

Diagnostica genetica – citogenetica molecolare

Descrizione

Equipe

Martina Betti (biologa)

Stefania Bonifacio (biologa)

Claudia Centrone (biologa)

Irene Giotti (biologa) (CGH-ARRAY)

Giuseppina Marseglia (biologa) (CGH-ARRAY)

Daniela Parrini (biologa)

Cos'è l'ibridazione in situ fluorescente (FISH)

L'ibridazione in situ fluorescente (FISH) è una tecnica che consente la localizzazione di una specifica sequenza di DNA su preparati fissati di cromosomi, nuclei interfasici e sezioni di tessuto, ottenuti da qualsiasi tipo di materiale biologico (sangue, biopsie, liquido amniotico, gameti), sia esso fresco, crioconservato o paraffinato.

La FISH rappresenta un indispensabile complemento della citogenetica tradizionale in quanto è caratterizzata da un maggiore potere di risoluzione: ciò vuol dire che tale tecnica consente di caratterizzare anomalie cromosomiche di numero e di struttura non definibili attraverso le tecniche di citogenetica classica e di identificare riarrangiamenti criptici, non visibili neppure dopo bandeggio ad alta risoluzione.

La FISH non viene quindi applicata di routine all'analisi del cariotipo, ma solo nei casi selezionati in base a specifici sospetti diagnostici o per approfondire determinate anomalie citogenetiche.

La FISH si basa sulla proprietà del DNA di fondersi in modo reversibile e prevede il legame tra una sonda molecolare (frammento di DNA specifico per la regione di interesse marcato con composti fluorescenti) e la sequenza di DNA complementare del preparato che è stato fissato e montato su un vetrino portaoggetti: la regione cromosomica di interesse risulta così facilmente individuabile a un microscopio a fluorescenza.

Principali tipi di sonda

- Alfoidi: specifiche per le regioni centromeriche
- Painting: specifiche per un intero cromosoma

- Subcromosomiche: specifiche per un intero braccio cromosomico o per regioni più o meno estese di esso
- Locus-specifiche: specifiche per regioni cromosomiche di piccole dimensioni.

Principali applicazioni diagnostiche della FISH

- diagnosi delle sindromi da microdelezione o da microduplicazione
- caratterizzazione di marker cromosomici
- caratterizzazione di riarrangiameti cromosomici, sia bilanciati che sbilanciati
- studio delle delezioni subtelomeriche
- determinazione della percentuale di mosaicismi cromosomici
- valutazione di anomalie numeriche su amniociti non coltivati (FISH interfaseica prenatale)
- valutazione della frequenza di anomalie cromosomiche nei gameti

Malattie studiate con la FISH

- Sindrome del Cri du chat
- Sindrome di Di George e Velocardiofaciali
- Sindrome di Miller Dieker
- Sindrome Smith-Magenis
- Sindrome di Rubinstein Taybi
- Sindrome di Williams
- Sindrome di Wolf-Hirschhorn
- Ritardo Mentale non sindromico

Cariotipo molecolare (CGH ARRAY)

La CGH-Array (aCGH) è una tecnologia in grado di evidenziare delezioni e/o amplificazioni analizzando l'intero genoma in un unico esperimento di ibridazione. Per tale motivo rappresenta l'approccio di elezione nella diagnosi di laboratorio di malattie dovute a sbilanci cromosomici criptici (di dimensione anche molto inferiore al limite di risoluzione della citogenetica convenzionale).

La tecnica si basa sull'ibridazione competitiva tra due DNA genomici (test e controllo) differenzialmente marcati e coibridati su un array di oligonucleotidi. Il potere di risoluzione della tecnica può variare a seconda della piattaforma utilizzata.

Attualmente per scopi diagnostici vengono impiegati array con risoluzione media tra 100 e 150 kb. La metodica consente di evidenziare aneuploidie, delezioni e duplicazioni ma non è in grado di evidenziare riarrangiamenti cromosomici bilanciati, mutazioni puntiformi, bassi mosaicismi o sbilanciamenti relativi a regioni cromosomiche non rappresentate sulla piattaforma.