

“Fast and Fluo”: la nuova tecnica FISHIS consente di catturare i cromosomi e apre nuovi orizzonti alla genomica

D. Giorgi, A. Farina, V. Grosso, S. Lucretti

L'innovazione genomica e la tradizione citogenetica

Le tecnologie “omiche” più produttive e ad alto impatto sono basate sul concetto di analisi parallela ad alta velocità di elementi biologici. Il sequenziamento parallelo, o *Next Generation Sequencing* (NGS), è la metodologia che attualmente sta portando le scienze della vita verso la decifrazione del codice genetico di molteplici e diversi organismi. Anche in questo caso, grazie a strumenti bioinformatici che applicano un sistema di calcolo “parallelo”, l'enorme quantità di dati generati dal NGS, difficili da interpretare e da rendere significativi, sta trovando un ordine e, finalmente, una spiegazione circa la loro funzione biologica. La comprensione del meccanismo della vita sta fornendo gli strumenti per migliorarne le condizioni e riparare eventuali “malfunzionamenti”, o malattie, che possano presentarsi nel suo naturale svolgimento.

L'unità base funzionale di un organismo è la cellula, e la sua funzionalità e “salute” sono in larga parte governate dall'organizzazione del suo DNA, contenuto nel nucleo e organizzato in unità di replicazione autonome, denominate cromosomi.

Dagli studi emerge come la presenza di specifiche sequenze di DNA, e la loro organizzazione in gruppi di ripetizioni variabili e differentemente collocate nel genoma dell'individuo, sia sempre più spesso individuata quale fonte di regolazione, ed alterazione, del funzionamento del patrimonio genetico di una specie (CNV: *Copy Number Variation*).

Sino ad oggi, l'analisi della struttura dei cromosomi di una cellula è stata effettuata su base qualitativa, ossia osservando al microscopio la presenza di specifiche sequenze di DNA tramite l'abbinamento, o ibridazione, di “pezzi” di DNA coniugati con molecole evidenziatrici, o “reporter”, generalmente di tipo fluorescente ed in grado di emettere una luce di fluorescenza specifica quando il fluorocromo viene eccitato da una determinata lunghezza d'onda (Figura 1).

L'osservazione microscopica consente di valutare qualitativamente la presenza, o meno, di un pezzo di DNA: in citogenetica molecolare le “bande” di colore diverso indicano la localizzazione di specifiche sequenze di

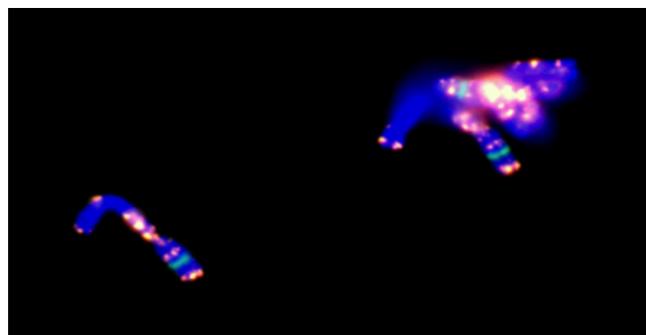


Figura 1
Immagine di cromosomi di grano (*T. durum* cv Cresco) colorati con metodica FISHIS e ibridazione con sequenze di DNA per le ripetizioni GAA (rosso) e rDNA (verde). La specifica marcatura fluorescente consente di identificare i singoli cromosomi e gli “spostamenti”, o traslocazioni, di porzioni dei cromosomi stessi, spesso correlati ad alterazioni visibili dell'organismo

DNA, e l'eventuale loro diversa collocazione tra cromosomi di individui diversi. Non si possono ottenere informazioni quantitative specifiche da queste osservazioni perché il materiale genetico non è manipolabile per analisi e clonaggi, ossia il DNA di interesse non è isolabile per esperimenti di biologia molecolare.

Innovazione e tradizione coniugate in un approccio originale: la citogenetica molecolare a flusso

I nuclei ed i cromosomi provenienti dalle molteplici forme cellulari, che siano linfociti del flusso sanguigno, cellule epiteliali, cellule tumorali in fase di proliferazione, o cellule staminali dalle potenzialità rigeneratrici, possono essere caratterizzati con la rapidità e la precisione necessarie a trattare grandi popolazioni dove gli eventi patologici, o di interesse, possono essere molto rari, con la sola tecnica della citofluorimetria a flusso (CFM) e *flow sorting*.

Con la CFM, gli elementi cellulari, sia animali che vegetali, sono analizzati e separati con alta resa e precisione secondo le loro diverse caratteristiche morfologiche e biochimiche, senza contaminazioni esterne che ne blocchino la crescita o le inquinino limitandone l'impiego. Con il *flow sorting* si possono isolare singoli elemen-

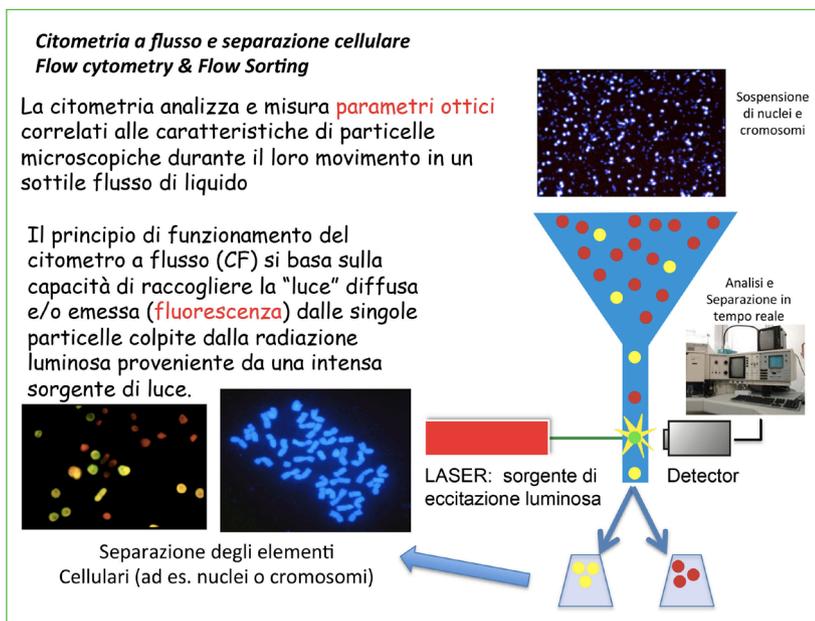


Figura 2

Come funziona un citometro a flusso: la sospensione di cromosomi e nuclei marcata con colorante specifico per il DNA viene analizzata da un citofluorimetro che cataloga in tempo reale le intensità di fluorescenza emesse dalle singole particelle. La quantità di fluorescenza viene utilizzata dallo strumento per frazionare la sospensione in provette singole contenenti le particelle di interesse. In circa un'ora di flow sorting si possono ottenere da 10 ng a 1µg di DNA puro, a seconda del campione in esame

ti e rare sotto-popolazioni per successive manipolazioni e studi (Figura 2).

Sino ad oggi, le grandi capacità analitiche della caratterizzazione molecolare, o citogenetica molecolare, non hanno trovato efficace applicazione per l'isolamento e la manipolazione di quegli elementi cellulari, come nuclei e cromosomi, così ben rivelati sul vetrino al microscopio, ma indisponibili per l'analisi citofluorimetrica, la separazione via *flow sorting* e l'analisi molecolare-genomica.

La citometria a flusso è stata introdotta pionieristicamente in Italia in ENEA, alla fine degli anni settanta, presso il Centro Ricerche della Casaccia, nel Laboratorio Dosimetria e Biofisica del Dipartimento Radiazioni (RAD) dell'allora Comitato Nazionale per l'Energia Nucleare (CNEN). Successivamente, grazie ad uno specifico investimento in beni strumentali e risorse umane, questa tecnologia è stata adottata anche per lo studio delle cellule vegetali, e le competenze nel tempo sviluppatesi sono oggi presenti nell'Unità Tecnica Sviluppo Sostenibile ed Innovazione del Sistema Agro-Industriale dell'ENEA.

Inizialmente, la citometria a flusso è stata applicata, dal nostro gruppo, alle cellule vegetali, considerate come uno "strumento" biotecnologico molto versatile

perché in possesso della capacità, condivisa nel campo animale solo con le preziose cellule staminali, di crescere indefinitamente e differenziare in un organo o - fatto biologico unico - rigenerare una nuova pianta, identica a quella dalla quale sono state prelevate inizialmente le cellule stesse. Questa capacità, detta totipotenza, rende le cellule vegetali un materiale *biotec* peculiare e dalla grandi potenzialità applicative: una singola cellula con una modificazione del suo corredo genetico può dar luogo ad un individuo completo con le nuove caratteristiche stabilizzate ed espresse. Le potenzialità applicative di una tecnica come la citofluorimetria a flusso e *flow sorting* consentono di identificare e selezionare la rara diversità presente in alcune cellule tra i milioni di elementi cellulari allevati *in vitro*.

Ma la capacità di identificare, tramite la citogenetica molecolare, le alterazioni del patrimonio genetico in

nuclei e cromosomi per analizzarle e studiarle con gli strumenti della genomica rimaneva ancora preclusa. Almeno sino a quando, presso i laboratori della Casaccia, è stata messa a punto per la prima volta una nuova tecnica, denominata *ibridazione in situ fluorescente in sospensione* (FISHIS: *fluorescent in situ hybridization in suspension*), in grado di unificare le migliori capacità della citogenetica molecolare con la separazione cellulare mirata della citometria a flusso e *flow sorting* e dando così origine alla citogenetica molecolare a flusso (<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0057994>).

La nuova tecnica FISHIS consente di marcare il DNA di nuclei e cromosomi in sospensione con sonde molecolari a DNA coniugate con coloranti fluorescenti per identificare immediatamente e con precisione alterazioni del patrimonio genetico, riconosciute tramite citometria a flusso e separate con il *flow sorting* (Figura 3). Si aprono, così, nuove prospettive di sviluppo che consentono di ampliare le conoscenze applicative in tutti i campi della genomica e diagnostica molecolare, grazie alla possibilità di rilevare la presenza di geni e sequenze di DNA di interesse, di identificare cromosomi e sotto-genomi in specie complesse (ad es. il grano tenero, la segale, il cotone), di diagnosticare la presenza/

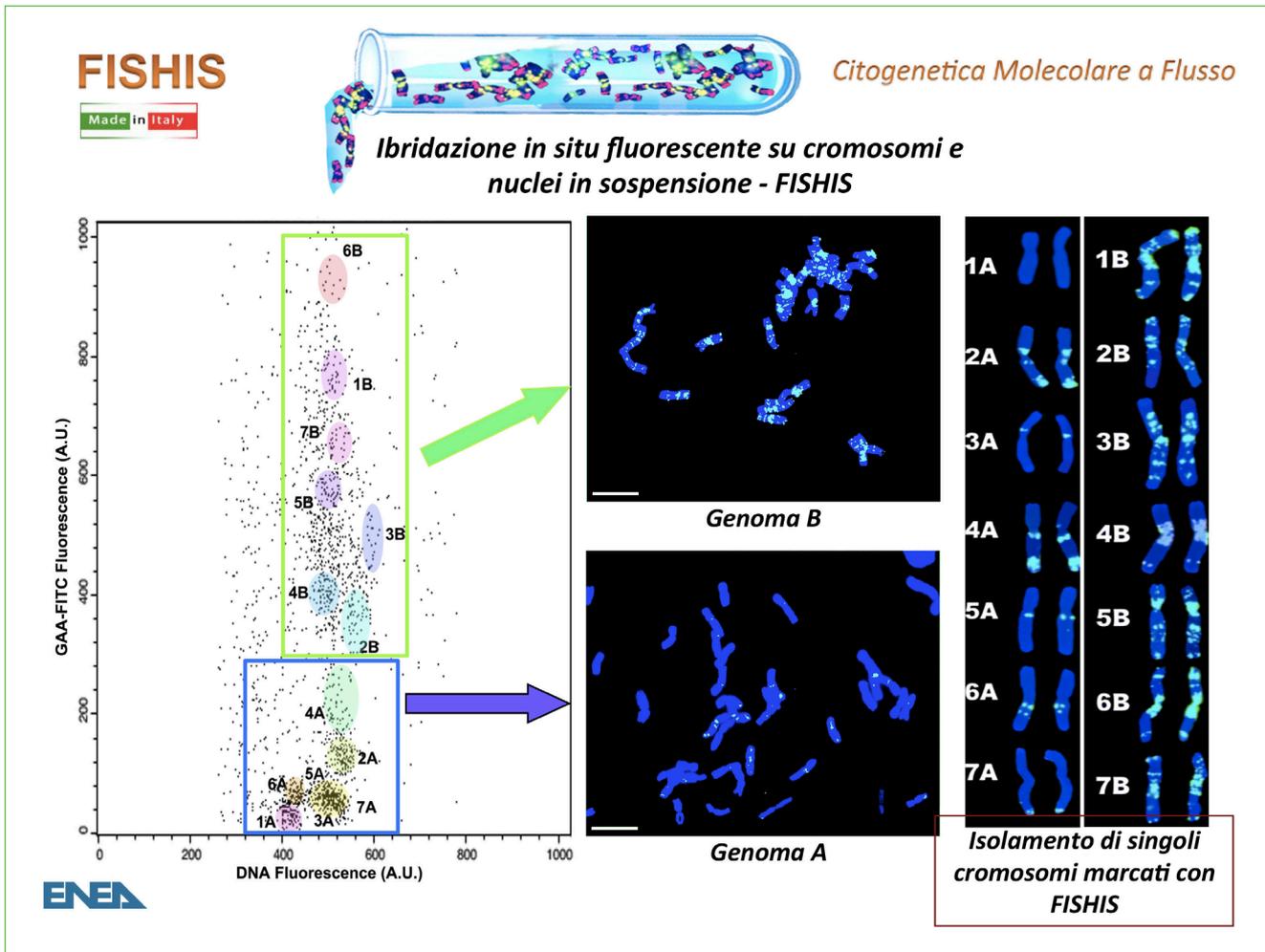


Figura 3
 La sospensione cromosomica ottenuta da cellule della radice di grano duro dopo sincronizzazione del ciclo cellulare e frantumazione dei tessuti viene ibridata con FISHIS con sequenze di DNA fluorescente (GAA+FITC) ed un colorante per il DNA totale. I singoli cromosomi, ciascuno con un pattern di ibridazione specifico, vengono riconosciuti dal citometro e separati nei due sotto-genomi che hanno originato la specie grano duro (genoma A e B) e nei singoli tipi cromosomici. Questa possibilità di frazionamento del genoma di grano duro, costituito da 12 miliardi di nucleotidi (12Gb), consente di leggere e comprendere il significato dei dati del sequenziamento, altrimenti non interpretabili nel loro insieme indiviso

assenza di geni e traslocazioni cromosomiche (causa di malattie genetiche e mutazioni).

Questa scoperta è l'ultima di una serie che ha visto l'ENEA mettere a punto, per prima, i sistemi di isolamento e separazione di cromosomi vegetali, alla base dell'approccio cromosomico scelto dal Consorzio Internazionale per il Sequenziamento del Grano (<http://www.wheatgenome.org/>), il più grande genoma mai affrontato dalla genomica, che è circa sei volte più vasto di quello umano.

L'ENEA può giustamente vantare un polo di eccellenza in Italia per lo sviluppo di sistemi di analisi e separazione cellulare nel campo delle biotecnologie, non presente in alcuna altra Istituzione di ricerca, sia pubblica che privata.

Per approfondimenti: debora.giorgi@enea.it - sergio.lucretti@enea.it

Debora Giorgi, Anna Farina, Valentina Grosso, Sergio Lucretti
 ENEA, Unità Tecnica Ambiente Sviluppo Sostenibile ed Innovazione
 del Sistema Agro-Industriale - Laboratorio Innovazione Agro-Industriale