

Colture cellulari
e
Analisi del cariotipo

Prof. Franca Pelliccia (Lab. Citogenetica) per corso Genetica Prof. Patrizio Dimitri
Dicembre 2018

ETEROPLOIDIA: (interi genomi → EUPLOIDIA)

➤ POLIPLOIDIA → $3n, 4n, 5n$

➤ APLOIDIA → n

ANEUPLOIDIA:

➤ IPERDIPLOIDIA → $2n + 1$ o più cromosomi
(Es. polisomia)

➤ IPOPLOIDIA → $2n - 1$ o più cromosomi
(Es. monosomia, nullisomia)

Analisi del Cariotipo

- »»» ogni specie possiede un set cromosomico fisso per numero, forma e dimensioni.
- »»» Di norma
 - ↳ il guadagno o la perdita porta ad una condizione svantaggiosa per l'individuo.

- ⇒ **GENOTIPO**: costituzione genetica di un organismo
- ⇒ **COPPIA DI OMOLOGHI**: presenti in cellule diploidi (diplobionti) somatiche
↳ e germinali ⇒ prima della meiosi
- ⇒ **CARIOTIPO**: assetto diploide ⇒ $2n$
- ⇒ **GENOMA**: assetto aploide ⇒ n

CARIOGRAMMA:

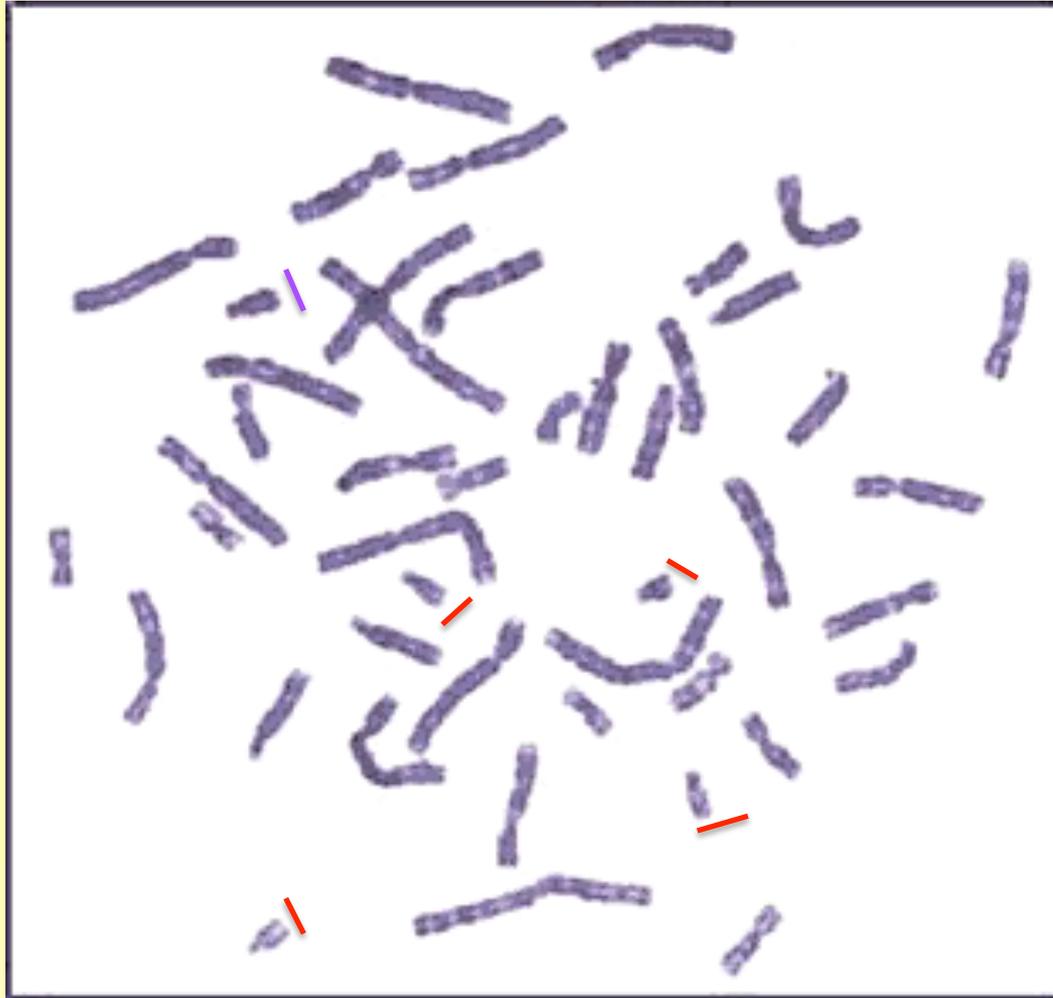
- ↳ disposizione ordinata dei cromosomi del cariotipo in coppie di omologhi con inizio dalle coppie di dimensione maggiore e termine con quelle di dimensioni minori.

IDIOGRAMMA:

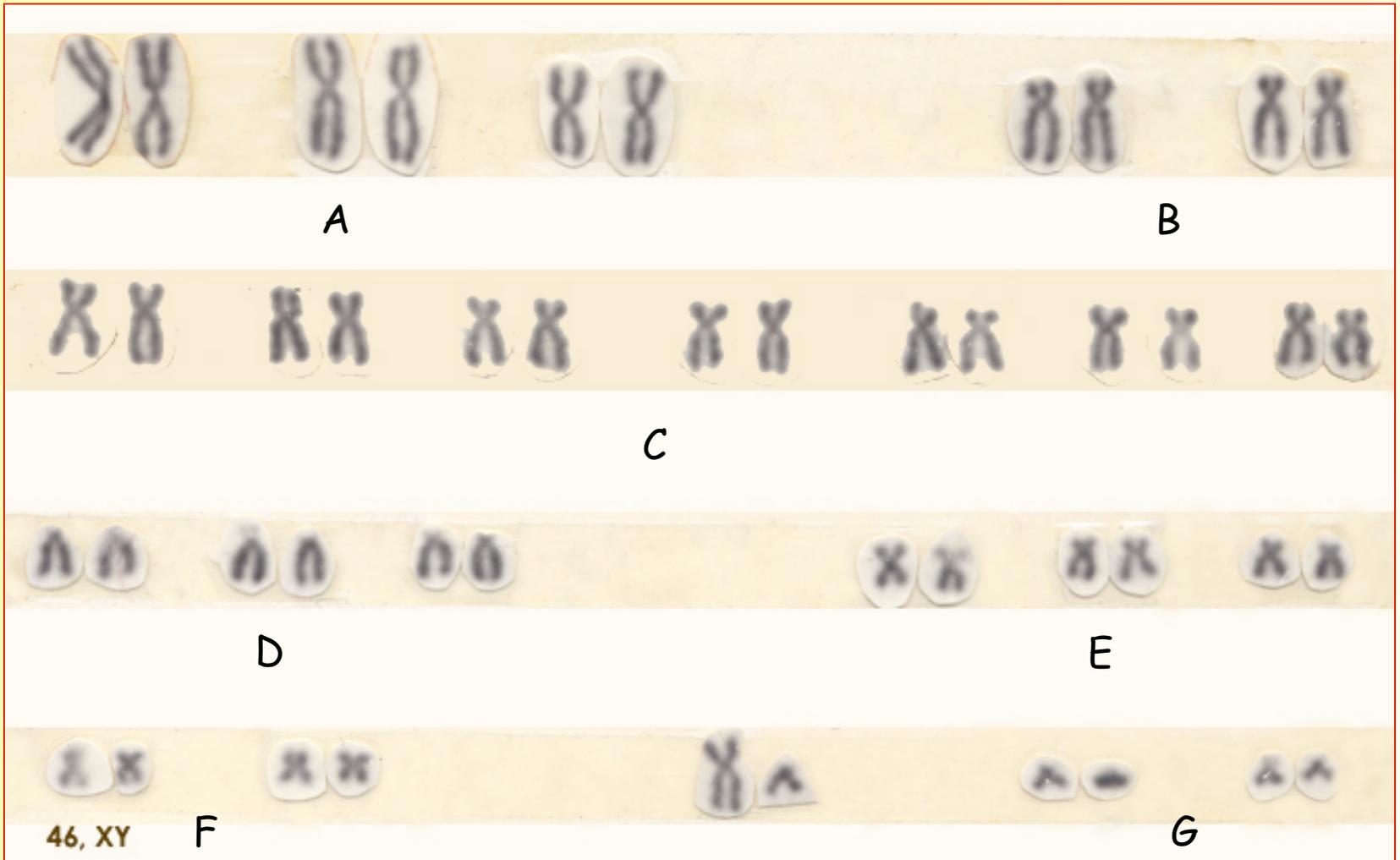
- ↳ rappresentazione schematica del carioγραμμα, in cui le dimensioni dei cromosomi hanno valore solo relativamente agli altri cromosomi.

CARIOTIPO

COLORAZIONE STANDARD GIEMSA



CARIOGRAMMA



Classificazione colture cellulari

1. ⇒ In base alla durata della coltura

- A. breve termine (es. linfociti);
- B. lungo termine (es. fibroblasti);
- C. perenni (es. linee stabilizzate, linfoblasti,.....)

Classificazione colture cellulari

2. → In base al grado di organizzazione:

- A. di organo;
- B. di tessuto;
- C. di cellule disperse (grado estremo di dissociazione in vitro)

Classificazione colture cellulari

3. ⇒ In base alle modalità di crescita:

- A. con adesione al supporto → monostrato
(fibroblasti)
- B. in sospensione → (linfociti, linfoblasti,)

Terreni di coltura

- ✓ Frazione salina → ioni inorganici (Na⁺, Ca⁺⁺)
 - ✓ " micromolare → aminoacidi, vitamine,
 - ✓ " macromolare → proteine del siero
 - ↳ fattori di crescita (polipept)
 - ↳ transferrina (trasf. ioni Fe nella cellula)
 - ↳ etc
- 1+2 ⇒ terreno di mantenimento (breve periodi, quiescenza)
- 1+2+3 ⇒ terreno di crescita: promuovere la moltiplicazione

Fattori importanti

- ✓ pH adatto → intervallo fisiologico (7.2 - 7.8) con:
 - sistema tampone fosfato-bicarbonato
 - ↳ tramite controllo della tensione di CO_2 nel termostato
- ✓ ambiente isotonico
- ✓ ambiente sterile
- ✓ temperatura

Per studiare i cromosomi metafasici

- A. tessuti con cellule che si dividono attivamente:
 - tessuti embrionali;
 - tessuti germinali (mitosi e meiosi),
 - midollo osseo;
 - linfonodi;
 - cellule origine neoplastica, etc.

- B. accumulare cellule in metafase:
 - in vitro → stimolazione alla proliferazione di cellule portate fuori dall'organismo.

Lo studio dei cromosomi si effettua anche su cellule proliferanti bloccate in metafase

Fonti di cellule in divisione nei mammiferi:

- ✓ • Sangue periferico
- ✓ • Fibroblasti
- ✓ • Midollo osseo
- ✓ • Linee cellulari immortalizzate
- ✓ • Villi coriali (10-12 settimana di gestazione)
- ✓ • Cellule fetali presenti nel liquido amniotico (14-16 settimana di gestazione)
- ✓ • Tumori solidi, cellule immortalizzate

Microscopio ottico (+computer) strumento di elezione

- ✓ **Potere di risoluzione** \Rightarrow capacità di un apparecchio di dare immagini distinte di due punti separati dell'oggetto che si osserva.
- ✓ **Limite di risoluzione** \Rightarrow distanza minima a cui due punti risultano distinti
 - $\hookrightarrow 0.61\lambda/AN$
 - $AN \rightarrow$ tiene conto dell'indice di riflessione del mezzo

Risoluzione

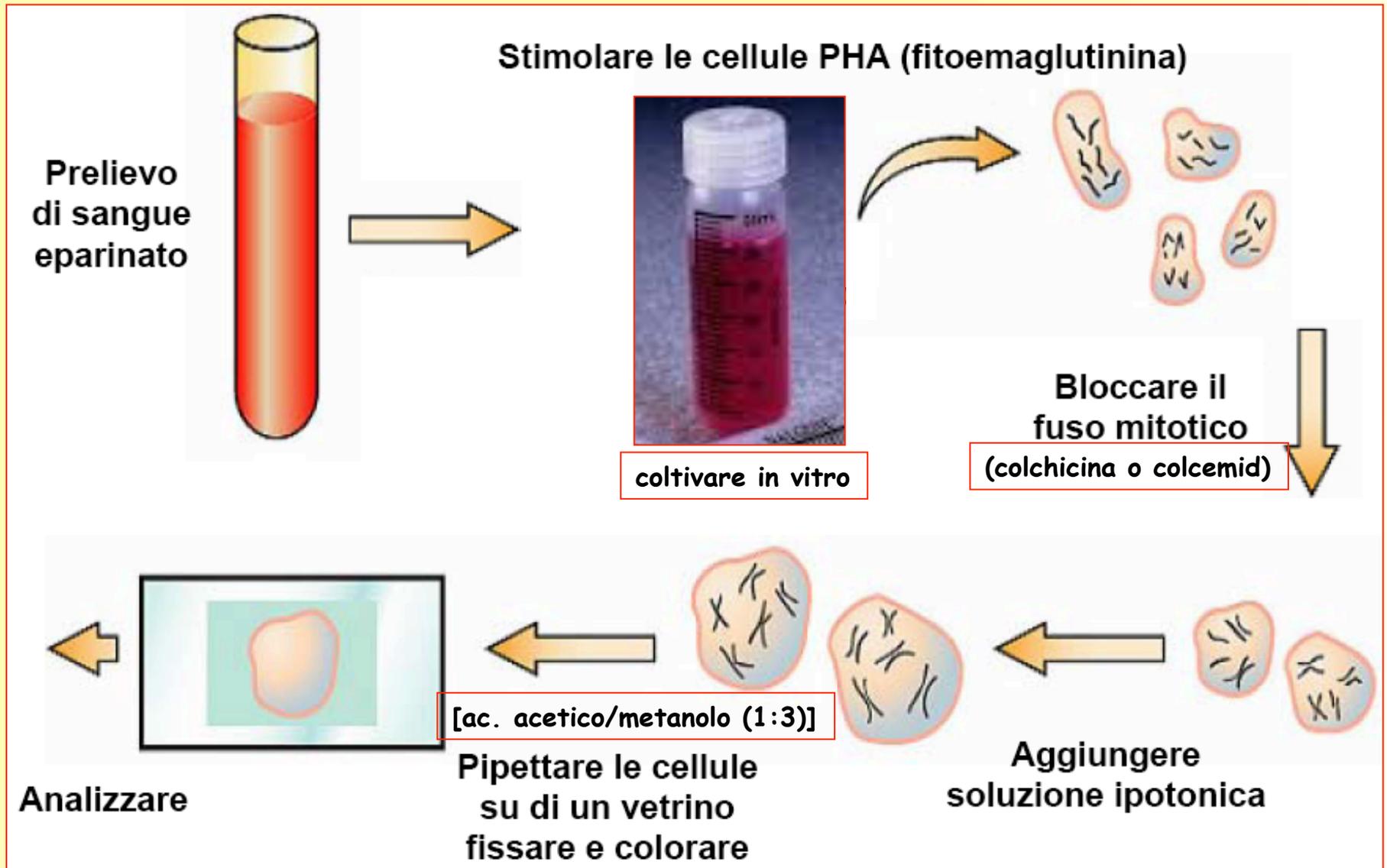
- ✓ Occhio umano 0.1 mm 100 μm
- ✓ Microscopio ottico $\lambda = 5500 \text{ \AA}$ 0,25 μm
(luce bianca) (ingrand. 1000-1500x)
- ✓ Microscopio elettr $\lambda = 0.05 \text{ \AA}$ 0,001 μm (1nm)
(fascio elettroni) (ingrand. $\sim 20000x$)
- ✓ Raggi X 0.0001 μm (0.1 nm)
(atomi $\sim 0.1-0.4$ nm)
- ✓ Dimensioni cromosoma 1 umano $\sim 10 - 0.5 \mu\text{m}$
mediamente $\sim 6 - 0.4 \mu\text{m}$

Colture da sangue periferico

Coltura a breve termine (48-72h):

- ✓ nel terreno → stimolazione dei linfociti con fitoemoagglutinina (PHA, dai semi di *Phaseolus*),
- ✓ colchicina o colcemid (antimitotico) interferisce con la polimerizzazione delle fibre del fuso (α e β -tubulina),
- ✓ blocco della coltura,
- ✓ lavaggi,
- ✓ soluzione ipotonica,
- ✓ fissativo (3 metanolo:1 ac. acetico, formaldeide, etc...),
- ✓ allestimento dei vetrini.

Come ottenere un preparato cromosomico



PARTE TECNICA

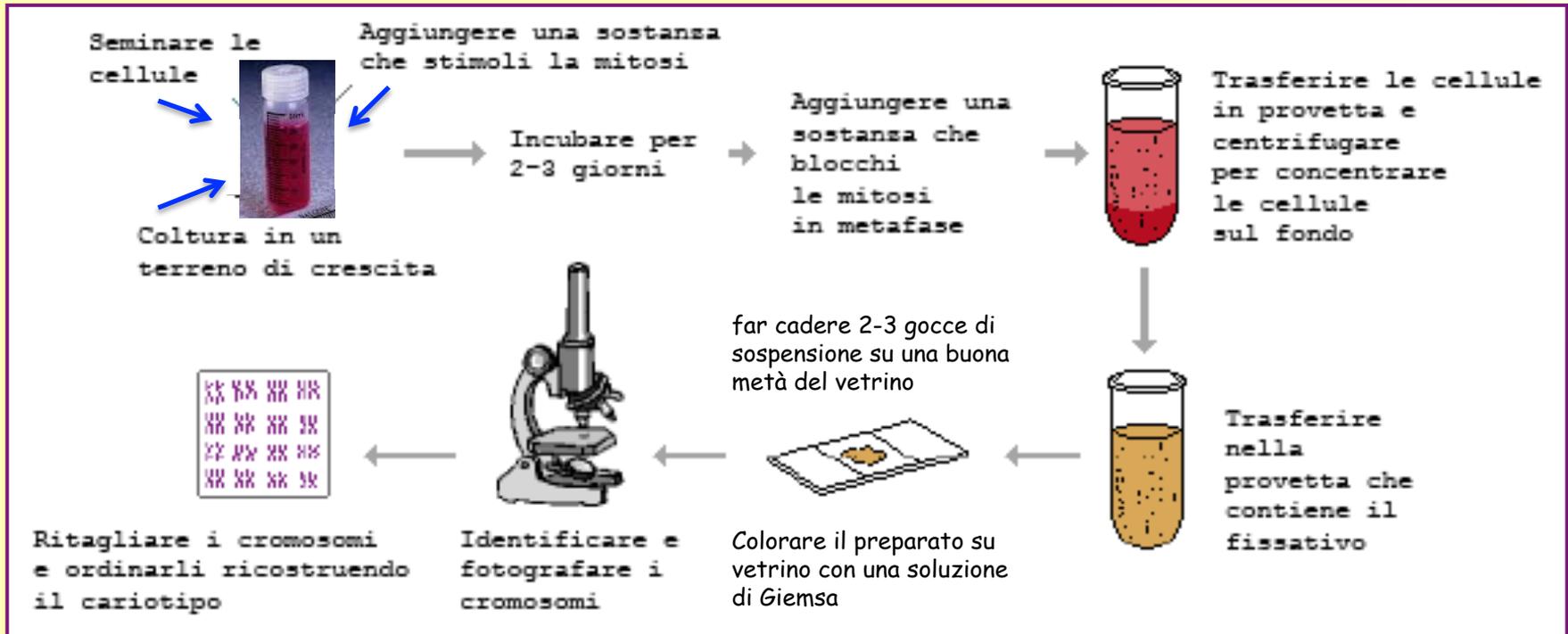
Al termine della coltura, la sospensione cellulare viene messa in una provetta da centrifuga e le cellule vengono raccolte mediante centrifugazione.

1. con una pipetta si elimina il soprannatante (terreno di coltura, cellule morte e detriti) senza toccare il pellet.
2. aggiungere una soluzione ipotonica per determinarne il rigonfiamento della membrana nucleare, in modo che i cromosomi ($2n=46$) possano separarsi meglio.
3. centrifugare a circa 800-1000 (le cellule con ipotonica sono delicate) e toglier delicatamente il soprannatante,
4. segue un trattamento con fissativo fresco e freddo (acido acetico e metanolo in rapporto 1:3) che disidrata e stabilizza la struttura dei cromosomi, permettendo di mantenere più a lungo, e in buono stato, il preparato,

PARTE TECNICA

5. centrifugare per sedimentare le cellule (pellet), aspirare il sopranatante e aggiungere 5-6ml di fissativo freddo e agitare bene, tenere in frigo per circa 30min, la parte plasmatica del nucleo, in cui sono immersi i cromosomi, risulta disidratata dall'alcool e ridotta dall'acido acetico e i cromosomi dovrebbero mantenere la medesima posizione che presentavano prima della fissazione,
6. fare almeno un altro passaggio in fissativo seguita da centrifugazione, dopo di che la sospensione cromosomica può essere conservata in provetta alla temperatura di -20°C anche per molti mesi oppure
7. eliminare il sopranatante, aggiungere poche gocce di fissativo freddo, mescolare e allestire i preparati metafasici su vetrino.

Procedura di allestimento di un preparato cromosomico



Giemsa: è una miscela di blu di metilene ed eosina

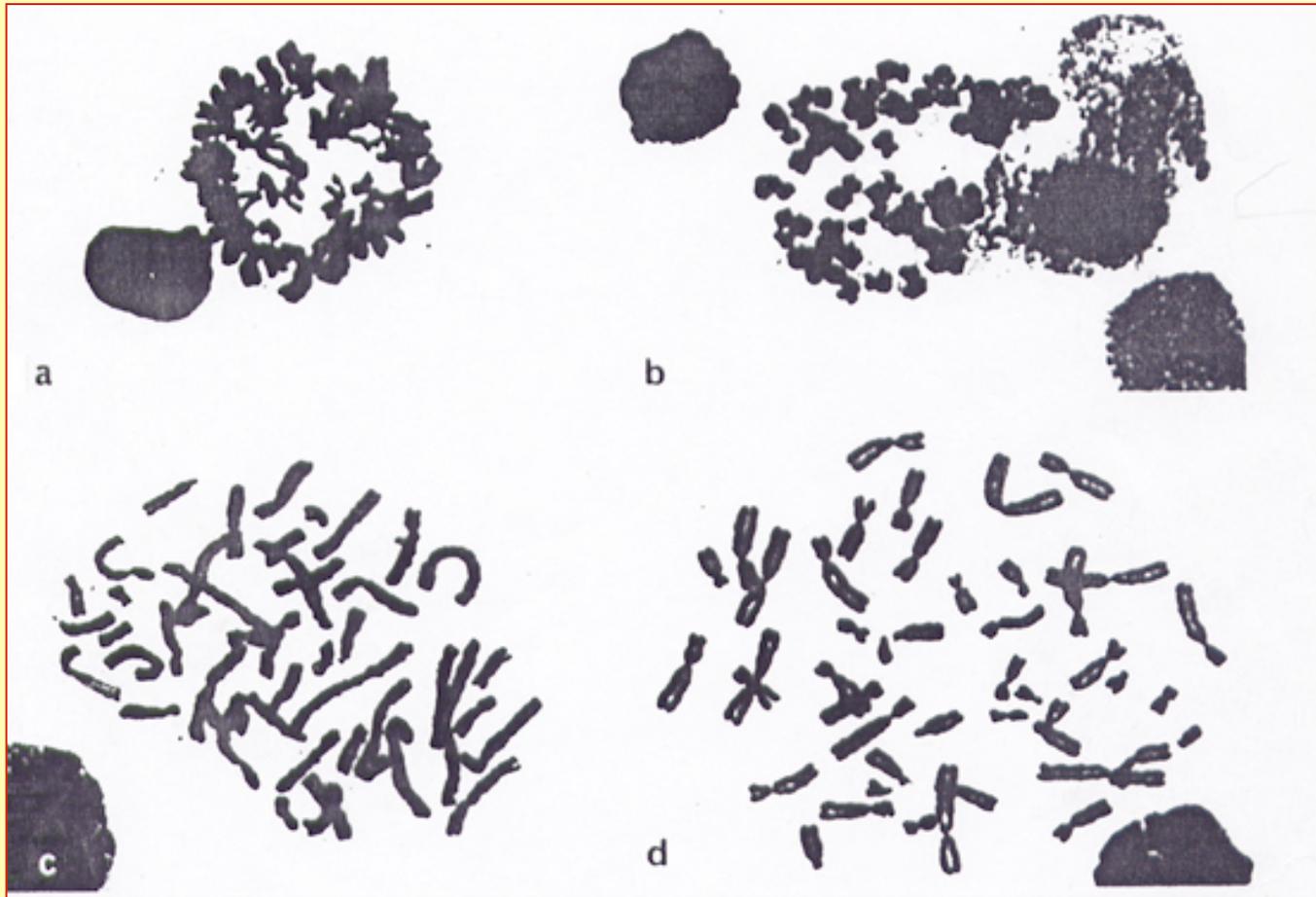
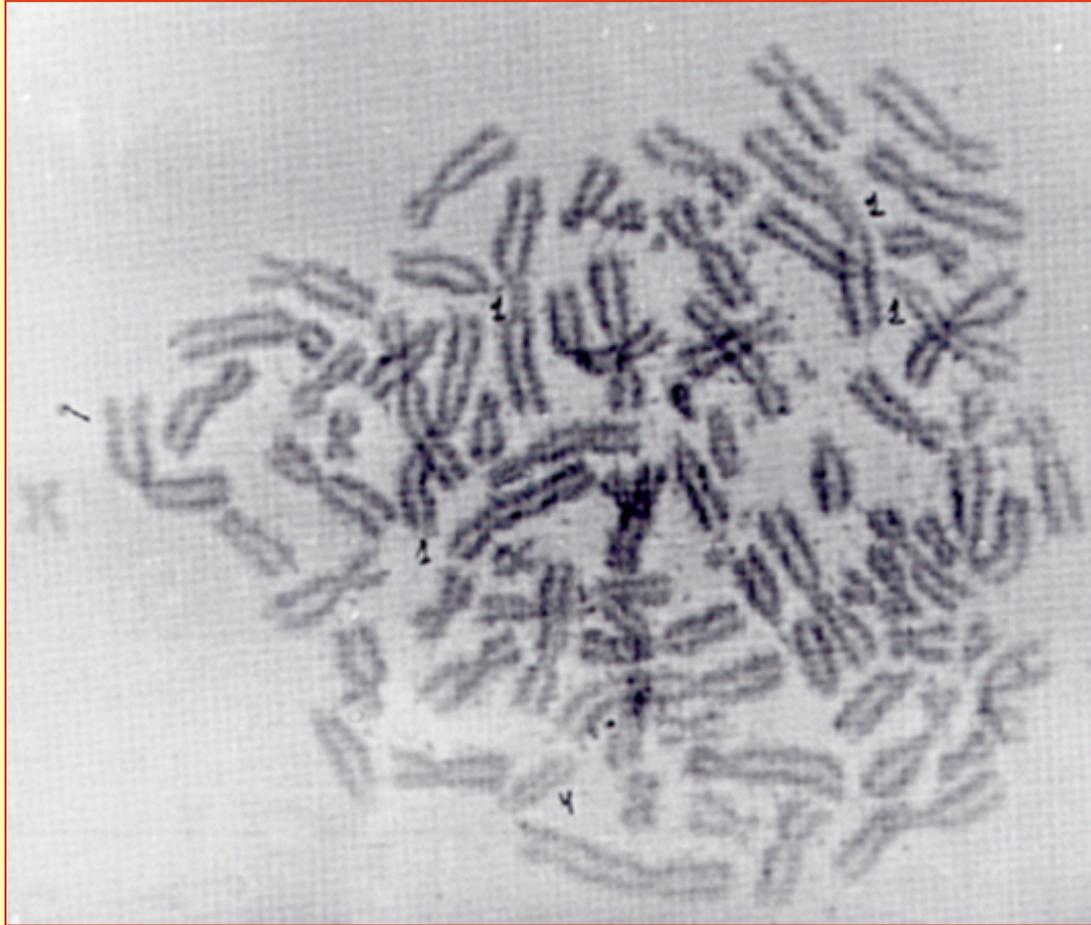


Fig. 1. - Azione della colchicina e della soluzione ipotonica su cromosomi umani:
a) metafase in assenza di trattamento;
b) effetto della colchicina;
c) effetto della soluzione ipotonica;
d) effetto dei due trattamenti associati.

Endoreduplicata



Poliploide



»»» Nella descrizione del cromosoma si indicano alcuni dei seguenti parametri:

» rapporto dei bracci cromosomici:

$$\frac{\text{lungh. braccio lungo } q}{\text{lungh. braccio corto } p}$$

» indice centromerico

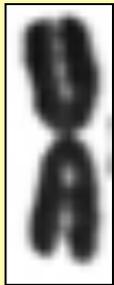
$$\hookrightarrow \frac{\text{lunghezza di } p}{\text{Lung. totale cromosomico}}$$

» centromero → costrizione primaria
(attacco delle fibre del fuso)

» costriz. secondarie → in genere contengono
i geni per l'rRNA (18, 5.8 e 28S)

I cromosomi vengono classificati in base alla loro dimensione e in base alla posizione del centromero

In base alla posizione del centromero i cromosomi del cariotipo si distinguono in:



Metacentrico

Submetacentrico

Subtelocentric
(Subtelomerico)

Acrocentrico

Varianti morfologiche normali

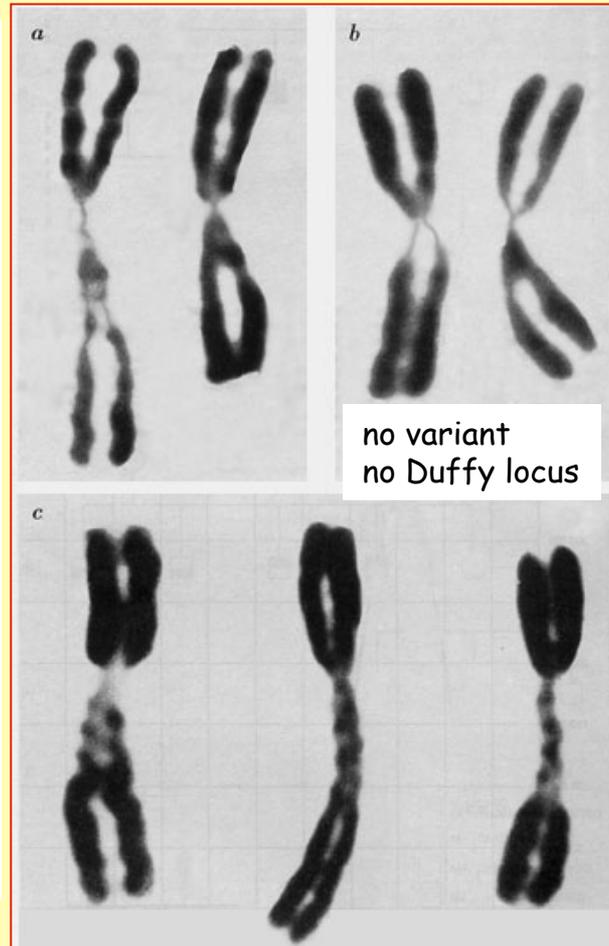
Fig. 1a, 1b.-Two pairs of no. 1 chromosomes from **metaphase lymphocytes of a family with Duffy blood locus. (ACKRI)**

Left: from the proband's uncle who is heterozygous for the variant chromosome, shown as the leftmost member of the pair.

Right: from the proband's sister who lacks the variant.

Fig. 1c.-Variant no. 1 chromosomes from three metaphase cells of the proband of family with Duffy locus.

The relatively uncoiled chromatids in the paracentric region can be seen. This distinctive region is not usually so clearly visible.



Cariotipo umano

Regioni eterocromatiche
subcentromeriche dei cromosomi:

nr. 1 (gruppo A)

nr. 9 (gruppo C)

nr. 16 (gruppo E)

Regione distale del braccio q del
cromosoma Y

The Duffy blood group system, which consists of 4 alleles, 5 phenotypes, and 5 antigens, is important in clinical medicine because of transfusion incompatibilities and hemolytic disease of the newborn.

The Duffy system enjoys the distinction of being the first blood group whose genetic locus was assigned to a specific autosome, i.e., chromosome 1 (1q23.2).

Bandeggio CBG

Colorazione dell'eterocromatina costitutiva nei mammiferi.

Trattamento del preparato cromosomico con

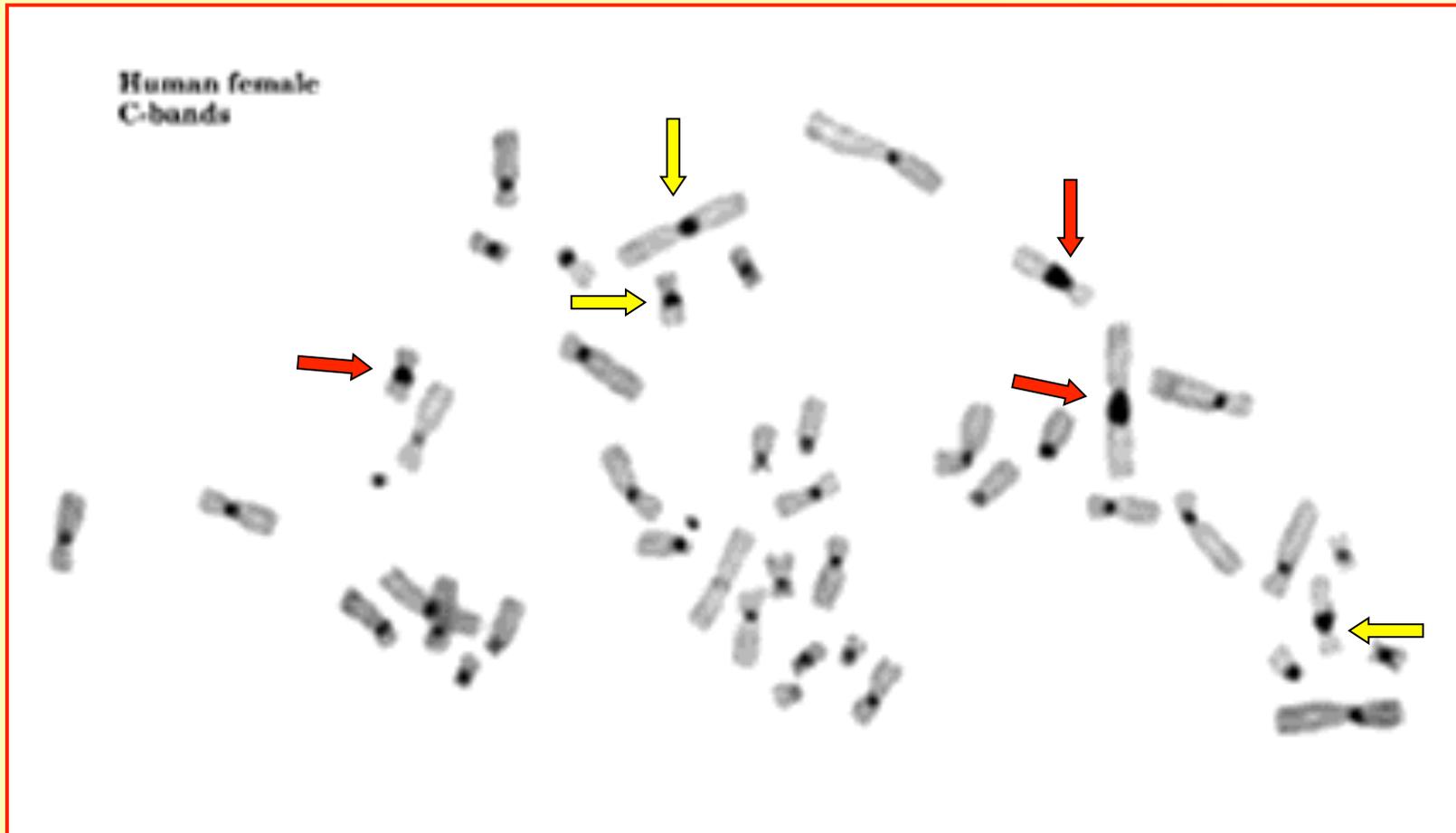
- con una soluzione alcalina (NaOH o BaOH)
(denaturazione),
- incubazione in una soluzione salina e
colorazione in *Giemsa*.

La perdita di DNA si verifica preferenzialmente nelle regioni non-C.

→ si colorano in modo più intenso le regioni di eterocromatina costitutiva: centromeri, costrizioni secondarie eterocromatina distale del braccio lungo (q) dell'y e la regione pericentromerica del braccio q dei cromosomi 1, 9 e 16, il resto del cromosoma è pallidamente colorato

- Ricerca di polimorfismi cromosomici
- Studio della regione eterocromatica del cromosoma y
- Caratterizzazione di cellule tumorali
- Identificazione di regioni amplificate

BANDEGGIO CBG



Assetto cromosomico in diverse specie

Il cariotipo

- Ogni specie animale e vegetale è caratterizzata da un proprio assetto cromosomico che si mantiene costante, per numero e morfologia, di generazione in generazione.

Determinazione cromosomica del sesso

Sistema **XY** (♂) nei mammiferi

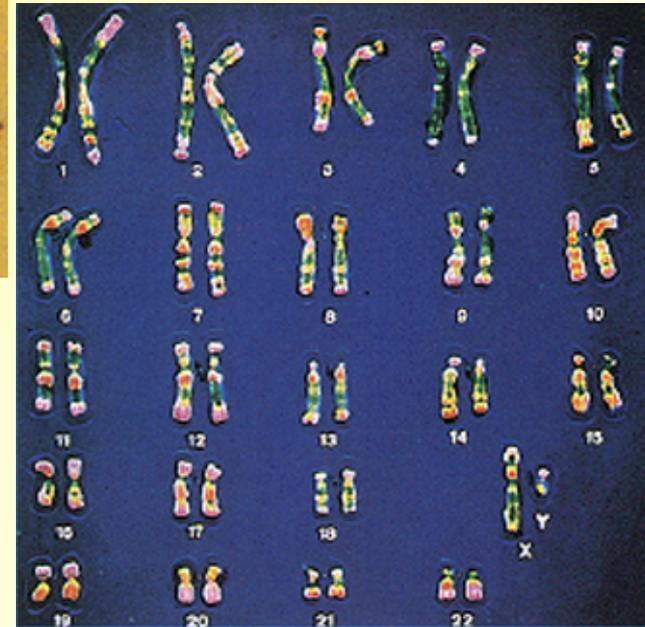
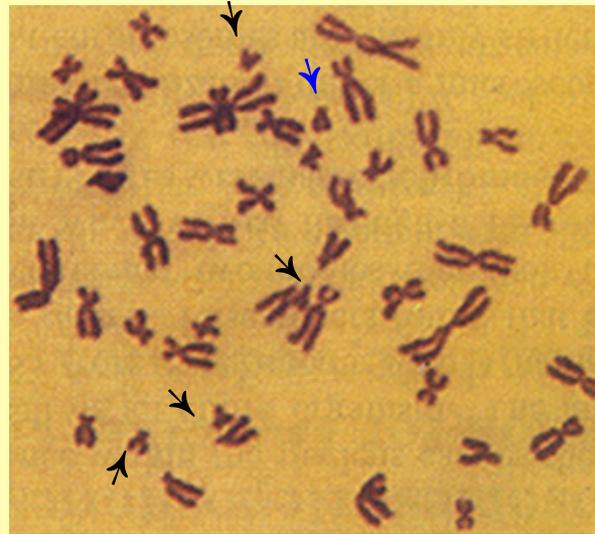
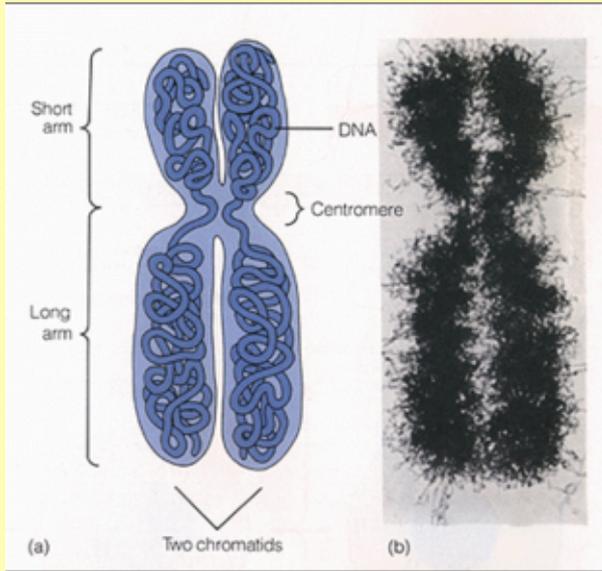
Sistema **ZW** (♀) negli uccelli

- Quando la determinazione del sesso è controllata dall'assortimento di cromosomi tra di loro morfologicamente differenti (nei mammiferi X e Y), questi vengono chiamati eterosomi, mentre le altre coppie di omologhi, vengono chiamate autosomi.

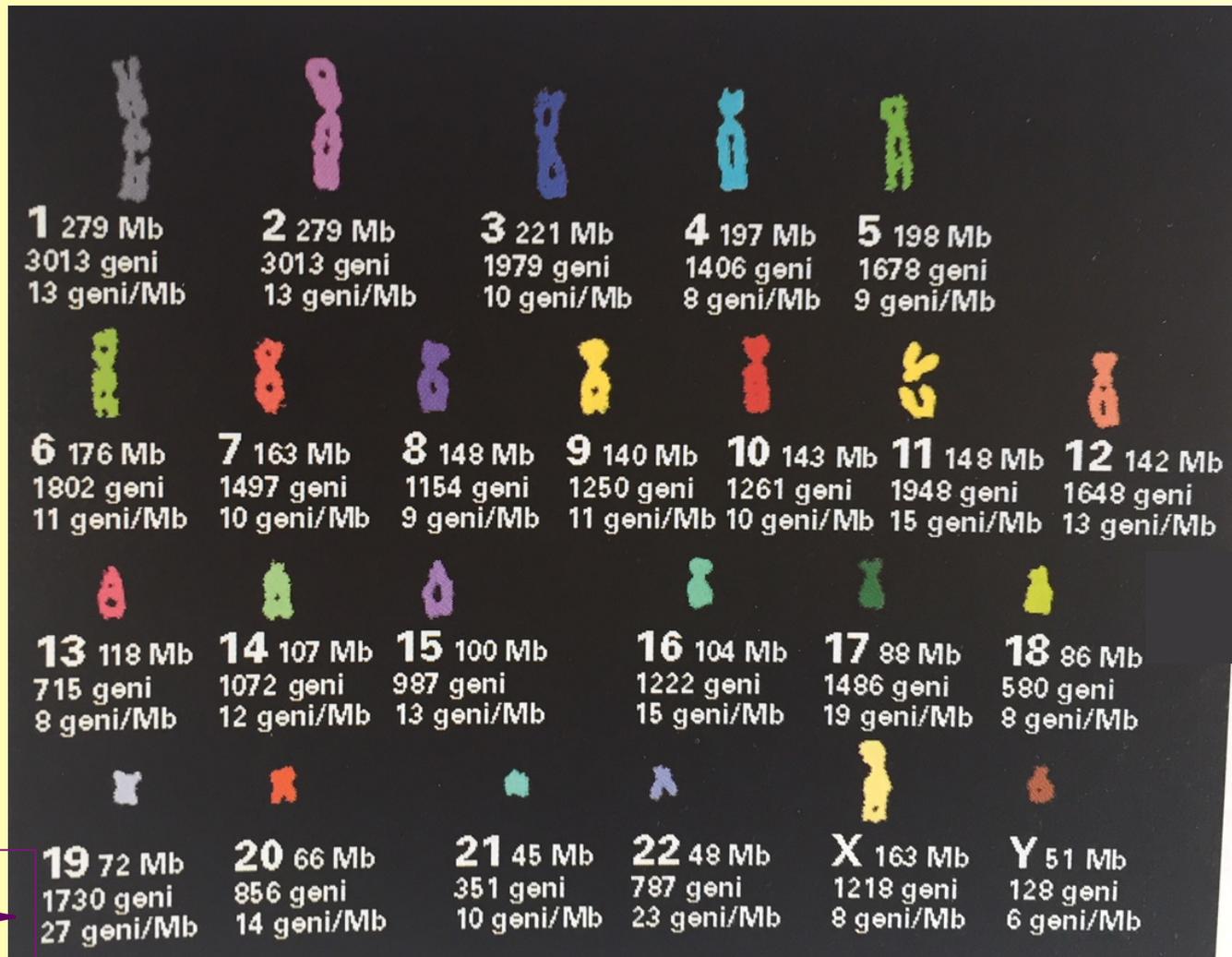
Organismo	Numero totale di cromosomi (2n)
Uomo	46
Scimpanzé	48
Cane	78
Gatto	38
Topo	40
Cavallo	64
Pollo	78
Rospo	36
Pesce rosso	94
Stella di mare	36
Moscerino della frutta (<i>Drosophila melanogaster</i>)	8
Zanzara	6
Formica australiana (<i>Myrecia pilosula</i>)	♂11, ♀12
Nematode	♂11, ♀12
<i>Neurospora</i> (aploide)	7
Muschio (aploide)	23
Equiseto	216
Sequoia gigante	22
Tabacco	48
Cotone	52
Patata	48
Pomodoro	24
Grano tenero	42
Lievito (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) (aploide)	16

^a Tutti i numeri cromosomici sono riferiti a cellule diploidi, tranne quando indicato.

Cromosomi umani



dati del
2001



Cromosomi metafasici umani con l'indicazione, per ognuno di essi, della quantità di DNA, del numero di geni stimato e dell'approssimativa densità genica.

Molti metodi di colorazione identificano
i cromosomi metafasici come
strutture uniformi.

Altri metodi invece producono un
pattern trasverso di bande colorate
in maniera differenziale.

Questi pattern sono invariati durante lo sviluppo
e tra cellule appartenenti
a diversi tessuti della stessa specie.

Una banda cromosomica è la manifestazione di un segmento di cromatina che ha specifici caratteri strutturali e funzionali in modo da essere visivamente distinta dai segmenti circostanti.

Ciascun cromosoma è un mosaico di compartimenti contigui sulla molecola di DNA.

Chromosome banding

Techniques used to reveal chromosome bands **enhance** an inherent pattern of chromosome organization.

A chromosome band is a manifestation of a **chromatin domain with functional and structural characteristics** that are homogeneous and distinctive over a long enough stretch to be seen down the microscope.

G- and R-banding reflect differences in chromatin structure and base composition between different regions of the genome.

Fluorochrome banding also reflects variation in base composition along chromosome length.

Bandeggio di tipo morfologico o strutturale

Basato sull'affinità tra specifici coloranti
e la cromatina.

Le tecniche possono variare da:

»»» **semplici:**

↳ (nessun pretrattamento e un
solo tipo di molecola colorante)

»»» **ad estremamente complesse:**

↳ (pretrattamento seguito da
varie combinazioni di coloranti).

Bandeggio Q (QFQ) (Q-bands by Fluorescence using Quinacrine)

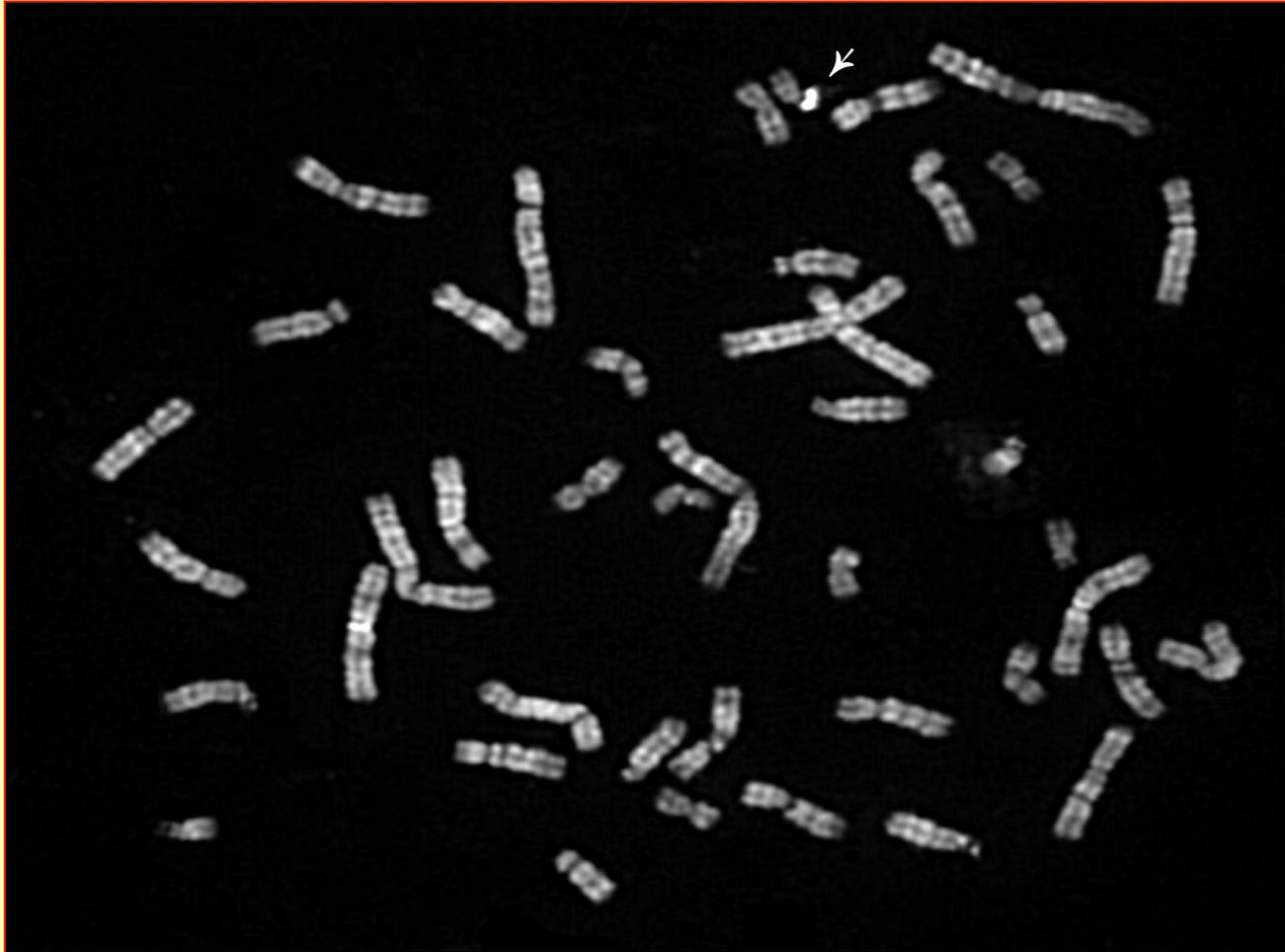
E' stato il primo metodo descritto per il bandeggio della parte eucromatica dei cromosomi umani (1968).

La tecnica consiste nella colorazione con la molecola fluorescente quinacrina o mostarda di quinacrina.

La **quinacrina** si intercala al DNA cromosomico
indipendentemente dalla sequenza
in basi ma ha una fluorescenza più brillante in
corrispondenza delle **regioni ricche in AT.**

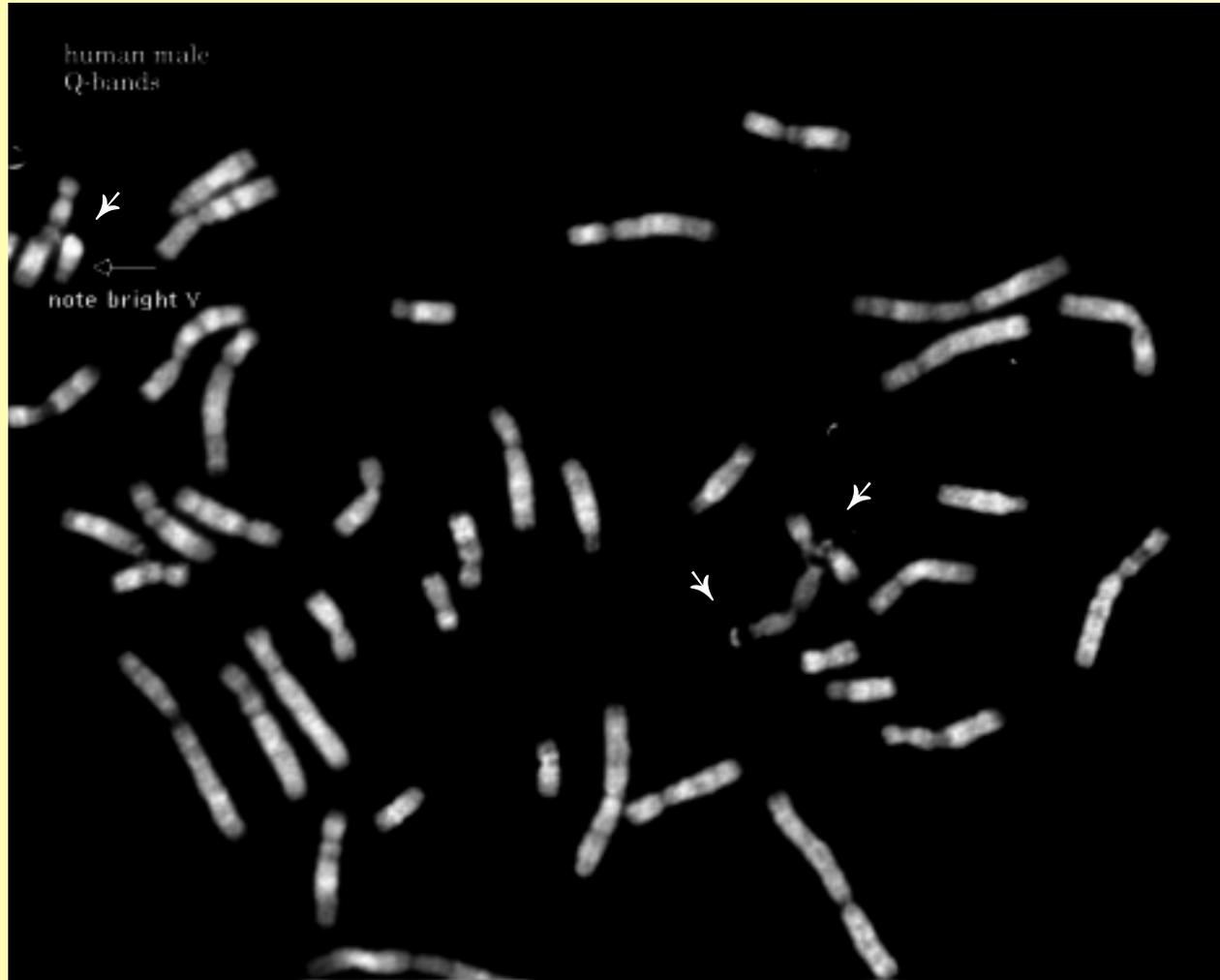
Un ruolo importante può essere sostenuto anche dalla componente
proteica della cromatina.

Colorazione QFM (Mostarda di Quinacrina)



👉 Fluorocromi: necessario un microscopio a fluorescenza

BANDEGGIO QFQ



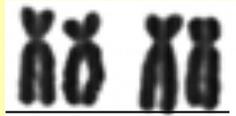
46,XY - cariotipo normale maschile

Bandeggio Q
(QFQ)
(Q-bands by Fluorescence using Quinacrine)

Quinacrine intercalates into chromosomal DNA irrespective of sequence, but fluoresces brighter in regions of AT-rich DNA.



1-3 gruppo A



4-5 gruppo B



X-6-12 gruppo C



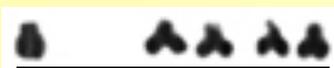
13-15 gruppo D



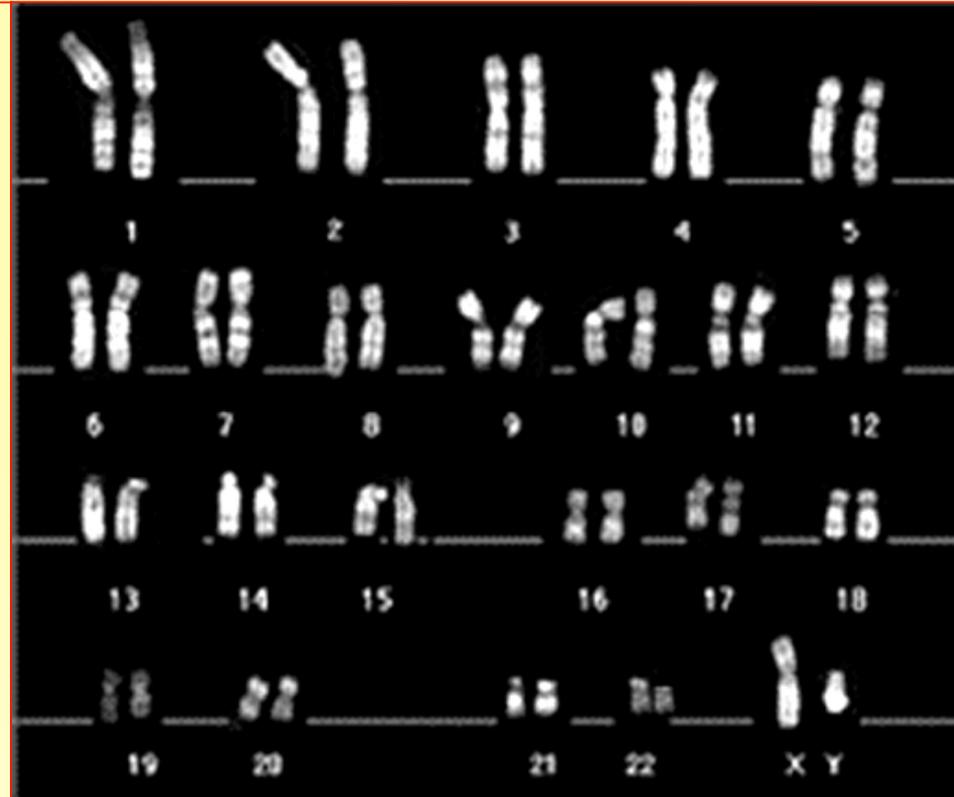
16-18 gruppo E



19-20 gruppo F



Y-21-22 gruppo G



Cariogramma

Bandeggio G

Pretrattamenti con

→ proteasi, (tripsina) ←

in grado di digerire, denaturare e ridurre le proteine risultano ugualmente efficaci.

Non è ben chiaro il meccanismo alla base di questo bandeggio, probabilmente è importante l'interazione del colorante sia con il DNA che con le proteine.

Bandeggio G

GTG (G-bands by Trypsin using Giemsa)

Pattern simile a quello ottenuto con il bandeggio Q, con maggiore risoluzione e stabilità.

Pretrattamento con **tripsina** e colorazione in **Giemsa**.

Cariogramma

(**Giemsa**: It is a mixture of Methylene blue and eosin)

Giemsa: Lymphocyte cytoplasm stains sky blue, monocyte cytoplasm stains pale blue, and leukocyte nucleare chromatin stains magenta.

Human female G-bands



46,XY

Bandeggio R (Reverse)

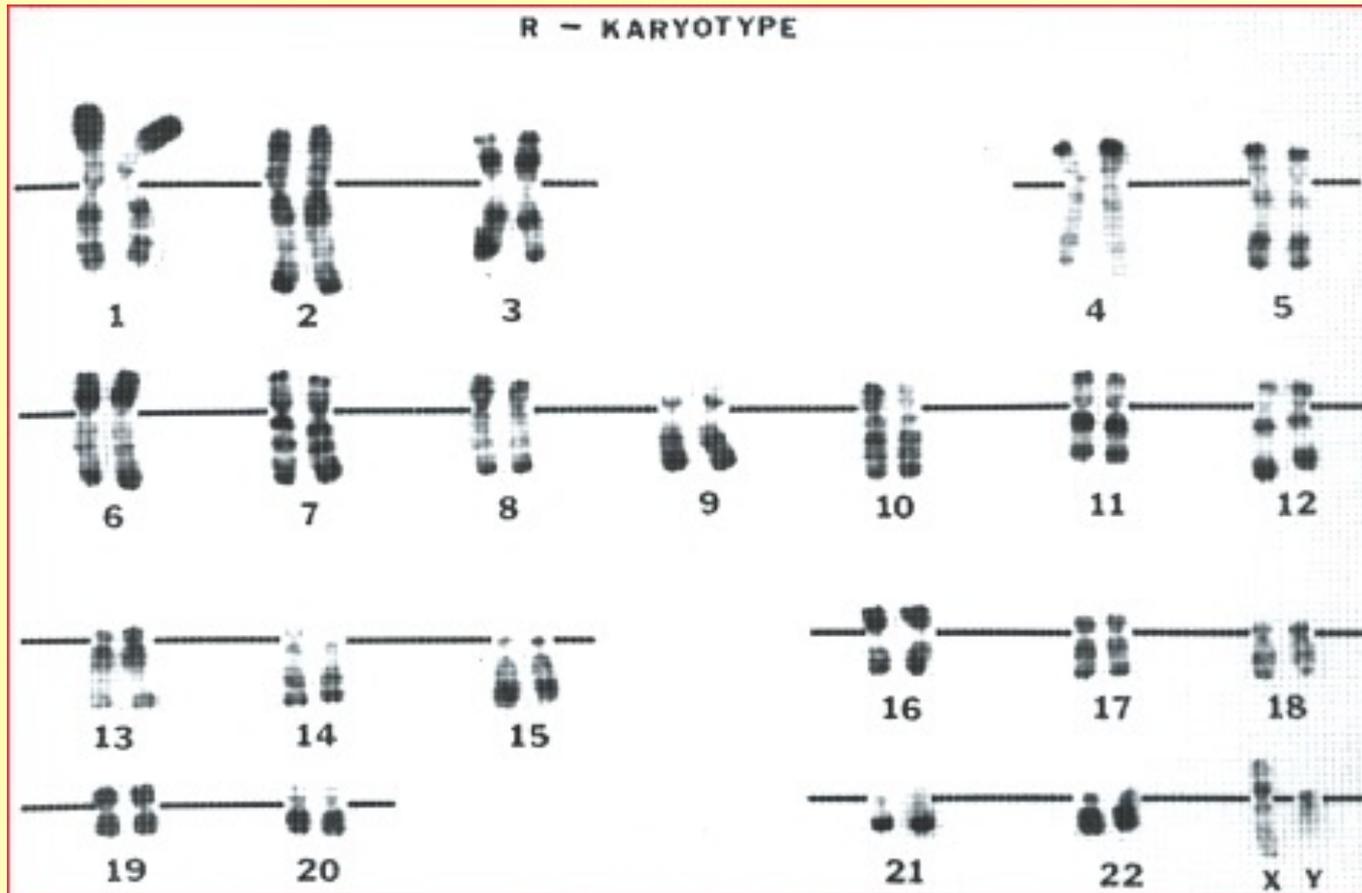
Le bande risultanti sono **inverse** rispetto a quelle ottenibili con il bandeggio Q e G.

Il metodo più comune consiste nella denaturazione parziale dei cromosomi in una soluzione salina ad alta temperatura seguita da colorazione in **Giemsa (RHG)**.

- **denaturazione** preferenziale del DNA ricco in AT
- successiva colorazione in corrispondenza delle regioni ricche in GC sottocondensate.

Vantaggio del bandeggio R rispetto al bandeggio G e Q.

Permette la visualizzazione delle
regioni telomeriche che risultano scure
(o intensamente fluorescenti).



Metodo alternativo

consiste nella denaturazione al calore seguita dalla colorazione con **Arancio di Acridina (RFA)**.

L'acridina si intercala al DNA a doppia elica emettendo una fluorescenza di **colore verde**, mentre interagisce con legame esterno con il DNA a singola elica emettendo una fluorescenza di **colore rosso**.

Arancio di acridina

Dopo il trattamento al calore le bande ricche in **GC** risultano **verdi (R-positive)** mentre quelle ricche in **AT** risultano **rosse (R-negative)**.

L'**acridina orange** emette fluorescenza **verde** quando si lega **dsDNA** (525 nm) e fluorescenza **rossa** quando si lega a **ssDNA** o **RNA** (650 nm).



Fluorocromi e tecniche di colorazione

Esistono molte molecole la cui fluorescenza è influenzata dalla composizione in basi del DNA al quale esse si legano.

Possono essere classificate in

- 2 grandi gruppi in base all'affinità nei confronti delle coppie di basi AT o GC.

Sono quindi in grado di produrre un

- pattern di bandeggio Q (AT)
- o pattern di bandeggio R (GC).

In altri organismi (es. piante, drosophila), non si ha un vero pattern di bandeggio ma una fluorescenza brillante di regioni di DNA più ricche in AT o in GC.

Cromomicina A3

Legame preferenziale con le coppie di basi GC.

Il pattern di tipo R può essere migliorato mediante l'uso di controcoloranti che presentano un legame preferenziale per le basi AT

(distamicina A o netropsina)

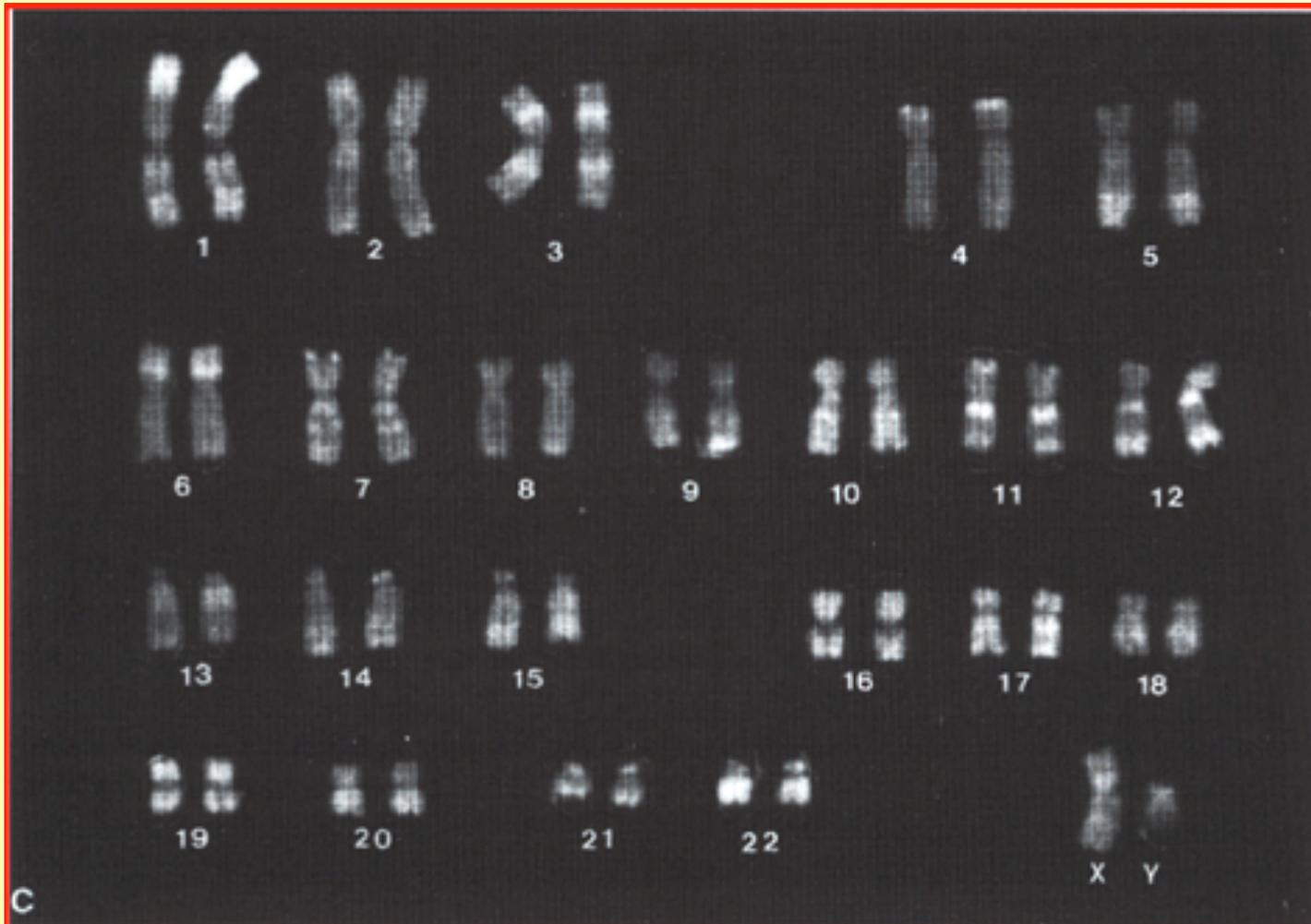
oppure di molecole che fungono da accettori di trasferimento di energia elettronica (methyl green).

Anche l'olivomicina, molecola simile alla cromomicina A3 è in grado di produrre un bandeggio di tipo R.

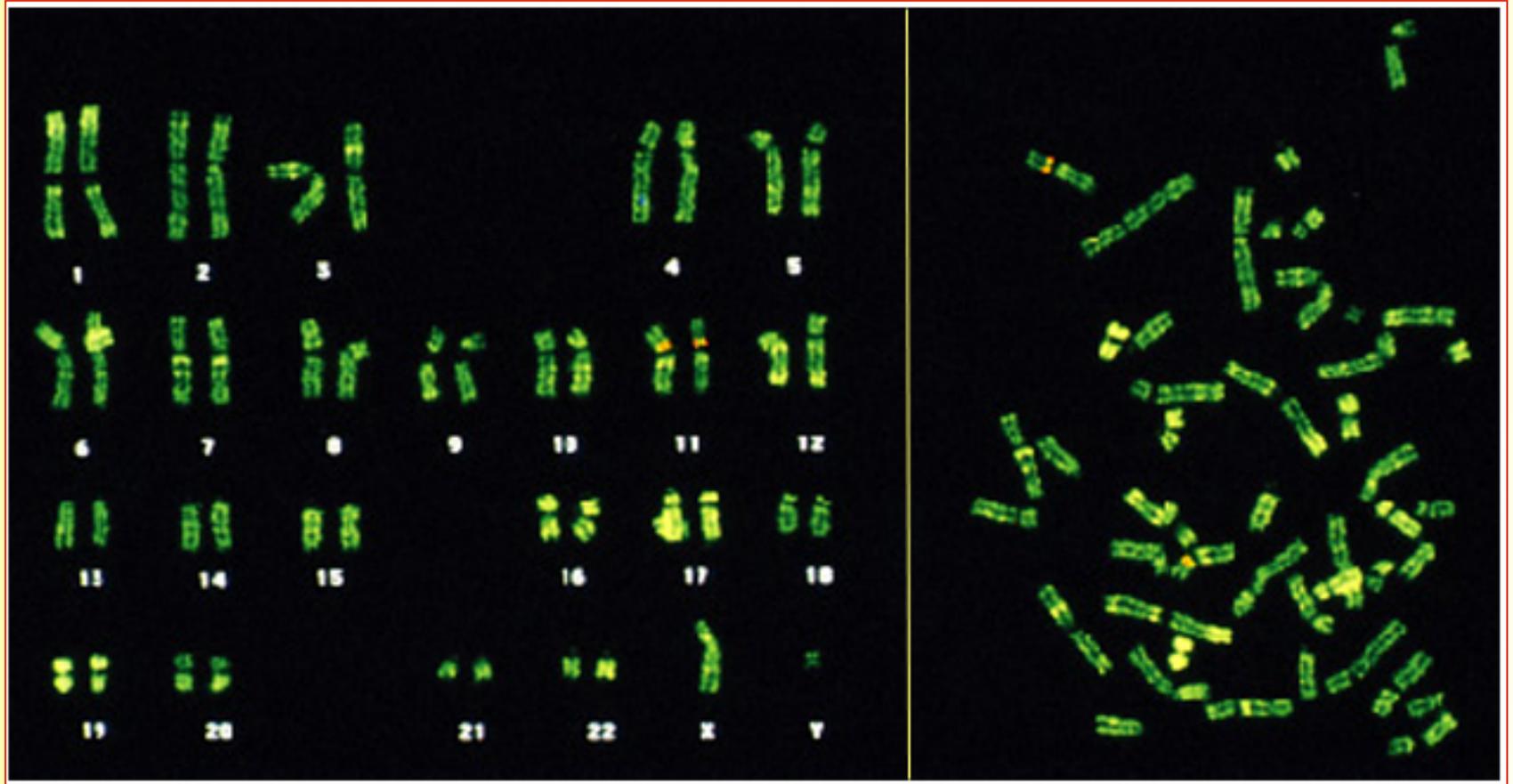
BANDEGGIO RBA



R-banding

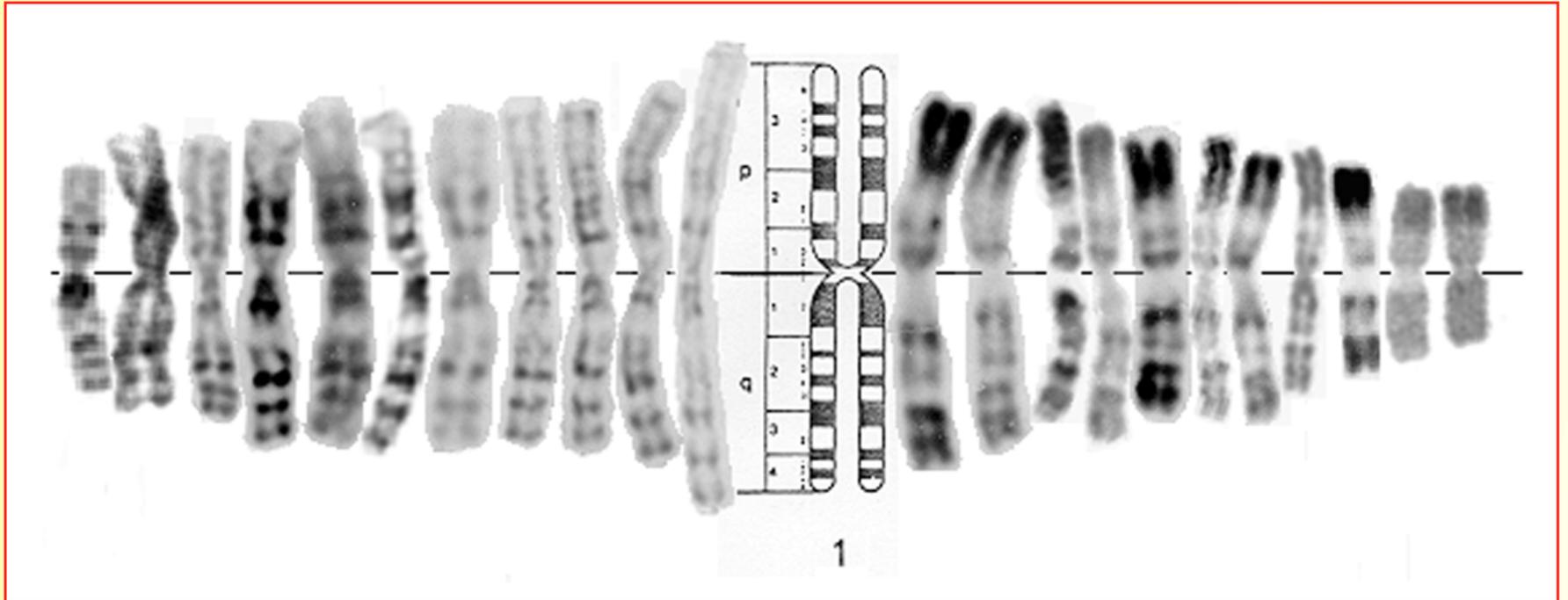


Bandeggio di tipo R

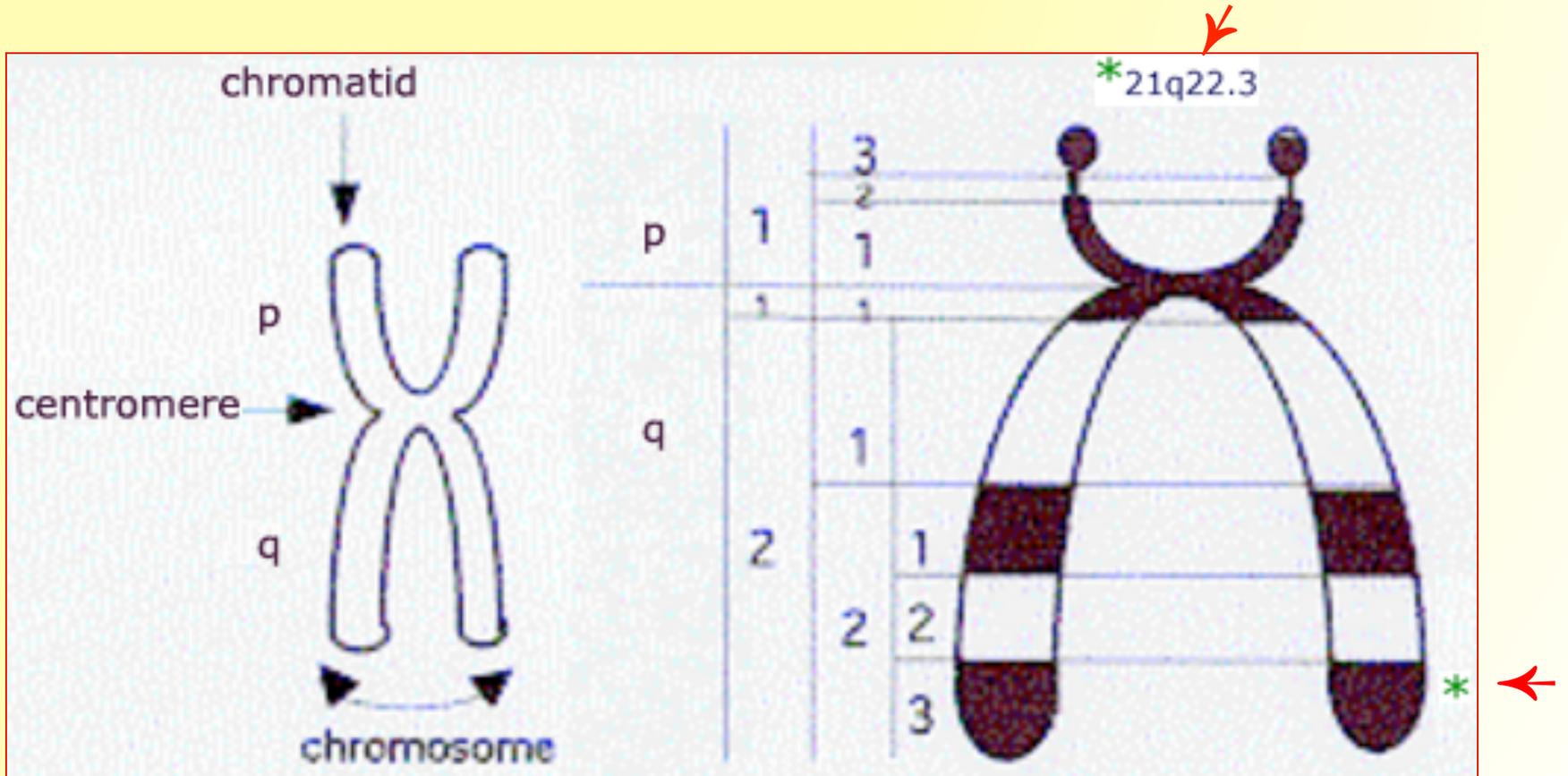


G-b

R-band



Definizione bande



Risoluzione (chromosome 4)

bande ⇒

400

550

850

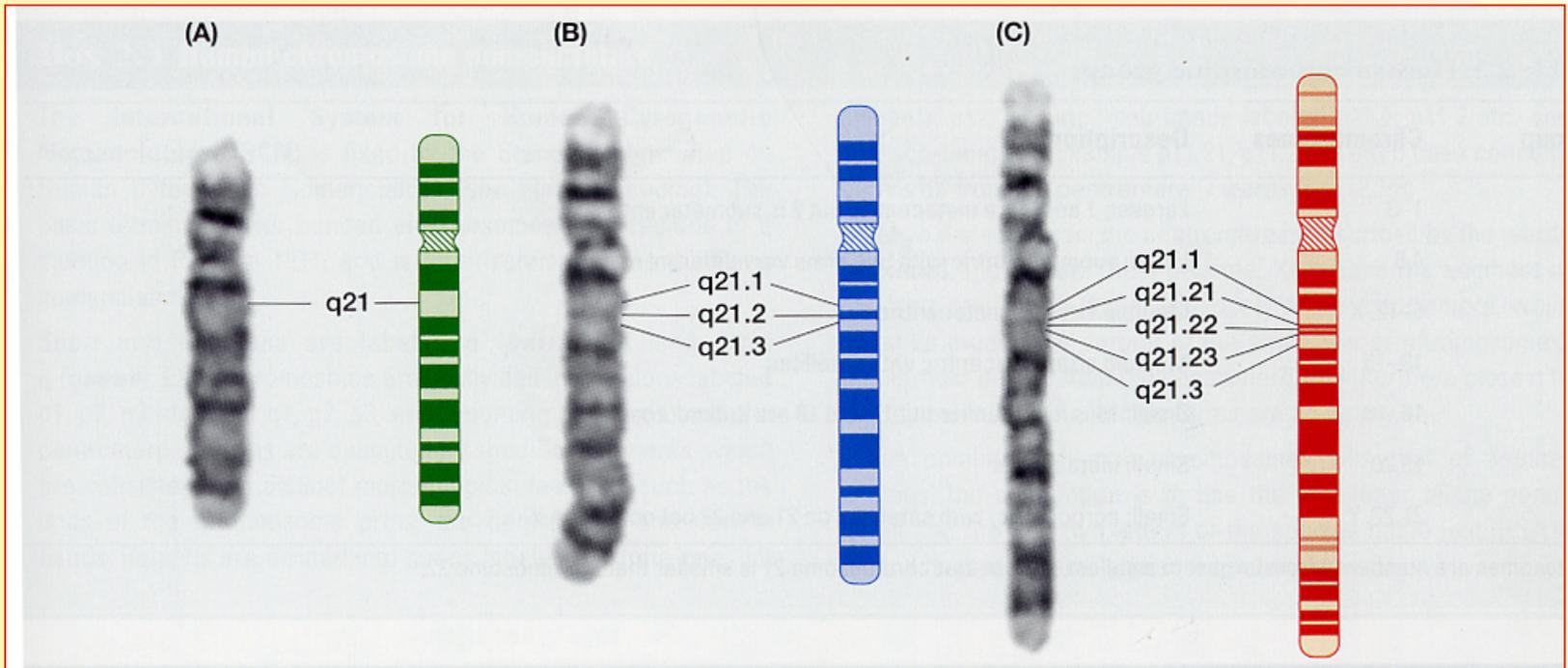


Figure 2.13: Different chromosome banding resolutions can resolve bands, sub-bands and sub-sub-bands.

Chromosome 4 (with accompanying ideogram) is shown at increasing levels of resolution approximating to (A) 400, (B) 550 and (C) 850 bands per haploid set. **Note** the subdivision of bands into sub-bands as the resolution increases. Adapted from Cross and Wolstenholme (2001). In *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis*, 3rd Edn (ed. D. E. Rooney). Reproduced by permission of Oxford University Press.

Bandeggio NOR

(Nucleolar Organizer Regions)

→ trattamento con argento (Bandeggio Ag-NOR).

Il bandeggio Ag-NOR evidenzia solo i NORs attivi (da 4 a 8 per metafase nei diversi individui) per cui nella colorazione sono coinvolte proteine associate all'attività trascrizionale.

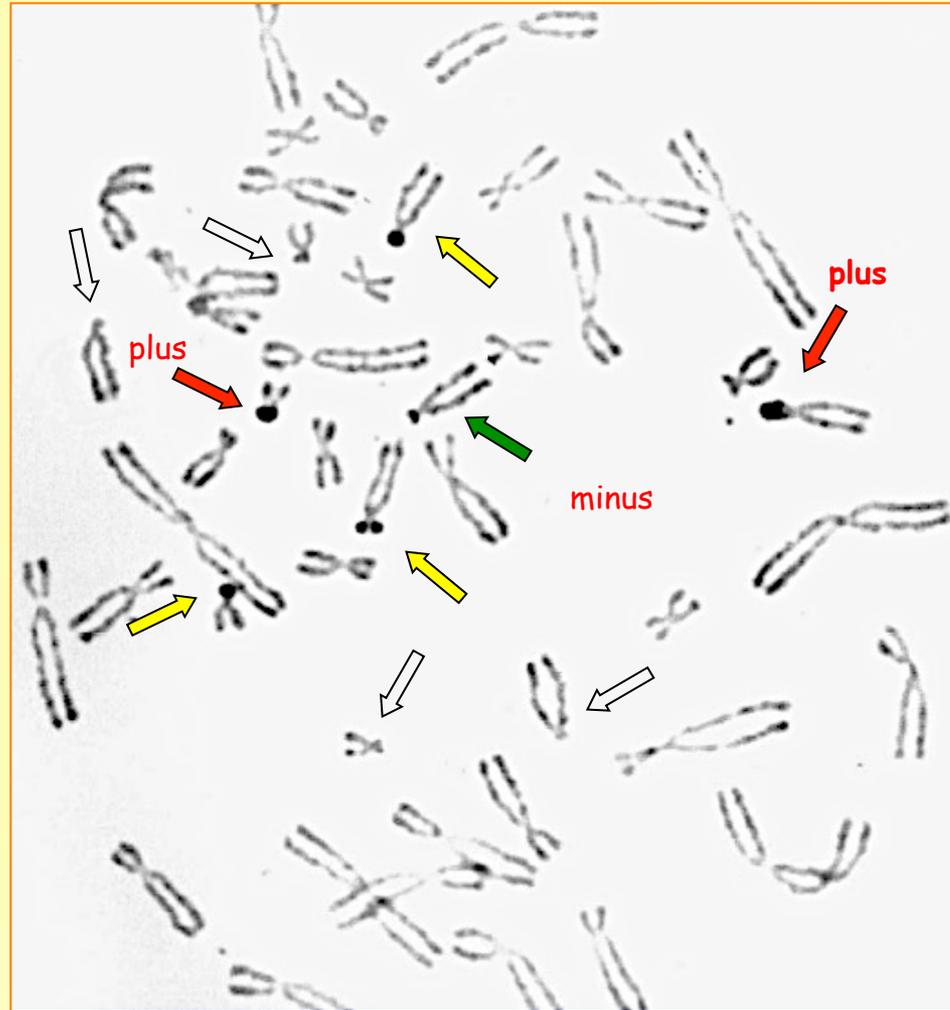
Nei mammiferi, le regioni colorate corrispondono alle costrizioni secondarie sui bracci corti dei cromosomi acrocentrici (gruppo D e G)
(cluster dei geni rDNA 18S, 28S e 5,8S).

AgNOR staining



Fig. 2.5 Metaphase showing typical AgNOR staining

AgNOR staining



Mutazioni nel numero dei cromosomi sessuali

La non-disgiunzione dei cromosomi sessuali umani provoca varie malattie da aneuploidia.

Nonostante il **cromosoma X sia tra i più grandi** sembra che l'aneuploidia degli eterocromosomi causi un minor perturbamento dell'equilibrio genetico

<i>Genotipo</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Origine della non-disgiunzione</i>	<i>Frequenza nella popolazione</i>
XO	Sindrome di Turner (femmina)	Meiosi nella formazione dell'uovo o dello sperma	$1/5000$
XXX	Metafemmina	Meiosi nella formazione dell'uovo	$1/1000$
XXY	Sindrome di Klinefelter (maschio)	Meiosi nella formazione dell'uovo o dello sperma	$1/2000$
XYY	Maschio normale	Meiosi nella formazione dello sperma	$1/2000$

XO: fenotipicamente femmine tuttavia gli organi sessuali non maturano alla pubertà e i caratteri sessuali secondari non si sviluppano.

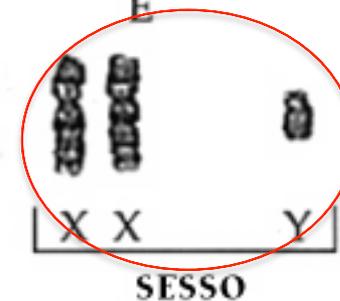
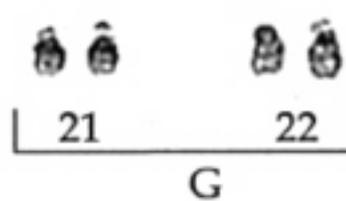
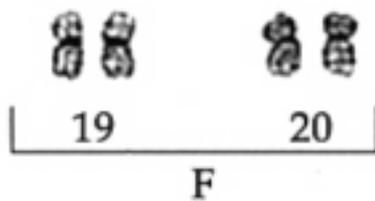
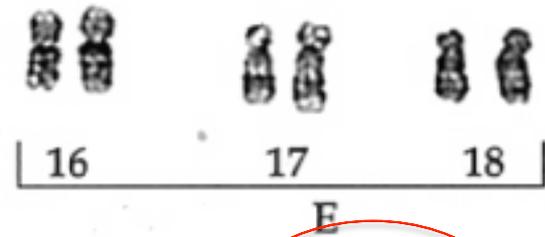
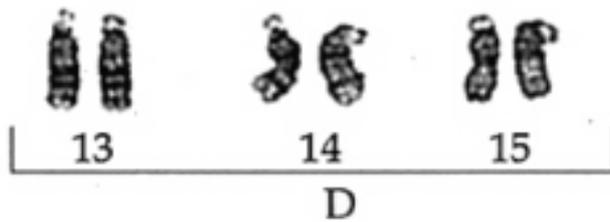
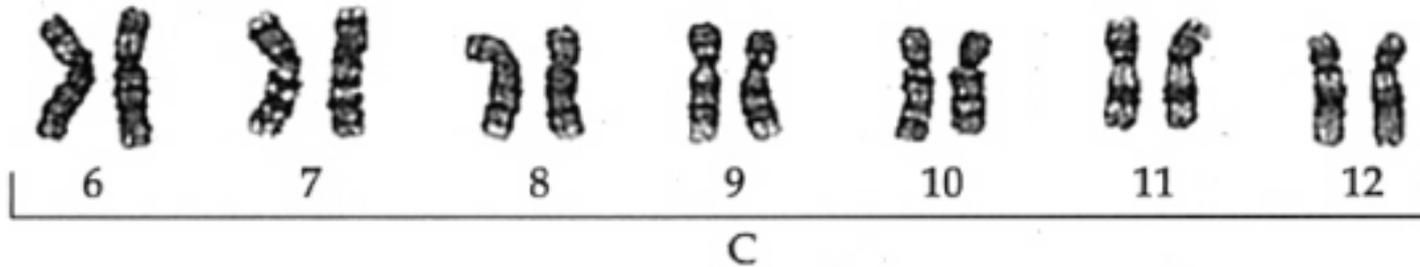
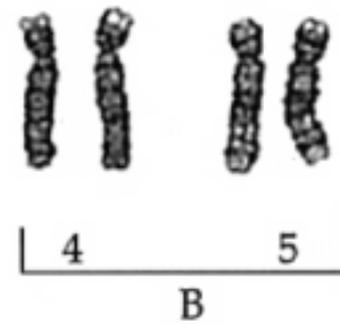
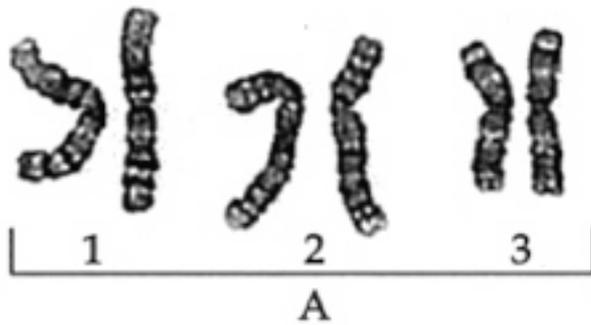
XXX: fenotipo non molto diverso da quello delle normali femmine XX ma hanno fertilità ridotta

XXY: fenotipicamente maschi con testicoli più piccoli del normale. Spesso sterili e a volte con caratteri sessuali secondari femminili.

XYY: Indistinguibili dai maschi XY. Tendono ad avere altezza maggiore e caratteri maschili più marcati.

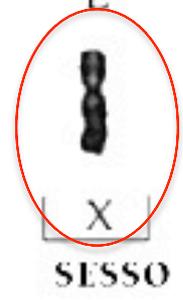
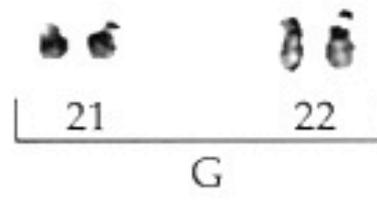
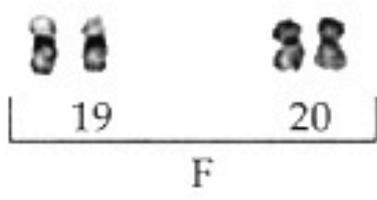
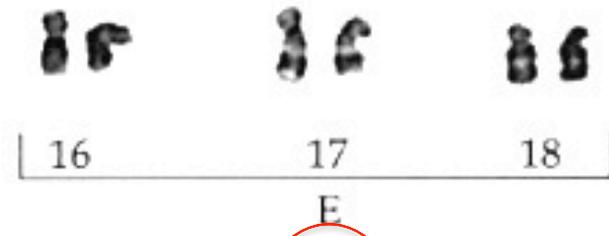
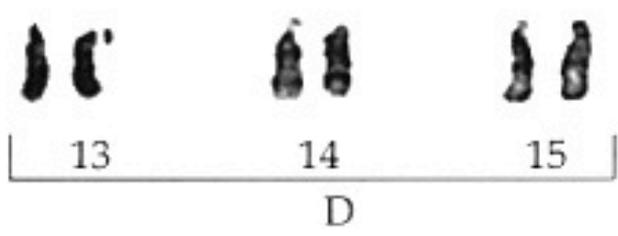
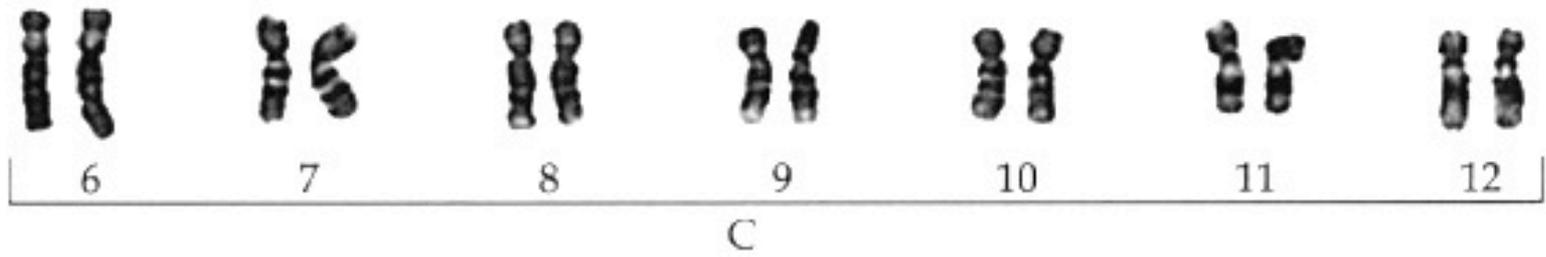
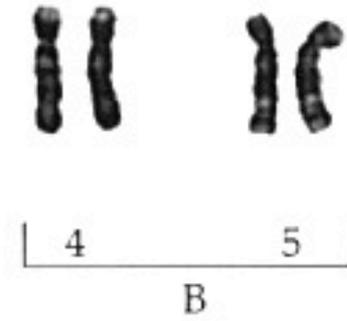
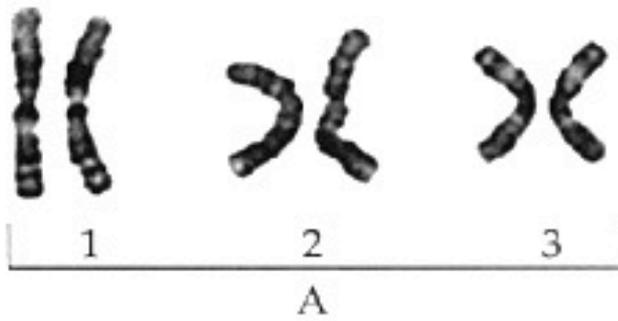
Sindrome di Klinefelter (XXY).

47, XXY



Sindrome di Turner (XO).

45, XO



Trisomie autosomiche

Table 17.1 Human autosomal trisomies.

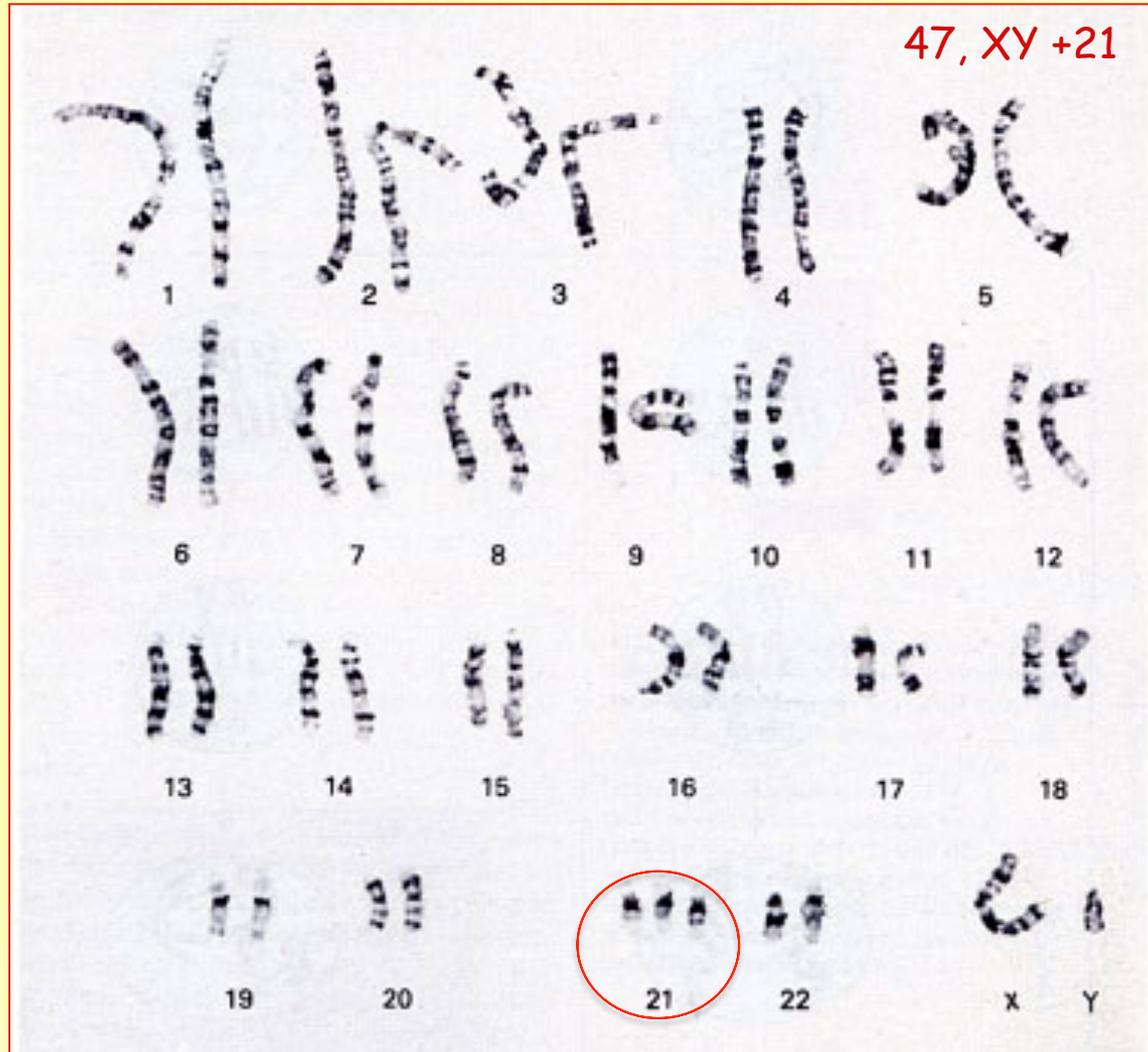
Chromosome	Frequency			Comments
	Clinically recognized pregnancies	Spontaneous abortions	Liveborn	
1	Nil	Nil	Nil	
2	0.16%	1.1%	Nil	
3	0.04%	0.3%	Nil	
4	0.12%	0.8%	Nil	
5	0.02%	0.1%	Nil	
6	0.04%	0.3%	Nil	
7	0.14%	0.9%	Nil	
8	0.12%	0.8%	Nil	
9	0.10%	0.7%	Nil	
10	0.07%	0.5%	Nil	
11	0.01%	0.1%	Nil	
12	0.02%	0.2%	Nil	
13	0.18%	1.1%	0.005%	Patau's syndrome: severe abnormalities, die shortly after birth
14	0.14%	1.0%	Nil	
15	0.26%	1.7%	Nil	
16	1.13%	7.5%	Nil	
17	0.02%	0.1%	Nil	
18	0.18%	1.1%	0.01%	Edwards' syndrome: severe abnormalities, die shortly after birth
19	Nil	Nil	Nil	
20	0.09%	0.6%	Nil	
21	0.45%	2.3%	0.12%	Down's syndrome: 75% spontaneously aborted, but many survive to adulthood
22	0.40%	2.7%	Nil	

Data from Jacobs & Hassold (1995).

Espersen et al., *Acute myeloid leukemia (AML) with t(7;12)(q36;p13) is associated with infancy and trisomy 19: Data from Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO-AML) and review of the literature.* *Genes, Chromosomes & Cancer*, 57(7): 359-365, 2018.

t(7;12)(q36;13) is a unique subgroup of childhood AML with presentation before 2 years of age with most cases being associated with +19.

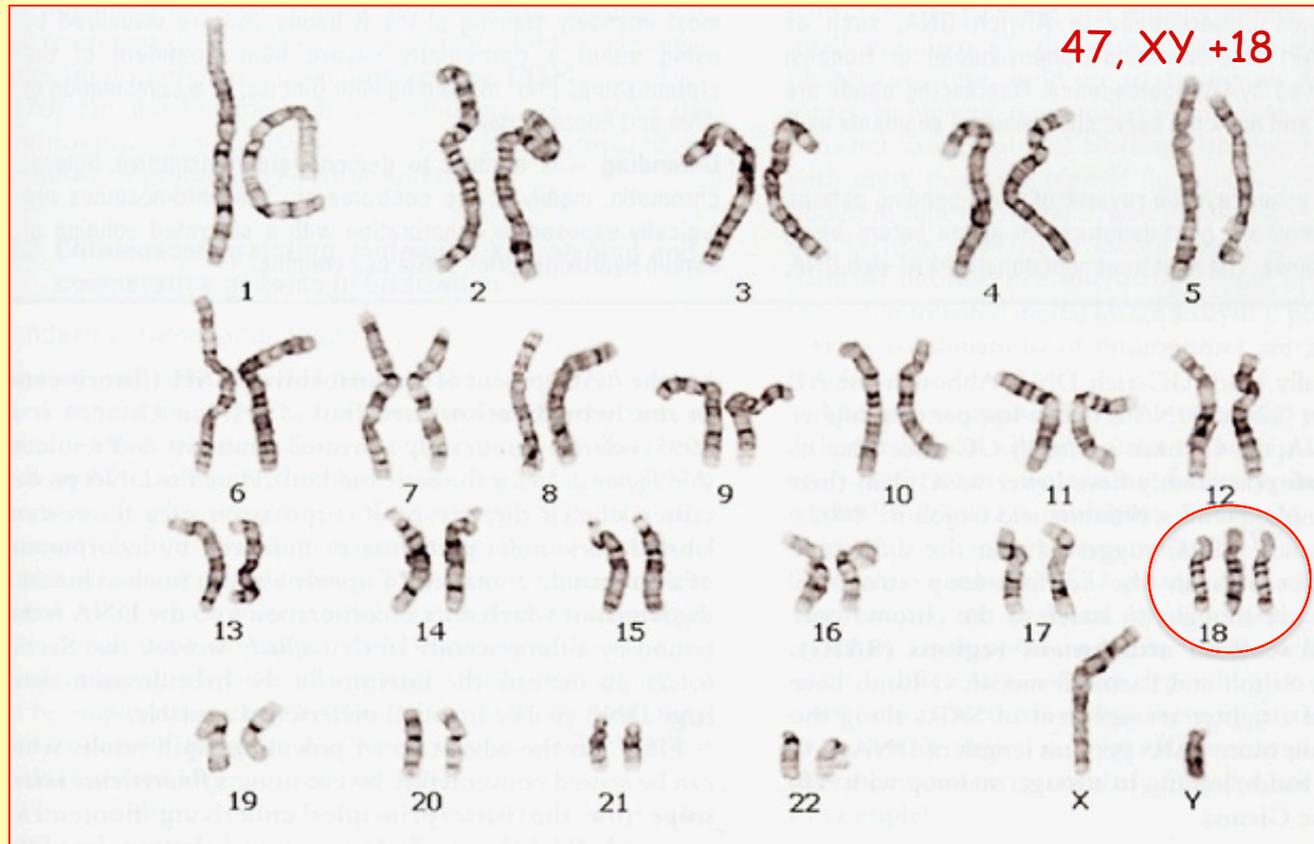
Cariogramma Sindrome di Down



Sindrome di Patau

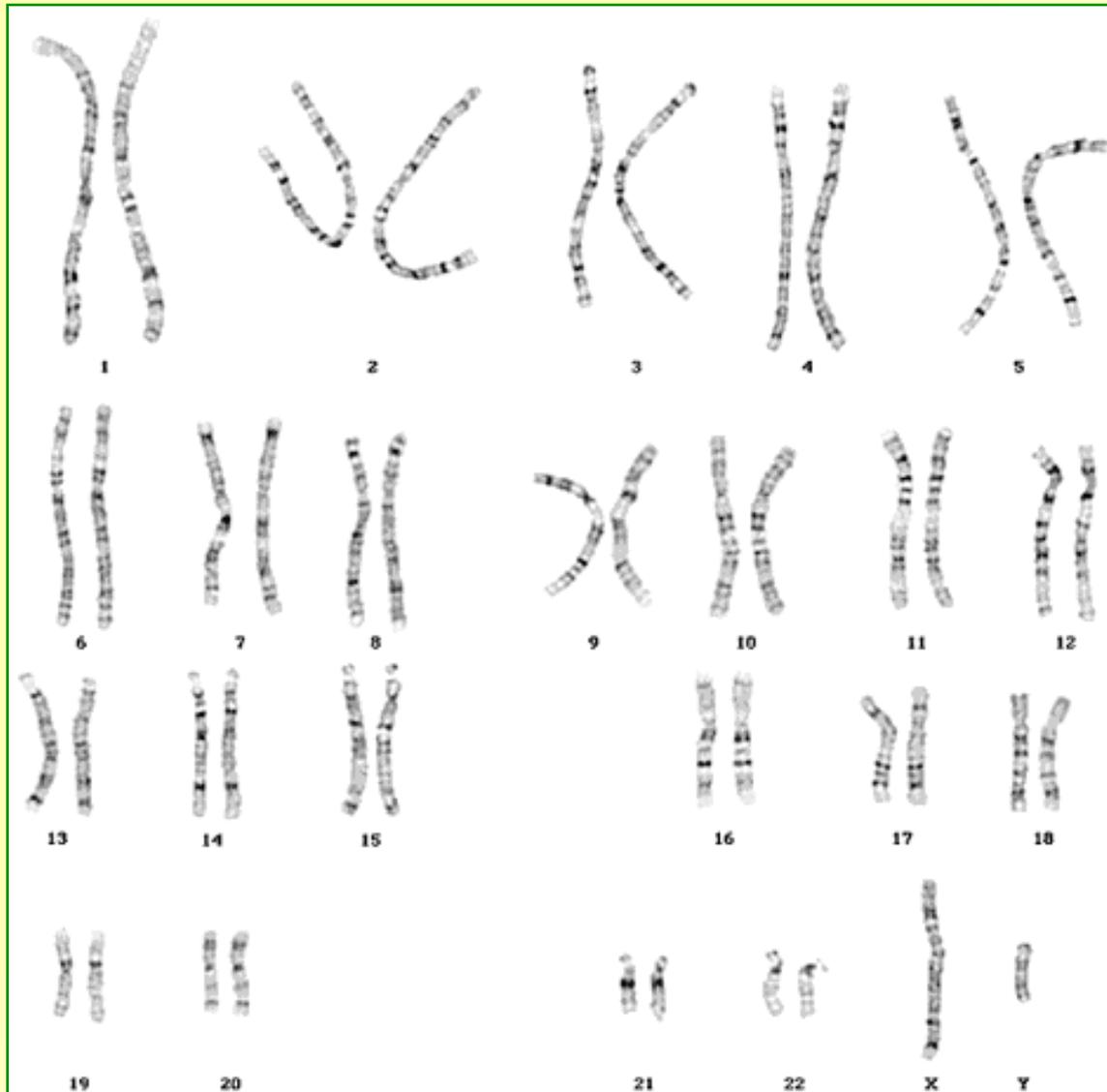


Sindrome di Edwards



BANDEGGIO GTG

Cariogramma - Risoluzione 650 bande

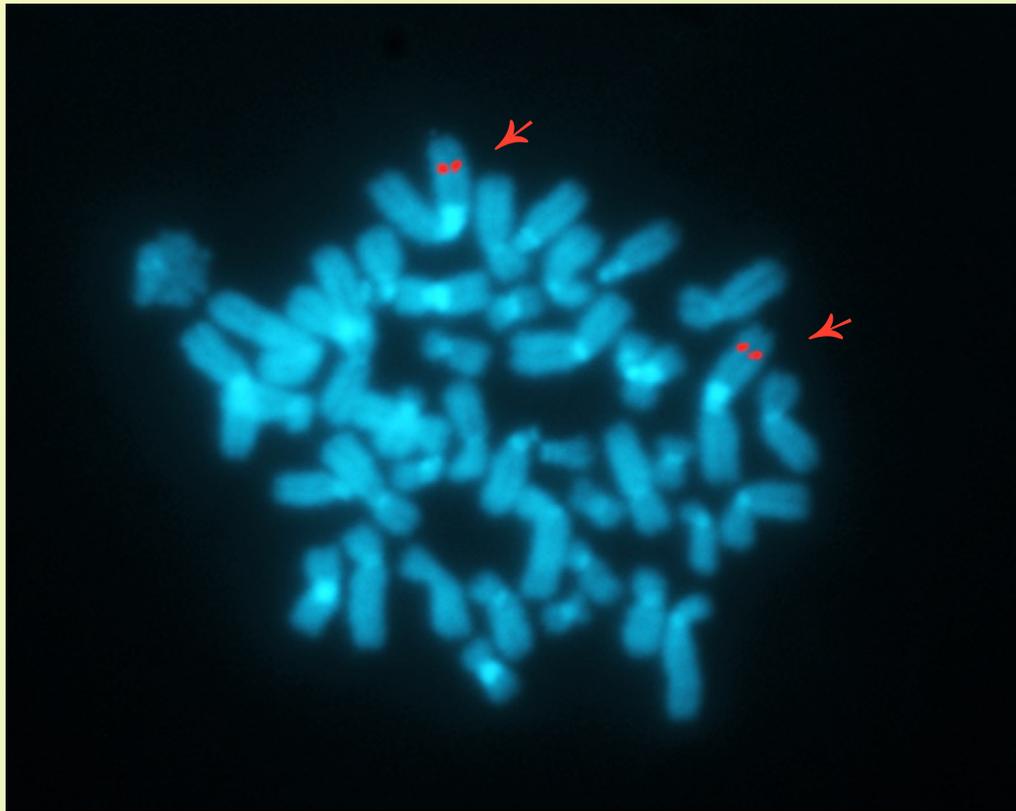


46,XY

"FISH"

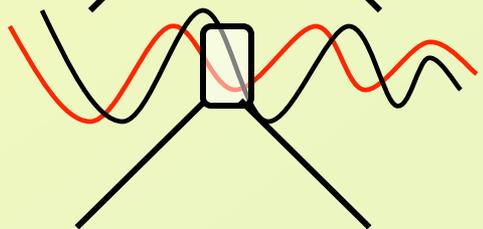
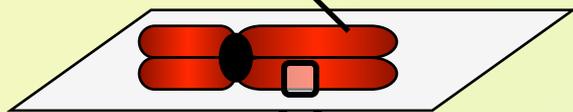


IBRIDAZIONE *IN SITU* FLUORESCENTE



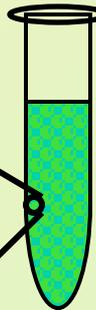
- tecnica di citogenetica molecolare che permette di localizzare ed individuare specifiche sequenze di acido nucleico su **chromosomi**, su **nuclei interfasici** o **sezioni di tessuti** ottenuti da qualunque materiale biologico
- sfrutta la capacità di molecole a singolo filamento, con sufficiente grado di complementarietà, di ibridare, ossia di formare una molecola a doppio filamento
- Correlazione tra **DNA-CROMOSOMI**

cromosoma
sul vetrino

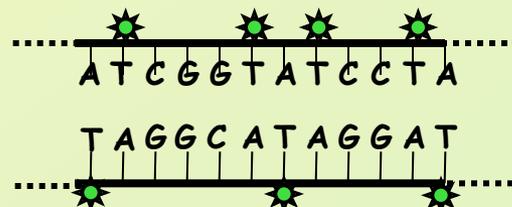
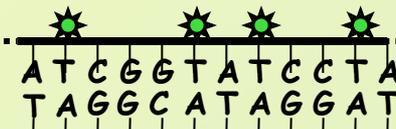


doppia elica
di DNA

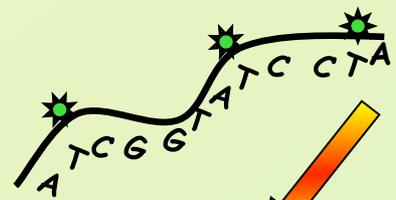
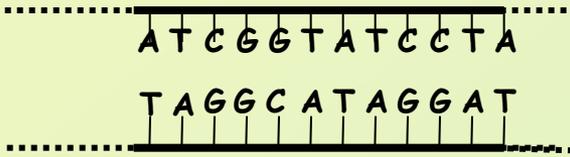
sintesi di una sonda complementare
marcata con un fluorocromo



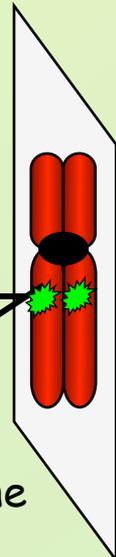
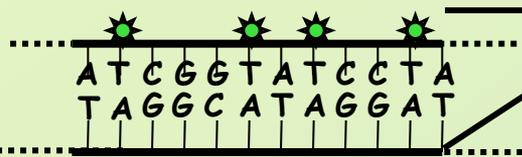
denaturazione



denaturazione

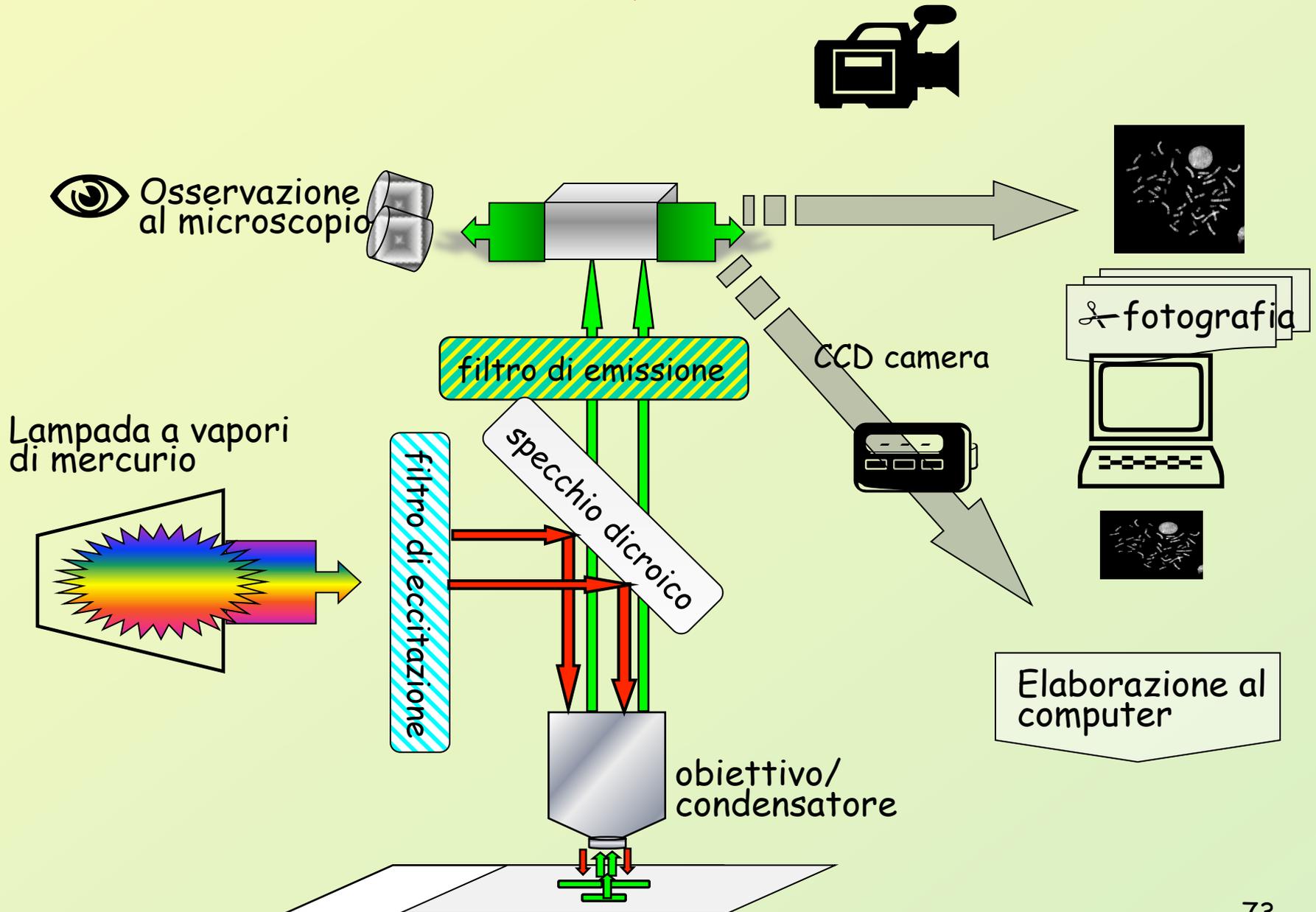


ibridazione della sonda sui
cromosomi denaturati
sul vetrino



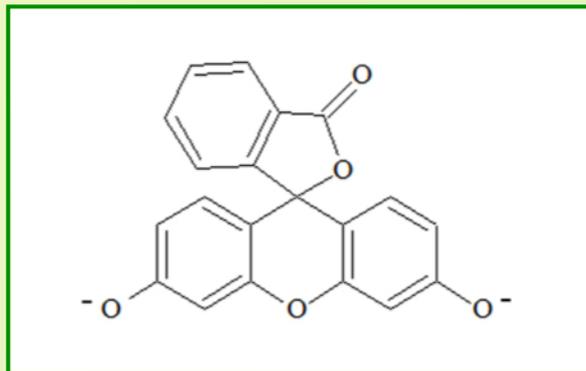
osservazione
del vetrino

FISH : microscopio a fluorescenza

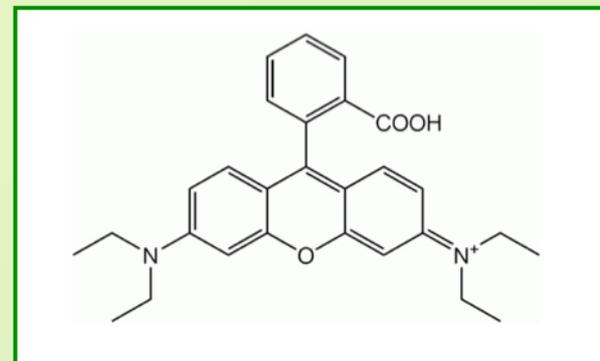


1. Metodo DIRETTO

- Molecola "reporter" **legata direttamente alla sonda di acido nucleico** (nucleotidi coniugati al gruppo fluoroforo)
- Gli ibridi possono essere osservati al microscopio immediatamente dopo l'ibridazione
- Il legame sonda-reporter deve resistere alle condizioni di ibridazione e di lavaggio
- La molecola reporter non deve interferire con la reazione di ibridazione



FLUORESCINA



RODAMMINA

2. Metodo INDIRECTO

- La sonda contiene una **molecola reporter** introdotta chimicamente o enzimaticamente, **evidenziabile per affinità citochimica**
- La presenza della molecola reporter non deve interferire con la reazione di ibridazione o sulla stabilità dell'ibrido risultante.
- La molecola reporter deve essere accessibile agli anticorpi.

Due sistemi maggiormente usati:

BIOTINA - AVIDINA

DIGOSSIGENINA - Anticorpo ANTIDIGOSSIGENINA

Marcatura della SONDA

⇒ DNA polimerasi (DNA pol.I di E.coli, DNA pol. di T4 e di T7, trascrittasi inversa, Taq DNA pol.) e RNA polimerasi accettano come substrato nucleotidi marcati con DIG/BIO e permettono, ad esempio, marcature per

RANDOM PRIMED * NICK TRANSLATION * PCR

DIG-dUTP/dTTP
BIO-dUTP/dTTP



ottimizzato per ottenere un'alta sensibilità.

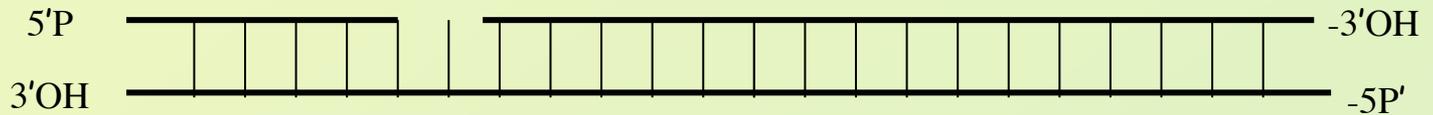
1 DIG/BIO-dUTP ogni 20-25 nt è la densità ottimale

poiché gli anticorpi coniugati coprono ~20 nt

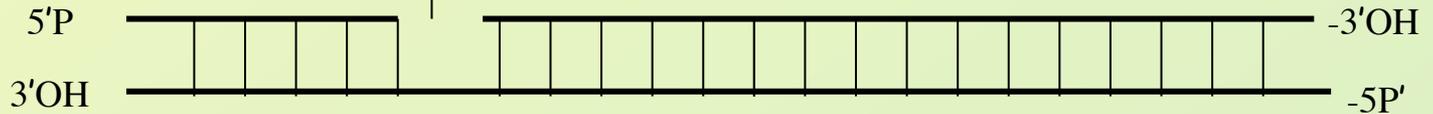
NICK TRANSLATION

- Nella miscela di reazione sono presenti, oltre al DNA da marcare, DNAsi I, DNA pol. I di E.coli, e i nt, di cui uno marcato.
- La DNA polimerasi I di E.coli aggiunge nt al 3'-OH creato dal taglio della DNAsi I. Grazie alla sua attività esonucleasica 5'→3' può rimuovere i nt dal 5' del taglio e incorporare quelli marcati.

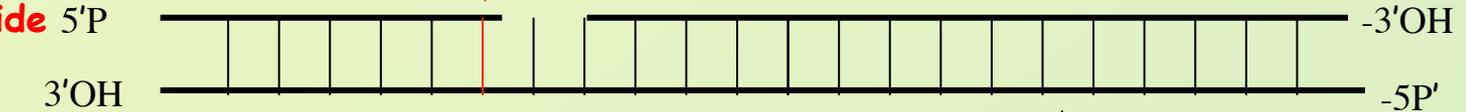
nick con un -OH disponibile



L'attività 3'→5' esonucleasica
rimuove il nucleotide



L'attività 5'→3' polimerasica
sostituisce il nucleotide



L'attività 5'→3' esonucleasica
sposta il nick verso il 3'

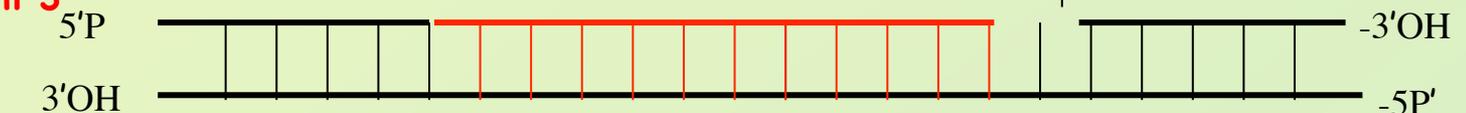


Diagramma di flusso della FISH

PREPARAZIONE E FISSAGGIO VETRINI

PRETRATTAMENTI
RNAsi per diminuire il fondo
Permeabilizzazione con proteasi, detergenti, acidi diluiti

Denaturazione con calore o ↑ pH

IBRIDAZIONE
DNA competitore, sali, formammide, dextran solfato

Lavaggi post-ibridazione

Detection immunologica
Blocking, anticorpo, controcolorazione

Preparazione e marcatura della sonda

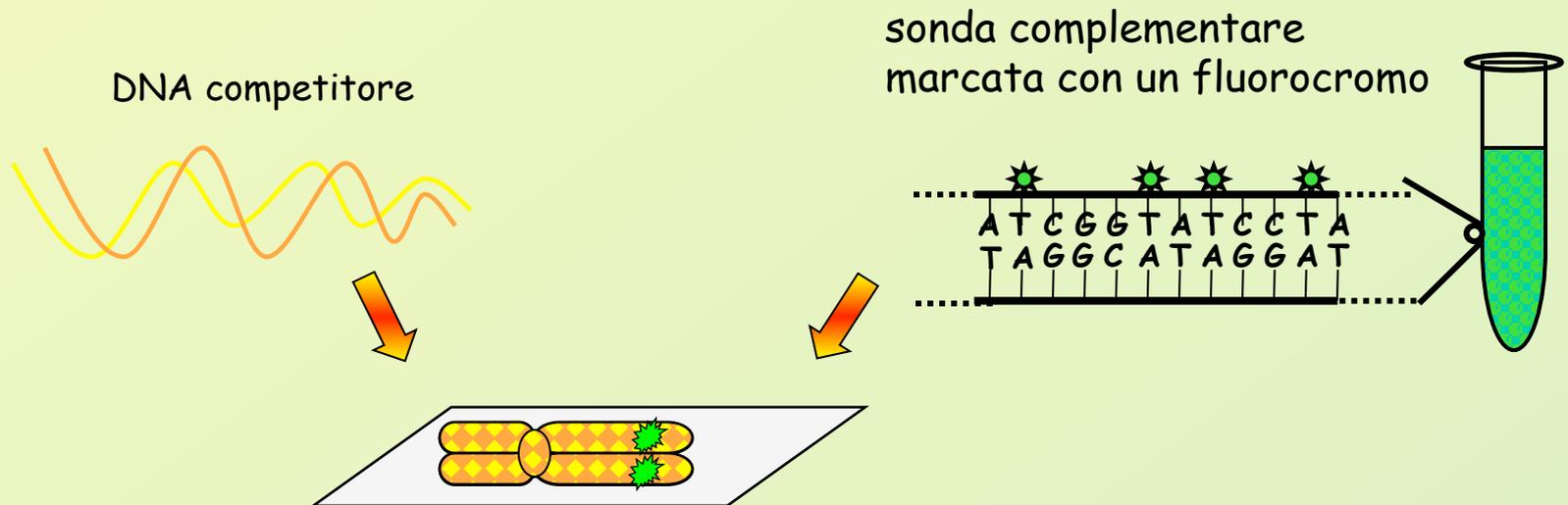
Determinare condizioni ibridazione

Chiusura dei vetrini e osservazione al m.o. a fluorescenza

Chiusura dei vetrini e osservazione al m.o. a fluorescenza

DNA COMPETITORE

Nasconde sequenze ripetute condivise da DNA bersaglio-sonda
Es. Sequenze Alu, LINEs, ecc



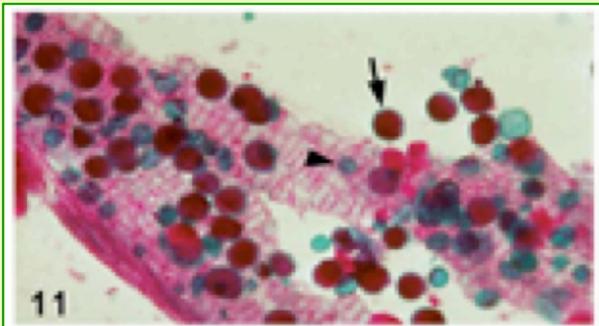
CONDIZIONI DI STRINGENZA

STRINGENZA	GRADI SOTTO LA T_m	
ALTA	5-10 °C	SI LEGANO IN QUESTE CONDIZIONI SOLO SEQUENZE AD ELEVATA OMOLOGIA DI SEQUENZA [GENERALMENTE >95%]
MEDIA	20-29°C	SI LEGANO IN QUESTE CONDIZIONI SEQUENZE PIÙ O MENO OMOLOGHE [GENERALMENTE >80%]
BASSA	40-48°C	SI LEGANO IN QUESTE CONDIZIONI SEQUENZE A BASSA OMOLOGIA [GENERALMENTE >50%]

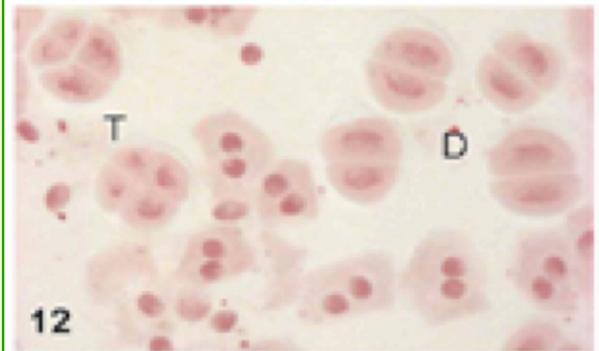
Quando vogliamo selezionare ibridazioni molto specifiche (FISH), per esempio se dobbiamo cercare un gene omologo ad una sonda, effettueremo un'ibridazione in condizioni di alta stringenza. Cioè utilizzando temperature di ibridazione relativamente (alla T_m del nostro target) alte e/o soluzioni ad alta forza ionica.

Quando vogliamo selezionare ibridazioni poco specifiche (per esempio nello screening di geni eterologhi, ZOOBlot) utilizzeremo condizioni di stringenza basse.

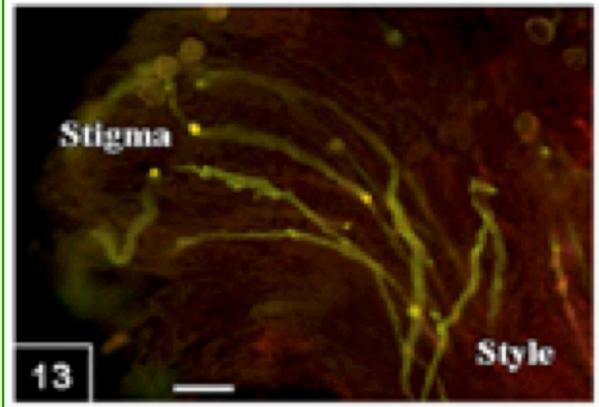
Tissue *In situ* hybridization



→ Tessuti

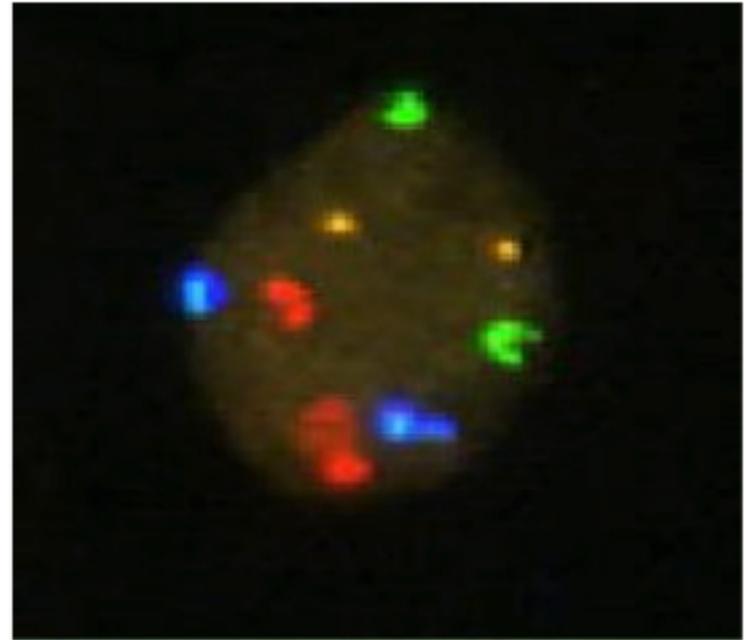
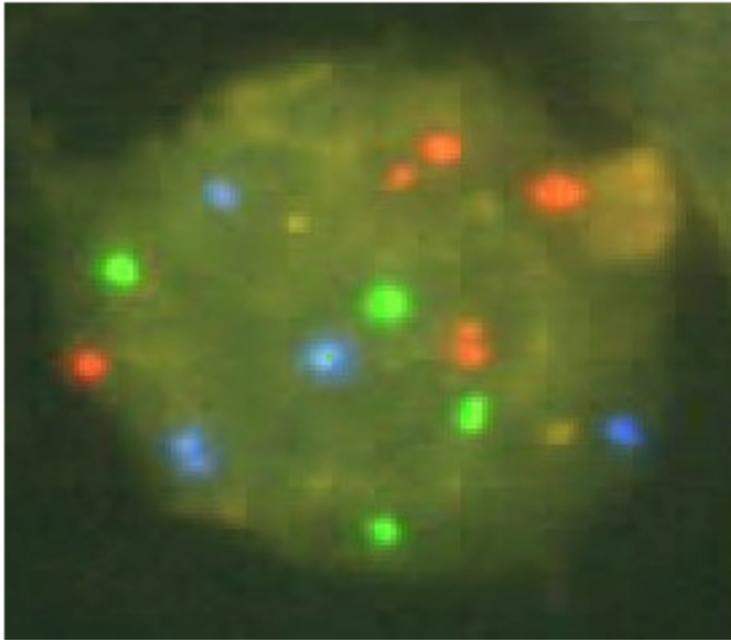


→ Granuli pollinici



→ Strutture specifiche
tubuli pollinici

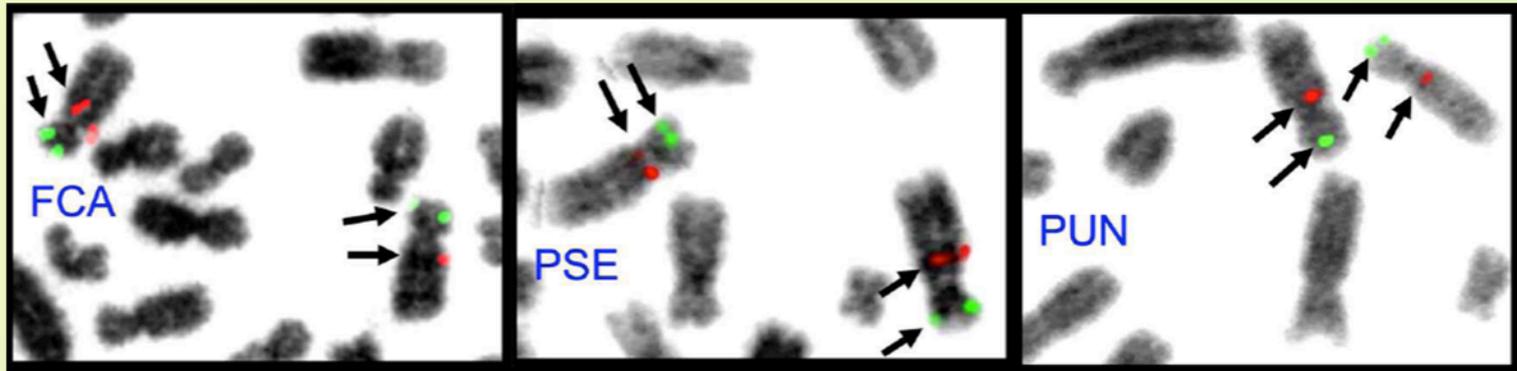
ANEUPLOIDIE/POLIPLOIDIE



ZOO-FISH

- permette di identificare e visualizzare direttamente sul cariotipo sequenze omologhe in organismi diversi
- necessaria una bassa stringenza delle condizioni di ibridazione
- utile quando un genoma non è ancora stato sequenziato ed è difficile utilizzare un approccio bioinformatico

Ibridazione di due sequenze tra 3 specie di felidi
Davis BW et al., GENOMICS 2008



Gatto Domestico

Gattopardo Africano

Leopardo

⇒ Conservazione delle sequenze e delle posizioni reciproche

un ulteriore passo avanti si ha con la costruzione di sonde cromosoma-specifiche

CHROMOSOME PAINTING



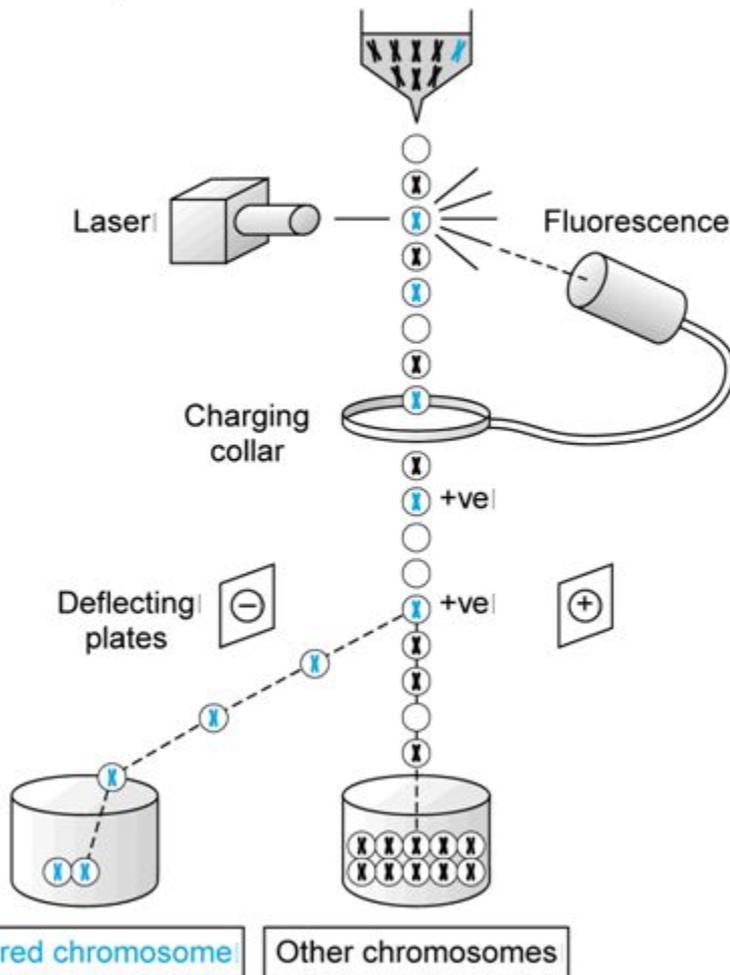
Permette di visualizzare specifici cromosomi in metafase o in cellule interfasiche

Sonde per painting

Le sonde per il painting vengono prodotte o con purificazione dei cromosomi mediante separazione a flusso e successiva PCR con primers degenerati o per microdissezione di normali cromosomi metafasici, seguita da amplificazione di DNA indipendente dalla sequenza

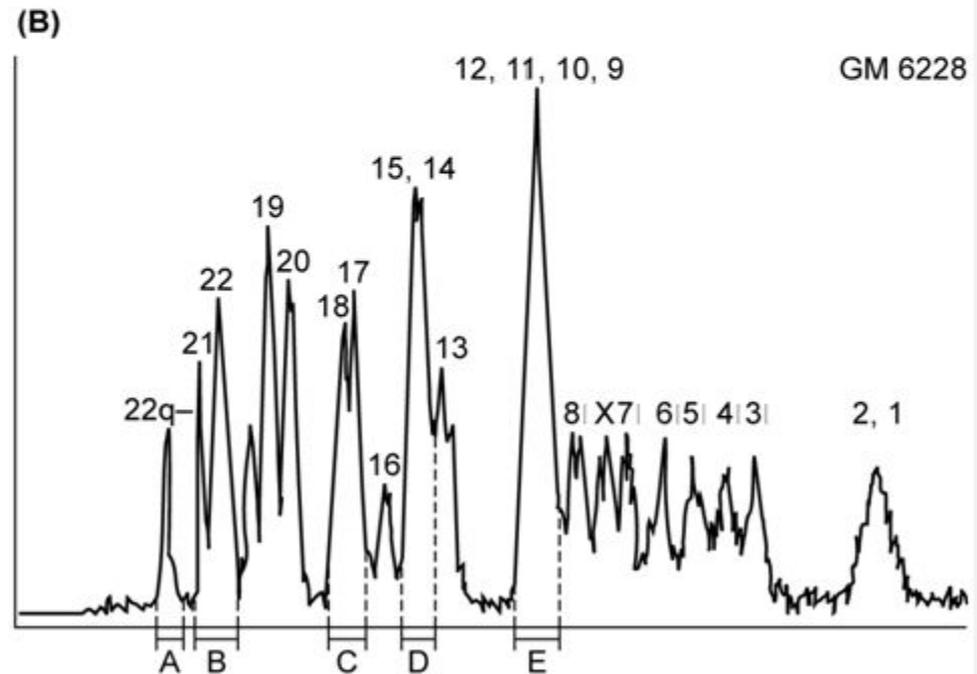
SEPARAZIONE DI CROMOSOMI CON CITOMETRIA A FLUSSO

(A) Metaphase chromosomes stained with fluorescent dye



Cariogramma di flusso:

Linea cellulare GM 6228 con
traslocazione $t(11;22)(q23;q11)$



- Si possono ottenere sonde per il reverse chromosome painting:
i cromosomi aberranti vengono isolati e utilizzati come sonde per il painting sui cromosomi di metafasi normali.
- La microdissezione permette la produzione di sonde per specifiche regioni cromosomiche.
- Adesso sono disponibili sonde per il painting di un numero crescente di specie

Multicolor Chromosome Painting

E' possibile distinguere simultaneamente in un unico esperimento cromosomi o target cromosomici multipli

Nel 1996 è stata dimostrata la possibilità di visualizzare con specifici colori tutti i 24 cromosomi umani. Comunemente vengono utilizzati 5 fluorocromi diversi; alcuni cromosomi sono marcati con un unico fluorocromo, gli altri con combinazioni diverse di due fluorocromi.

SKY

- **SKY** (SPECTRAL KARYOTYPING) → ibridazione simultanea delle 24 sonde per painting cromosoma-specifiche, marcate con una combinazione differente di 5 fluorocromi. Lo spettro di emissione completo viene misurato da un singolo filtro per mezzo di una combinazione di microscopia a fluorescenza, spettroscopia di Fourier e CCD. Viene generato un interferogramma per ogni pixel nell'immagine che è specifico per uno o una combinazione di fluorocromi. Viene poi assegnato un colore specifico a tutti i pixel con identico spettro.

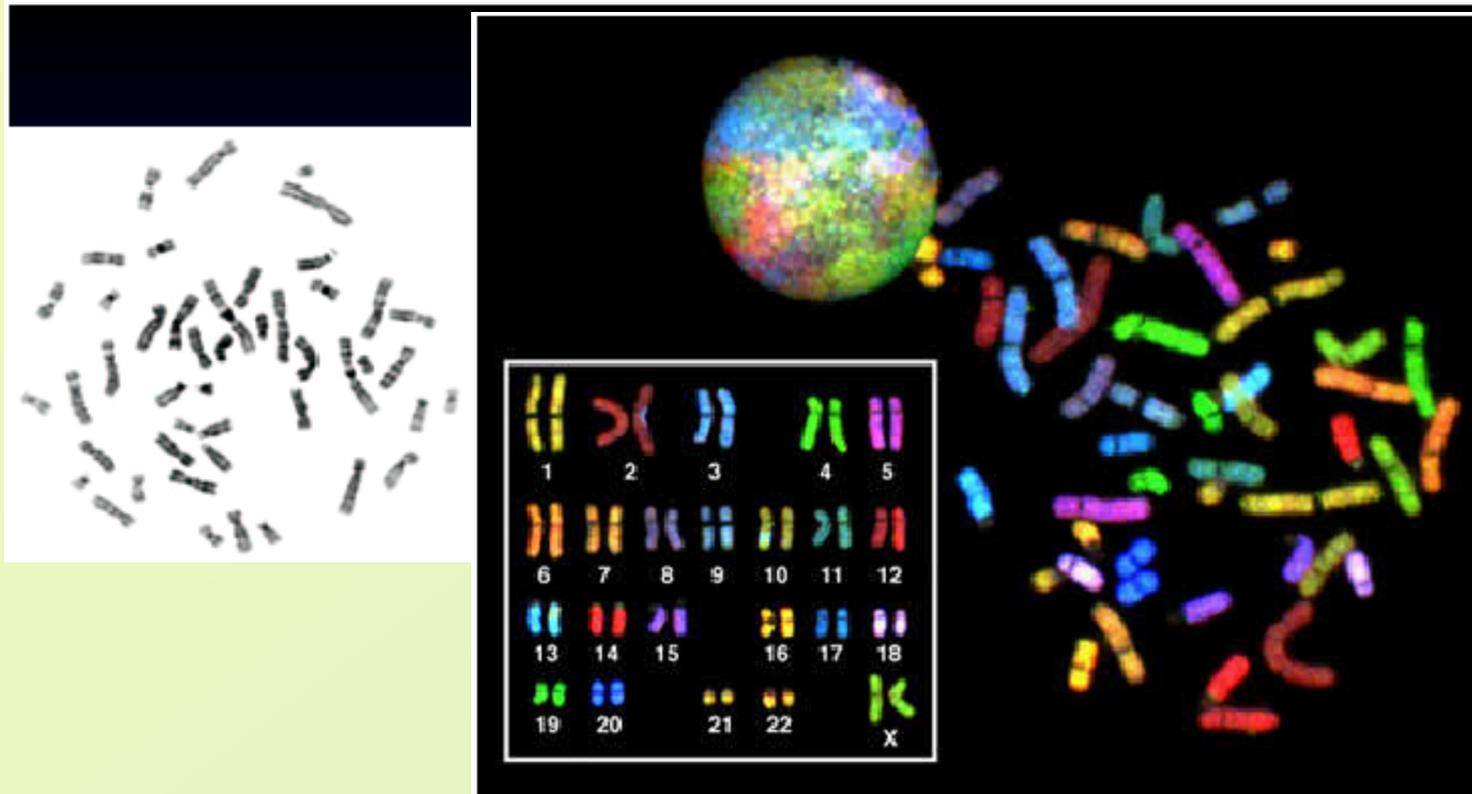
M-FISH

- **M-FISH** (MULTICOLOR-FISH) → ibridazione tipo SKY, ma diverso metodo di discriminazione delle diverse combinazioni di segnali fluorescenti. Vengono catturate immagini separate per ognuno dei 5 fluorocromi con filtri molto selettivi e poi combinate per mezzo di software specifici.

SKY/Multiplex-FISH:

- analisi simultanea di tutto il corredo cromosomico con un approccio rapido: un singolo esperimento per lo studio dell'intero cariotipo;
- sistema affidabile di caratterizzazione contemporanea di tutti i riordinamenti cromosomici nella cariotipizzazione di cellule neoplastiche
- ma non è in grado di rivelare amplificazioni e/o delezioni $\leq 1\text{Mb}$ nello stesso cromosoma

Uso di sonde painting in fluorescenza per tutti i cromosomi,
utile per sensibilità nei cariotipi complessi



- **M-FISH** e **SKY**: FISH con 24 sonde painting

SKY

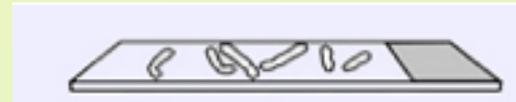
Separazione dei 24 cromosomi
(flow sorted)



Marcatura dei singoli
cromosomi utilizzando varie
combinazioni di fluorocromi



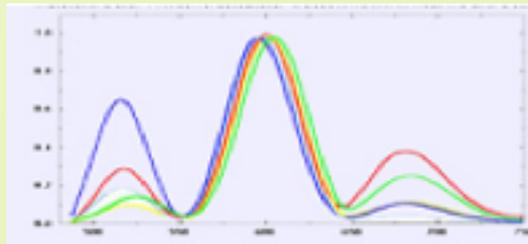
IBRIDAZIONE A 37°C PER 24/72 ORE



Steps di detection per visualizzare le sonde e rimuovere i nucleotidi non legati



Acquisizione con
microscopio a fluorescenza
e camera CCD



INTERFEROGRAMMA



M-FISH

Ogni cromosoma è marcato con una combinazione unica di massimo quattro dei cinque fluorocromi utilizzati.

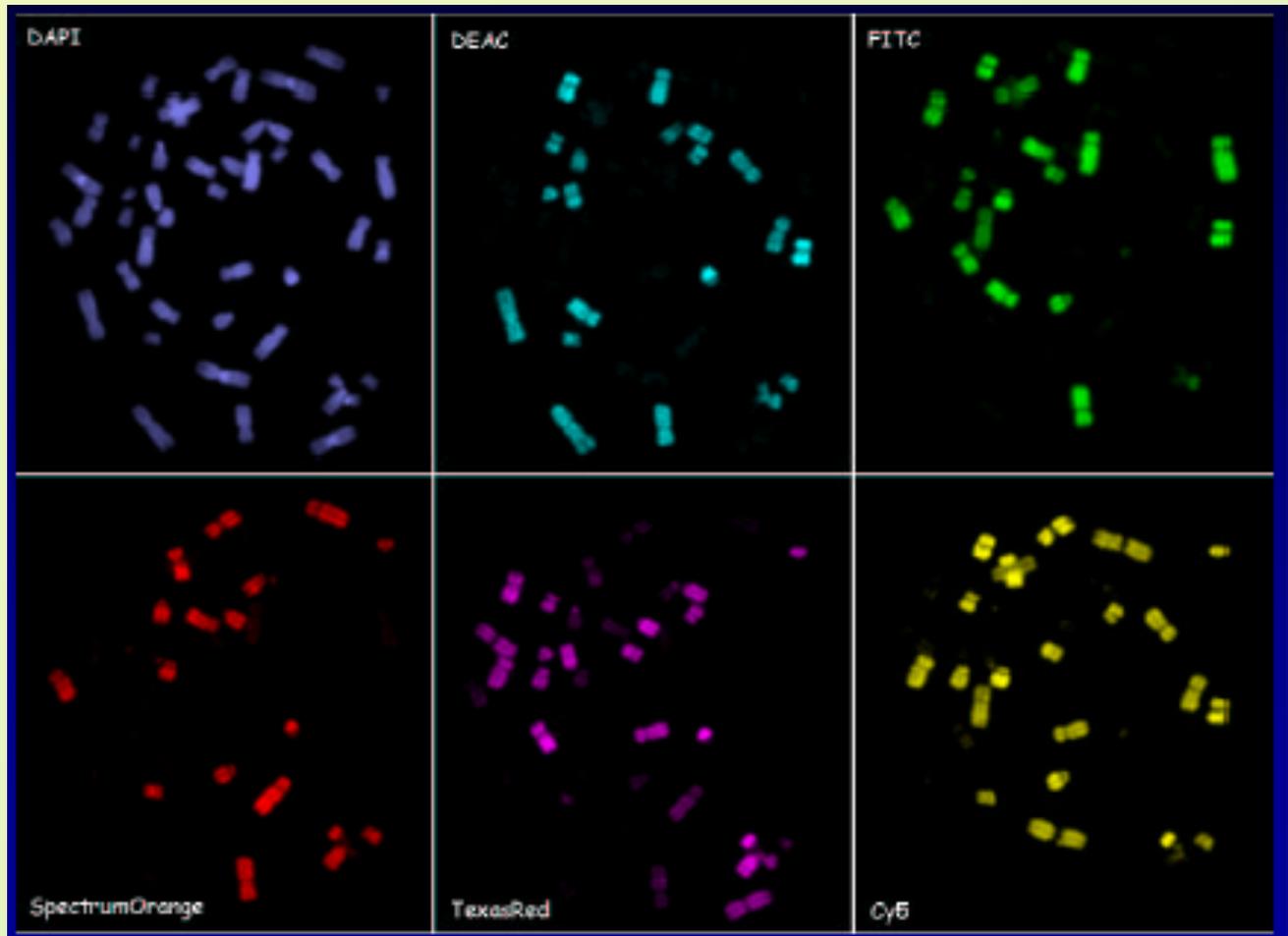
chr	Label	chr	Label	chr	Label
1	BCD	9	ADE	17	C
2	E	10	CE	18	ABD
3	ACDE	11	ACD	19	AC
4	CD	12	BE	20	A
5	ABDE	13	AD	21	DE
6	BCDE	14	B	22	ABCE
7	BC	15	ABC	X	AE
8	D	16	BD	Y	CDE

Si ottiene così una specifica fluorescenza, o spettro, per ciascun cromosoma

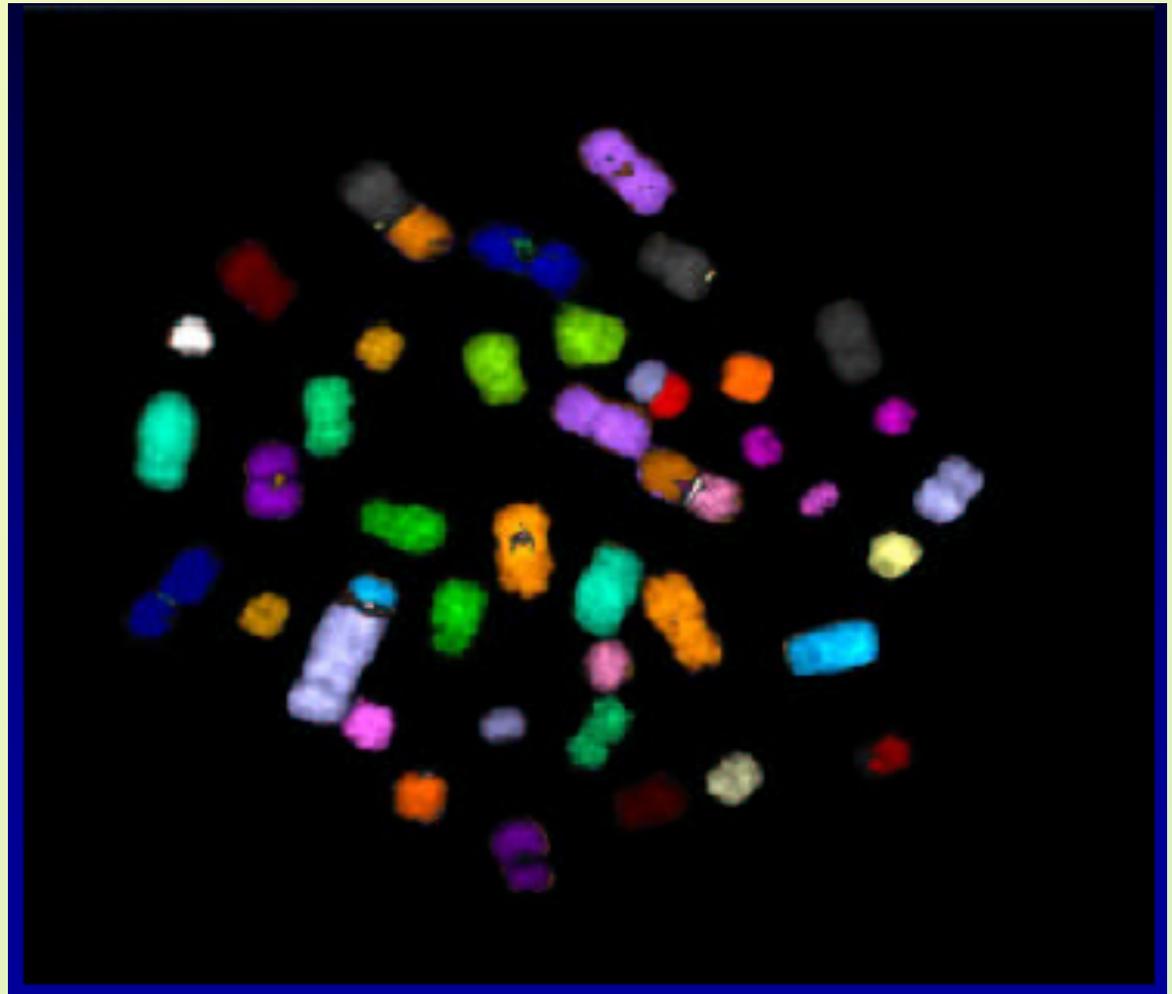
A = Rodamina
B = Texas Red
C = Cy 5

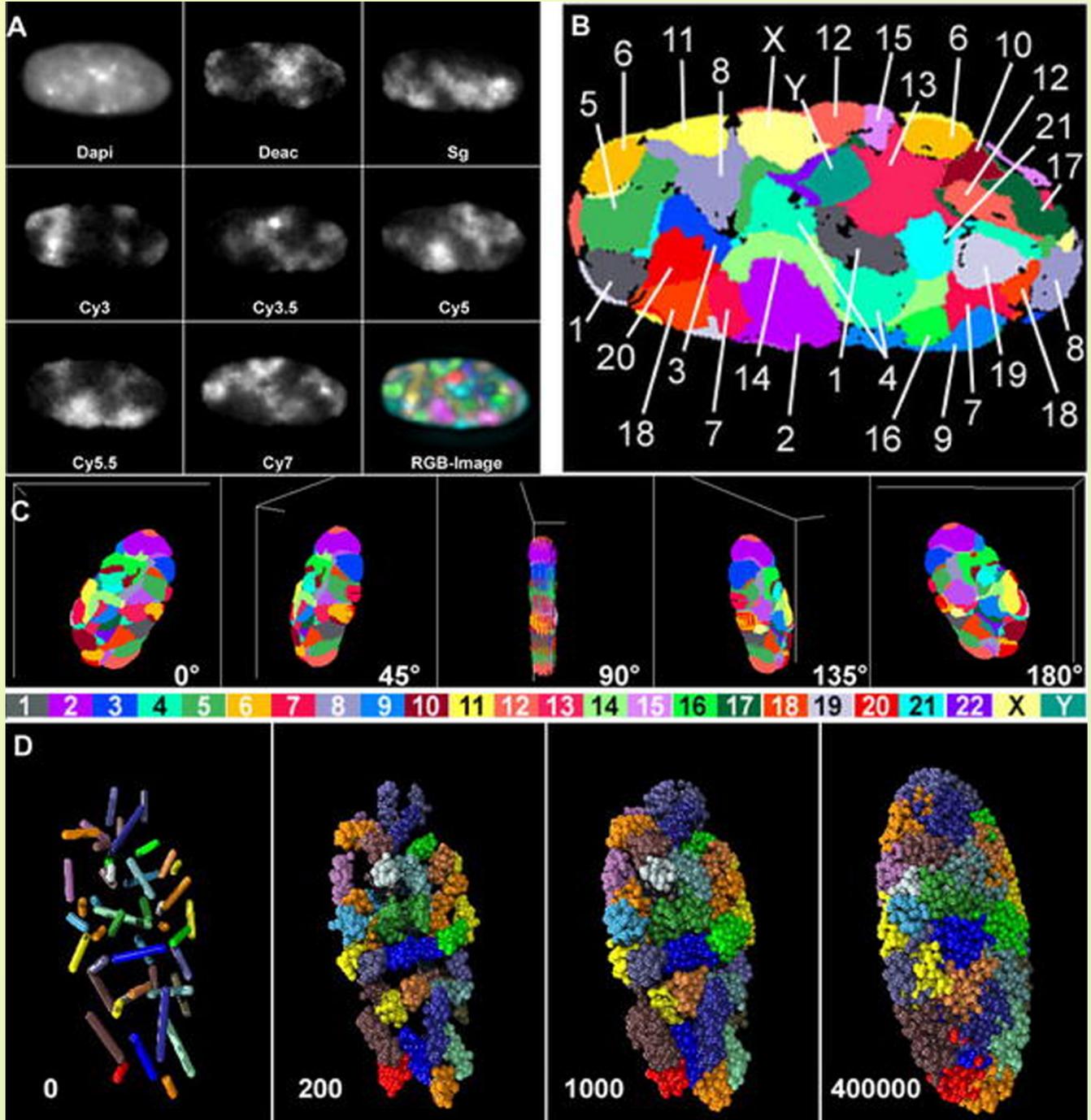
D = FITC
E = Cy 5.5

Le immagini sono catturate con differenti acquisizioni



Combinando le informazioni delle acquisizioni effettuate con i sei filtri passa-banda si ottiene, infine, l'immagine totale.





FINE

