



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecnico di Laboratorio Biomedico

**CGH-ARRAY E DIAGNOSI
ONCOEMATOLOGICA**

Relatore: Chiar.mo
Prof. Discepoli Giancarlo

Tesi di Laurea di:
Brinzac Constantin Cristian

A.A. 2020/2021

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUZIONE | 3 |
| <u>Il Genoma umano</u> | 3 |
| <u>Polimorfismi e varianti</u> | 4 |
| <u>Le Malattie Genetiche</u> | 5 |
| <u>Patologie tumorali e genetica</u> | 6 |
| <u>Indagini genetiche nei tumori ematologici</u> | 6 |
| <u>Il Cariotipo Convenzionale e le alterazioni cromosomiche</u> | 7 |
| <u>La FISH e le alterazioni subcromosomiche</u> | 10 |
| <u>L'Array-CGH, indagine genomica ad alta risoluzione</u> | 11 |
| 2. SCOPO DELLA TESI | 14 |
| 3. MATERIALI E METODI | 15 |
| <u>Casi valutati</u> | 15 |
| <u>La tecnica Array-CGH</u> | 15 |
| <u>Fase preanalitica</u> | 16 |
| Estrazione del DNA..... | 16 |
| Misurazione del DNA..... | 18 |
| Elettroforesi su gel..... | 19 |
| <u>Fase analitica</u> | 20 |
| Pretrattamento al calore e marcatura..... | 20 |
| Purificazione e combinazione..... | 21 |
| Ibridazione e lavaggi..... | 23 |
| <u>Fase di acquisizione</u> | 24 |
| Scansione, acquisizione ed elaborazione dei dati..... | 24 |
| <u>Valutazione dei risultati</u> | 25 |
| <u>Analisi delle CNVs</u> | 27 |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE | 29 |
| <u>Risultati generali</u> | 29 |
| <u>Casi non valutabili</u> | 31 |
| <u>Casi valutabili</u> | 32 |
| <u>Casi con delezione 20q</u> | 39 |
| <u>Rilevanza dei dati array-CGH</u> | 41 |
| 5. CONCLUSIONI | 42 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 44 |

1. INTRODUZIONE

Il Genoma umano

Il genoma umano è l'insieme delle informazioni necessarie per portare alla formazione di un individuo completo e sano. Le informazioni genetiche guidano la crescita e lo sviluppo di singole cellule, la differenziazione di tessuti, l'organizzazione di organi e apparati, la coordinazione delle funzioni dei vari organi, la risposta agli stimoli ambientali, e quindi la formazione di un individuo funzionale, di per sé, e all'interno di un gruppo sociale.

Le informazioni genetiche sono codificate nel DNA che è contenuto nei cromosomi.

Il Progetto Genoma Umano ha identificato la sequenza completa del DNA umano che è di circa 3,2 miliardi di basi e contiene circa 20000 sequenze codificanti per proteine, i geni. Lo studio ha inoltre scoperto che il DNA non codificante per proteine assomma al 98,5%, più di quanto fosse stato previsto, e quindi solo circa l'1,5% del DNA totale è costituito da sequenze codificanti. Oltre l'85% del DNA non codificante ha comunque una serie di fondamentali funzioni, non tutte ancora chiarite, ma che si possono genericamente definire regolatorie, cioè funzionali ad una corretta espressione dei geni codificanti.

Il numero di geni umani sembra essere solo poco più del doppio rispetto a quello di organismi molto più semplici, come *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*. La maggior parte dei geni umani è organizzata in esoni (sequenze codificanti) e introni (sequenze non codificanti), che sono frequentemente molto più lunghi degli esoni fiancheggianti. Le cellule umane utilizzano massicciamente lo splicing alternativo, cioè la esclusione di esoni, per produrre un gran numero di proteine differenti da un singolo gene, e si pensa che il proteoma umano sia molto più grande di quello degli organismi summenzionati.

Il DNA umano è suddiviso e organizzato in 23 filamenti definiti cromosomi: 22 autosomi, più due cromosomi che determinano il sesso (cromosoma X e cromosoma Y). I cromosomi sono numerati da 1 a 22 in ordine di lunghezza

decescente. Le cellule somatiche hanno due copie dei cromosomi 1-22 provenienti ognuna da un genitore, più un cromosoma X dalla madre e un cromosoma X o Y (rispettivamente nella femmina e nel maschio) dal padre, per un totale di 46 cromosomi distribuiti in 23 coppie, 22 di cromosomi omologhi (autosomi) e una di cromosomi sessuali (eterosomi).

I geni umani sono distribuiti in maniera non uniforme lungo i cromosomi. Ogni cromosoma contiene varie regioni ricche di geni e poveri di geni, che sembrano correlate con il contenuto in basi GC e con le bande cromosomiche ottenute dopo colorazione di cromosomi in metafase. Il significato di questa alternanza non casuale di densità genica non è ben compresa allo stato attuale della conoscenza scientifica.

Polimorfismi e varianti

Il DNA umano non è identico in ogni individuo. Fin dagli anni '90 è emerso che ognuno di noi ha molte differenze nella sequenza del DNA rispetto allo standard della sequenza comune nel genere umano. Queste differenze sono genericamente indicate con il termine varianti genetiche.

Alcune di queste varianti sono relativamente frequenti nella popolazione e sono definite più propriamente come varianti polimorfiche o polimorfismi. In particolare si parla di polimorfismi genetici per indicare i casi in cui una singola variante ha una frequenza nella popolazione uguale o superiore all'1%. Molti polimorfismi sono del tutto innocui, poiché non coinvolgono regioni del genoma importanti. Se una variante si riscontra nella popolazione con una frequenza inferiore all'1% si parla invece di variante rara, a volte addirittura "privata" quando la si ritrova in singoli individui o singole famiglie.

Le varianti spesso sono benigne, ovvero non sono associate a patologie. Tuttavia, alcune sono implicate nello sviluppo di malattie, in particolare di vere e proprie malattie genetiche. In questo caso può essere corretto l'uso del termine "mutazione" o "variante patogenetica".

Le dimensioni delle varianti sono estremamente variabili.

Molti studi hanno confermato, ad esempio, la presenza di SNPs, cioè Single Nucleotide Polymorphisms, che sono sostituzioni di una singola base lungo una

sequenza genetica. Si stima che uno SNP sia presente in media ogni 100 / 1000 basi nel genoma umano, con una distribuzione non uniforme. Di conseguenza è più corretto affermare che “tutti gli uomini sono geneticamente identici almeno al 99%”.

Oltre ai SNP sono comunque molto frequenti varianti che interessano tratti più ampi di DNA, da poche basi a kilobasi o addirittura megabasi. In questi casi la loro non patogenicità è legata all’interessamento di sequenze o regioni povere di geni o addirittura non codificanti.

Le Malattie Genetiche

Variazioni nelle sequenze di basi del DNA possono essere causa di espressione anomala di uno o più geni ed essere quindi associate a un fenotipo clinico, ad una patologia o ad una sindrome, cioè ad una coesistenza di alterazioni anatomiche o funzionali di più organi. Questi stati patologici possono essere causati da una mutazione genica, da perdite o da acquisizioni di tratti di DNA più o meno grandi o di interi cromosomi. Il numero attuale di malattie genetiche riconosciute è all’incirca 5000 senza contare le migliaia di situazioni patologiche in cui le variazioni genetiche costituiscono uno dei fattori determinati o un fattore predisponente.

Un concetto sostanziale all’interno delle patologie genetiche è la differenza tra costituzionali e acquisite.

Si definisce malattia genetica costituzionale una patologia dovuta ad alterazioni genetiche presenti nello zigote (germinali) e quindi in tutte le cellule dell’organismo. Queste patologie possono manifestarsi già alla nascita, ma possono essere evidenti già in gravidanza durante lo sviluppo fetale o possono manifestarsi in età pediatrica o addirittura nell’età adulta. Caratteristica comune è che le alterazioni genetiche che le causano sono ereditabili e trasmissibili in quanto presenti in tutte le cellule dell’organismo e quindi veicolabili anche da ovuli e spermatozoi.

Una malattia genetica acquisita invece è una patologia causata da una o più anomalie del genotipo non presenti alla nascita ma che si verificano, nel corso della vita dell’individuo, in una cellula di un determinato tessuto. Occorre tenere

presente che nel corso della vita, le nostre cellule accumulano spontaneamente mutazioni sporadiche nei geni. La maggior parte non causa problemi, ma alcune possono dare origine a patologie rilevanti, ad esempio tumori. Le mutazioni sono dovute a errori casuali durante la replicazione del DNA o all'esposizione a fattori di rischio ambientali. I termini “acquisito” o “somatico” spiegano la loro insorgenza e sottintendono anche la loro presenza in singoli tessuti, e non intutto l'organismo, e soprattutto la non ereditabilità.

Patologie tumorali e genetica

Tutte le patologie tumorali sono legate ad alterazioni genetiche. Variazioni nella sequenza di un gene o nel suo numero di copie funzionanti possono portare a alterazioni della normale fisiologia della cellula quali la proliferazione, la differenziazione o l'apoptosi; si tratta di processi molto complessi che presuppongono la funzione e la coordinazione di numerosissimi geni: una o più di queste alterazioni possono portare alla genesi di tessuto neoplastico.

Le alterazioni genetiche nei tumori sono di tipo acquisito nella stragrande maggioranza dei casi ma si stanno evidenziando in numero sempre crescente alterazioni genetiche costituzionali, ereditarie, che aumentano il rischio di insorgenza di tumore rispetto alla popolazione generale. Chi è portatore di queste varianti genetiche non necessariamente si ammalerà di tumore, ma ha un rischio maggiore che ciò avvenga. Non si eredita la malattia, ma solo la mutazione genetica e di conseguenza il rischio di ammalarsi di tumore.

Indagini genetiche nei tumori ematologici

I tumori del sangue, come le leucemie e i linfomi, si collocano in Italia tra le prime dieci cause di morte per tumore. La ricerca ha permesso, nel corso degli anni, di raggiungere traguardi importanti che oggi consentono di curare buona parte di queste patologie. Sebbene le cause dei tumori del sangue non siano del tutto chiarite, è certo il ruolo dei fattori genetici acquisiti.

È fondamentale utilizzare conoscenze sulle basi genetiche delle malattie del sangue per il miglioramento della definizione della diagnosi e della prognosi dei pazienti e per lo sviluppo di trattamenti innovativi sempre più efficaci.

Nell'iter diagnostico dei tumori ematologici le indagini genetiche hanno un ruolo ormai insostituibile. Nel tempo sono state messe a punto varie tecniche di indagine che permettono di rilevare alterazioni genetiche causative o di accompagnamento e che forniscono informazioni sulla genesi della patologia, sulla diagnosi, sulla prognosi e sulla scelta delle opzioni terapeutiche.

Il Cariotipo Convenzionale e le alterazioni cromosomiche

L'analisi dei cromosomi umani, citogenetica convenzionale, nasce negli anni '60 come strumento di studio dei cromosomi e delle patologie correlate alle loro anomalie. Le tecniche di colorazione con bandeggio, proprie di questa analisi, hanno permesso l'identificazione di ogni singolo cromosoma, il che ha portato alla realizzazione del cariotipo umano o cariogramma.

Il cariotipo è la sistemazione ordinata di tutti i cromosomi, ottenuti da preparati di cellule in metafase. Una volta ottenute le metafasi, ogni cromosoma viene individuato, esaminato e accoppiato al suo omologo tenendo conto di determinate caratteristiche come lunghezza, posizione del centromero, assetto del bandeggio, in accordo con la classificazione dell'International System for Human Cytogenomic Nomenclature" (ISCN), periodicamente aggiornata.

Il cariotipo normale di un individuo viene espresso attraverso la seguente formula: 46,XY (maschio) o 46,XX (femmina).

Per circa 40 anni è stato impiegato il Cariotipo Convenzionale come unico strumento di individuazione delle patologie cromosomiche. L'analisi cromosomica può essere condotta su cellule in metafase che possono essere ottenute da diversi campioni. Infatti la procedura per la realizzazione di un cariotipo, dà la possibilità di utilizzare campioni di sangue venoso periferico, di midollo osseo e di altri tessuti in cui siano presenti cellule in attiva proliferazione.

L'ottenimento di un cariotipo costituzionale si articola su diverse fasi, che sono le stesse per tutte le tipologie di campioni, fatta eccezione per alcuni dettagli. L'allestimento delle colture cellulari è la prima fase, si prosegue con il blocco colchicinico delle metafasi e con la processazione delle colture. Successivamente si allestiscono i preparati sul vetrino e lo si colora per garantire la comparsa del bandeggio cromosomico. Il vetrino pronto viene poi osservato al microscopio. In

questa fase si osservano le metafasi presenti su di esso e valutandole si acquisiscono le immagini di quelle repute idonee allo studio. Le metafasi acquisite sono cariotipizzate ed una volta ordinati tutti i cromosomi si può osservare la presenza o l'assenza di anomalie.

Questa tecnica consente di "vedere" tutto il genoma ma è utile soprattutto per la rilevazione di anomalie numeriche e strutturali maggiori. Tali alterazioni devono essere sufficientemente grandi e devono coinvolgere perdite o duplicazioni oppure spostamenti di materiale genetico di almeno 10 Megabasi. Questo è il limite fondamentale del cariotipo standard legato alla risoluzione di bandeggio cioè al numero di bande che la colorazione è in grado di evidenziare, che è mediamente di 350-400 bande per corredo aploide.

Un altro limite che caratterizza tale metodica è la possibilità di insuccesso della coltura cellulare, poiché a volte può accadere che le cellule in coltura non crescano adeguatamente.

Un primo gruppo di patologie cromosomiche è rappresentato dalle anomalie numeriche. La mancanza di uno o più cromosomi (monosomie) è un fenomeno abbastanza frequente nelle patologie tumorali così come la presenza di uno o più cromosomi aggiuntivi (trisomie e tetrasomie soprattutto). Si tratta di alterazioni aspecifiche cioè non legate ad un tipo particolare di patologia anche se alcune alterazioni ricorrono in modo particolare in determinate patologie, ad esempio la monosomia 7 o la trisomia 8 nelle mielodisplasie. Il loro ruolo nella patogenesi della patologia non è sempre chiaro ma è riferibile alla alterazione del dosaggio di certi geni onco-adiuvanti o onco-soppressori presenti nei cromosomi coinvolti.

Il secondo gruppo di patologie cromosomiche è quello delle anomalie strutturali, cioè cambiamenti della forma e che possono coinvolgere uno, due o più cromosomi. I cambiamenti strutturali derivano da rotture e conseguenti ricongiungimenti errati di porzioni cromosomiche. Le anomalie strutturali più importanti sono: le traslocazioni, le inversioni, le delezioni, le duplicazioni.

- Traslocazioni: consistono in uno scambio di segmenti tra cromosomi diversi. In presenza di una Traslocazione occorre valutare sia la quantità di materiale genetico scambiato che il punto di rottura e saldatura dei cromosomi interessati. Frequentemente in campo oncologico i punti di rottura sono all'interno di geni e

la saldatura dopo lo scambio comporta la genesi di geni chimerici con funzioni alterate che iniziano o favoriscono la proliferazione tumorale.

-Inversioni: si originano in seguito alla formazione di due rotture sulle braccia del cromosoma con rotazione di 180° del segmento compreso tra le due rotture. Le inversioni, come le traslocazioni, non comportano in genere perdita di materiale genetico ma ricombinazione di geni e formazione di geni chimerici.

- Delezioni: consistono nella perdita di segmenti cromosomici. Distinguiamo le delezioni terminali, in cui vi è una sola rottura all'estremità del cromosoma, e le delezioni interstiziali, causate da due rotture all'interno dello stesso cromosoma. La perdita di materiale genetico determina sempre uno sbilanciamento genomico che comporta nella maggior parte dei casi una patologia. La sua gravità dipende sia dalla quantità di materiale perso che dal suo contenuto in geni.

- Duplicazioni: consistono in un raddoppiamento di un tratto di un cromosoma e comportano uno sbilanciamento nel dosaggio genico. Sia le delezioni che le duplicazioni dipendono da appaiamenti e ricombinazioni anomale tra regioni diverse di uno stesso cromosoma.

Molte malattie Onco-Ematologiche sono correlate proprio a traslocazioni o delezioni di specifici punti di alcuni cromosomi.

Nella Leucemia Mieloide Cronica (LMC) ad esempio, la traslocazione tra i cromosomi 9 e 22, rispettivamente nei punti q34 e q11 comporta la rottura dei geni ABL1 e BCR e lo spostamento della parte 3'ABL1, normalmente localizzato sul 9q34, vicino alla parte 5'BCR sul 22q11 con la produzione di un gene ibrido 5'BCR-3'ABL1. Il gene ibrido viene trascritto in mRNA e tradotto in una proteina con una attività anomala che accelera la crescita cellulare, rallenta la differenziazione e blocca l'apoptosi avviando il processo tumorale.

Dinamiche analoghe si verificano in moltissime altre patologie oncoematologiche come leucemie acute, linfomi e mielomi.

Le Delezioni sono altrettanto frequenti nelle patologie oncoematologiche. Nelle Mielodisplasie ad esempio ricorrono spesso le delezioni dei cromosomi 5, 7, 12 e 20. In alcuni casi il fattore chiave che porta alla genesi o alla progressione del processo neoplastico è ormai chiaro: la delezione 5q comporta la perdita di una

regione critica, in 5q31, in cui sono contenuti molti geni attivi nella normale maturazione delle cellule del midollo; la delezione 12 nella regione p13 comporta la perdita di una copia del gene ETV6, anch'esso regolatore della crescita cellulare. Meno chiare sono le delezioni 7q e 20q in cui non sono ancora state precisate le regioni critiche e gli oncogeni chiave.

Frequenti sono anche i cariotipi complessi, con la presenza contemporanea di alterazioni numeriche e strutturali, traslocazioni e delezioni o duplicazioni, che interessano vari cromosomi. In questi casi spesso si riesce spesso ad identificare le alterazioni driver e a distinguerle da quelle secondarie anche se non si riesce sempre a definire con dettaglio tutte le anomalie presenti.

La FISH e le alterazioni subcromosomiche

La FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) è una metodica introdotta negli anni '80 e perfezionata nei decenni successivi e che grazie alle sue peculiarità ha permesso di rilevare alterazioni cromosomiche non visibili con il cariotipo convenzionale.

Il miglioramento della risoluzione del cariotipo infatti non ha eliminato il limite di risoluzione e per tale motivo, a partire dagli anni '80 la biologia molecolare ha consacrato la FISH come una delle tecniche citogenetiche più utilizzate in quanto permette un notevole miglioramento nella ricerca di alterazioni molto piccole arrivando ad avere una risoluzione $\geq 0,1$ Mb.

La FISH è una tecnica in grado di identificare sequenze target di DNA genomico, in modo da valutarne la presenza e la localizzazione ed è possibile utilizzarla per studiare sia le metafasi che i nuclei interfasci.

Lo strumento cardine sono le sonde, costituite da sequenze di DNA cromosoma-specifiche e marcate con molecole fluorescenti, che permettono di localizzare un gene o una predeterminata sequenza genomica di interesse.

La procedura prevede inizialmente la denaturazione del DNA bersaglio e delle sonde attraverso l'esposizione di entrambi ad agenti chimico-fisici che determinano l'apertura delle doppie eliche. La fase successiva ovvero l'ibridazione, prevede che le sonde si appaiano alle loro sequenze omologhe presenti sul DNA target. Nella fase finale avviene l'osservazione al microscopio a

fluorescenza, con il quale è possibile visualizzare i segnali luminosi in corrispondenza della posizione in cui la sonda si è legata.

Per le sue specifiche caratteristiche la FISH viene impiegata molto frequentemente nella diagnosi delle patologie oncoematologiche sia per la definizione di alterazioni rilevate con il cariotipo convenzionale, sia per la ricerca di microalterazioni criptiche, cioè non visibili al cariotipo per ridotta dimensione delle regioni interessate, sia per la ricerca di alterazioni su nuclei interfascici in assenza di cromosomi valutabili.

Il principale limite della FISH è che essa non consente di visualizzare l'intero genoma ma solo segmenti cromosomici prescelti dall'operatore; è infatti strettamente orientata dal sospetto clinico, un'indagine mirata solo una o poche determinate regioni trascurando regioni del genoma in cui potrebbero trovarsi riarrangiamenti submicroscopici causativi di patologia.

Particolarmente utile si rivela nei cariotipi complessi per la ricerca delle alterazioni driver e per la definizione delle alterazioni.

In ambito ematologico la FISH è diventata imprescindibile nell'inquadramento citogenetico di patologie come la Leucemia linfatica cronica o il Mieloma multiplo, patologie in cui ottenere cromosomi valutabili è spesso impossibile e dove traslocazioni e microdelezioni sono frequenti e rilevanti dal punto di vista prognostico.

L'Array-CGH, indagine genomica ad alta risoluzione

Nella prima decade degli anni 2000 è stata messa a punto una nuova tecnica di indagine genetica denominata Comparative Genomic Hybridization (CGH), che è in grado di identificare la presenza di alterazioni cromosomiche a livello dell'intero genoma, senza ricorrere all'allestimento di colture cellulari e senza prediligere alcune regioni piuttosto che altre. Questo ha rappresentato un ulteriore progresso per le indagini citogenetiche integrando una visione completa del genoma ad una risoluzione elevata, unendo in pratica le caratteristiche del cariotipo ai vantaggi delle indagini molecolari.

A partire dal 2004 l'introduzione dell'array-CGH ha permesso la trasformazione della citogenetica classica specialmente in ambito costituzionale. Per merito di questa nuova metodica, sono stati fatti grandi passi in avanti nella rilevazione a

livello genomico delle Variazioni del Numero di Copie (CNV: delezioni e duplicazioni) in alta risoluzione.

Diversi studi hanno dimostrato che l'array-CGH riesce a rilevare il 10 - 20% di sbilanciamenti cromosomici submicroscopici patogenetici nei bambini con ritardo mentale e ritardo dello sviluppo mentre solo il 3-5% di queste anomalie sarebbe rilevabile con altri mezzi.

Il principio dell'array-CGH è basato sull'ibridazione contemporanea di un DNA campione e di un DNA genomico di riferimento, marcati entrambi con fluorocromi differenti. La fase di co-ibridazione è effettuata su un supporto solido, l'array, ricoperto da frammenti di DNA noti come sonde o cloni. Al termine di tale incubazione il preparato viene osservato da un apposito scanner che rileva l'emissione di segnali di fluorescenza da parte di entrambi i fluorocromi. Un software andrà infine ad effettuare un'analisi comparativa tra le intensità di fluorescenza emesse dai due DNA con l'obiettivo di identificare le possibili variazioni del numero di copie del DNA campione rispetto a quello di riferimento.

I supporti solidi, su cui avviene la co-ibridazione, hanno subito nel corso degli anni un'evoluzione, che ha reso possibile un ulteriore miglioramento del livello di risoluzione dell'array-CGH.

La risoluzione della piattaforma array dipende, infatti, dalla distanza media delle sonde rispetto al genoma standard di riferimento (spacing) e dalla lunghezza delle sonde. Tanto maggiore è il numero delle sonde presenti nell'array tanto più piccole sono le dimensioni delle anomalie che possono essere identificate.

Da risoluzioni iniziali di 800 kb, relativamente basse, si è passati in breve tempo a risoluzioni inferiori alle 100 kb.

I vetrini per l'array-CGH si ottengono mediante sintesi diretta degli oligonucleotidi sul supporto. Gli oligonucleotidi, lunghi circa 25 basi, sono sintetizzati in situ su un substrato in posizioni predefinite.

I principali vantaggi che si ottengono con l'impiego dell'array-CGH consistono non solo nella maggiore risoluzione rispetto al cariotipo, non solo nella rilevazione contemporanea di delezioni, duplicazioni, aneuploidie e amplificazioni di ogni locus rappresentato sull'array, ma anche nell'automazione, nella velocità

di esecuzione del test, nell'utilità della diagnosi di malattia genetica. E ancora, non c'è bisogno di cellule in coltura, ma il DNA viene estratto direttamente dalle cellule nucleate presenti nel sangue intero.

Sebbene la metodica presenti vantaggi sicuramente indispensabili per le indagini citogenetiche, sono presenti anche dei limiti. Tra questi vi è l'impossibilità di vedere riarrangiamenti strutturali bilanciati come traslocazioni e inversioni; l'incapacità di rilevare modifiche del numero di copie delle regioni del genoma che non siano ben rappresentate sulla piattaforma array. La tecnica non è in grado di evidenziare livelli di mosaicismo inferiori al 25%, ed è inoltre non affidabile per mosaicismi inferiori al 50%.

Un altro aspetto che deve essere considerato quando viene impiegato l'array-CGH è quello economico. Si tratta di una metodica che, utilizzando materiali e reagenti particolari, richiede un costo considerevole e sicuramente superiore rispetto al cariotipo standard e alla FISH.

Tenendo conto di tutto ciò è chiaro che l'array-CGH non ha soppiantato totalmente tutte le precedenti tecniche citogenetiche. Ci può essere la necessità, a tutt'oggi, di affiancare a questa metodica anche l'esecuzione del cariotipo standard e della FISH. Infatti la presenza di alterazioni cromosomiche non rilevabili dall'array, non può essere trascurata, ma deve essere rilevata con l'impiego di altre tecniche.

Al termine di questa panoramica va sottolineato con le prime due metodiche, il Cariotipo Convenzionale e la FISH, siano essenzialmente degli esami citologici, anche se molto particolari, e richiedano tessuti vitali, colture cellulari, cromosomi di buona qualità, osservazione al microscopio e specifiche conoscenze di citogenetica, mentre la terza, l'array-CGH, richieda DNA estratto e specificamente trattato, strumentazione e software dedicati. In entrambi i casi è fondamentale un'esperienza specifica degli operatori.

2. SCOPO DELLA TESI

Questo studio è stato condotto presso il Laboratorio di Genetica Medica dell'Ospedale "G. Salesi" di Ancona per esplorare l'applicabilità del test genetico molecolare dell'ibridazione genomica comparativa (Array-CGH) su DNA allo studio dei tumori ematologici.

Vista la disponibilità di un test genetico che può rilevare la presenza di delezioni e duplicazioni nel DNA genomico di un individuo, abbiamo deciso di provare ad applicare questo test su campioni di midollo osseo di pazienti con emopatie maligne per valutarne la resa.

Il test in questione è l'array-GCH, un test genetico impiegato nella diagnosi di patologie dello sviluppo del bambino caratterizzate da sindromi con disabilità intellettive e dismorfismi o malformazioni, sindromi che in circa il 15-20 % dei casi hanno come causa delezioni o duplicazioni di segmenti più o meno ampi di DNA.

Una parte dei casi di tumori ematologici ha come causa genetica delezioni e duplicazioni del DNA. Il cariotipo convenzionale e la FISH sono test molto efficienti nell'individuare queste cause ma con una certa frequenza non le chiariscono in modo soddisfacente.

Il nostro studio è del tutto preliminare e, per il nostro laboratorio ha un valore esplorativo.

La domanda alla quale abbiamo voluto trovare una risposta è la seguente:

- il test array-CGH può avere una utile collocazione tra gli esami genetici diagnostici in campo ematologico?

In altri termini:

- le informazioni che il test fornisce sono migliori, più dettagliate, più utili, di quelle del cariotipo convenzionale, tali da rendere accettabili i costi piuttosto elevati di questo test in termini di reagenti, tempi, impegno tecnico manuale, competenze per la interpretazione dei risultati?

3. MATERIALI E METODI

Casi valutati

Per questo studio abbiamo selezionato i casi seguendo questi criteri:

- diagnosi clinica e citologica di patologia clonale neoplastica del midollo osseo: leucemia acuta, mielodisplasia, disordine mieloproliferativo cronico;
- disponibilità di aspirato midollare, residuo dopo l'allestimento delle colture cellulari per l'esecuzione del cariotipo, su cui eseguire il test;
- diagnosi confermata con cariotipo valutabile e con alterazioni cromosomiche presenti.

Abbiamo testato e valutato 18 casi. La casistica che ne risulta è piuttosto eterogenea ma ogni singolo caso fornisce spunti per una valutazione complessiva del test. Le informazioni sulla diagnosi nei singoli casi sono riportate nella tabella dei risultati generali.

La tecnica Array-CGH

Il test Array-CGH richiede protocolli di preparazione, esecuzione ed elaborazione piuttosto complessi. Ogni fase del test infatti implica estrema precisione e particolare attenzione, entrambe volte all'ottenimento di un prodotto ottimale, idoneo all'esecuzione e alla riuscita del test.

L'estrazione del DNA deve fornire un acido nucleico che abbia una quantità e una purezza molto elevate.

La quantità del DNA estratto deve essere elevata in quanto esso viene sottoposto alle fasi successive intero e senza essere mai amplificato in nessuna sua parte. La purezza del DNA estratto deve essere elevata e mantenuta tale in ogni fase della lavorazione poichè la presenza di contaminanti e di residui di reattivi può interferire con le fasi di preparazione e di analisi dei campioni.

A questo scopo la procedura stessa prevede fasi e step di controllo.

Va ricordato che l'Array-CGH ha come scopo la rilevazione e l'analisi delle CNVs (Copy Number Variations) cioè alterazioni quantitative, quali delezioni e duplicazioni, causa di patologie genetiche e che la rilevazione è basata sul confronto con un DNA standardizzato normale.

I campioni analizzati mediante la tecnica Array-CGH sono stati sottoposti alle procedure che seguono.

Fase preanalitica

Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto dai campioni di sangue midollare in eparina sodica, residui dopo l'utilizzo di una parte per l'allestimento delle colture per il cariotipo e la FISH. La procedura è svolta interamente in modo manuale servendosi del kit Puregene Blood Core Kit A (QIAGEN).

Per effettuare la lisi dei globuli rossi, in una provetta Eppendorf sono stati dispensati 900µL di RBC Lysis Solution a cui sono stati aggiunti 300µL di sangue intero. La provetta è stata incubata per 4 minuti a temperatura ambiente (15-25°C) e contemporaneamente invertita delicatamente per 10 volte per favorire la lisi dei globuli rossi.

Successivamente la provetta è stata centrifugata per 35 secondi a 15000 x g ed è stato rimosso quanto più sovrantante possibile avendo cura di lasciare il pellet visibile di globuli bianchi e circa 10-20µL di liquido residuo.

Per facilitare la lisi dei globuli bianchi nella fase seguente, la provetta è stata sottoposta al vortex vigorosamente per 10 secondi. Questo passaggio permette inoltre di risospendere le cellule nel liquido residuo e di non rendere più visibile il pellet di globuli bianchi.

Vengono aggiunti 300µL di Cell Lysis Solution alle cellule che sono state risospese delicatamente per aiutare la loro lisi.

Il Cell Lysis Solution è una soluzione costituita da un detergente anionico e da uno stabilizzatore di DNA che limita l'attività delle DNAasi intracellulari impedendone la sua degradazione. Tale reagente, lisando i globuli bianchi,

permette la fuoriuscita del DNA, ma anche delle DNAasi intracellulari che devono essere immediatamente inattivate affinché il DNA nucleare non venga deteriorato.

Nello step successivo sono stati dispensati 1,5 μ L di RNase A Solution ed in seguito il campione è stato mescolato per inversione 25 volte. La provetta è stata poi lasciata incubare per 15 minuti a 37°C. L'incubazione viene fatta a tale temperatura poiché l'RNAsi, essendo un enzima che degrada l'RNA, lavora ad una temperatura ottimale di 37°C ed in questo modo ci si assicura che l'acido nucleico ottenuto alla fine sia solo DNA.

In seguito il campione è stato posto in ghiaccio per 1 minuto per poterlo raffreddare rapidamente. 100 μ L di Protein Precipitation Solution sono stati aggiunti nella provetta e, affinché potesse avvenire la precipitazione delle proteine, il campione è stato sottoposto al vortex ad alta velocità per 20 secondi.

Il Protein Precipitation Solution, per mezzo di precipitazione salina, rimuove i contaminanti come le proteine che, dopo centrifugazione per 1 minuto a 15000 x g, formano un pellet compatto e marrone. È stato ripetuto il passaggio al vortex ed in seguito la provetta è stata incubata in ghiaccio per 5 minuti e centrifugata per 1 minuto sempre a 15000 x g.

La precipitazione del DNA caratterizza la fase successiva ed è stata espletata dispensando 300 μ L di 100% isopropanolo (2-propanolo) in una nuova provetta Eppendorf nella quale è stato aggiunto il sovrinatante contenente il DNA della Eppendorf precedentemente centrifugata. Il campione è stato mescolato invertendo delicatamente la provetta per 50 volte, accertando che il DNA fosse in sospensione. Per osservare il DNA sotto forma di pellet bianco la provetta è stata centrifugata per 1 minuto a 15000 x g. Facendo attenzione che il pellet rimanesse nella provetta, il sovrinatante è stato eliminato rovesciando prudentemente l'Eppendorf la quale è stata poi lasciata asciugare capovolta su carta assorbente. Successivamente nella provetta sono stati aggiunti 300 μ L di 70% etanolo e la stessa è stata invertita diverse volte con lo scopo di lavare il pellet di DNA. Il campione, poi, è stato centrifugato per 2 minuti a 15000 x g e si è ripetuta la procedura per eliminare il sovrinatante. Quindi l'Eppendorf è stata posizionata dritta e aperta e posta sotto cappa spenta per 1,5 ore affinché l'etanolo potesse evaporare.

La fase conclusiva dell'estrazione del DNA è rappresentata dalla sua idratazione che prevede l'utilizzo del DNA Hydration Solution. 50µL di questo reagente sono stati dispensati nella provetta, la quale, in seguito, è stata passata al vortex eseguendo 3 impulsi a media velocità. Per velocizzare l'idratazione il campione è stato incubato per 10 minuti a 65°C e poi tenuto sotto cappa a temperatura ambiente per tutta la notte.

Il DNA ottenuto può essere conservato a 4°C per una settimana, mentre per una conservazione di lungo periodo deve essere posto a -20°C o a -80°C.

Misurazione del DNA

La misurazione del DNA rappresenta lo step successivo all'estrazione e viene eseguita il giorno seguente.

È stata valutata la concentrazione e la purezza del DNA estratto impiegando lo strumento Spettrofotometro Nanodrop e il software Nanodrop 2000, impostando l'opzione predefinita del DNA-50, poiché questa è relativa al DNA a doppio filamento.

Inizialmente le superfici ottiche dello strumento sono state pulite e prima di procedere con la quantizzazione del DNA, sono stati dispensati sulla postazione inferiore 1,5µL di buffer DNA Hydration Solution. Questo step coincide con la misurazione del bianco ed è necessario per calibrare lo Spettrofotometro. Comunemente, la soluzione di bianco coincide con il buffer in cui la molecola d'interesse è sospesa o dissolta, in tale caso il DNA Hydration Solution.

Una volta effettuato il comando a "vuoto" si è proceduto prelevando dalla provetta 1,5µL di DNA che sono stati depositati sul piedistallo dello strumento. Successivamente il braccio della testina è stato abbassato ed il Nanodrop ha misurato l'assorbanza a diverse lunghezze d'onda utilizzando la legge di Lambert-Beer e ha calcolato automaticamente anche il rapporto di concentrazione e purezza del campione.

Le lunghezze d'onda relative all'acido nucleico sono le seguenti: 230, 260 e 280nm. I rapporti tra di esse conferiscono indicazioni sulla qualità e purezza del DNA precedentemente estratto.

Il rapporto tra le due assorbanze 260/280 deve avere un valore di $\sim 1,8$. Se il rapporto risulta essere molto più basso può essere indice della presenza di proteine o altri contaminanti che assorbono fortemente attorno ai 280nm.

È valutato anche un secondo rapporto di purezza tra le due assorbanze 260/230 e questo deve essere compreso tra 1,8 e 2,2. Se il rapporto è considerevolmente più basso può essere il segnale della presenza di contaminanti quali EDTA, carboidrati o solventi.

Nella stessa seduta lo Spettrofotometro ha quantificato anche la concentrazione dell'acido nucleico. Di regola dall'estrazione si dovrebbero ottenere circa 18 μ L di DNA con una concentrazione di almeno 55ng/ μ L.

Per ogni campione esaminato è stato realizzato un foglio di lavoro in cui sono stati inseriti il nome e il cognome del paziente e, successivamente alla misurazione del DNA, sono stati riportati i valori di purezza e di concentrazione.

Elettroforesi su gel

In seguito alla determinazione della concentrazione e della purezza, si è verificato che il DNA non fosse degradato attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio. Se alla fine della seduta risulta esserci un'unica banda per ogni campione, allora l'integrità dell'acido nucleico è confermata.

Per procedere con la corsa elettroforetica è stato preparato il gel di agarosio all'1%, sciogliendo 0,5g di agarosio in 50mL di TBE, Tris-Borato-EDTA. La soluzione è stata portata ad ebollizione ponendola sopra ad un agitatore al massimo della potenza e della temperatura. Successivamente sono stati aggiunti alla soluzione di agarosio 2,5 μ L di Gel Star, facendo attenzione a non esporlo a luce diretta. Tutto questo è stato poi lasciato raffreddare su di uno scaffale metallico fino al raggiungimento di una temperatura tale da permettere di tenerlo in mano. Infine la soluzione ottenuta è stata versata in una camera elettroforetica ed è stata lasciata solidificare per 1 ora in presenza di un pettine, necessario per la formazione dei pozzetti.

Dopo la solidificazione del gel, il pettine è stato rimosso e si è proceduto con il caricamento dei campioni nei rispettivi pozzetti. Ogni campione è stato caricato

utilizzando provette Eppendorf da 1,5mL che sono state numerate. I campioni sono stati ottenuti mescolando in una provetta 2 μ L di DNA con 2 μ L di Loading Buffer e in seguito posti nei pozzetti del gel.

Questa fase della metodica è terminata chiudendo la camera del gel, posizionando correttamente gli elettrodi (il rosso per il polo positivo e il nero per il polo negativo) e applicando un campo elettrico di 120V per 40 minuti. Durante la corsa elettroforetica il DNA, poiché è caricato negativamente, è migrato verso il polo positivo. Trascorsi i 40 minuti il gel è stato rimosso dalla camera e osservato attraverso un transilluminatore a UV grazie al quale è stato possibile visualizzare la banda relativa al DNA.

Fase analitica

Pretrattamento al calore e marcatura

Per la realizzazione di questa fase sono state utilizzate provette da 0,2mL. Poiché ogni campione deve avere un controllo dello stesso sesso e poiché sono stati utilizzati i vetrini 8x60, che contengono in tutto 8 posti, sono stati trattati contemporaneamente 8 campioni e 8 controlli.

Per ogni campione è necessario avere un quantitativo di DNA pari a 1000ng, quindi utilizzando la formula $V_C=1000/C$, dove C è la concentrazione del campione in ng/ μ L, è stato calcolato il DNA in μ L.

Poi è stato calcolato il volume di acqua milliQ occorrente per ottenere un volume finale pari a 18 μ L, secondo la formula $V_A= 18 - V_C$.

Successivamente si è posto il V_A calcolato per ogni campione in ogni provetta e si è aggiunto il V_C calcolato.

Ad ogni provetta sono stati aggiunti 10 μ L di Reaction Primer e 10 μ L di Reaction buffer, precedentemente scongelati, raggiungendo dunque un volume finale di 38 μ L.

Ogni provetta è stata mescolata manualmente e con uno spin di centrifuga e poi caricata nel termociclatore, il quale è stato preriscaldato a 99°C. Una volta

posizionati tutti i campioni nello strumento è stato impostato il programma array4.cyc e sono stati lasciati incubare a 99°C per 20 minuti.

Nell'attesa è stata preparata la mix di marcatura dispensando, in una provetta Eppendorf, i seguenti componenti: 82,4µL di dCTP labelling mix, 8,24µL di CY3 dUTP o CY5 dUTP (a seconda che si trattasse dei campioni o dei controlli) e 8,24µL di Klenow per un volume totale di 98,88µL per ogni campione ed ogni controllo.

CY3 e CY5 sono due diversi fluorocromi e sono necessari nella tecnica dell'array-CGH in quanto marcano rispettivamente i campioni di DNA e i controlli. Questi fluorocromi sono coloranti sintetici ed appartengono alla categoria dei polimetini. Sono dotati di un carattere fluorescente che copre lo spettro che va da IR a UV, in base alla struttura chimica. Grazie ad essa sono in grado di marcare e quindi di legarsi a proteine, acidi nucleici, anticorpi e peptidi. La preparazione della mix deve essere fatta in penombra affinché le cianine non si deteriorino.

Trascorsi i 20 minuti e ultimata la mix di marcatura, le provette sono state poste in ghiaccio per 5 minuti aggiungendo ai 38µL, i 12µL di mix ottenendo un volume totale di 50µL di soluzione di marcatura.

In seguito ogni provetta è stata mescolata prima manualmente e poi centrifugata ad alta velocità. Al termine le provette sono state caricate nel termociclatore ed è stato impostato il seguente programma: 2 ore a 37°C, 10 minuti a 65°C e stop a 4°C. Infine le provette sono state poste in ghiaccio per 5 minuti.

Purificazione e combinazione

In questa fase il DNA appena marcato deve essere purificato da tutti i componenti che sono serviti per la marcatura.

Lavorando sempre in penombra sono state preparate e numerate 16+16 provette Amicon da 2mL e sono state disposte su due file. I campioni precedentemente inseriti nel termociclatore e poi posti in ghiaccio, sono stati centrifugati a 6000giri per 1 minuto. Successivamente in tutte le provette della fila 1 (16 provette) sono stati inseriti 430µL di Tris-EDTA buffer solution. Tutto ciò che c'era nelle provette, ovvero i 50µL, è stato prelevato e dispensato nelle Amicon della fila 1

raggiungendo un totale di 480 μ L. Questi sono stati mescolati e aspirati con una pipetta. Nelle provette della fila 1 è stato poi posto un filtro sul quale è stato versato tutto il contenuto precedentemente aspirato con la pipetta. Dopodiché sono stati chiusi i tappi delle Amicon e si è centrifugato il tutto a 14000 giri per 10 minuti.

Terminata la centrifugazione la provetta è stata svuotata, mentre il filtro è stato tenuto e riposto poi nella stessa. Sono stati aggiunti di nuovo 480 μ L di Tris-EDTA buffer solution e ripetuta una centrifugazione sempre a 14000 giri per 10 minuti. Le provette con l'eluato ottenuto sono state eliminate ed i filtri sono stati trasferiti, mantenendoli capovolti, sulle nuove Amicon della fila 2. Queste sono state centrifugate a 1000 giri per 1 minuto, quindi i filtri sono stati buttati e le provette contenenti circa 20 μ L sono state recuperate. Si deve fare attenzione al volume finale ottenuto e controllare se è stato rispettato.

Durante la centrifugazione è stato acceso l'evaporatore centrifugo per un preriscaldamento, impostando il tempo a 15 minuti, la temperatura a 60°C e la modalità V-AQ.

Le provette centrifugate sono state posizionate con il tappo aperto nell'evaporatore centrifugo per 20 minuti a 60°C. Una volta assicurato che il pellet si fosse asciugato, lo si è ricostituito con 9,5 μ L di TE. I campioni sono stati infine posti in ghiaccio.

Utilizzando lo Spettrofotometro Nanodrop sono state eseguite le letture dei campioni e dei controlli selezionando l'opzione "microarray-type DNA (bianco con TE). In questa fase si sono misurate le concentrazioni del DNA e delle cianine, e i valori ottenuti devono essere compresi entro i seguenti range:

- Per i campioni ed i reference: da 300 a 400ng/ μ L;
- Per CY3: da 7 a 15pmoli/ μ L;
- Per CY5: da 5 a 13pmoli/ μ L.

Successivamente ogni campione è stato abbinato ad un controllo dello stesso sesso e con una concentrazione di DNA marcato comparabile. Infatti la differenza tra le due concentrazioni deve essere <100ng/ μ L. Unito il campione ad il suo controllo è stata effettuata una centrifugazione veloce, in seguito alla quale è stata ottenuta una mix di colore viola.

Si è proceduto poi con un'ulteriore centrifugazione ed infine i campioni ed i controlli combinati sono stati avvolti nella carta stagnola e posti freezer a -20°C. Questo step li rende stabili per un massimo di 24 ore.

Sono stati inoltre accesi il forno ad ibridazione a 65°C e il bagnomaria a 37°C, i quali saranno utilizzati il giorno successivo nella fase di ibridazione.

Ibridazione e lavaggi

Facendo attenzione a lavorare in penombra, è stato scaldato il termoblocco a 94°C.

I reattivi quali, DNA cot, 10X Blocking Agent e 2X HI-RPM Hybridization Buffer, ed i campioni sono stati tirati fuori dal congelatore.

Per eseguire l'ibridazione, ad ogni campione sono stati addizionati: 2µL di DNA cot, 4,5µL di 10X Blocking Agent e 22,5µL 2X HI-RPM Hybridization Buffer. Tali reagenti sono stati aggiunti nelle provette uno alla volta a cominciare dal DNA cot che, essendo arricchito in sequenze altamente ripetute, è in grado di bloccare gli elementi ripetitivi e prevenire fenomeni di ibridazione aspecifici. Le provette sono state centrifugate ed ogni tappo è stato avvolto nel parafilm per evitare la loro apertura durante lo step successivo. I campioni sono stati quindi caricati nel termoblocco a 94°C per 3 minuti e poi trasferiti nel bagnomaria a 37°C per 30 minuti, al buio.

Successivamente è stato preparato il vetrino coprioggetto posizionandolo, con le guarnizioni e il barcode verso l'altro, su uno dei settori della cameretta. Poi, aprendo la confezione, è stato prelevato il vetrino agilent spottato. I campioni sono stati rimossi dal bagnomaria, centrifugati e ordinati sul vetrino a partire dal barcode secondo uno schema preimpostato. In seguito sono stati prelevati 45µL di campione utilizzando una pipetta da 100µL e dispensati negli spazi specifici presenti nel vetrino coprioggetto. Su quest'ultimo è stato appoggiato il vetrino agilent spottato e le viti della cameretta sono state chiuse al punto tale da non far fuoriuscire i campioni, ma allo stesso tempo permettere al liquido di muoversi all'interno della camera. Una volta fatto ciò la cameretta è stata inserita nel forno a 65°C e a 20rpm per tutta la notte. Nel forno la cameretta è stata controbilanciata

da un'altra cameretta vuota. Durante questa fase il campione e il controllo competono per legarsi alle sonde complementari spottate sul vetrino.

Per il giorno successivo sono state preparate le seguenti soluzioni da inserire nel bagnomaria a 37°C:

- La soluzione Agilent Stabilization Dry;
- La soluzione Wash Buffer 2.

Trascorse 24 ore, la cameretta è stata tirata fuori dal forno ed aperta. Poi il vetrino e il coprioggetto sono stati separati all'interno di una vaschetta contenente la soluzione di disassemblaggio e utilizzando delle pinzette. Rapidamente e minimizzando l'esposizione all'aria sono stati effettuati i lavaggi. Il vetrino microarray è stato trasferito nel portavetrini già posizionato nella vaschetta contenente la Wash 1 ed il tutto è stato posto in agitazione su piastra magnetica per 5 minuti. Nell'attesa è stato controllato che la temperatura della soluzione Wash 2 restasse a 37°C. Terminato il primo lavaggio, il vetrino è stato spostato nella Wash 2 per 1 minuto. Questo lavaggio è più stringente rispetto al primo, per tale motivo il vetrino deve restare immerso il tempo giusto; in caso contrario si rischia di staccare le cianine dal DNA.

In seguito il vetrino è stato posto in Acetonitrile per 45 secondi sotto cappa spenta e poi trasferito per altri 45 secondi nella soluzione Agilent Stabilization Dry. L'Acetonitrile è una soluzione che protegge i fluorocromi dalla degradazione causata dall'ozono, mentre la soluzione stabilizzante è acetonitrile modificato capace di asciugare immediatamente il vetrino una volta esposto all'aria, impedendo la formazione di goccioline o aloni.

Infine il vetrino asciutto è stato posizionato nello scanner con il barcode in basso e la scritta agilent in alto.

Fase di acquisizione

Scansione, acquisizione ed elaborazione dei dati

L'ultima fase dell'array-CGH è rappresentata dalla lettura del vetrino e dall'analisi dei dati rilevati. Tutto ciò è effettuato grazie all'impiego di uno scanner chiamato InnoScan 710 (Innopsys), il quale è collegato ad un software di

acquisizione delle scansioni, ovvero il Mapix. Questo software permette di calibrare i laser, che eccitano i fluorocromi, e i fotomoltiplicatori, i quali misurano l'intensità di luce emessa dai due fluorocromi.

Inserito il vetrino nello scanner, la scansione è stata eseguita mediante laser verdi e rossi, rispettivamente alla lunghezza d'onda di circa 532nm e 633nm. Le immagini ottenute sono state infine importate nel software CytoSure Interpret in grado di compiere diverse azioni come: elaborare automaticamente un grafico corrispondente a ciascun cromosoma, gestire facilmente tutti i dati dell'array-CGH, archiviare i dati di ogni esperimento e rendere disponibili i collegamenti on-line con le principali banche dati.

Valutazione dei risultati

La valutazione dei risultati in seguito alla realizzazione di un array-CGH, rappresenta una delle fasi più critiche e decisive dell'intera metodica. Tutt'ora infatti, definire il ruolo delle CNVs può risultare piuttosto complesso e per tale motivo ogni laboratorio deve necessariamente seguire le linee guida emesse dall'American College of Medical Genes, per poter interpretare correttamente i risultati ottenuti mediante il test array-CGH.

Tra gli aspetti più importanti dell'analisi dei microarrays vi è la verifica dei "QC metrics", ovvero parametri di controllo della qualità, utilizzati per garantire l'affidabilità e la riproducibilità del test. Tuttavia prima di eseguire un'analisi approfondita è doveroso assicurarsi che i dati ottenuti non siano stati alterati da fattori esterni alla metodica. Da ciò si capisce quanto sia fondamentale accertarsi che le aberrazioni rilevate siano proprie del campione analizzato e non relative a errori riconducibili al modo in cui è stata eseguita la metodica. Questi errori possono essere causati dalla fonte o dalla qualità del DNA, dal protocollo adottato, ma anche dalla funzionalità dello scanner e dall'affidabilità del software impiegato nell'elaborazione delle immagini.

Utilizzando il protocollo Agilent, le linee guida adottate richiedono la valutazione di diversi parametri, tra cui vi sono:

- DLRSpread: è considerato il parametro chiave in quanto è un'indicazione del rumore attorno al segnale medio della matrice. Il Derivate Long Ratio

e la Deviazione Standard misurano in modo leggermente diverso quanto sono dispersi i cloni dell'array intorno allo zero. Il valore ottenuto dovrebbe essere $<0,3$ e questo è indice di un array buono, poiché segnala la presenza di cloni strettamente raggruppati intorno allo zero. D'altra parte se il valore che si ricava è più alto, il DNA è di scarsa qualità. In realtà un array eccellente dovrebbe avere un valore DLRS $<0,1$, ciò nonostante avere un valore $<0,2$ consente comunque di rilevare aberrazioni molto piccole, permettendo un'identificazione più accurata delle regioni cromosomiche moltiplicate o cancellate, riducendo così la necessità di ripetizioni sperimentali.

- Signal Intensity: è il parametro che indica l'intensità media del segnale ed è relativa ai due fluorocromi impiegati. Non esiste un limite superiore per tale valore, comunque normalmente il fluorocromo verde ha un valore > 350 mentre quello rosso > 250 . Un segnale troppo basso potrebbe essere causato o da un problema che si verifica durante la reazione di marcatura relativa alle sonde o dalla scarsa qualità del DNA oppure dall'aggiunta di una quantità errata di DNA. Questi ultimi due problemi possono essere identificati ed eliminati prima di terminare la metodica utilizzando lo Spettrofotometro Nanodrop, il quale misura accuratamente la concentrazione di DNA e il livello di incorporazione delle molecole di colorante.
- Background Noise: questo parametro definisce il rumore di fondo ed è calcolato osservando i punti di controllo negativo sull'array. I valori che si ottengono dovrebbero essere compresi tra 5 e 10. Un valore inferiore a 5 è valutato come eccellente. Valori di rumore di fondo elevati sono invece, nella maggior parte delle volte, causati dalle fasi di lavaggio. Durante queste è infatti necessario verificare che la velocità dell'agitatore sia corretta. Se tali valori persistono, è consigliato lavare i piatti con acetonitrile per rimuovere l'accumulo di molecole di colorante non incorporate.
- Signal to Noise Ratio: tale valore viene determinato dividendo l'intensità del segnale per il rumore di fondo e indica con quanta chiarezza è possibile rilevare i punti al di sopra del livello di fondo. I valori per essere definiti ottimali devono essere superiori a 100. Se sono compresi tra 30 e

100 sono accettabili-buoni, ma se non superano 30 vengono classificati come scarsi. Solitamente quest'ultimi sono riconducibili all'efficacia delle fasi di marcatura e lavaggio dei campioni.

Analisi delle CNVs

Utilizzando il software CytoSure ogni campione viene esaminato e i 60000 spot letti e valutati. In ciascuno spot le situazioni che possono verificarsi sono tre:

- Se lo spot ha assunto una colorazione gialla, la sonda nel grafico è posizionata vicino allo zero. Ciò indica l'equivalenza tra il DNA campione e il DNA controllo, quindi l'assenza di alterazioni;
- Se lo spot ha assunto una colorazione verde, la sonda nel grafico è posizionata sopra la linea di equilibrio. In questo caso il DNA campione è maggiore del DNA controllo ed è indice della presenza di una duplicazione;
- Se lo spot ha assunto una colorazione rossa, la sonda nel grafico è posizionata sotto la linea di equilibrio. In quest'ultima circostanza il DNA campione è minore del DNA controllo e ciò è sintomo della presenza di una delezione.

L'aspetto fondamentale nell'analisi dei microarrays è la valutazione delle CNVs, cioè del loro contenuto genomico e delle correlazioni con il fenotipo o con la patologia presente nel soggetto in esame.

Nel caso di test condotti su campioni costituzionali per sindromi cliniche, il software consente di spiegare il valore di ogni CNVs individuata mediante la consultazione di database interni o esterni. In questo modo è possibile effettuare un confronto tra i dati raccolti di un determinato paziente e le informazioni archiviate nel tempo di individui già studiati. Al termine dell'analisi, la natura di ogni CNVs deve essere chiarita assegnando a ciascuna di essa un preciso significato clinico. Le Copy Number Variations possono essere classificate in:

- *Patogeniche*: è certo che l'anomalia sia associata a sindromi conosciute ed è responsabile del fenotipo patologico del paziente;
- *Incerte*: se la loro associazione con fenotipi clinici non è ancora stata chiarita precisamente;

- *Benigne*: se non hanno alcun significato patologico e costituiscono varianti polimorfiche presenti in molti individui sani e ripetutamente riscontrate nella popolazione normale;
- *Varianti ad incerto significato clinico (VOUS)*: rappresentano un ampio gruppo di CNVs che o non sono state descritte, o non ci sono prove sufficienti per chiarire il loro significato clinico. In genere queste aberrazioni contengono geni di cui non si conosce perfettamente la funzione o la sensibilità al dosaggio.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Risultati generali

Per questo studio abbiamo lavorato su 18 casi.

In tutti i casi sono state eseguite a scopo diagnostico le consuete indagini di Citogenetica: Cariotipo e FISH. Il campione residuo dopo l'allestimento delle colture cellulari è stato trattato e preparato per l'esame array-CGH secondo il protocollo descritto.

I risultati complessivi dei test sono riportati nella tabella sottostante. Segue la descrizione dettagliata dei casi.

| caso | Diagnosi clinica | Cariotipo e FISH | array-CGH |
|------|-------------------------------|--|--|
| 1 VG | LAL-B con marcatori mieloidi | Cariotipo: normale. FISH: microdelezione interstiziale nella banda 11q23 per assenza del segnale relativo al segmento distale di KMT2A (MLL). | Confermata la microdelezione 11q; la localizzazione e l'estensione identificano con precisione i punti di rottura dimostrando il riarrangiamento KMT2A-ARHGEF12. Evidenziata delezione 20q. |
| 2 MA | LAM secondaria a MDS. | Cariotipo: complesso con anomalie strutturali, non tutte identificabili, coinvolgenti i cromosomi 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 18 e 20. FISH: confermata la traslocazione/delezione 5q e la delezione 7q e altre. | Confermata delezione 5q, definizione del punto di inizio e di fine, evidenziate due microdelezioni aggiuntive. Un frammento terminale del cromosoma 7 è conservato. I cromosomi 8 e 20 sono completi, non deleti, quindi traslocati e non riconoscibili. |
| 3 PT | Leucemia Prolinfocitica T | Cariotipo: t(X;12), aspecifica. FISH: microdelezione 6q21 in regione SEC63 (70%). | Confermata delezione 6q, definizione del punto di inizio e di fine, mosaicismo più basso (30%). |
| 4 AB | MDS, esordio | Cariotipo: delezione 5q. FISH: EGR1x1: delezione 5q. | Non valutabile. DNA scarso. |
| 5 AP | MDS del20q, rivalutazione | Cariotipo: non valutabile. FISH: D20S108x1: del20q. | Non valutabile. DNA scarso. |
| 6 BG | DMC MFI del20q, rivalutazione | Cariotipo: delezione 20q. FISH: D20S108x1: del20q. | Non valutabile. DNA non idoneo. |

continua

segue

| n° iniziali | Diagnosi clinica | Cariotipo e FISH | array-CGH |
|-------------|---|--|---|
| 7 BC | LAM M0-M1, esordio | Cariotipo: complesso con: traslocazione 4;8, delezione 9p e anello sovranumerario del cromosoma 12. FISH: confermate traslocazione e trisomia 12, non deleta regione 9p-CDKN2A. | Confermato riarrangiamento 9p con due delezioni (5kb) e una duplicazione. Confermata duplicazione estesa 12q. Alterazioni non ricorrenti nella patologia. |
| 8 MS | DMC MFI +8, del20q evolutiva, rivalutazione | Cariotipo: trisomia 8 e delezione 20q. FISH: trisomia 8 e D20S108x1: del20q. (80%). | Non valutabile. DNA non idoneo. |
| 9 ML | MDS del20q evolutiva, rivalutazione | Cariotipo: delezione 20q. FISH: D20S108x1: del20q. (90%). | Confermata delezione 20q. Artefatti da DNA degradato su molti cromosomi. |
| 10 MM | MDS, esordio | Cariotipo: delezione 20q. FISH: D20S108x1: del20q.(45%). | Non valutabile. DNA scarso. |
| 11 BG | DMC MFI del20q, rivalutazione | Cariotipo: non valutabile. FISH: D20S108x1: del20q.(75%). | Confermata delezione 20q (95%). Evidenziata delezione 2p. |
| 12 BL | LA con eosinofilia, esordio | Cariotipo: traslocazione 5;13 e duplicazione interstiziale 12q, subclone con trisomia 12. FISH: confermata t5;13 PDGFRB+ (50%), +12 (20%). | Confermata duplicazione 12 q12-q15. Non evidenziata trisomia 12. Conservato cromosoma 5. |
| 13 FR | LAL / Linfoma T, esordio | Cariotipo: non valutabile. FISH: delezione biallelica 9p-CDKN2A, trisomia 7q e delezione 7p, delezione 13q con duplicazione del cromosoma delecto. | Conferma trisomia 7q e monosomia 7p. Confermata delezione di entrambi i 9 (3kb con CDKN2A). Confermata delezione 13q interstiziale e duplicazione terminale. Evidenziata delezione 14 prossimale rispetto al gene TCR. Evidenziata trisomia 18q. |
| 14 EG | DMC tipo TE, esordio | Cariotipo: delezione 20q. FISH: D20S108x2: escluso il coinvolgimento della regione critica q12-q13.11. | Nessuna evidenza di delezione 20q. |
| 15 SN | LAM secondaria a MDS | Cariotipo: due subcloni anomali: uno con trisomia 1q e uno con trisomia 1q e delezione 6q. FISH: microdelezioni 5q e 12p (non rilevate al cariotipo) (80%), trisomia 1q (57%), del6q (44%). | Trisomia 1q: 80%. Del5q, 1 Mb: 100%. Del6q: 40%. Dup7p ter (?): 100%. Del12p, 1,5 Mb: 100%. Del13q: 20%. |
| 16 GF | LAM secondaria a MFI | Cariotipo: delezione 5q e amplificazione 11q. FISH: amplificazione KMT2A e delezione TP53 (60%), delezione 5q (10%). | Del 4q (?): 54%. Del5q 100%, 1,8 Mb (no EGR1)?. Del 9q, 27 Mb: 37%. Cth 11q 100%. Del 17p 100%. Dup 17p prox (?). Del17q (?). |
| 17 SR | DMC tipo PV, esordio | Cariotipo: ?iso20p (2/20). FISH: D20S108x2 normale. | Cromosomi 20 normali, normali anche tutti gli altri. |
| 18 LL | MDS, esordio | Cariotipo: delezione 20q. FISH: D20S108x1: del20q.(47%). | Non valutabile. DNA scarso. |

Casi non valutabili

Al termine della procedura di estrazione del DNA, 6 casi non sono risultati valutabili in quanto non idonei per le successive fasi del test che quindi non è stato eseguito.

In 4 casi il DNA ottenuto era in quantità insufficiente. Il test richiede una quantità standard di DNA sospeso in tampone ad una concentrazione prestabilita. Quando questi parametri non sono raggiunti il campione non può essere testato.

I campioni di midollo osseo inviati per la diagnosi citogenetica sono molto variabili per quanto riguarda la presenza di cellule, e quindi di DNA disponibile per questo test. I motivi principali di cellularità ridotta sono vari: il tipo di patologia, l'indice di crescita delle cellule, la eventuale terapia effettuata, il campionamento non ottimale, l'uso non corretto di anticoagulanti. In alcuni casi la cellularità del campione è talmente ridotta da non consentire neanche le indagini citogenetiche di base.

Nel nostro studio inoltre, per non gravare sul paziente e sull'organizzazione dei prelievi, abbiamo utilizzato il campione residuo dopo la preparazione delle colture per le indagini citogenetiche. Nel caso in cui questo test venga utilizzato effettivamente nei protocolli di diagnosi, dovrà essere programmato il prelievo di un campione specifico.

In 2 casi il DNA ottenuto dalla separazione era qualitativamente non idoneo.

Il test richiede, oltre ad una quantità standard di DNA, anche una elevata qualità del DNA, cioè elevata purezza e ridotta degradazione. Se questi parametri non soddisfano i livelli richiesti il campione non può essere testato. La purezza dipende essenzialmente dalla ridotta presenza di contaminanti, RNA, proteine, residui di reattivi. La degradazione corrisponde alla frammentazione del DNA.

Le stesse cause che incidono sulla quantità di DNA disponibile possono condizionare anche la qualità del DNA stesso. Tecnicamente non si può fare altro che seguire scrupolosamente i protocolli di conservazione, di preparazione e di controllo dei campioni.

Casi valutabili

In 12 casi è stato possibile procedere con il test e ottenere informazioni valutabili. Di seguito è riportata la descrizione in dettaglio di questi casi.

Caso 1 VG

Diagnosi di Leucemia Acuta Linfoblastica B con espressione di marcatori mieloidi all'immunofenotipo.

Il Cariotipo risulta normale.

La FISH con un pannello di sonde specifiche per i riarrangiamenti più frequenti nelle LAL-B evidenzia una microdelezione interstiziale nella banda 11q23 per assenza del segnale relativo al segmento distale del gene KMT2A (MLL).



L'array-CGH conferma la microdelezione 11 nella banda 11q23.3, precisa l'estensione, 1,9 Mb, identifica con precisione i punti di rottura, rispettivamente all'interno del gene KMT2A e del gene più distale ARHGEF12. In conseguenza della microdelezione si verifica il riarrangiamento KMT2A-ARHGEF12, molto raro ma conosciuto e correlato a forme di Leucemia Acuta Mieloide, con possibilità di espressione di marcatori linfoidei sia B che T, ad alto rischio.

L'array-CGH evidenzia anche la presenza di una delezione 20q, di circa 12,2 Mb, non individuata alla valutazione del cariotipo.

L'array-CGH ha quindi fornito in questo caso dati molto rilevanti consentendo di riformulare la diagnosi (LAM e non LAL-B), identificare l'alterazione genetica causativa, definire l'alto grado di rischio della patologia.

Caso 2 MA

Diagnosi di Leucemia Acuta Mieloide secondaria a Mielodisplasia.

Il Cariotipo risulta particolarmente complesso con numerose anomalie strutturali: una traslocazione del cromosoma 5, la monosomia del 7, una delezione dell'8, una traslocazione del 20q ed altre alterazioni non identificabili, coinvolgenti i cromosomi 6, 9, 11, 13, 14 e 18. Anche in assenza di dettagli più precisi il cariotipo conferma la diagnosi e l'alto grado di rischio della patologia.

Per questo motivo in FISH si decide di indagare soltanto le alterazioni dei cromosomi 5 e 7 che sono frequenti e tipiche delle MDS: per il cromosoma 5 si identifica la delezione q, in concomitanza con la traslocazione; per il cromosoma 7 si conferma la monosomia. Entrambe le alterazioni sono presenti nel 60% delle cellule presenti.

L'array-CGH conferma la delezione 5q, definisce il punto di inizio e di fine ed evidenzia anche due microdelezioni aggiuntive, di significato sconosciuto; un frammento terminale del braccio corto di un cromosoma 7 è conservato; i cromosomi 8 e 20 sono completi, non deleti, verosimilmente traslocati e non riconoscibili all'esame citogenetico.

In questo caso l'array-CGH ha fornito numerosi dettagli citogenetici aggiuntivi ma comunque non rilevanti per una definizione diagnostica e prognostica già raggiunta con cariotipo e FISH.

Caso 3 PT

Diagnosi di Leucemia Prolinfocitica T.

Il cariotipo mostra una traslocazione tra il braccio corto X ed il braccio lungo 12. La traslocazione non è tra quelle ricorrenti ed i punti di rottura presunti non appaiono in relazione con oncogeni noti. Non è possibile quindi stabilire il significato ed il valore prognostico.

In FISH interfascica sono stati valutati alcuni riarrangiamenti cromosomici ricorrenti nelle Linfoproliferazioni T con riscontro di una delezione della regione SEC63 del braccio lungo del cromosoma 6 nel 70% dei nuclei.

Le alterazioni rilevate sono compatibili con la diagnosi proposta ma non consentono ulteriori riflessioni.

L'array-CGH confermata la delezione 6q, con definizione del punto di inizio e di fine e segnala un mosaicismo più basso (30%) di quello riscontrato in FISH. Non evidenziate altre delezioni o duplicazioni.

Caso 7 BC

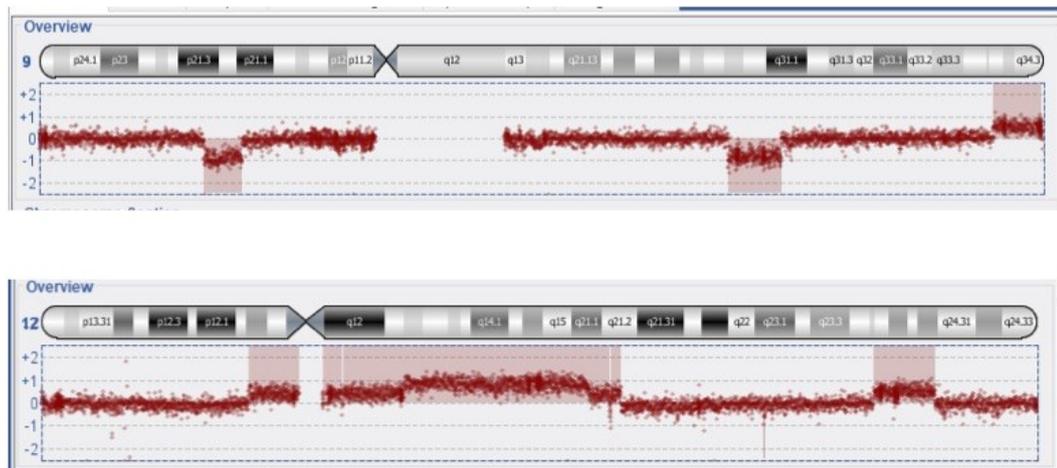
Diagnosi di Leucemia Acuta Mieloide sottotipo M0-M1.

Il cariotipo si evidenzia complesso con una traslocazione 4;8, una delezione 9p e anello sovranumerario del cromosoma 12.

La FISH conferma la traslocazione e la trisomia 12; non risulta deleta la regione 9p21 in cui è localizzato l'oncosoppressore CDKN2A.

Nel complesso le alterazioni riscontrate sono insolite, non ricorrenti, in una LAM e non appaiono coinvolti oncogeni mieloidi noti.

L'array-CGH appare indicato in questo caso in quanto potrebbe individuare microdelezioni o microduplicazioni che interessano regioni cromosomiche con un ruolo primario nella genesi della LAM.



L'array-CGH conferma un riarrangiamento complesso del cromosoma 9 con una delezione del braccio corto, una delezione del braccio lungo e una duplicazione terminale del braccio lungo. Conferma anche, sotto forma di duplicazione, la presenza dell'anello del cromosoma 12 che contiene sia materiale del braccio corto che del braccio lungo.

L'array-CGH chiarisce dettagliatamente i riarrangiamenti dei cromosomi 9 e 12 ma non fornisce dettagli utili a fini diagnostici o prognostici.

Caso 12 BL

Diagnosi di Leucemia Acuta con eosinofilia.

Il cariotipo mostra una traslocazione tra i bracci lunghi dei cromosomi 5 e 13 e una duplicazione interstiziale 12q; una metafase mostra inoltre una trisomia 12 lasciando ipotizzare la presenza di un subclone con +12.

In FISH si conferma che il punto di rottura sul cromosoma 5 interessa il gene PDGFRB. Il gene partner sul cromosoma 13 non è noto. Risultano positivi circa il 50% dei nuclei con un subclone con trisomia 12 pari a circa il 20%.

La diagnosi è già completa e dettagliata e consente il corretto inquadramento della patologia come: neoplasia mieloide/linfoide con eosinofilia e riarrangiamento di PDGFRB (classificazione WHO 2016).

L'array-CGH confermata la duplicazione 12 che interessa il tratto q12-q15. Non rileva invece il piccolo subclone con il 12 duplicato (trisomia 12) ipotizzato con il cariotipo e confermato con la FISH.

Caso 13 FR

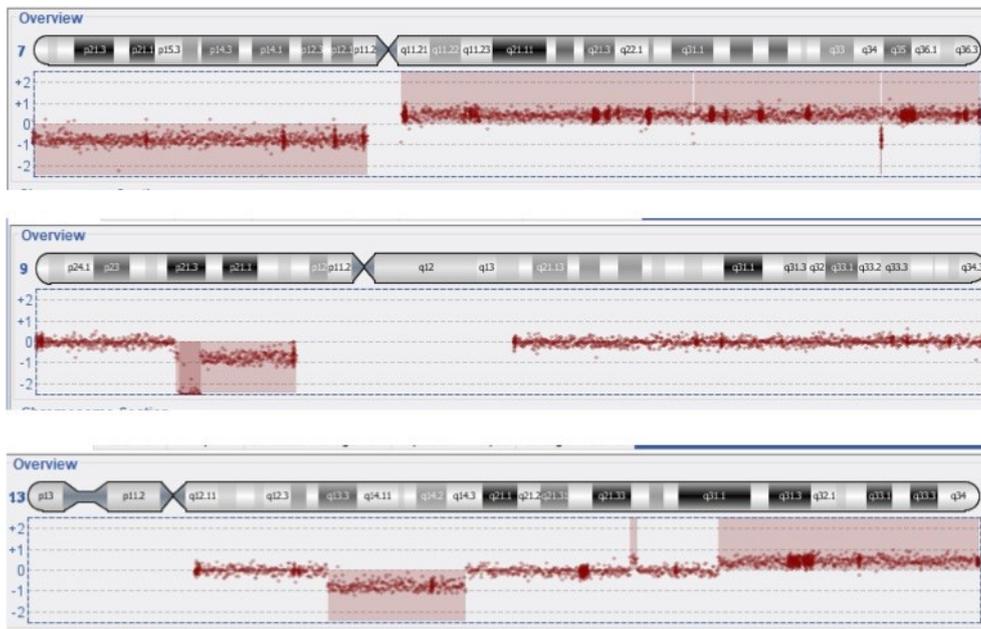
Diagnosi di LAL / Linfoma T

Il cariotipo non risulta valutabile per assenza di metafasi.

In FISH interfascica sono stati valutati alcuni riarrangiamenti cromosomici ricorrenti nelle Linfoproliferazioni T con riscontro di: delezione biallelica 9p-CDKN2A, trisomia 7q e delezione 7p, delezione 13q con duplicazione del cromosoma deuto.

Le alterazioni rilevate in FISH sono ricorrenti in questa patologia e ne supportano la diagnosi e l'alto grado di rischio.

L'array-CGH potrebbe chiarire le alterazioni a livello cromosomico ed eventualmente evidenziarne altre.



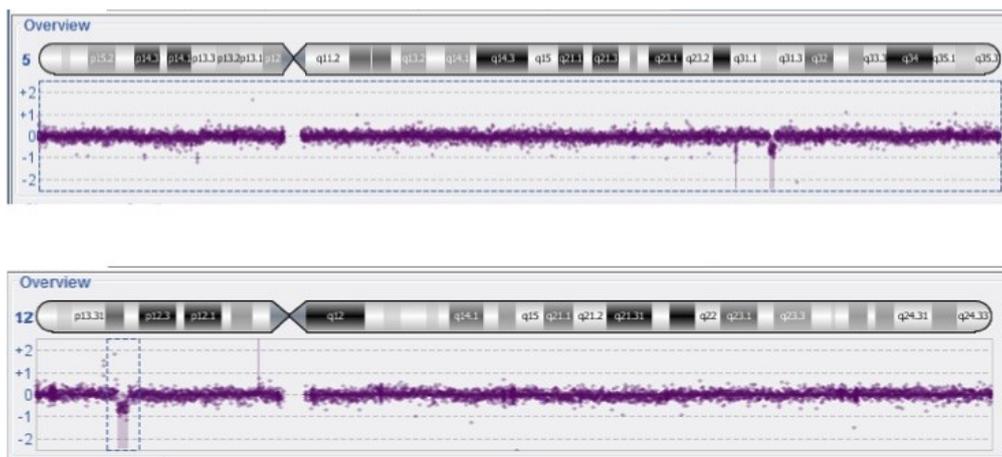
Il test: conferma la trisomia 7q e la monosomia 7p (verosimilmente per presenza di un isocromosoma 7q); conferma la microdelezione in entrambi i 9p (3kb che comprendono CDKN2A); conferma la delezione interstiziale e la duplicazione terminale del 13q. Inoltre evidenzia una microdelezione 14, prossimale rispetto al gene TCR, di significato sconosciuto, ed una duplicazione del braccio lungo 18 il cui studio non era compreso nel pannello di sonde utilizzato in FISH.

Caso 15 SN

Diagnosi di Leucemia Acuta Mieloide secondaria a Mielodisplasia.

Il cariotipo mostra la presenza di due subcloni anomali: uno con trisomia 1q e uno con trisomia 1q e delezione 6q. Non si evidenziano anomalie cromosomiche tipiche e ricorrenti in questo tipo di patologia.

La FISH eseguita con un pannello di sonde evidenzia una microdelezione 5q (regione critica EGR1) e una microdelezione 12p (regione critica ETV6), entrambe non rilevate al cariotipo e presenti nell'80% dei nuclei; conferma inoltre la trisomia 1q nel 57% dei nuclei e la delezione 6q nel 44%, confermando la presenza di almeno due subcloni di dimensioni diverse.



L'array-CGH conferma la microdelezione 5q, estesa per 1 Mb e comprendente EGR1, e la microdelezione 12p, estesa per 1,5 Mb e comprendente ETV6, entrambe nel 100% delle cellule. Conferma anche la trisomia 1q nell'80% (percentuale diversa da quella rilevata in FISH) e la delezione 6q nel 40%.

Il test evidenzia anche una microduplicazione 7p terminale, di significato sconosciuto, nel 100% delle cellule, che non è nota come alterazione ricorrente in queste patologie e che potrebbe essere anche costituzionale e non correlata alla patologia.

L'array-CGH si rivela utile nel chiarire la discrepanza tra cariotipo e FISH per le delezioni 5q e 12p e nel confermare la presenza in mosaico di più subcloni. È quindi una utile conferma citogenetica ma di scarsa rilevanza clinica.

Caso 16 GF

Diagnosi di Leucemia Acuta Mieloide secondaria a Mielofibrosi

Il cariotipo non risulta diagnostico per ridottissimo numero di metafasi valutabili: in una sola metafase si apprezza una apparente delezione 5q classica e abbondante materiale aggiuntivo sul braccio lungo 11 apparentemente derivato dallo stesso 11 per duplicazioni (figura dei cromosomi).

La FISH conferma l'amplificazione del gene KMT2A sul cromosoma 11 ed evidenzia la delezione TP53 nel 60% dei nuclei; la delezione 5q, indagata con la sonda EGR1, non è confermata.

In questo caso l'array-CGH appare particolarmente indicato per la scarsità di informazioni fornite dalla citogenetica. Il test fornisce infatti molte informazioni, in parte attese e congruenti, in parte inattese.



Un cromosoma 11 è interessato da riarrangiamenti complessi, tecnicamente definiti cromotrips (cth): delezione di almeno 6 regioni diverse e triplicazioni e quadruplicazioni di altre 6 regioni. Nelle delezioni è compreso ATM, un gene oncosoppressore, nelle amplificazioni è compreso l'oncogene KMT2A, come già individuato dalla FISH.

Un cromosoma 17 risulta avere perso tutto il braccio lungo, congruente con la perdita di una copia di TP53 in FISH, ed una piccola regione del braccio lungo, di significato sconosciuto.

Un cromosoma 5 riporta in effetti una delezione, ma di dimensioni ridotte, 1,9 Mb, non visibile al cariotipo, e localizzata al di fuori della regione critica che contiene EGR1. Il valore di questa delezione atipica non è noto.

Il test mostra anche due piccole delezioni del braccio lungo del cromosoma 4, di valore sconosciuto, in circa il 50% delle cellule, ed una ampia delezione del braccio lungo 9, rara ma nota come ricorrente nelle leucemie mieloidi, nel 35% delle cellule. Queste ultime alterazioni sono verosimilmente presenti non in tutte le cellule neoplastiche ma solo in sottopopolazioni, cioè subcloni.

Casi con delezione 20q

I rimanenti 4 casi sono accomunati dalla evidenza al cariotipo o alla FISH di delezione del braccio lungo 20 (del20q). In questi casi l'array-CGH è utile per definire l'ampiezza della delezione e l'interessamento di una o più regioni critiche presenti nel braccio lungo 20, dettagli che né il cariotipo né la FISH sono in grado di fornire.

Caso 9 ML

Diagnosi di Mielodisplasia, con del20q, in fase evolutiva, da rivalutare.

Il cariotipo mostra che la delezione 20q, estesa da q11 a q13, è presente in tutte le metafasi. Non evidenza di anomalie cromosomiche aggiuntive.

La FISH con sonda specifica per il locus D20S108 nella banda 20q12 conferma la delezione nel 90% dei nuclei.

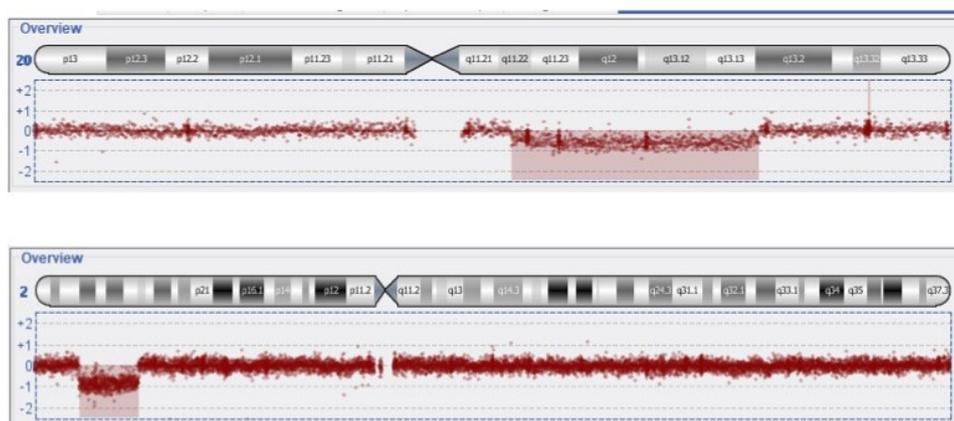
L'array-CGH viene eseguito per avere il dettaglio dell'estensione della delezione. Confermata delezione 20q, estesa per 18,7 Mb dalla banda q11.22 alla q13.2.

Caso 11 BG

Diagnosi di Disordine Mieloproliferativo Cronico tipo Mielofibrosi, con del20q, da rivalutare

Il cariotipo non risulta valutabile per assenza di metafasi.

La FISH conferma la delezione 20q, con un solo segnale D20S108 nel 75% dei nuclei.



L'array-CGH conferma la delezione 20q, estesa per 18,7 Mb dalla banda q11.22 alla q13.2 (95%). Il test evidenzia anche una ampia delezione sul braccio corto 2, estesa per 15,8 Mb dalla banda p25.1 alla p23.3, non ricorrente e di significato sconosciuto.

Caso 14 EG

Diagnosi di Disordine Mieloproliferativo Cronico tipo Trombocitemia.

Il cariotipo mostra una delezione 20q in 7 metafasi su 20 valutate (35%).

La FISH con sonda specifica per il locus D20S108 nella banda 20q12 mostra la presenza di 2 segnali in tal modo escludendo il coinvolgimento della regione critica q12-q13.11. È possibile quindi che la delezione interessi una regione più distale, non caratterizzabile in FISH per indisponibilità di sonde specifiche.

L'array-CGH è indicato proprio per valutare questa possibilità. Il test risulta normale non evidenziando nessuna delezione. Il risultato quindi implica due ipotesi: 1) la delezione è effettivamente assente e il cariotipo non è stato correttamente interpretato, 2) la delezione è presente, è atipica, ma il clone è inferiore al 40% per cui l'array-CGH non la evidenzia correttamente.

Caso 17 SR

Diagnosi di Disordine Mieloproliferativo Cronico tipo Policitemia.

Il cariotipo mostra un apparente isocromosoma 20p (equivalente di duplicazione dell'intero 20p e di delezione dell'intero 20q) in 2 metafasi su 20 valutate (10%). Il risultato non viene ritenuto, con sicurezza, diagnostico.

La FISH con sonda specifica per il locus D20S108 nella banda 20q12 mostra la presenza di 2 segnali in tal modo escludendo la delezione 20q. il risultato rafforza la possibilità che l'interpretazione del cariotipo non sia corretta.

Anche in questo caso l'array-CGH è stato eseguito per cercare di dirimere questa incertezza. Il test risulta normale non evidenziando nessuna delezione. Anche in questo caso rimangono aperte due ipotesi: 1) l'alterazione non c'è e il cariotipo non è stato correttamente interpretato, 2) l'alterazione è presente ma il clone è troppo ridotto per essere evidenziato con il test array-CGH.

Rilevanza dei dati array-CGH

Per avere una visione riassuntiva, per ogni singolo caso valutabile è stata codificata la rilevanza delle informazioni fornite dall'array-CGH rispetto a quelle ottenute dal Cariotipo e dalla FISH, stabilendo due tipologie: citogenetica e clinica, e due livelli: ridotta ed elevata. La rilevanza citogenetica fa riferimento alla quantità e alla qualità dei dettagli citogenetici forniti dal test, la rilevanza clinica si riferisce alla loro capacità di definire meglio aspetti clinici come la diagnosi, la prognosi o le scelte terapeutiche.

Nella tabella 2 sono riassunte le valutazioni dei singoli casi.

| caso | rilevanza del CGH rispetto a Cariotipo e FISH | |
|-------|---|---------|
| | citogenetica | clinica |
| 1 VG | elevata | elevata |
| 2 MA | elevata | ridotta |
| 3 PT | ridotta | ridotta |
| 7 BC | elevata | ridotta |
| 9 ML | elevata | ridotta |
| 11 BG | elevata | ridotta |
| 12 BL | ridotta | ridotta |
| 13 FR | elevata | ridotta |
| 14 EG | ridotta | ridotta |
| 15 SN | elevata | ridotta |
| 16 GF | elevata | ridotta |
| 17 SR | ridotta | ridotta |

Il test array-CGH si è rivelato utile dal punto di vista citogenetico, fornendo dettagli e informazioni che hanno ampliato la comprensione delle alterazioni citogenetiche rilevate da Cariotipo e FISH, in 8 casi su 12 totali valutabili (66%) ma le informazioni fornite sono state utili dal punto di vista clinico solo in 1 caso su 12 (8%).

5. CONCLUSIONI

L'array CGH è un metodo di analisi del DNA con caratteristiche peculiari: è in grado di evidenziare la presenza nel genoma di delezioni e duplicazioni, valutando tutti i cromosomi in un singolo test; è un'analisi di tipo quantitativo basata su confronto tra il DNA del soggetto da testare ed un DNA di controllo.

L'array-CGH rappresenta ad oggi l'unico test molecolare che consente di analizzare l'intero genoma umano con risoluzione elevata.

Questo test ha consentito di ridurre i limiti della risoluzione delle indagini citogenetiche a 10-100 kb rispetto a 5-10 Mb del cariotipo convenzionale. Nato come test di indagine nelle sindromi costituzionali dismorfico-malformative, ha portato il detection rate delle alterazioni causative mediamente dal 5 al 20%.

Una parte dei casi di tumori ematologici ha come causa genetica delezioni e duplicazioni del DNA. Il cariotipo convenzionale e la FISH sono test efficienti nell'individuare queste cause ma con una certa frequenza non le chiariscono in modo soddisfacente.

L'utilità del test array-CGH nell'analisi delle patologie acquisite di tipo oncoematologico è prevedibile ma tuttora non stabilita in modo definitivo.

Con il nostro studio ci siamo proposti di fare una valutazione preliminare dell'applicabilità del test Array-CGH allo studio dei tumori ematologici: cioè di esplorare i problemi, di vario ordine e grado, da risolvere prima di una adozione del test nella diagnostica di routine.

L'analisi dei risultati generali ottenuti su un gruppo di 18 campioni e la descrizione di alcuni singoli casi ci hanno consentito di fare alcune riflessioni sulla validità del test e sulla progettazione di future esplorazioni.

Per garantire il massimo dei risultati, e ridurre i casi non idonei al test, occorre utilizzare campioni di midollo osseo ottimali, prelevati specificamente per questo test, processati in tempi brevi o correttamente conservati.

L'esecuzione del test prevede per ogni campione una fase preparatoria manuale che richiede preparazione specifica, precisione, controlli di qualità, reattivi e materiale consumabile monouso con costi elevati; la fase informatica di produzione dei dati richiede hardware e software dedicati e deve essere effettuata da personale competente; la valutazione dei risultati richiede competenze specifiche sulle patologie oncoematologiche, sulle loro alterazioni genetiche e genomiche e sulla rilevanza clinica, competenza che permette di distinguere tra alterazioni causative e accessorie. Il test array-CGH è quindi da ritenere un test costoso sia in termini strettamente economici che anche in termini di tempo e di competenze necessarie.

Nella nostra casistica il test array-CGH ha fornito dettagli citogenetici aggiuntivi a quelli del Cariotipo e della FISH, in un considerevole numero di casi ma le informazioni fornite sono state utili dal punto di vista clinico solo in una minoranza. Questo risultato, che appare deludente, è in realtà un risultato relativo, e non assoluto: la rilevanza clinica dei risultati dell'array-CGH nei casi studiati, è sempre ridotta in quanto ci troviamo di fronte a risultati della citogenetica già molto informativi.

Per poter avere il valore assoluto del test occorre valutare i risultati dell'array-CGH su casi di neoplasie ematologiche in cui la citogenetica non è informativa. Questo è l'obiettivo della prossima fase di questo studio esplorativo. Campioni con cariotipo non valutabile o normale potrebbero essere più degli altri da studiare con array-GCH, per evidenziare anomalie genomiche non rilevate, ma per questa prima fase esplorativa abbiamo preferito scegliere casi già informativi.

Per le sue caratteristiche intrinseche il test array-GCH non si pone in alternativa alle indagini citogenetiche cardine come Cariotipo Convenzionale e FISH.

Tecniche di indagine citogenetica come Cariotipo Convenzionale, FISH e CGH-array non devono essere impiegate singolarmente in alternativa l'una all'altra, in quanto forniscono la loro resa migliore se integrate tra loro per permettere alla citogenetica di ottenere sempre di più diagnosi di precisione.

6. BIBLIOGRAFIA

Vermeesch J.R. et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *European Journal of Human Genetics*; 15: 1105-1114, (2007).

Theisen A. Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Nature Education* 1(1):45, (2008).

Freeman J.L. et al. Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Research*, 16: 949- 961 (2006).

Miller D. T. et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J. Hum Genet.* 86(5):749-764, (2010).

Elementi di Biologia e Genetica, P. Bonaldo-P. Defilippi-F. Majone-S. Minucci-P. Piomboni-G. B. Principato- M. G. Romanelli

[https://www.cell.com/ajhg/pdf/S0002-9297\(07\)62843-2.pdf](https://www.cell.com/ajhg/pdf/S0002-9297(07)62843-2.pdf)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1876176/>

<https://www.nature.com/scitable/topicpage/microarray-based-comparative-genomic-hybridization-acgh-45432/>

<http://www.diagnosiprenatale.com/diagnosi-prenatale/analisi-prenatali-cariotipo-molecolare-tecnica-array-cgh.aspx>

https://www.laboratorigenoma.eu/prestazioni_sottocategoria.asp?IdCat=37&IdSubCat=940

<http://bios-project.blogspot.com/2010/01/cgh-array.html>

file:///D:/Users/Utente/Downloads/magri_PRESENTAZIONE.pdf

<https://www.nature.com/articles/gim200842>

<https://slideplayer.it/slide/607468/>

<https://academic.oup.com/nar/article/34/2/445/2401660>

https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-88-470-1512-8_2 →LIBRO

file:///D:/Users/Utente/Downloads/magri_PRESENTAZIONE.pdf

https://www.laboratorigenoma.eu/prestazioni_sottocategoria.asp?IdCat=18&IdSubCat=110

https://air.unimi.it/retrieve/handle/2434/170508/169572/phd_unimi_R08246_1.pdf;jsessionid=A3A6AC3B65808700E5F904B4134A9D1A.suir-unimi-prod-01

<http://tesi.cab.unipd.it/44198/1/Tesi.pdf>

https://www.ogt.com/resources/literature/399_understanding_array_quality_control_qc_metrics_for_cytosure_arrays

RINGRAZIAMENTI

Nel finale vorrei ringraziare moltissimo il mio relatore Giancarlo Discepoli per il suo lavoro, per l'aiuto e per il tempo che ha dedicato a questo progetto di tesi.

Desidero anche ringraziare il prof. Gambella che durante questi 3 anni ha svolto un ruolo di guida per me e per i ragazzi del mio corso, lo ringrazio per tutte le volte che con pazienza e costanza ha risposto alle mie domande e per tutto il tempo che ci ha dedicato.

Ringrazio tutto il personale dell'ospedale e dei laboratori che ci hanno accompagnato durante gli studi e ci hanno introdotto al mondo del lavoro durante la frequentazione del tirocinio.

Un particolare ringraziamento va alla mia ragazza Chiara che più di ogni altra persona mi ha supportato durante il percorso di studi. Fin dal principio mi ha incoraggiato a continuare gli studi ed è stata al mio fianco in ogni momento in cui mi sono trovato in difficoltà, soprattutto in questa ultima parte burocratica che per me è stata forse più complessa degli esami stessi.

Nel finale voglio ringraziare anche i miei compagni con cui ho condiviso il percorso e con cui ho passato bellissimi momenti.

Un particolare ringraziamento anche Marco Castellani che è stato la mia bussola nel corso degli studi.