

IX Congresso Nazionale SIGU
Venezia, 11 novembre 2006

L'INCREDIBILE FENOMENO CHE HA RESO POSSIBILE L'ANALISI CITOGENETICA

Relatore: Gianluigi Terzoli

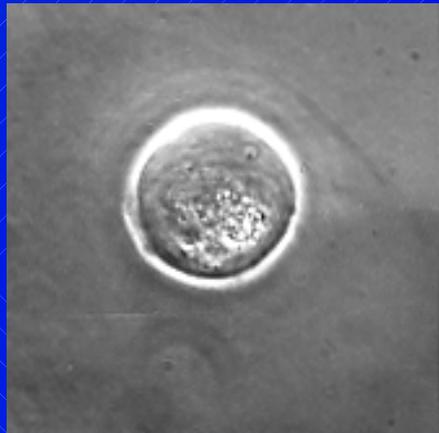
Autori: Gianluigi Terzoli, Carlo Introini, Marina Di Segni.

**Laboratorio di Genetica Medica (Resp. Domenico Coviello)
Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina
Elena**

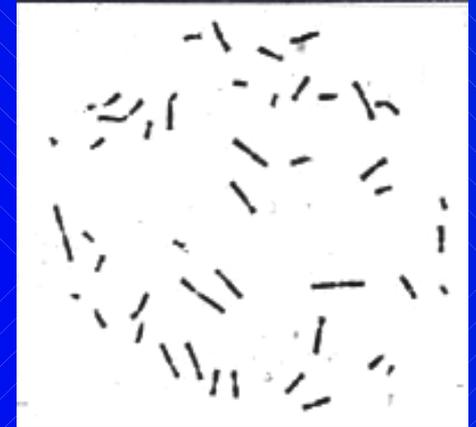
Si ringraziano per il loro essenziale contributo Marco Baccarin e Cristina Botta.

LA PREPARAZIONE CROMOSOMICA:

dalla cellula in mitosi a cromosomi ben sparpagliati
(spreading) e adatti all'analisi dopo tecniche di bandeggio



Ipotonica
Fissativo
Evaporazione



Le tre fasi della preparazione cromosomica:

- Trattamento con soluzione ipotonica
- Trattamento con una miscela di fissativo
- Evaporazione del fissativo a temperatura e umidità relativa controllate

Un omaggio a Tjio e Levan...

...nel 50° anniversario dalla pubblicazione “The chromosome number of men” (Tjio e Levan. Hereditas, 1956)

Con l'identificazione del numero corretto dei cromosomi dell'uomo ha inizio la Citogenetica Umana

Nella preparazione cromosomica appare un nuovo protagonista: l'acido acetico

“Serendipity” affermò più volte Tjio in una intervista rilasciata al giornalista Rich McManus nel 1998.

Serendipity: la capacità innata di scoprire cose importanti senza averle cercate.

Questo è accaduto quando Tjio scoprì il numero esatto dei cromosomi dell'uomo.

Era la mattina del 22 dicembre 1955.

Tjio stava lavorando a delle colture di fibroblasti ottenuti da polmone di feto umano. Insieme a Levan era diventato esperto nelle colture di fibroblasti.

Dopo circa 24 ore di colchicina le colture presentavano un gran numero di cellule in mitosi.

Si trattava ora di procedere con le tecniche della preparazione cromosomica apprese da Hsu, nel tentativo di ottenere “piastre metafasiche” che permettessero di contarne i cromosomi.

Trattamento ipotonico (abbreviato rispetto a Hsu); poi “squashing” cui avrebbe dovuto seguire un lavaggio con alcool metilico (secondo l'uso corrente degli istologi).

Si procede invece lavando i vetrini con **acido acetico** acquoso al 60 % per ben due volte “...per rimuovere i sali residui dell'ipotonica” scrisse.

Quindi essiccazione all'aria e colorazione in orceina.

Un rapido ed emozionante sguardo al microscopio.

I cromosomi appaiono nitidi, ben sparpagliati e possono essere facilmente contati...e sono 46 (fig.2)... non 48 come fino ad allora era stato sostenuto, scritto ed insegnato.

In 261 metafasi su 265 contate, il numero di cromosomi risulta essere 46.

Non c'è più dubbio, i cromosomi delle cellule umane sono 46.

Il lavoro viene pubblicato su Hereditas nel gennaio del 1956 con il titolo “The chromosome number of man”.

È l'inizio della citogenetica dell'uomo.



Fig. 1. *Metafase ottenuta da Hsu nel 1952*

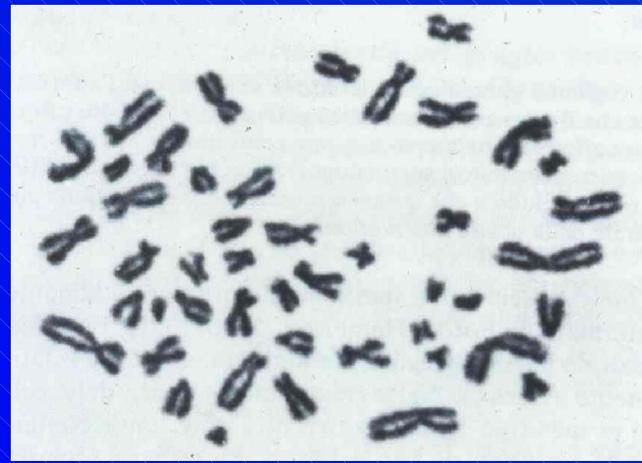


Fig. 2. *Metafase ottenuta da Tjio nel 1956.*

- Se si confronta l'aspetto delle mitosi ottenute da Hsu (fig.1) con quelle ottenute da Tjio(fig.2) si constata un salto di qualità nello spreading e nelle dimensioni dei cromosomi. Ciò ha permesso un facile e sicuro conteggio.
- Tjio attribuì alla riduzione del tempo di ipotonica la causa degli inattesi risultati ottenuti. Possiamo invece affermare che la vera novità fu l'introduzione dell'acido acetico in soluzione acquosa come "fissativo" al posto dell'alcool metilico.
- L'acido acetico per la prima volta fa la sua comparsa nelle tecniche della preparazione cromosomica e mai più abbandonerà la scena.
- Le tecniche della preparazione cromosomica furono perfezionate successivamente da Moorhead che nel 1960 introdusse una nuova metodica che permetteva di ottenere molte cellule in divisione da un prelievo di sangue periferico. I linfociti venivano stimolati dalla fitoemoagglutinina (PHA) e dopo 72 ore circa di incubazione in termostato, con breve tempo di colchicina, si poteva raccogliere un gran numero di mitosi.

L'essenza della tecnica della preparazione cromosomica consisteva nel:

- trattamento delle mitosi con ipotonica per breve tempo;
- fissazione in alcool metilico-acido acetico (3:1);
- sgocciolamento su vetrino istologico che veniva poi posto ad asciugare all'aria.

Da allora questi steps furono presenti in tutte le preparazioni cromosomiche non solo per i linfociti stimolati, ma anche per le colture di cellule di differenti tessuti quali fibroblasti cutanei, cellule del midollo, del liquido amniotico, ecc. In tutte queste tecniche l'acido acetico è sempre presente nell'ultimo step della preparazione cromosomica, anche se miscelato con l'alcool metilico. L'essiccazione all'aria dei vetrini, cioè l'evaporazione del fissativo metil-acetico in cui sono sospese le cellule, prese il posto del lavaggio finale in acido acetico acquoso al 60 %.

Molto più tardi, nel 1983, ricompare l'acido acetico in soluzione acquosa al 60 % quale "dissociante", per ottenere preparati cromosomici da cellule del feto, in mitosi spontanea, presenti nel citotrofoblasto di villi coriali prelevati nel primo trimestre di gestazione. Il suo uso viene limitato quasi esclusivamente a questa tecnica, nota come "tecnica diretta". È impressionante osservare la somiglianza delle metafasi ottenute da Tjio (fig.4) con quella ottenuta con tecnica diretta (fig.3).



Fig 3. Metafase ottenuta con "tecnica diretta" da cellule del citotrofoblasto ottenuta nel nostro laboratorio.

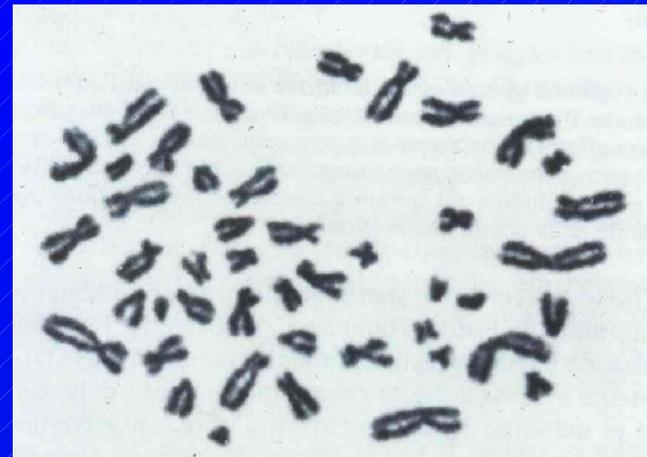


Fig. 4. Metafase ottenuta da Tjio nel 1956.

Le preparazioni cromosomiche di tutte le altre colture cellulari proseguivano però senza cambiamenti, nella scia della tecnica di Moorhead, cioè con l'evaporazione finale del fissativo metil-acetico.

Nonostante l'acido acetico sia sempre presente nelle tecniche e domini l'ultimo step, quello dell'evaporazione finale, ancora non viene preso in considerazione come fattore importante per l'esito della preparazione cromosomica. Nell'opinione comune dei laboratori infatti, seguendo l'interpretazione di Tjio, si riteneva e si ritiene ancora che le cellule in mitosi e i cromosomi si gonfino durante il trattamento ipotonico, tanto che si raccomanda estrema attenzione e delicatezza nel manipolare le cellule durante questo step perché, si dice, rese molto fragili in quanto gonfiate all'estremo dall'acqua inglobata.

D'altro canto in questo periodo l'attenzione dei citogenetisti è rivolta soprattutto a scoprire il rapporto fra le numerose anomalie cromosomiche (che le nuove tecniche di bandeggio sempre più sofisticate e ad alta risoluzione andavano rivelando) e le conseguenti patologie pre- e post-natali.

Un fenomeno *costante* dell'analisi citogenetica è l'alta *variabilità* dei risultati, pesantemente influenzati da fattori esterni quali il cambiamento del tempo e delle stagioni. In alcuni casi occorre ripetere l'analisi, ciò nonostante in pochi si sono occupati di studiare e indagare più a fondo le dinamiche delle cellule durante la preparazione cromosomica nel tentativo di superare questi problemi.

L'INCREDIBILE FENOMENO

Nel 1985 Lundsteen in una lettera a Prenatal Diagnosis, afferma che il controllo della temperatura e dell'umidità relativa dell'ambiente in cui avviene l'evaporazione finale del fissativo è essenziale per ottenere risultati ripetibili e di migliore qualità nelle preparazioni cromosomiche.

Nell'estate del 1988, durante il XXI Simposio di Citogenetica tenutosi a Praga, furono presentate tre sequenze fotografiche riprese durante l'evaporazione finale del fissativo di colture di linfociti. Riportiamo qui solo quella ottenuta ad una temperatura di 23°C e ad un'umidità relativa del 43 % circa (fig.5).

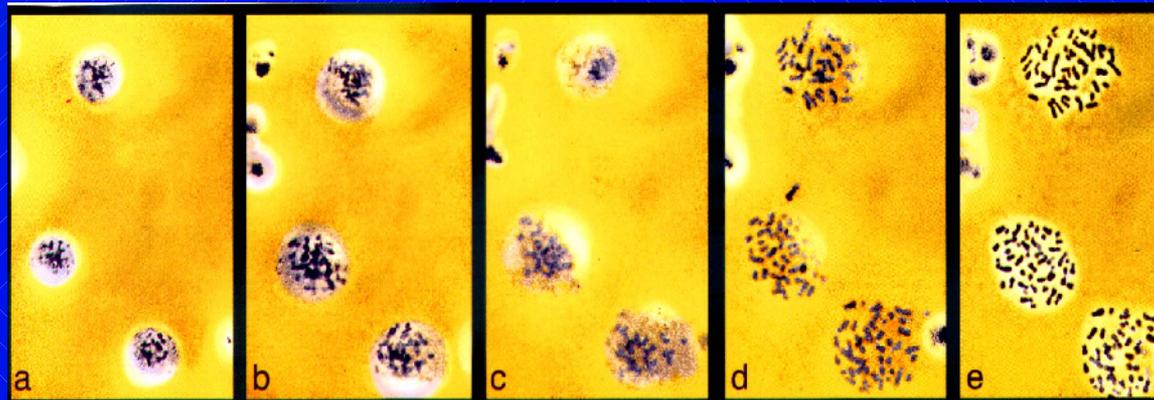


Fig. 5. Dinamica del comportamento delle mitosi e dei cromosomi durante l'evaporazione finale del fissativo. (Terzoli, XXI Simposio di Citogenetica, Praga 1988)

Per la prima volta viene documentato e dimostrato che:

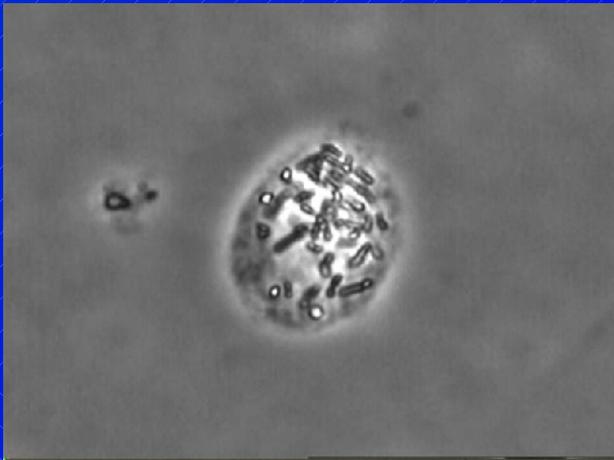
- Prima dell'evaporazione finale del fissativo (e quindi dopo il trattamento ipotonico) le mitosi appaiono piccole, tondeggianti con all'interno i cromosomi che appaiono come bastoncini neri, corti (foto a).
- Ad un certo punto, durante l'evaporazione dell'alcool metilico(foto b), quando l'acido acetico entra in contatto con le molecole di acqua dell'umidità atmosferica, le cellule iniziano a gonfiarsi come palloncini ed i cromosomi si sparpagliano aumentando di dimensioni in modo vistoso, fino a 10 volte le loro dimensioni iniziali (foto c, d, e).
- Le altre due sequenze (qui non riportate) dimostrano che questo incredibile fenomeno di spreading e di aumento delle dimensioni dei cromosomi è influenzato pesantemente dalla temperatura e dalla umidità ambientale in cui avviene l'evaporazione, confermando la segnalazione di Lundsteen.

Sulla scorta di queste osservazioni è stato possibile far costruire una macchina in cui temperatura ed umidità relativa fossero regolabili a piacere e controllabili. In questa macchina, in più di dieci anni di lavoro sperimentale, sono state effettuate le evaporazioni del fissativo finale di colture ottenute da differenti linee cellulari. È stato possibile quindi individuare le temperature e le umidità ideali per ogni tipo di coltura e di conseguenza ottenere il ripetersi costante della qualità dello spreading e dei cromosomi.

Lo studio delle dinamiche delle mitosi durante la preparazione cromosomica viene ripreso in modo magistrale da Claussen che pubblica nel 2002 un sostanzioso lavoro dal titolo *“Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis”*. Riassumiamo i punti che riguardano l’oggetto di questo studio:

- Durante il trattamento ipotonico i cromosomi, all’interno della cellula (che ha forma sferica) si muovono dal centro verso la membrana cellulare.
- Appena le cellule sono raggiunte dal fissativo la loro membrana viene distrutta.
- In presenza di acido acetico e acqua, le proteine citoplasmatiche e i cromosomi si gonfiano vistosamente e in modo indipendente (i cromosomi infatti si gonfiano anche in assenza delle proteine citoplasmatiche).
- L’evaporazione finale del fissativo in ambiente privo di acqua impedisce il rigonfiarsi delle proteine citoplasmatiche e quindi lo spreading dei cromosomi, e l’aumento delle dimensioni di questi ultimi.
- All’aumentare dell’umidità ambientale, aumentano anche lo spreading e la dimensione dei cromosomi.

**IL RUOLO DELL'ACIDO ACETICO E DELL'ACQUA
NELL'IDRATAZIONE DELLE PROTEINE CITOPLASMATICHE E DEI
CROMOSOMI:
visualizzazione del fenomeno**



a



b



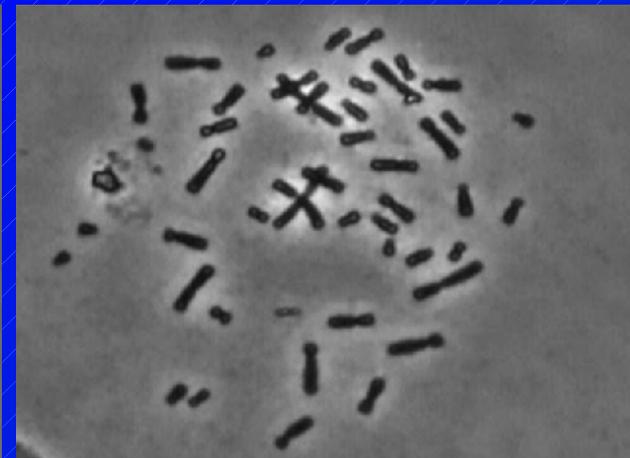
c



d



e



f

IL RUOLO DELL'ACIDO ACETICO E DELL'ACQUA NELL'IDRATAZIONE DELLE PROTEINE CITOPLASMATICHE E DEI CROMOSOMI

Descrizione del fenomeno

Fino a quando il fissativo è composto da una miscela di alcool e di acido acetico, le mitosi appaiono rotondeggianti ed al loro interno si possono osservare i cromosomi che appaiono come bastoncini scuri e rifrangenti, corti e poco distanziati gli uni dagli altri (foto a).

L'alcool metilico evapora prima dell'acido acetico e, ad un certo punto, improvvisamente, la mitosi che appariva come una piccola sfera trasparente, ben delimitata, contenente i cromosomi si espande progressivamente (foto b).

Le proteine citoplasmatiche si gonfiano e spingono i cromosomi distanziandoli gli uni dagli altri (spreading). Contemporaneamente si gonfiano anche le proteine dei cromosomi che aumentano di dimensioni in modo vistoso (foto c, d, e).

Questo fenomeno giunge ad un massimo limite per poi arrestarsi

Segue quindi l'evaporazione definitiva dell'acido acetico (foto f)

CONSEGUENZE DELL'INCREDIBILE FENOMENO

- L' "incredibile fenomeno" ha offerto a Tjio l'opportunità di un conteggio esatto e indiscutibile del numero dei cromosomi umani.
- Ai citogenetisti oggi, permette l'analisi fine della struttura, mediante le tecniche di bandeggio, permettendo lo studio delle anomalie cromosomiche correlate a numerose patologie umane

IL BANDEGGIO

- Il rigonfiarsi dei cromosomi, cui consegue l'aumento di volume nelle tre dimensioni (e quindi anche nella lunghezza) è il fenomeno che permette il formarsi lungo il loro asse di zone più o meno gonfie, più o meno condensate, che dopo opportuna colorazione si manifestano come bande più o meno scure (fig. 6).
- Il pattern di bande è tipico e costante per ogni coppia di cromosomi e dà la possibilità di identificare e di analizzare i cromosomi banda per banda (fig. 7).

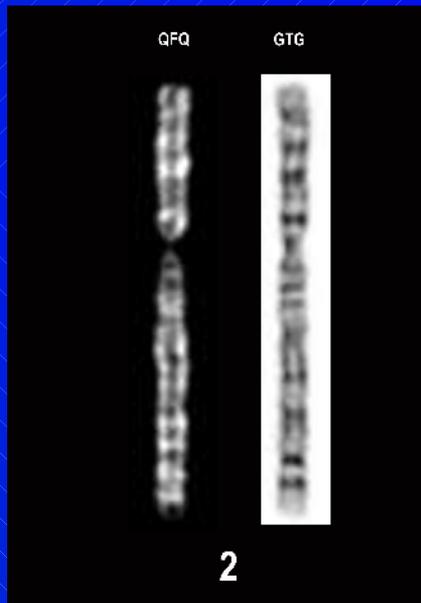


Fig.6. Cromosoma 2 dopo colorazione QFQ e GTG

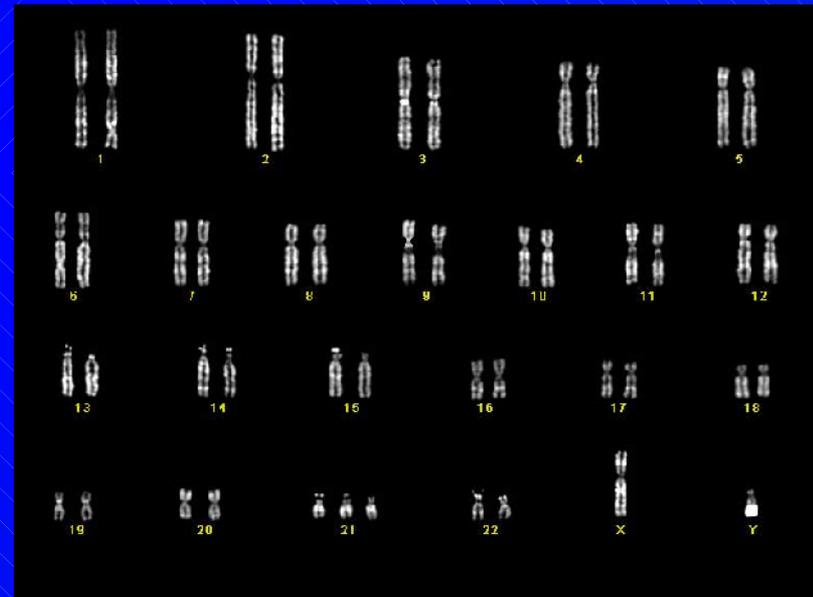


Fig. 7. Cariogramma di una metafase da colture di amniociti, ad una risoluzione di circa 400 bande per set ploide.

- Quanto più è grande il numero delle bande, tanto più aumenta la risoluzione con cui l'analisi cromosomica viene effettuata.

ANALISI BIOCHIMICA DEL FENOMENO: L'IDRATAZIONE DELLE PROTEINE

Durante il terzo step della preparazione cromosomica la cellula mitotica subisce il trattamento con il fissativo; quest'ultimo non è altro che una miscela costituita da 3 parti di alcool assoluto (solitamente metanolo) e una parte di acido acetico. A causa dell'evaporazione preferenziale del metanolo (U. Claussen, 2002), vi è un momento in cui, durante l'evaporazione finale del fissativo, lo stesso risulta costituito dal solo acido acetico. Questo, una volta entrato in contatto con l'acqua presente nell'umidità atmosferica, grazie alla sua igroscopicità, si dissocia liberando una quantità di protoni H^+ proporzionale al suo pK. L'acido acetico in forma ionizzata è in grado di rompere legami salini, legami tiolici e naturalmente i legami idrogeno, cioè i legami che stabilizzano la struttura proteica del citoplasma e la struttura proteica sulla quale è ancorato il filamento di DNA che costituisce il cromosoma mitotico (Fig. 7).

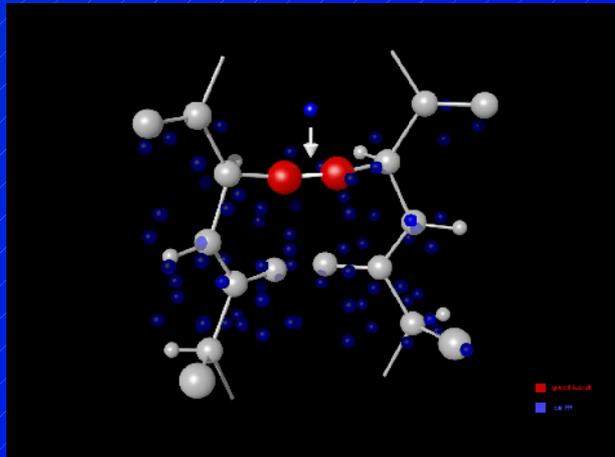


Fig. 8. *Azione dell'acido acetico sui legami intercatena di due catene adiacenti.*

L'acido acetico in forma dissociata è in grado di rompere legami salini e tioici formatosi tra i gruppi laterali di catene polipeptidiche adiacenti.

Come risultato dell'azione dell'acido acetico, si verifica la rottura di alcuni punti di ancoraggio della struttura proteica che permette il superavvolgimento del DNA, fatto che si traduce nel parziale allontanamento delle catene polipeptidiche che fino a quel momento apparivano legate (Fig. 9).

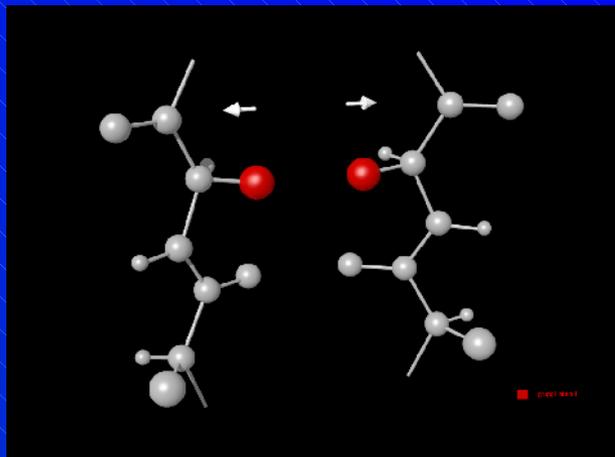


Fig. 9. *Allontanamento delle catene polipeptidiche in seguito all'azione dell'acido acetico.*

A questo punto si può pensare che, grazie alla sua energia termica (moto browniano), l'acqua possa penetrare negli spazi intercatena ed interagire con i gruppi polari delle catene peptidiche appena liberati grazie all'azione dell'acido acetico, provocando, in sinergia alla liberazione di tensione dovuta alla rottura dei suddetti legami, un ulteriore allontanamento delle catene polipeptidiche (Fig. 10).

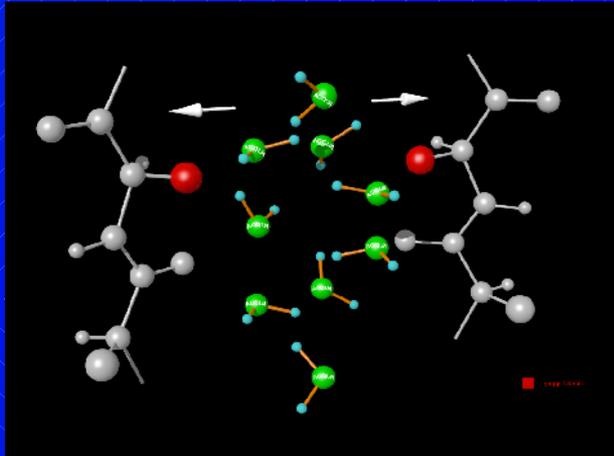


Fig. 10. *Ingresso dell'acqua negli spazi intercatena creati dalla rottura dei legami e in seguito all'azione dell'acido acetico.*

La struttura proteica si gonfia per effetto dell'idratazione provocando l'aumento delle dimensioni del cromosoma mitotico.

Nella nostra interpretazione l'allontanamento delle catene polipeptidiche dovuto all'azione sincrona di acido acetico e acqua, nel loro insieme provoca alle proteine citoplasmatiche e alle proteine coinvolte nella formazione del cromosoma mitotico un effetto di idratazione, fenomeno che a livello macroscopico si traduce nel rigonfiamento della cellula e del cromosoma che in questo modo aumenta tridimensionalmente fino a 10-20 volte rispetto alle dimensioni iniziali.

Bibliografia

- U Claussen., Michel S., Mühlig P., Westermann M., Grummt U.-W., Kromeyer-Hauschild K., and Liehr T., Demistifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenet Genome Res* 98:136-146, (2002).
- Hsu, T.C.: Mammalian chromosomes in vitro. I. The karyotype of man. *J. Hered.* 43, 167-172 (1952).
- Levan, A.: The effect of colchicine on root mitoses in allium. *Hereditas* 24, 471-486 (1938).
- Lundsteen C., Lind A.M.: A test of climate room for preparation of chromosome slides. *Clin. Genet.* 23, 240-242, (1985).
- Makino, S., Nishimura, I.: Water pretreatment squash technique. *Stain Technol.* 27, 1-7 (1952).
- Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J. et al.: Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 20, 613-616, (1960).
- Simoni B, Brambati G, Danesino C, Rossella F, Terzoli GL, Ferrari M, Fraccaro M. Efficient direct chromosome analysis and enzyme determination from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Hum Genet* (1983) 63: 349-357.
- Spurbeck J.L., Zinsmeister A.R., Meyer J. and Jalal S.M.: Dynamics of chromosome spreading. *American Journal of Medical Genetics* 61:387-393, (1996).
- Steele MW, Breg WR Jr. Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. *Lancet* (1966) 1: 383.
- Terzoli G., Lalatta F., Gilbert F., Chorionic villus sampling: improved method for preparation of karyotypes after short-term incubation. *Prenatal Diagnosis* 7, 389-394 (1987).
- Tjio, J.H., Levan, A.: The chromosome number of man. *Hereditas* 42, 1-6 (1956).
- Winiwarter, H., de, Oguma, K.: La formule chromosomiale humaine (a propos de deux travaux récents). *Arch. Biol. (Liege)* 40, 541-553 (1930).