

Hematoloji’de FISH

Dr. Beyhan DURAK

Osmangazi Üniversitesi, Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Eskişehir

Genetik değişiklikler ve kanser arasındaki ilişkiyi yaklaşık bir yüzyıl önce ilk kez Theodor Boveri düşünmüştür. Boveri bu düşüncesini 1914 yılında yayınladığı “Malign tümörler nasıl oluşur?” isimli makalesinde şöyle açıklamaktadır;

- Hücre ve organizmadaki normal fonksiyonların meydana gelmesini sağlayan kromozomlar üzerinde yer alan kalıtım birimlerinin dengesidir.
- Bu dengenin kromozomal değişimler nedeniyle bozulması tümör oluşumuna sebep olur.

Boveri’nin bu teorisinin doğrulanması için yaklaşık elli yıl geçmesi gerekmiştir ve 1960 yılında Nowell ve Hungesford ilk kez bir kromozomal yeniden düzenlenmenin insanda tümöre neden olduğunu KML de “Philadelphia kromozomu” ile göstermişlerdir.

Philadelphia kromozomunun keşfi ile genom, kromozomlar ve kanser arasındaki ilişki her geçen gün ivme kazanarak araştırılmış ve araştırılmaktadır. Bu sayede oluşan ve oluşmakta olan verilerin sonuçları tanı koyma, prognoz ve terapi planlamada özellikle lösemi ve lenfomada, sitogenetik tanının önemini ortaya koymuştur.

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH), nükleik asit problemleri aracılığı ile preparat üzerinde bulunan hücresel yada kromozomal DNA veya RNA’nın incelenmesi temeline dayanan bir tekniktir. Moleküler tekniklerin sitolojik preparatlara uygulanabileceği gerçeği ilk olarak 1969 yılında Gall ve Pardue tarafından ortaya atılmış olmakla birlikte ilk dönemlerde radyoaktif maddelerin kullanılması, uygulama süresinin uzun olması

ve moleküler klonlama tekniklerinin geliştirilememiş olması bu tekniğin çok yavaş ilerlemesine yol açmıştır. Ancak moleküler klonlama teknikleri ile diğer rekombinant DNA yöntemlerinin büyük bir hızla gelişmesi, ISH tekniğinin ivme kazanmasına yol açmıştır. Özellikle prob işaretlenmesinde radyoaktif olmayan maddelerin kullanılabilmesi, sinyallerin güçlendirilmesinde immünokimyasal ajanlardan yararlanılabileceği saptandıktan sonra bu teknikte belirgin bir ilerleme gözlenmiş, çok geniş uygulama alanı bulmuştur.

FISH tekniğinin moleküler tekniklerdeki ilerlemelere paralel olarak gelişmesi ve geniş bir uygulama alanı bulmasının altında yatan gerçek, bu tekniğin kolay uygulanabilir olması, duyarlılığı ve güvenilirliğinin yüksek olması, diğer moleküler DNA hibridizasyon yöntemlerine göre rezolüsyon gücü, mozaizm tanısı gibi avantajlarının olmasıdır.

Moleküler sitogenetik metodları (ISH, FISH, CGH) klasik sitogenetik yöntemlerle tanımlanamayan kromozomal mikrolezyonlar ve yeniden düzenlenmeleri ortaya koyma olanağı sağlar. Bu teknikler belli bir gen, marker veya kromozomal bölge için aneuploidi ve/veya translokasyonu kısa sürede tanımlamamıza yardımcı olur. Sitogenetikte rutin GTG bantlama tekniğinde >4Mb, HRB (2000 band düzeyinde) tekniğinde de >2 Mb ye kadar olan düzensizlikler saptanabilmektedir. Bu boyutlardan daha küçük olan yapısal düzensizlikler ancak FISH (1-3Mb) ile saptanabilmektedir. İnterfaz nükleusunda kromozomlar daha az yoğun ve metafaza göre 10-20 kat daha uzun olduğu için rezolüsyon 100 kilobaza kadar çıkabilir.

Tümör hücrelerinde metafaz kromozomu eldesi zorluğu bilinen bir gerçektir. Elde edilen bu metafaz kromozomlarının morfolojileri çoğunlukla klasik sitogenetik yöntemlerle özellikle yapısal anomalileri ortaya koyabilmede yetersiz kalabilmektedir. Kromozom elde edilemediğinde de ne yapısal ne de sayısal değerlendirmeye yapılamamaktadır. FISH analizi interfaz nükleusunda analizi olanaklı kılması nedeniyle kanser genetiğinde kullanılan en önemli teknik olmuştur. FISH analizi tümöre özgü karyotipik anomalilerin saptanmasında sitogenetik yöntemlere göre çok daha hızlı, hassas ve çoğunlukla daha güvenlidir. FISH tekniği özellikle lösemilerde geniş bir kullanım alanına sahip olup birçok farklı amaçla avantajlı bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlar;

- Farklı prob setleri sayesinde lösemi tipine özgü spesifik karyotipik yeniden düzenlenmenin varlığı veya yokluğunu belirlemek böylece hastalık tanısını koymak.
- Tedaviye paralel olarak karyotipik değişiklikleri belirlemek böylece tedaviyi izlemek.
- Hastanın klinik remisyonu ile karyotipik remisyonunun paralellliğini belirlemek ve göstermek.
- Hastalık tedavisinin sonuçlarını değerlendirmek, remisyonu kontrol altında tutarak, hastalığın dirençli hale gelip gelmeyeceğini belirleyebilmek.
- Hastalık relapsında karyotipik değişiklikleri belirleyebilmek.
- Kemik iliği nakli sonrası hastanın kemik iliği hücrelerinin orjinini (alıcı ve verici ayrı cinsiyetten ise) belirlemek.
- Analiz sonucu 24 saat içinde verilebilmekte bu sayede hastaya en kısa sürede tedavi başlanabilmektedir.
- Tetkik edilen anomaliye ilişkin çok sayıda nükleus (en az farklı 200 nükleus) incelenebilmektedir. Bu sayı kolayca arttırılabilmektedir.

FISH Tekniğinde Kullanılan Problar

Belirli bir kromozomal bölgenin veya DNA kesiminin FISH yöntemi ile görünür hale gelebilmesi için o bölgeye spesifik bir probun kullanılması gerekir. FISH yönteminde hedef DNA/RNA molekülüne komplementer işaretli nükleik asit dizisine "prob" denir. Problar haptenler, florokromlar, enzimler veya kolloidal altın ile işaretli olabilirler. Ancak bugün pratik olmaları ve ticari olarak bulunabilmeleri nedeniyle direkt ve florokromlarla işaretli problemler kullanılmaktadır. Hematolojik malign

hastalıklarda tanı amaçlı kullanılmakta olan 35 spesifik (lokus spesifik ve/veya translokasyon spesifik), bunun yanında 24 kromozoma özgü tüm kromozom, telomer ve α -satellit problemleri bulunmaktadır. Ayrıca iki farklı panel prob seti de rutin kullanımda ticari olarak bulunabilmektedir.

Sinyal özelliklerine göre problemler

- Lokus spesifik problemler
- Translokasyon problemleri
 - a) Tek füzyon (single fusion)
 - b) Çift füzyon (dual fusion)
 - c) Tek füzyon ekstra sinyal (extra signal)
- Kırık noktası yeniden düzenlenme (break apart rearrangement) problemleri
- α -satellit problemleri
- Tüm kromozom problemleri
- Telomer problemleri

Bu problemler kullanım şekilleri ve özelliklerine göre tek ve/veya çift renkli, prob setlerinde; üç ve/veya beş farklı renkle işaretli olabilirler.

Hematolojik Malign Hastalıklarda Kullanılan Problemler ve Tanı

Kronik Miyeloid Lösemi

KML de Rowley'in 1973 yılında Philadelphia kromozomunu bir translokasyon kromozomu olarak tanımlamasından sonra bu translokasyonun moleküler temelini aydınlatılması moleküler yöntemlerin geliştirilmesiyle olmuştur. Bundan onbir yıl sonra 1984 yılında Groffen ve ark. Kromozom 9q34 üzerindeki ABL onkogenini ve kromozom 22q11 üzerindeki BCR "breakpoint cluster region" bölgesini tanımladılar. Derivatif kromozom 22 üzerinde BCR-ABL ve derivatif kromozom 9 üzerinde ABL-BCR hibrid genleri de belirlenmiş oldu.

BCR-ABL hibrid geni normal ABL genine göre yüksek bir tirozin kinaz aktivitesine sahip olan bir kimerik protein sentezletir (Davis ve ark., 1985). Bu protein KML patolojisindeki en önemli rolü üstlenir (Daley ve ark., 1990). KML tanısı için klinik tablonun yanısıra günümüzde patognomik BCR-ABL füzyon transkriptinin de ortaya konması gerekmektedir. Bu amaçla bu translokasyon bölgelerine spesifik BCR-ABL translokasyon probu kullanılmaktadır. Bunun yanında KML için spesifik ve ticari olarak kullanıma hazır problemler:

- α -Satellit 8 probu
- 9q34 Lokus spesifik probu

<i>Akut Miyeloid Lösemi</i>		<i>Kronik Lenfositik Lösemi</i>	
- α -satellit 8	Alfa satellit probu	- α -satellit 12	Alfa satellit probu
- MLL (11q23)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu	- p53 (17p13.1)	Lokus spesifik probu
- CSF1R (5q33-q34)	Lokus spesifik probu	- RB1 (13q14)	Lokus spesifik probu
- EGR1 (5q31)	Lokus spesifik probu	- D13S319 (13q14.3)	Lokus spesifik probu
- D7S486 (7q31)	Lokus spesifik probu	- D13S25 (13q14.3)	Lokus spesifik probu
- D7S522 (7q31)	Lokus spesifik probu	- LAMP1 (13q34)	Lokus spesifik probu
- AML1/ETO t(8;21)(q22;q22)	Translokasyon probu	- ATM (11q22.3)	Lokus spesifik probu
- CBFβ inv(16)(p13;q22)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu	- IGH (14q32)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu
- D20S108 (20q12)	Lokus spesifik probu	- BCL6 (3q27)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu
- PML/RARA t(15;17)(q22;q21.1)	Translokasyon probu	<i>Miyelodisplastik Sendrom</i>	
- RARA (17q21.1)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu	- CSF1R (5q33-q34)	Lokus spesifik probu
- BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	Translokasyon probu	- EGR1 (5q31)	Lokus spesifik probu
		- D7S486 (7q31)	Lokus spesifik probu
		- D7S522 (7q31)	Lokus spesifik probu
		- D20S108 (20q12)	Lokus spesifik probu
		- CEP 8	Alpha satellit probu
		- MLL (11q23)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu
<i>Akut Lenfositik Lösemi</i>		<i>Multiple Miyeloma</i>	
- p16 (9p21)	Lokus spesifik probu	- p53 (17p13.1)	Lokus spesifik probu
- 9q34	Lokus spesifik probu	- RB1 (13q14)	Lokus spesifik probu
- MLL (11q23)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu	- D13S319 (13q14.3)	Lokus spesifik probu
- TEL/AML1 t(12;21)(p13;q22)	Translokasyon probu	- LAMP1 (13q34)	Lokus spesifik probu
- IGH/MYC t(8;14)(q24;q32)	Translokasyon probu	- ATM (11q22.3)	Lokus spesifik probu
- MYC (8q24)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu		
- BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	Translokasyon probu		

- IGH (14q32)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu
- IGH/FGFR3 t(4;14)(q16;q32)	Translokasyon probu
- LSI IGH/CCND1 XT t(11;14)	Translokasyon probu
- LSI IGH/MAF t(14;16)(q32;q23)	Translocation probu
- CEP 9	Alpha satellit probu
- CEP 15	Alpha satellit probu
- EGR1 (5q31)	Lokus spesifik probu

Non-Hodgkin Lenfoma

- ALK (2p23)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu
- IGH/CCND1 t(11;14)(q13;q32)	Translokasyon probu
- IGH/BCL2 t(14;18)(q32;q21)	Translokasyon probu
- IGH (14q32)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu
- IGH/FGFR3 t(4;14)(q16;q32)	Translokasyon probu
- MYC (8q24)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu
- MALT1 (18q21)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu
- IGH/MYC t(8;14)(q24;q32)	Translokasyon probu
- BCL6 (3q27)	Kırık noktası yeniden düzenlenme probu

Kaynaklar

1. Başaran N., Acar H., Artan S., Silahtaroglu A.: Teorik ve Pratik Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH). Kurs Kitapçığı. Editör Nurettin Başaran, Eskişehir, 1996.
2. Fonatsch C., Krömer E.: Myelogeische Leukaemien. Medizinische Genetik, 2:100-107, 2002.
3. Ganten D., Ruckpaul K.: Molekularmedizinische Grundlagen von haematologischen Neoplasien. Springer, Heidelberg. 2003.
4. Greer J.P., Foerster J., Lukens J.N., Rodgers G.M., Paraskevas F., Glader B.: Wintrobe's Clinical Haematology (II.th Edition). Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia USA, 2004.
5. Harder L., Grote W.: Bedeutung der genetischen Diagnostik für die Klassifikation und Risikostratifizierung maligner Lymphome. Medizinische Genetik, 2:115-118, 2002.
6. Heim S., Mitelman F.: Cancer Cytogenetics (2.nd ed.). Wiley-Liss, New York, 1995.
7. İlhan O.: Kronik Miyeloid Lösemi. Türkiye Klinikleri Journal of Hematology, 2:24-31, 2004
8. Özkalemkaş F.: Akut Lenfoblastik Lösemi. Türkiye Klinikleri Journal of Hematology, 2:10-23.
9. Rieder H., Flohr T.: Akute Lymphatische Leukaemien der Erwachsene. Medizinische Genetik, 2:100-107, 2002.
10. Rooney D.E.: Human Cytogenetics malignancy and acquired abnormalities (Thrid Edition). Oxford University Pres, New York, 2001.