Hematolojik Kanserlerde FISH Terminolojisi ve Raporların Yorumlanması

Dr. R. Dilhan Kuru
İstanbul Üniversitesi, İstanbul

Hematopoetik ve lenfoid dokuları tutan tümörlerde tanının konması, doğru sınıflandırmanın yapılabilmesi, uygun tedavinin belirlenmesi ve tedaviye cevabın izlenmesi açısından kromozomal anomalilerin tespiti önemli bir rol oynar[1]. Klasik sitogenetik yöntemlerine tamamlayıcı olarak geliştirilen Fluoresan İn Situ Hibridazasyon (FISH) uygulamaları kanser çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır. FISH tekniği duruma göre metafazlara (metafaz FISH-mFISH) veya interfaz hücrelerine (interfaz FISH-iFISH) uygulanmaktadır[2-6]. Hematolojik kanserlerde FISH analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ve raporlandırılması elde edilen verilerin klinik olarak kullanılabilmesi için uluslararası kurallar ve kılavuzlar kullanılmaktadır[7-9].

FISH sonuçlarının değerlendirilmesi ve doğru formüle edilebilmesinde ortak bir dil oluşturmak amacıyla "İnsan Sitogenetik Terminolojisi için Uluslar arası Bir Sistem " (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature-ISCN)-1995 basımında in situ hibridizasyon terminolojisi bölümü eklenmiştir[10] .

METAFAZ FISH (mFISH)

Eğer öncesinde konvansiyonel bir sitogenetik inceleme yapıldı ise, önce karyotip sonucu (**.**) işareti, takiben **ish** kısaltması bir boşluk ve ish sonucu yazılır. Eğer konvansiyonel sitogenetik inceleme yapılmadıysa sadece ish sonucu yazılır. Kromozom yapı anomalileri gözlendiğinde ise **ish** bir boşluk ondan sonra yapısal anomaliyi tarif eden sembol ve kısaltma (standart sitogenetik ve ish yada sadece ish ile görülse de) takiben parantez içinde ilgili kromozom yazılır, ayrı parantezler içinde kırık noktaları ve kullanılan problar yer alır. Eğer varsa klon adı belirtilir. Eğer klon adı yoksa GDB' ye (Genome Database) göre dizayn edilen lokus kullanılır. Lokus bilgisi UCSC (University of California Santa Cruz) veya Ensembl Genom Tarayıcısına (www.genome.ucsc.edu/ ve www.ensemble.org/) göre yazılmalı ve kromozom üzerinde kısa kolun terminalinden (pter) uzun kolun terminaline (qter) doğru tanımlanmalıdır. Lokus tarifi büyük harflerle yazılır, ve her lokusun durumu **var (+)** yada **yok (-)** şeklinde belirtilir. Eğer GDB lokusu belli değilse gen adı da kullanılabilir (HUGO nomenklatürüne göre). Aşağıda hematolojik kanserlerde sık kullanılan FISH problarıyla elde edilen karyotip formülleri örneklendirilmektedir[10-14].

46,XY.ish 17p13.1(TP53x2)

Bu örnekte, konvansiyonel sitogenetik analiz ile normal erkek karyotipi saptanmış, 17p13.1'de bulunan TP53gen bölgesine özgü prob kullanılarak yapılan FISH analizi sonucunda metafazlarda normal hibridizasyon gösterilmiştir.

46,XX.ish del(17)(p13.1)(TP53-)

Bu örnekte ise, konvansiyonel sitogenetik analiz ile normal kadın karyotipi saptanmış, 17p13.1'de bulunan TP53gen bölgesine özgü prob kullanılarak yapılan FISH analizi sonucunda metafazlarda TP53 gen bölgesinde delesyon tespit edildiği gösterilmiştir.

ish del(17)(p13.1)(TP53– x2)

Tablo 1. FISH terminolojisinde kullanılan sembol ve kısaltmalar 10-14	
Eksi (-)işareti	Spesifik bir kromozomdan kaybedilen bölge
Artı (+)işareti	Spesifik bir kromozomda bulunan bölge
Çift artı(++)işareti	Spesifik bir kromozomdaki iki hibridizasyon sinyali yada bölgeleri
Çarpı (X) işareti	FISH'te gözlenen sinyallere ait kopya sayısının gösterir
Nokta (.)	Sitogenetik sonucu ish sonucundan ayırmak için kullanılır
İki nokta üst üste(:)	Kırık (detaylı sistem)
Noktalı virgül (;)	Farklı derivatif kromozomlardaki probları ayırır
Soru (?)	Şüpheli kromozom ve kromozom yapısı
Eğik çizgi(/)	Klonları veya bitişik probları birbirinden ayırır
Çift eğik çizgi (//)	Kimerik klonları birbirinden ayırır.
del	Delesyon
der	Derivatif
dmin	Double minute
dup	Duplikasyon
i	İzokromozom
ider	İzoderivatif
inv	İnversiyon
ish	İn situ Hibridizasyon
mar	Marker kromozom
mos	Mozaik
t	Translokasyon
subtel	Subtelomerik
amp	Amplifiye olan (artan) sinyal
nuc	Nüklear veya interfaz
nucish	Nüklear yada interfaz in situ hybridizasyonu
arr	Aray
cgh	Comperative Genomik Hibridizasyon
con	Birbiriyle ilişkili, yan yana duran sinyal
dim	Azaltılmış sinyal yoğunluğu
enh	Artmış sinyal yoğunluğu
fib ish	Uzatılmış kromatin/DNA ipliklerinin in situ hybridizasyonu
FISH	Fluoresan İn Situ Hibridizasyon
pcp	Kısmi kromozom boyama
rev ish	Revers İn Situ Hibridizasyon (CGH içinde yer alır)
Sep	Yarılmış sinyal

Bu örnekte, konvansiyonel sitogenetik analizi yapılmamış fakat TP53 bölgesinde her iki 17. kromozomdaki delesyon ish yöntemi ile tespit edilmiştir.

46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[20].ish t(9;22)(ABL1-;BCR+,ABL1+)[20]

Bu örnekte, t(9;22) taşıyan bir erkek bireye ait karyotip BCR ve ABL1 için iki renkli probun kullanıldığı ish yöntemiyle gösterilmiştir. Kullanılan prob dual füzyon olmadığı için derivatif 9 üzerindeki ABL1 lokusu derivatif 22. kromozomun distalinde BCR ile birlikte tespit edilmiştir.

47,XY,t(9;22)(q34;q11.2),+der(22)t(9;22)[20].ish t(9;22)(ABL1- ;BCR+,ABL1+),der(22)(BCR+,ABL1+)[20]

Bu önekte ise t(9;22)'ye ilave olarak der(22) taşıyan bir erkek karyotipi ish kullanılarak gösterilmiştir.

46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[20].ish t(9;22)(ABL1+,BCR+;BCR+,ABL1+)[20]

Günümüzde tüm füzyon probları iki renkli dual füzyon olarak dizayn edilmektedir. Yukarıda BCR ve ABL1 için dual füzyon problar kullanılarak tespit edilen t(9;22)'li bir kadın karyotipi yer almaktadır. Bir kopya ABL1 ve bir kopya BCR her iki derivatif kromozomda da yer alır.

46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[20].ish der(9)t(9;22)del(9)(q34q34)(ABL1- , BCR+)

der(22)t(9;22)(BCR+,ABL1+)[20]

Burada ise konvansiyonel sitogenetik analizle sadece t(9;22) gözlenen ancak BCR ve ABL1 için dual füzyon problar kullanıldığında ilave olarak derivatif 9'da ABL1 lokusunu kapsayan bir delesyonun da tespit edildiği bir kadın karyotipi yer almaktadır.

46,XX,inv(16)(p13.1q22)[20].ish inv(16)(p13.1)(3'CBFB+)(q22)(5'CBFB+)[20]

Konvansiyonel sitogenetik ile inversiyon 16 tespit edilen bir kadın karyotipinin ish yöntemiyle de gösterildiği formül yukarıda yer almaktadır. İnversiyon sonucu iki prob birbirinden ayrılmış ve iki ayrı parantezde gösterilmiştir. İnversiyon 16 (inv(16)) probu bir breakapart probdur, CBFB geninin 3' kısa kol ve 5' uzun kol olmak üzere iki ayrı kısmından oluşmakta ve normal bireylerde füzyon prob şeklinde gözlenir. İnversiyon kırık noktaları ve FISH bilgisi parantezler içinde ifade edilir[14-16].

46,XX,t(16;16)(p13.1;q22)[20].ish t(16;16)(3'CBFB+;5'CBFB+)[20]

Bu örnekte ise translokasyon sonucu ayrılan CBFB lokusu ish yöntemiyle de gösterilmiştir.

ish dmin(NMYCx20~50)[20]

Bu örnekte konvansiyonel sitogenetik yapılmadan, ish yöntemiyle tespit edilen hücre başına 20~50 kopya NMYC içeren dmin'ler ifade edilmektedir.

İNTERFAZ (NÜKLEER) FISH (nuc ish)

İnterfaz FISH (iFISH) yöntemi bölünmeyen, interfaz aşamasındaki hücrelere uygulanmaktadır. iFISH analizleri sonucu elde edilen sonuçlar **nuc ish** sembolü ile gösterilir ve sinyal sayısı ve her birinin diğerine göre pozisyonu belirtilir. Sinyal sayısı **nuc ish** sembolünü takiben parantez içinde ilgili lokus ve çarpı işareti (**x**) ile uygulanan probun temsil ettiği lokusa ait sinyal sayısı ifade edilmektedir. Aşağıda interfaz FISH

yöntemiyle elde edilen karyotip formülleri örneklendirilmektedir[10-14]

nuc ish(DXZ1x2)

Bu örnekte X sentromer (DXZ1) lokusuna ait iki kopya olduğu gösterilmiştir.

nuc ish(MYCN amp)[200]

Bu örnekte ise incelenen 200 hücrede MYCN kopya sayısında amplifikasyon gösterilmektedir.

Eğer detaylı bir sistem kullanılacaksa **ish** takiben tarif eden band bölgesi de yer alır.

nuc ish 9q34(ABL1x2),22q11.2(BCRx2)[300]

Bu örnekte, 300 hücrede ABL1 ve BCR lokusları band bölgeleri tarif edilerek yazılmış ve ikişer kopya olarak bulunduğu gösterilmiştir.

nuc ish(D17Z1,ERBB2)x2[100]

Yukarıda yer alan örnekte olduğu gibi, eğer prob iki yada daha fazla lokus için kullanılırsa , tek bir parantez içinde set olarak yazılarak, virgülle (**,**) ayrılır, ve parantez dışında (**x)** işaretiyle kopya sayısı belirtilerek ifade edilir.

Eğer aynı kromozom üzerinde multiple prob kullanılırsa, aşağıdaki örnekte olduğu gibi tek bir parantez içinde kısa kolun terminalinden (pter), uzun kolun terminaline (qter) virgülle ayrılarak listelenir ve kopya sayısı belirtilir.

nuc ish(KAL,GK,DMD)x1

İnterfaz FISH, karşı cins donör kullanılan kemik iliği trasplantasyonu sonrası X ve Y sentromer probları ile kimerizm taramasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Kimerleri çift bölme işaretiyle (**//**) gösterilmektedir[14].

nuc ish(DXZ1x2)[500]//

Bu örnekte incelenen 500 hücrenin alıcıya ait olduğu ve XX karyotipini taşıdığı gösterilmektedir.

//nuc ish(DXZ1,DYZ3)x1[500]

Bu örnekte ise 500 hücrenin vericiye ait olduğu ve XY karyotipini taşıdığı ifade edilmektedir.

nuc ish(DXZ1x2)[100]//(DXZ1,DYZ3)x1[400]

Yukarıdaki örnekte 100 hücrenin alıcıya ait XX, 400 hücrenin de vericiye ait XY içerdiği bildirilmektedir.

FISH analizinde son basamak olan bulguların değerlendirilerek rapor haline getirilmesinde belli kurallar söz konusudur. FISH raporunda; analizi yapan laboratuar, hasta ve örnekle ilgili bazı bilgilerin mutlaka bulunması gereklidir. Uygulanan yöntemin iFISH yada mFISH olduğu, kullanılan prob ve proba ait bilgiler belirtilmelidir. Sonuç bölümünde; rapor tarihi, incelenen hücre sayısı bulunmalıdır [8,9,17] .

Kaynaklar

1. Kuru RD. Hematolojik Kanserlerde FISH Uygulamaları. Deviren A, editör. Hemogenetik. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2018,15-20.
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H and Vardiman JW, "World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues," IARC Press, Lyon, 2001.
3. Hu L, Ru K, Zhang L, Huang Y, Zhu X, Liu H, Zetterberg A, Cheng T and Miao W. Fluorescence in situ hybridization (FISH): an increasingly demanded tool for biomarker research and personalized medicine. Biomarker Research;2:3,2014,1-13.
4. Grody WW, Nagessh RP, Ve Naeım F, Principles of Molecular Techniques. In: Naeım F,Nagessh RP, Grody WW, (eds). Hema-topathology Morphology, Immunophenotype, Cytogenetıcs, and Molecular Approaches. London, Elsevie; 2008,65-79.
5. Garimberti E and Tosi S. Fluorescence in situ Hybridization (FISH) Basic Principles and Methodology. In: Bridger JM, Volpi EV. (eds). Fluorescence in situ Hybridization (FISH) Protocols and Applications. London, Springer Sicence;2010, 3-20.
6. Bishop R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. Bioscience Horizons ;3(1),2010,85-95.
7. Çırakoğlu A. Hematolojik Kanserlerde Sitogenetik ve FISH Raporlarının Yazımı ve Yorumlanması. Deviren A, editör. Hemogenetik. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2018, 21-7.
8. Claustres M, Kozich V, Dequeker E, Fowler B, Hehir-Kwa JY, Miller K, et al. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). Eur J Hum Genet;22(2), 2014,160-70
9. Hastings R, Howell R, Betts D, Porter S, Haferlach C, Dastugue N, et al. Guidelines and Quality Assurance for Acquired Cytogenetics. ECA-European Cytogeneticists Association Newsletter ;31, 2013,7-21.
10. Mitelman Fe. ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S Karger; 1995.
11. Shaffer LG, Tommerup Ne. ISCN (2005): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S Karger; 2005.
12. LG S, Slovak ML, Champell LJ. ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S Karger; 2009.
13. L.G. S, McGowan-Jordan J, Schimid Me. ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S Karger; 2013.
14. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid ME.ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. Basel: Karger; 2016.
15. Bishop R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. Bioscience Horizons; Volume 3 , Number 1, 2010,85-95
16. Swansbury J, Min T, and Aruliah S. Fluorescence In Situ Hybridization Methods and Troubleshooting Applied to Fixed Cell Suspensions . In: Campbell L J,(eds). Cancer Cytogenetıcs Methods and Protocols, (Second Ed.). Melbourne, Springer, 2010,13-31
17. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, Gutiérrez NC, Liebisch P, O'Connor S, et al. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. Haematologica;97(8), 2012,1272-7.