (sul cromosoma 3) e *HMG42* (sul cromosoma 12).

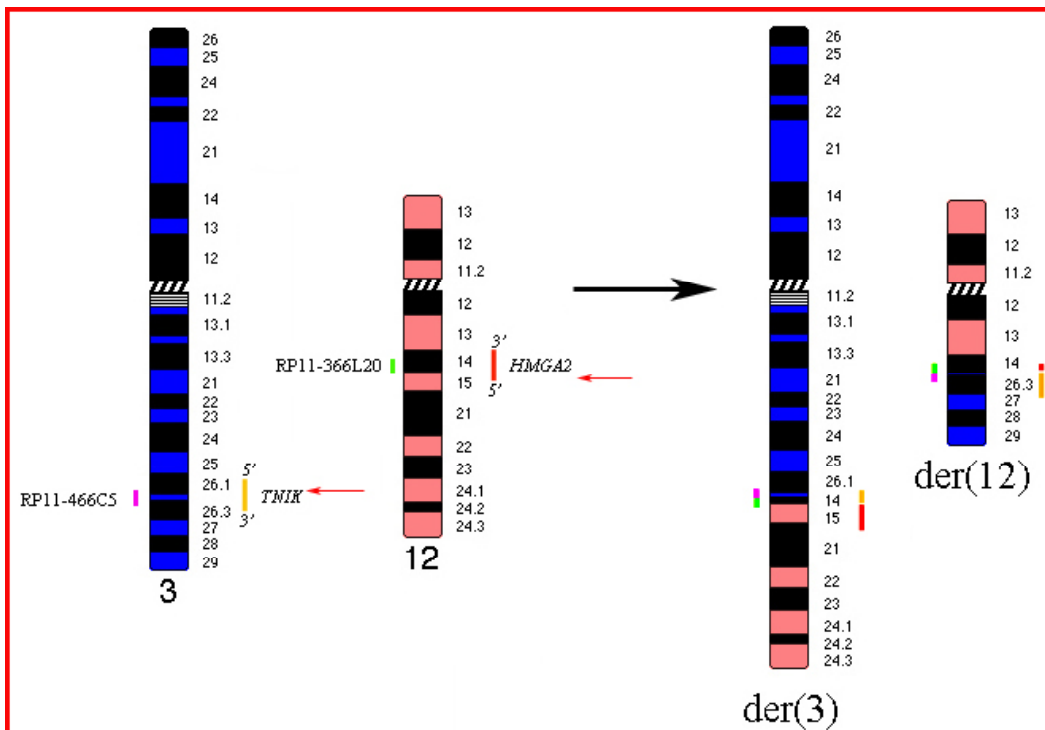


Figura 5.3 Rappresentazione schematica della probabile origine di formazione dei due cromosomi derivativi osservati nel caso #2: a seguito delle rotture (indicate dalle frecce rosse) si originano i cromosomi derivativi e le conseguenti regioni di fusione dei loci rispettivamente nelle bande 3q26.2 e 12q14.

Secondo lo schema proposto nella figura 5.3, i breakpoints a livello dei due bracci lunghi dei cromosomi 3 e 12 rappresentano l'evento primario per l'insorgenza della neoplasia.

I punti di rottura cadono rispettivamente:

- sul cromosoma 3, nell'esone 9 del gene *TNIK*,
- sul cromosoma 12, nella regione 3'UTR del gene *HMGA2*.

La figura 5.4 mostra, attraverso una rappresentazione schematica, le regioni e l'organizzazione dei geni a livello dei quali avvengono le rotture e successive fusioni.

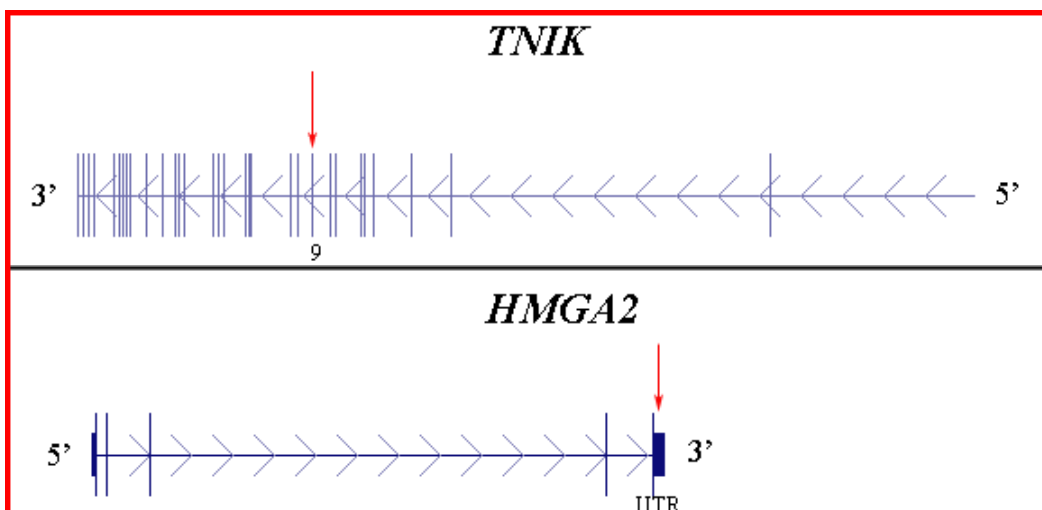


Figura 5.4 Rappresentazione schematica dei geni *TNIK* e *HMGA2* e dell'organizzazione delle regioni contenenti esoni, introni e UTR: le frecce rosse indicano le regioni in cui cadono i punti di rottura.

I dati riguardanti le rotture e le fusioni tra i due loci cromosomici sono stati ottenuti attraverso approcci

molecolari da un altro operatore del laboratorio in cui ho svolto il mio lavoro di tesi. Tali risultati sono presentati esclusivamente allo scopo di confermare il coinvolgimento nella traslocazione delle regioni in cui si localizzano i due geni. Inoltre, sono attualmente in corso ulteriori indagini molecolari riguardanti l'analisi di espressione.

Dai risultati ottenuti da me mediante caratterizzazione in FISH e conseguiti dall'analisi di tipo molecolare eseguita in laboratorio, si evince che non si ha come prodotto di fusione un gene chimerico, poiché il gene *HMG2* non viene intaccato nelle sue sequenze codificanti, mentre il gene *TNIK* è interrotto circa a metà della sua lunghezza.

## CASO #4

### *Caratterizzazione citogenetica mediante Multicolor-FISH*

Mediante analisi di citogenetica classica, effettuata nel laboratorio di provenienza del campione era stata precedentemente individuata la trisomia del cromosoma 11, l'assenza di un cromosoma 12 normale e la presenza di un marker di grandi dimensioni, costituito essenzialmente dal cromosoma 12. L'utilizzo della Multicolor-FISH, oltre a confermare la trisomia del cromosoma 11, ha permesso di chiarire la struttura e l'origine cromosomica del marker ovvero un der(12)t(1;12) generato in seguito ad una traslocazione sbilanciata t(1;12) (figg. 4.24 e 4.25).

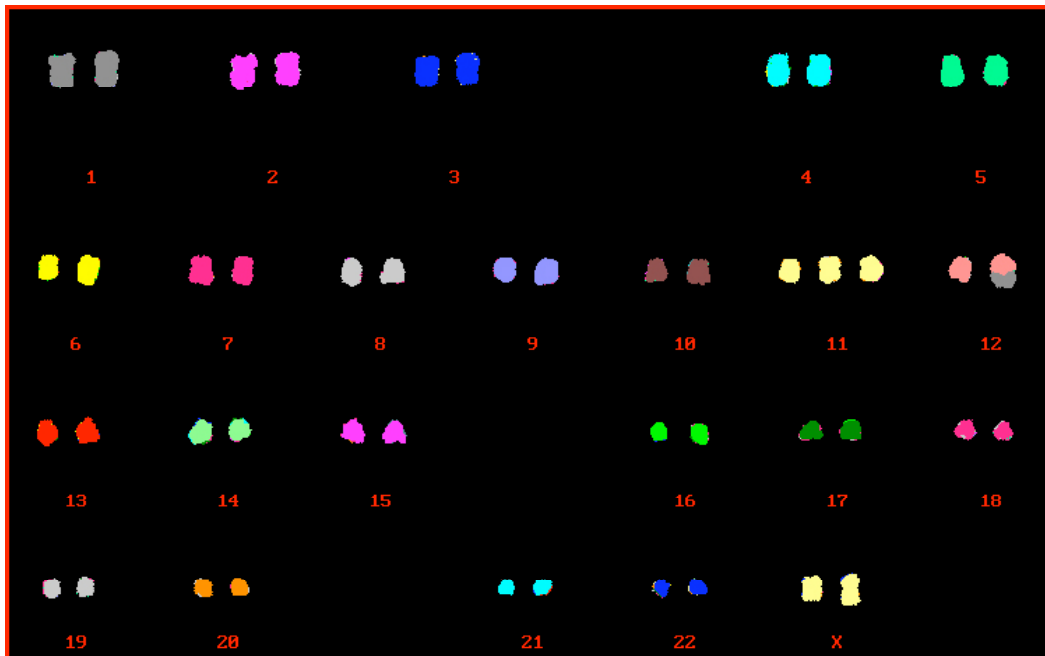


Figura 4.24 Cariotipo pseudocolorato di una metafase del caso #4: si nota la presenza della trisomia 11 e del cromosoma der(12)t(1;12).



Figura 4.25 Stessa metafase della figura 4.24 in DAPI invertito: il marker è facilmente distinguibile per dimensioni e morfologia.

Al fine di caratterizzare più in dettaglio il cromosoma marker, si sono resi necessari esperimenti di FISH con sonde WCP/PCP e sonde subtelomeriche specifiche per il braccio lungo del cromosoma 12.

#### ***Caratterizzazione citogenetica mediante FISH con sonde WCP/PCP e sonde alfoidi***

La coibridazione di sonde WCP specifiche per i cromosomi 1 e 12 e delle sonde alfoidi per i cromosomi 11 e 12 ha confermato la traslocazione t(1;12) e la trisomia del cromosoma 11 precedentemente identificate tramite Multicolor-FISH (fig. 4.26).

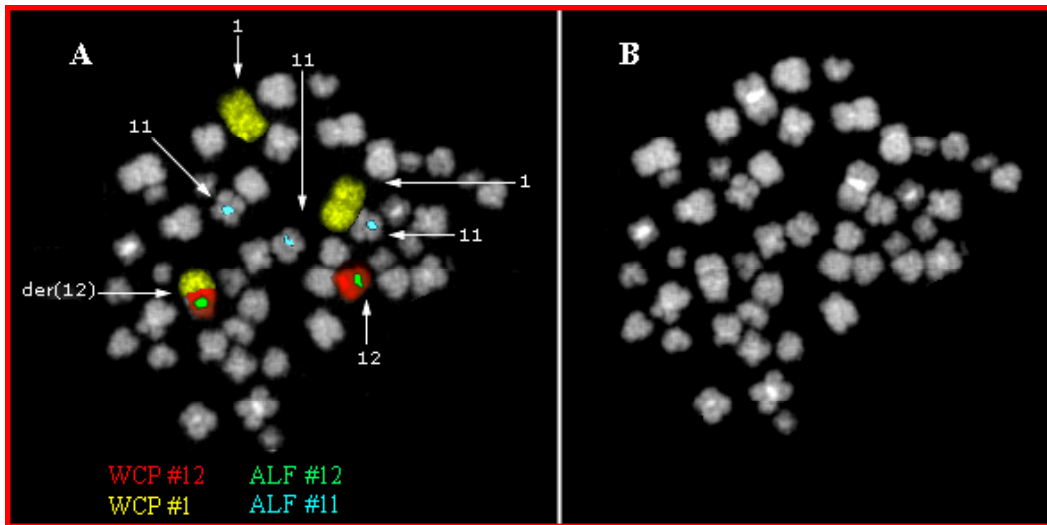


Figura 4.26 In A) coibridazione delle sonde WCP per i cromosomi 1 e 12 e sonda alfoide per i cromosomi 11 e 12; in B) stessa metafase colorata in DAPI.

#### ***Caratterizzazione citogenetica mediante FISH con sonde subtelomeriche specifiche***

Nel primo esperimento di FISH con sonde puntiformi si è condotta un'ibridazione con sonde subtelomeriche specifiche per il braccio corto (RP11-902P8) e per il braccio lungo (RP11-438F14) del cromosoma 1 e per il braccio lungo del cromosoma 12 (RP11-452D11), al fine di comprendere quale parte del cromosoma 1 fosse traslocata sul cromosoma 12 e se ci fosse la delezione della regione 12qter.

L'ibridazione della sonda subtelomerica RP11-452D11 ha confermato che la regione subtelomerica del cromosoma 12 rimane integra in seguito al riarrangiamento che determina esclusivamente la giustapposizione di una porzione del braccio lungo del cromosoma 1 (fig. 4.27).



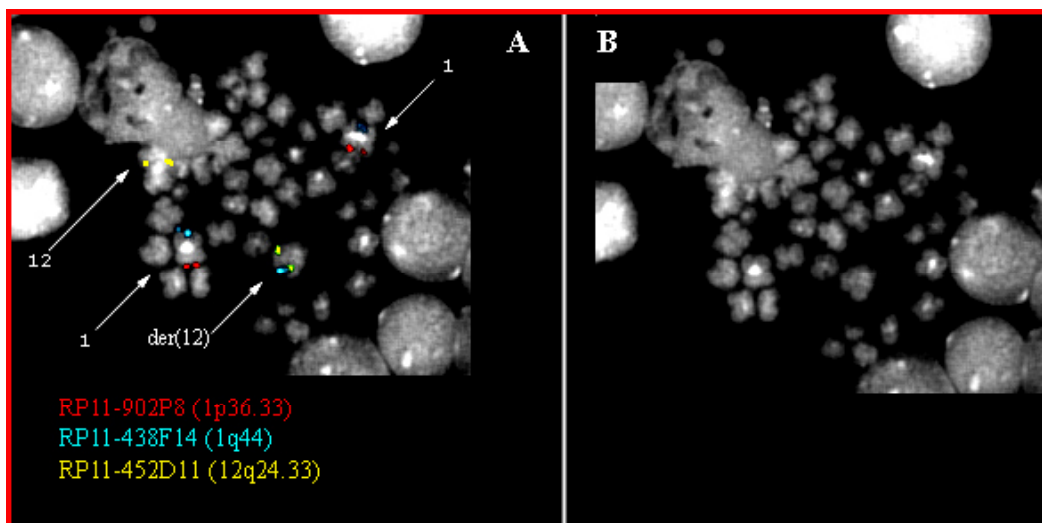


Figura 4.27 In A) Coibridazione di sonde subtelomeriche specifiche per i cromosomi 1 (entrambi i bracci) e 12 (braccio lungo), rispettivamente RP11-902P8 (1p36.33), RP11-438F14 (1q44) e RP11-452D11 (12q24.33): il cromosoma der(12) risulta positivo per i cloni subtelomerici del braccio lungo dei cromosomi 1 e 12; in B) stessa metafase colorata in DAPI.

In corrispondenza di questa regione, grazie alla consultazione del database UCSC, sono stati individuati diversi geni codificanti proteine zinc finger (*ZNF26*, *ZNF84*, *ZNF140*) (fig.4.28).

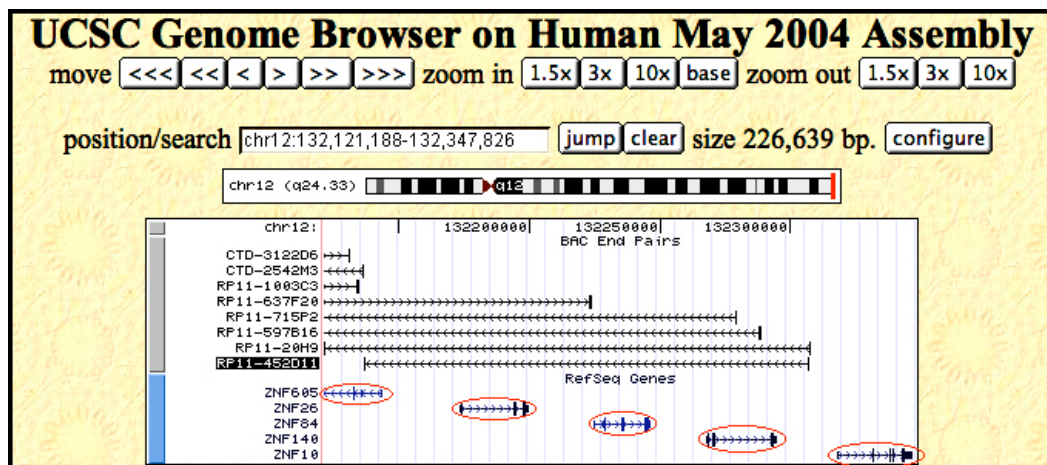


Figura 4.28 Immagine della pagina web di UCSC raffigurante la posizione di mappa della sonda subtelomerica del 12q RP11-452D11 e la presenza delle sequenze codificanti per i geni zinc finger (cerchiati in rosso).

### ***Caratterizzazione citogenetica mediante FISH con sonde puntiformi***

Gli esperimenti di FISH con sonde puntiformi sono stati condotti al fine di verificare l'estensione della regione del cromosoma 1 traslocata sul cromosoma der(12).

Poiché si tratta di una regione di grandi dimensioni, inizialmente si è proceduto selezionando, previa consultazione del database informatico "Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology" (<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/>) che riporta tutti i geni noti coinvolti in patologie tumorali, cloni BAC specifici per geni spesso coinvolti in riarrangiamenti cromosomici nelle leucemie. I geni considerati in questa prima fase sono: *ARNT* (1q21.2), *PPAL4* (1q21.1-2) e *LOC440686* (1q21.1). I cloni BAC corrispondenti a questi loci sono rispettivamente: RP11-95N5 (chr1:147,522,291-147,672,875), RP11-65G1 (chr1:146,365,566-146,529,432) e RP11-160L8 (chr1:146,051,561-146,248,741) (fig. 4.29).

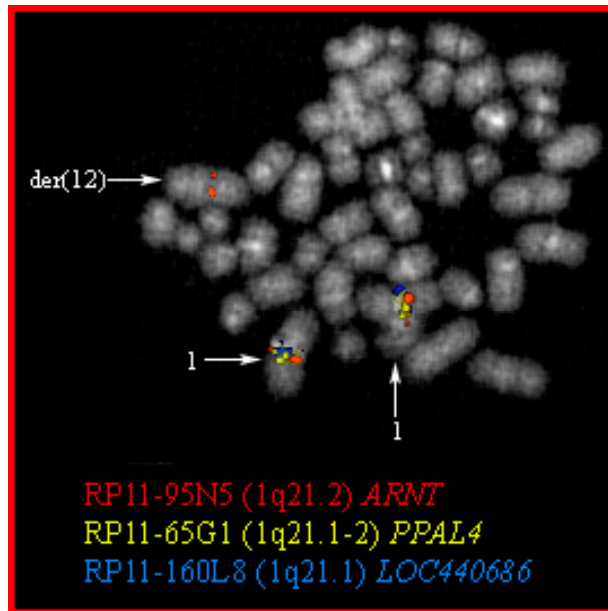


Figura 4.29 Coibridazione di BAC corrispondenti a geni noti, frequentemente coinvolti in tumori ematologici: RP11-95N5 per il gene *ARNT*, RP11-65G1 per il gene *PPAL4*, RP11-160L8 per il gene *LOC440686*.

Come, però, si può notare dalla figura 4.29, la sonda RP11-95N5 ha dato segnale di ibridazione sui due cromosomi 1 e sul der(12), mentre gli altri due cloni hanno mostrato segnale di ibridazione solo sui cromosomi 1. Pertanto, negli esperimenti successivi di FISH, sono stati scelti BAC più centromerici rispetto a RP11-65G1 e RP11-160L8 e più telomerici rispetto a RP11-95N5.

I cloni che hanno permesso di mappare il breakpoint sul braccio lungo del cromosoma 1 sono stati RP11-125H17 e RP11-171P5, entrambi localizzati nella regione 1q21.2 e tra loro sovrapposti (fig. 4.30).

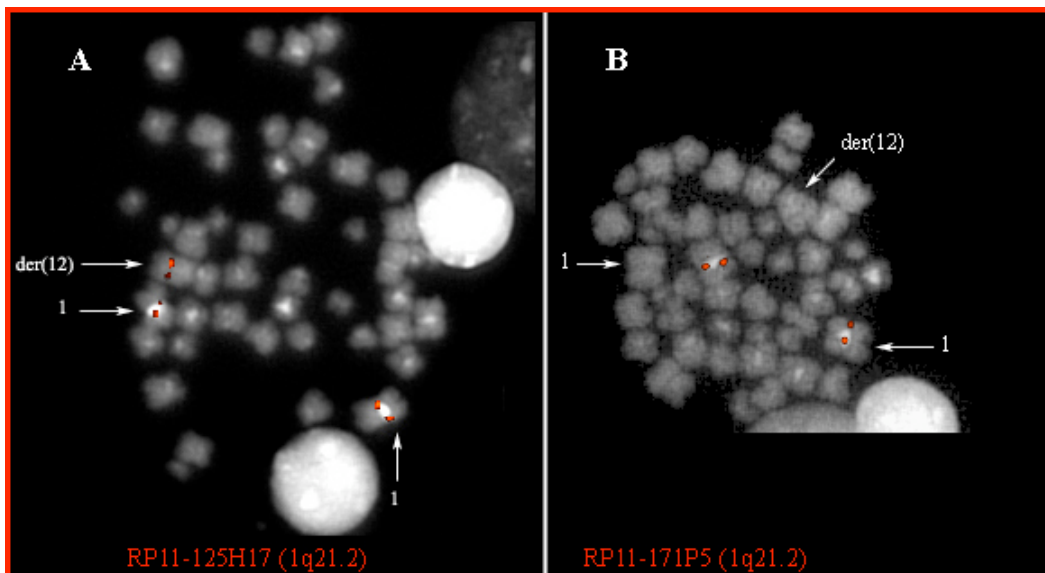


Figura 4.30 In A) ibridazione del BAC RP11-125H17 che mostra segnali di ibridazione sui cromosomi 1 e der(12); in B) ibridazione del BAC RP11-171P5 che mostra segnale di ibridazione solo sui cromosomi 1.

Consultando il database UCSC, si osserva che all'interno della regione in cui è localizzato il breakpoint del braccio lungo del cromosoma 1 mappano due geni: *MRPS21* (*mitochondrial ribosomal protein S21*)

e *PRPF3* (*PRP3 pre-mRNA processing factor 3 homolog*), gene che codifica per un fattore proteico coinvolto nel meccanismo di splicing (fig. 4.31).

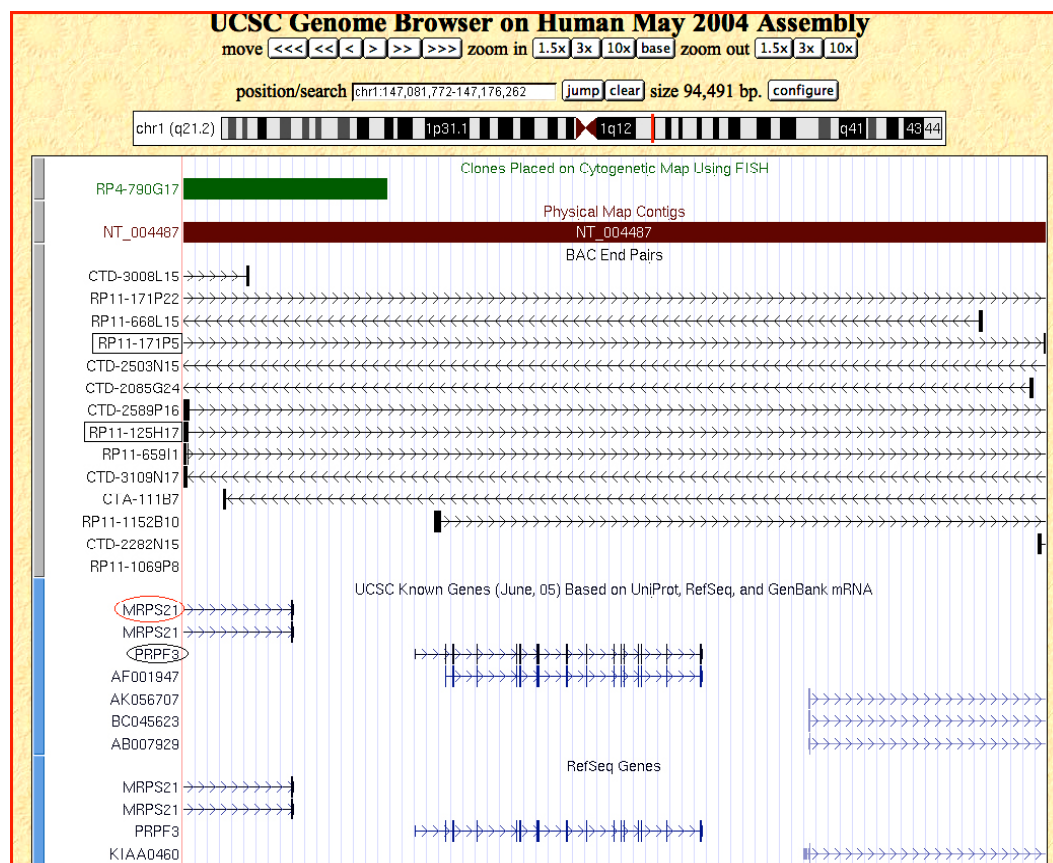


Figura 4.31 Immagine della pagina web di UCSC raffigurante la regione del breakpoint sul braccio lungo del cromosoma 1: all'interno della regione sono presenti i due geni *MRPS21* e *PRPF3* (cerchiati in rosso e nero rispettivamente) e parte delle sequenze dei BAC RP11-171P5 e RP11-125H17 (indicati con riquadri neri).

#### **Discussione dei risultati: CASO #4**

Il caso #4 presenta una trisomia del cromosoma 11 e la traslocazione sbilanciata e non reciproca  $t(1;12)$  che determina una parziale trisomia del braccio lungo del cromosoma 1 che risulta giustapposto a una estremità 12qter. Il der(12) che deriva dalla traslocazione è costituito dal cromosoma 12 completo (infatti la FISH con la sonda subtelomerica del 12q mostra segnale di ibridazione sia sul 12 che sul derivativo) e da gran parte del braccio lungo del cromosoma 1 (fig. 5.6).

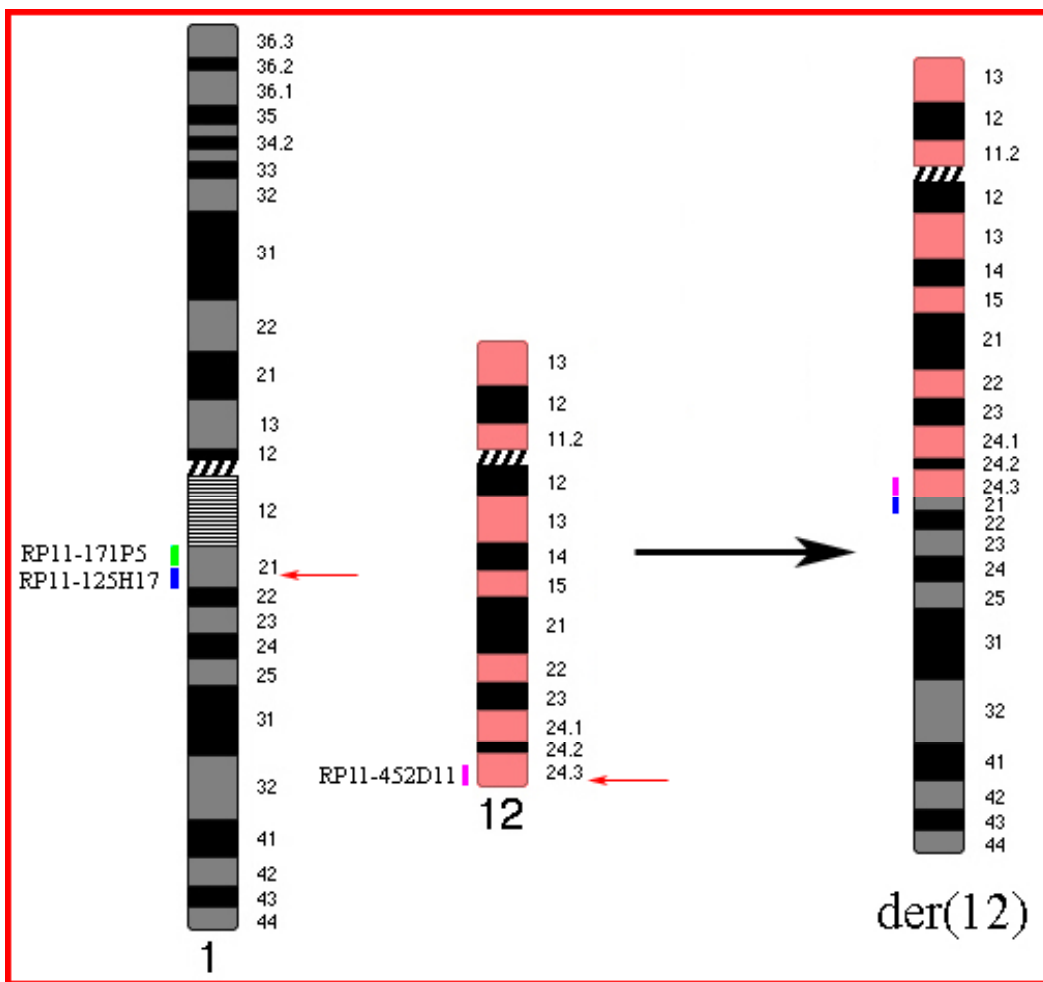


Figura 5.6 Rappresentazione schematica dell'origine di formazione del der(12) nel caso #4: il marker presenta quasi l'intero braccio lungo del cromosoma 1 giustapposto al braccio lungo del cromosoma 12.

In figura 5.6 è presentato un modello esplicativo dell'origine di formazione del marker. Si può ipotizzare che una traslocazione reciproca e bilanciata abbia portato alla formazione del der(12), così come lo si vede, e di un der(1) il quale sia andato perso durante le divisioni cellulari. A seguito di una non disgiunzione mitotica durante la divisione cellulare, la cellula neoplastica selezionata a favore è stata quella contenente i due cromosomi 1 e i due cromosomi 12 integri, di cui uno recante la porzione trisomica del braccio lungo del cromosoma 1.

All'interno della regione dell'1q in cui cade il punto di rottura mappano due geni, potenziali candidati per l'insorgenza della neoplasia: *MRPS21* (cr1:147,079,825-147,093,856) e *PRPF3* (cr1:147,107,090-147,138,741), entrambi situati all'interno della banda 1q21.2 (fig. 5.7). L'intervallo di sequenza entro cui si ha la più alta probabilità che cada il punto di rottura è cr1:147,081,772-147,176,262. Infatti, questo intervallo è delimitato da due BACs (RP11-171P5 e RP11-125H17) le cui sequenze sono tra loro parzialmente sovrapposte.

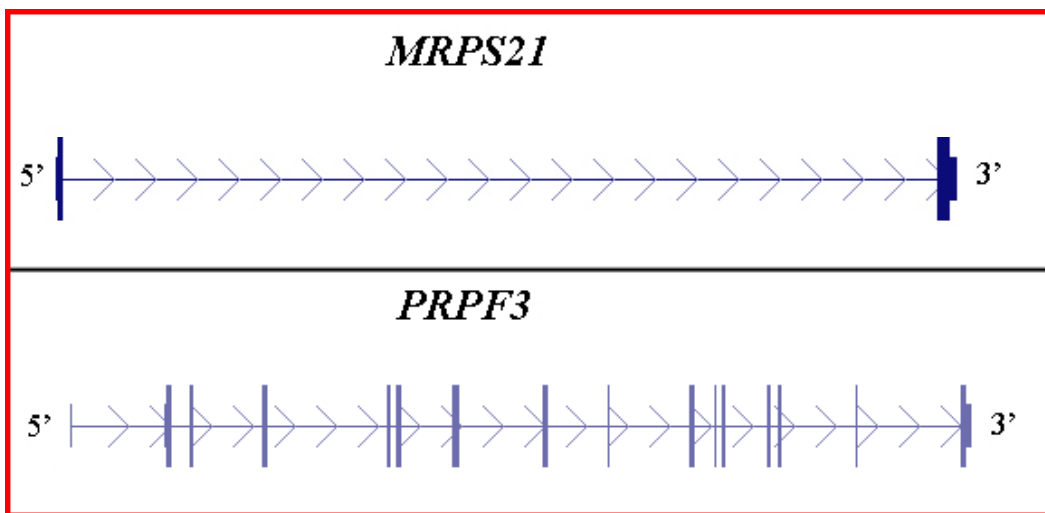


Figura 5.7 Rappresentazione schematica dei geni *MRPS21* e *PRPF3* e dell'organizzazione delle loro regioni geniche (esoni e UTRs).