

FISH diagnosztika

Sápi Zoltán, Bodó Miklós

Szt. János Kórház, Pathológiai Osztály,
Semmelweis Egyetem Általános Orvosi Kar, Onkopathológiai és Citodiagnosztikai Tanszék,
Budapest

Több mint 2 évtizedig a különböző sávtechnikákat tekintettük megbízható alapnak a citogenetikai analíziseket illetően, ami egyben az első genomikus abnormitások szűrésére is szolgált. A konvencionális sávtechnika azonban csupán a 2 Mb fölötti DNS-átrendeződéseket, eltéréseket tudja kimutatni, továbbá komoly kihívást jelentett a de novo kiegyensúlyozatlan kromoszómaátrendeződések kimutatása. A fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) technikák előtérbe törésével azonban nagy fokban növekedett a citogenetikai diagnózisok biztonsága, pontossága, valamint nem csak metafázisú, hanem interfázisú sejtek is könnyen, gyorsan és egyszerűen vizsgálhatók. Cikkünkben foglalkozunk a FISH technika részleteivel, valamint bemutatjuk különböző tumorok esetén (lágyszövetes tumorok, emlőcarcinoma, vesesejtes rák, hólyagtumorok és germinális tumorok) e technika gyakorlati alkalmazásának lehetőségeit. *Magyar Onkológia* 46:25–32, 2002

For over two decades banding has remained the 'gold standard' of cytogenetic analysis, providing the first genome-wide screen for abnormalities. However, conventional cytogenetic banding techniques are limited to the detection of rearrangements involving more than 2 Mb of DNA. In addition, the identification of de novo unbalanced chromosome rearrangements provides a particular challenge for chromosome banding to decipher. In recent years a number of techniques based on FISH have evolved, all of which complement the conventional banding approaches and which have steadily increased the accuracy of cytogenetic diagnosis. FISH is now the method of choice because of the increased sensitivity, and speed with which it can be applied to a variety of cellular targets. In this article we try to highlight the technical aspects of FISH and the practical application of this technique on different tumors (soft tissue tumors, breast carcinomas, renal cell carcinomas, bladder tumors and germ cell tumors). *Sápi Z, Bodó M. FISH diagnostics. Hungarian Oncology* 46:25–32, 2002



Bevezetés

Több mint 2 évtizedig a különböző sávtechnikákat tekintettük megbízható alapnak a citogenetikai analíziseket illetően, ami egyben az első genomikus abnormitások szűrésére is szolgált. A konvencionális sávtechnika azonban csupán a 2 Mb fölötti DNS-átrendeződéseket, eltéréseket tudja kimutatni, továbbá komoly kihívást jelentett a de novo kiegyensúlyozatlan kromoszómaátrendeződések kimutatása.

A fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) technikák előtérbe törésével azonban nagy fokban növekedett a citogenetikai diagnózisok biz-

tonsága, pontossága, valamint nem csak metafázisú, hanem interfázisú sejtek is könnyen, gyorsan és egyszerűen vizsgálhatók. Az in situ hibridizációs technika lényege, hogy specifikus nukleinsav-szekvenciákat tudunk detektálni többnyire keneteken, de metszeteken is.

A technikát magát már 30 évvel korábban leírták és alkalmazták, ekkor azonban radioizotóppal jelölt nukleinsavakat használtak és a detektálás autoradiográfiával történt. Az új és különböző fluorochromok megjelenése és az érzékeny detektáló szisztémák kifejlesztése mára már a FISH technikát igen népszerűvé tették és egyben széles körben alkalmazzák.

Érkezett: 2002. február 12.
Elfogadva: 2002. március 6.

Levelezési cím: Dr. Sápi Zoltán,
Szent János Kórház, Pathológiai Osztály,
1125. Budapest, Diósárok u. 1.
Telefon: 458-4611, Fax: 458-4670

FISH-hez használt próbák

„Painting probes”: azok a próbák, melyek egy kromoszóma teljes hosszában hibridizálnak, azaz a teljes kromoszómát „festik”. Ezen próbák használata igen alkalmas strukturális abnormitások ki-

mutatására (pl. transzlokációk). A painting próbákat különböző fluorochromokkal jelölhetjük, így egyszerre több kromozómát vizsgálhatunk. Ezen technika csúcsa az ún. M-FISH vagy más néven spektrális kariotipizálás (7), amikor az összes kromozómát „festjük” egyidejűleg, ami természetesen mindenfajta DNS-szakasz-átrendeződést, citogenetikai abnormitást kimutathat. Amíg a néhány kromozómát érintő kromozóma „festés” ma már igen elterjedt (pl. dual-color FISH technika), addig az M-FISH technikát csak erősen specializált citogenetikai laboratóriumok használják, szinte kizárólag kutatási célokra.

Centromerikus és ismétlődő szekvencia próbák: minden kromozóma centromerikus régiójában (α és β satellit) a kromozómára jellemző ismétlődő szakaszok, szekvenciák vannak (100-5000

kópia) és ugyanilyen ismétlődő szekvenciák (TTAGGG) vannak a telomerikus régiókban. Minthogy az ismétlődő szakaszok miatt hosszú DNS-szakaszokról van szó, a repetitív próba is nagy (több 100 kb), ezért a hibridizációs jel kompakt, intenzív fluoreszcens szignálként jelentkezik. Bár az említett centromerikus régiók specifikusak az egyes kromozómákra, mégis vannak kivételek, ugyanis pl. a 13-as és 21-es kromozómák olyan hasonlóak, hogy a próbáik keresztreakciót adnak. A centromerikus próbák ideálisak a különböző numerikus kromozómaeltérések (kromozómaaneuploiditás) kimutatására meta- és interfázisú sejtekben is.

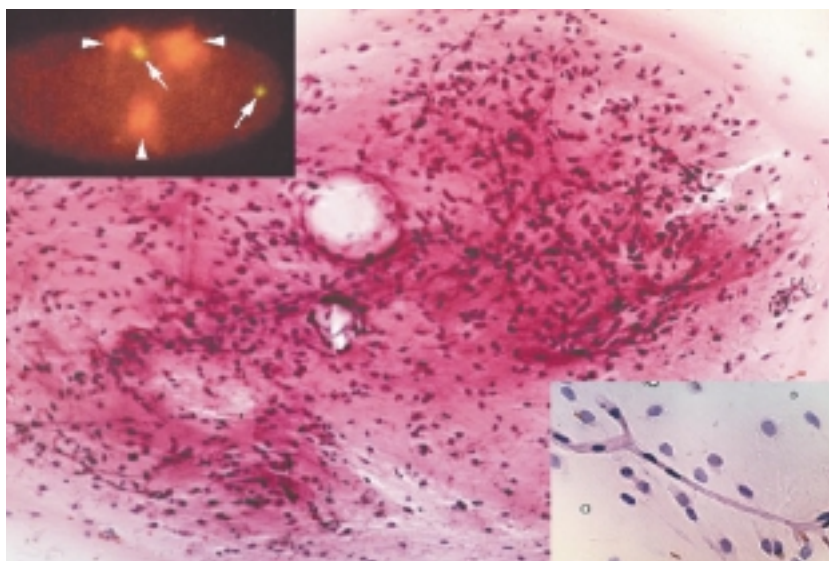
Unikális szekvencia-próbák: egyes specifikus kromozómaszegmensek feltüntetésére alkalmas. Ezek lehetnek cDNS-ek (nincs repetitív elem) vagy genomikus klónok (többnyire van repetitív elem). A különböző vektorok a megfelelő hosszúságú DNS-sel a következők lehetnek: plasmidok (1-10 kb), bakteriofágok (25 kb-ig), cosmidok (35-45 kb), bakteriális arteficiális kromozóma (BAC) (300 kb-ig), élesztő (yeast) arteficiális kromozóma (YAC) (100 kb-2 Mb). Ezen unikális szekvencia-próbákkal lehetőség van arra, hogy feltüntessük: a kérdéses szakasz elveszett (deléció) vagy áthelyeződött (saját kromozómán belül vagy más kromozómára), azaz finomabb strukturális átrendeződéseket vizsgálhatunk.

A különböző próbák gyakorlati alkalmazását és a szignálok megjelenését az 1. ábrán tüntetjük fel.

1. ábra. Különböző fluoreszcens in situ hibridizációs lehetőségek

	Metafázisú kromozómák		Interfázisú magok	
	Egyszerű FISH	Dual-color FISH	Egyszerű FISH	Dual-color FISH
Normális				
Triszómia				
Monoszómia				
Deléció				
Transzlokáció				

2. ábra. Myxoid liposarcoma citológiai képe monomorph sejtekkel. Az alsó inzertben jellegzetes plexiform kapilláris hálózat látható, míg a felső inzertben dual-color FISH-sel t(12;16)-t tudunk igazolni. A nyílhegyek a 12-es painting próbát, míg a nyílak a 16-os centromerikus próbát mutatják. A juxtapozícióban levő sárga és piros szignál jól látható.



FISH szenzitivitás

A kis területek (targets) detektálásának lehetősége igen jelentősen megnőtt az ún. hűtött CCD kamerák alkalmazásával. Ebben az esetben a -20°C-on működő kamera olyan fluoreszcens szignálokat is érzékelni tud, ami az emberi szem számára láthatatlan. A hullámhossz 400 és 1000 μ m között van, ezért gyakorlatilag bármilyen fluorophor használható.

A már korábban említett M-FISH és az ehhez hasonló multikolor SKY technikák igen szofisztikált felszerelést igényelnek (hűtött CCD kamera, interferométer, igen szűk sávú filterek, bonyolult software csomag stb.), de ezek segítségével a géntérképezéstől az ismeretlen genetikai anyag kimutatásán keresztül az egy „csip”-ben 50-100 féle onkogén kimutathatóságáig minden lehetséges.

A FISH felbontási képessége (2 elkülönülő fluoreszcens szignál) kb. 1-2 Mb a metafázisú kromozómákat illetően. Az interfázisú sejtekben azonban a kromatinszálok kevésbé kondenzáltak, így a felbontás 50 kb-ig csökkenhet. A magból a kromatinszálok kinyerése pedig további metodikai lehetőségeket ad, ezek közül legismertebb az ún. Fiber-FISH (1, 24), ami nagy felbontású és pl. kromozómaátrendeződések feltérképezésére szolgál.

Fluoreszcens in situ hibridizáció gyakorlati kérdései

Alapvetően kétféle módszer ismert, a direkt és az indirekt. A direktben a próba már eleve fluoro-

chrommal jelölt. A legtöbb kommerciálisan beszerezhető próba direkt jelölt, előnye, hogy egyszerűbb metodikát igényel, alacsony a háttérszignál, a szignálók erősek, viszont a próbák drágák és a szenzitivitás nem olyan jó, mint az indirekt metódusnál. Az indirekt metódusban a próbát egy hapténnel jelöljük (a két leggyakrabban használt haptén a biotin és a digoxigenin, újabban pedig az oestradiol), ehhez kapcsolódhatnak a különböző színű fluorochromok nagy variációban (FITC; rhodamin; TexasRed stb.). A magfestés általában DAPI-val (kék) vagy propidium-joddal (piros) történik. A detektáláshoz egy epifluoreszcens mikroszkóp szükséges, általában legalább 2-es szűrővel, de ideális a 3-as szűrő (3 szín különíthető el) és jó, ha ezen kívül több 1-es szűrő is rendelkezésre áll.

A saját laboratóriumunkban használt dual-color FISH metodikát az alábbiakban adjuk meg:

Lenyomat vagy kenet. A kenet hátulján bekarcoljuk a területet.

Fixálás: metanolban

1. Mikrohullámú kezelés 2x5 perc citrátpufferben
2. 50% esetsav 3 percig, majd szárítás kb. 1 óra
3. Öblítés 2 SSC-ben 5 perc
4. RNA-se emésztés, 1 óra 37°C
5. Mosás 2 SSC-ben 4x5 perc
6. Utófixálás 4% paraformaldehidben 2 perc
7. Mosás PBS-ben 2x5 perc
8. Pepszines emésztés 37°C 10–25 perc
9. Mosás PBS-ben 2x5 perc
10. Posztfixálás paraformaldehidben 2 perc
11. Mosás PBS-ben 2x5 perc
12. Dehidráció felszálló alkoholsorban 50–70–96-abszolút alkohol, szárítás
13. Próbák előkészítése: szobahőre melegítés, centrifugálás
Hígítás: 4 µl hybrisol (formamid 2 SSC), 1 µl próba
Dual color esetén a hybrisol mennyisége csökken:
3 µl hybrisol,
1 µl próba,
1 µl a másik próba
Össz mennyiség mindig 5 µl a 18 x 18 mm-es fedőlemezhez
Ismételt centrifugálás
14. Fedőlemezre cseppenteni 5 µl próbát, ráfordítani a bejelölt területet
15. Denaturáció: melegítőlappra 80°C-on 3–4 perc
16. Hibridizáció, kihülés nélkül áttenni, 37°C-on nedveskamrában, sötétben, egy éjszakán át
17. Másnap poszthibridizációs mosás formamid 2 SSC-ben 37°C 3x5 perc
18. Mosás TNT-ben (TrisNa-Tween 20) 5 perc
19. Detektálás 40 perc 37°C, sötétben jelöléstől függően (biotin, digoxigenin)
20. Fedés (magfestés) jelöléstől függően DAPI

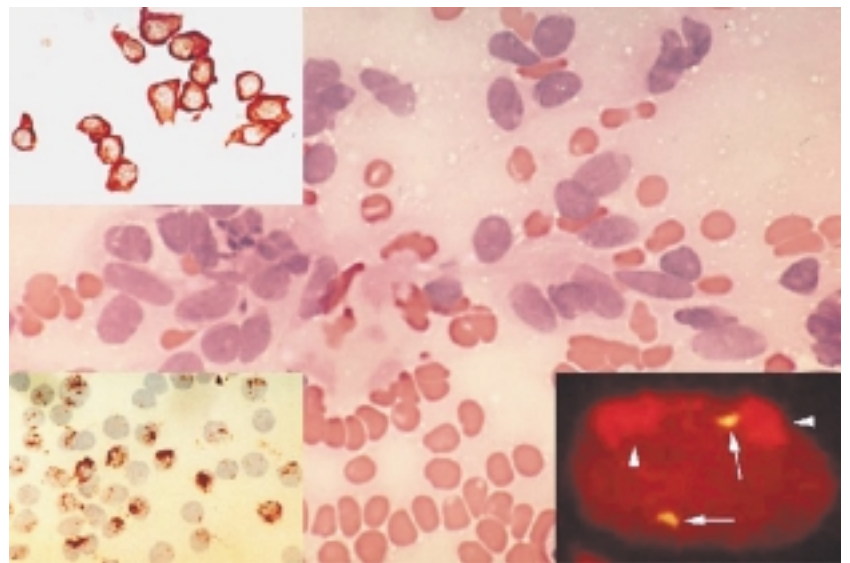
Comparativ Genomikus Hibridizáció (CGH)

Végül szólni kell néhány szót egy újabban kifejlesztett speciális hibridizációs technikáról: a

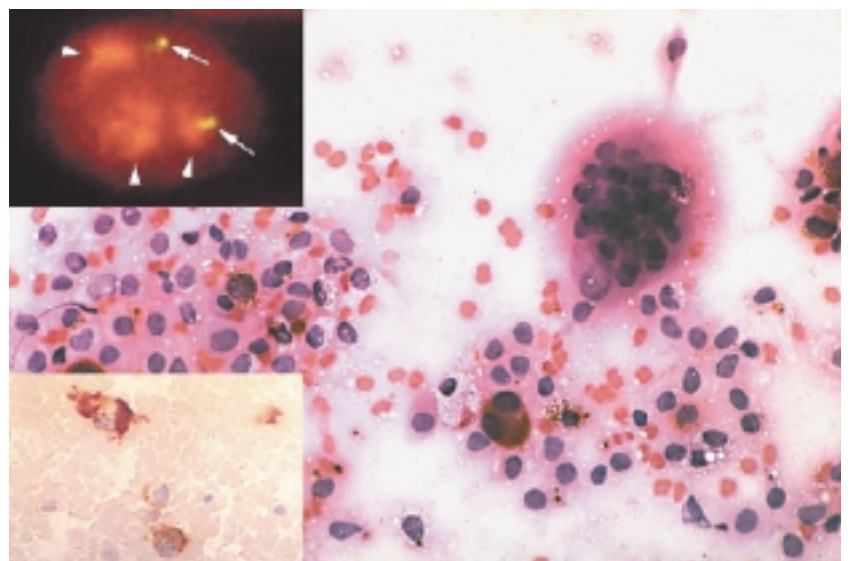
CGH-ről. Ennek lényege, hogy a próba alapvetően normális és tumoros (teszt) DNS keveréke, ahol a normális és tumoros DNS különböző fluorochrommal van jelölve (pl. sárga és piros). Ha ezzel a keveréssel citogenetikai eltérést nem mutató normális szövetet nézünk, akkor a két szín kombinációját (rózsaszínt) fogunk látni, de ha pl. deléción van, akkor a kromoszóma azon helyén a szín közelebb lesz a normálshoz (sárga), viszont ha génamplifikáció vagy extra DNS van jelen, akkor a szín eltolódik a teszt tumoros DNS irányába, tehát piros lesz. Bár igen költséges eljárás és szinte kizárólag kutatási célokra használják, mégis ma a szolid tumorok citogenetikai vizsgálatának egyik kedvelt formája, különösen, ha a tumort nehéz kariotipizálni, vagy komplex kariotípusról van szó, esetleg kiegyensúlyozatlan kromoszómaátrendeződéseket kell vizsgálni.

3. ábra.

Synovialis sarcoma citológiai képe. A felső inzert vimentinpozitivitást, míg a bal alsó keratinpozitivitást mutat. A jobb alsó inzertben t(X;18)-t igazoltunk. A juxtapozícióban levő szignálok jól láthatók, de egyel kevesebb piros szignál van (X kromoszóma), hiszen a beteg férfi.



4. ábra. Világossejtes sarcoma citológiai képe az alsó inzertben HMB-45-pozitivitással. A felső inzertben látható az igazolt t(12;22), a nyílhegyek a 22-es painting próbát, a nyilak a 12-es centromerikus próbákat jelzik. A jellegzetes transzlokáció kimutatásával különíthető el ez a tumorfeleség a melanoma malignumtól.



A FISH technika gyakorlati alkalmazása szolid tumorok esetén

Lágyrésztumorok

5. ábra.

Epithelioid sarcomában igazolt $t(8;12)$. A dagant tetraploidnak bizonyult, így érthető, hogy dupla számú szignált láthatunk mind a 8-as kromoszómát illetően (zöld szignál), mind a 22-es kromoszómát illetően (piros szignál).

A nyílak a juxtapozícióban levő szignálokat jelzik. (A többi mag esetén egymásra vetülés van, illetve a piros szignálok egy része fókuszon kívül helyezkedik el.)

A különböző szolid tumorok közül talán a lágyrésztumorok mutatnak leginkább jellegzetes citogenetikai eltéréseket és ezek közül a numerikus eltérések, a transzlokációk és deléciók (pl. FISH technikával) könnyen és gyorsan kimutathatók (15). További értéket ad a módszernek, hogy aspirációs citológiai anyagon is elvégezhető, tehát még műtét előtt, ugyanakkor a jellegzetes transzlokációk stb. kimutatásával és egyéb kiegészítő vizsgálatokkal (pl. immuncitokémia) a citológiai anyagból szövettani értékű diagnózis adható. Saját, közel 120 aspirációs citológiai anyagunkból eddig 19 esetben sikerült jellegzetes és karakterisztikus transzlokációt kimutatni a következő megoszlásban: 5 myxoid liposarcoma $t(12;16)$, 8 synovialis sarcoma $t(X;18)$, 2 clear cell sarcoma $t(12;22)$, 2 Ewing/PNET tumor $t(11;22)$, 1

desmoplasticus kis kereksejtes tumor $t(11;22)$ és 1 epithelioid sarcoma $t(8;22)$.

Az epithelioid sarcoma egyben jó példa arra is, hogy érdemes párhuzamosan DNS-meghatározást is végezni, hiszen pl. tetraploid tumoroknál (ahogy ez történt esetünkben is) a kromoszóma-szám megduplázódik, így a várható szignál szám-eltérések is kétszeresek lesznek. A transzlokáció kimutatását a már leírt dual-color FISH technikával végeztük, melyben szimultán egy painting (piros) és egy centromerikus (sárgás-zöldes) próbát használunk. Ennek megfelelően normális esetben 2 szeparált nagyobb piros foltot (szignált) és 2 szeparált kisebb-élesebb sárgás-zöldes foltot (szignált) láthatunk (ha azonban pl. X kromoszómát jelöltük a painting próbával, akkor természetesen férfiaknál csak egy piros szignált észlelünk). Amennyiben transzlokáció van, akkor a painting próbából egy rész átkerül a másik kromoszómára, így egy extra piros szignált láthatunk (összesen hármat, de X kromoszóma esetén és férfinnál kettőt) és ez az extra szignál szoros közelségbe (juxtapozícióba) kerül a centromerikus (sárgás-zöld) szignállal.

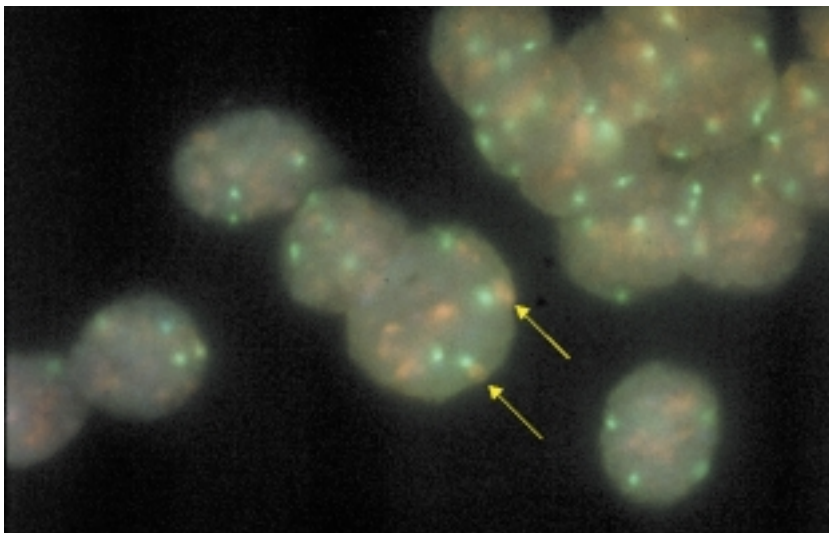
A 2. ábrán myxoid liposarcoma, a 3. ábrán synovialis sarcoma, a 4. ábrán világossejtes sarcoma és a 5. ábrán epithelioid sarcoma jellegzetes transzlokációit mutatjuk be. A 6. ábrán látható egy peridiploid DNS-tartalmú synovialis sarcoma 18-as triszómiával, mely egyben példa a numerikus kromoszómaeltérés bemutatására.

További nonrandom transzlokációt alveolaris rhabdomyosarcomában találunk $t(2;13)$; $t(1;13)$, valamint jól ismert $t(9;22)$ extrasceletalis myxoid chondrosarcomában. A fent említett és ismertett lágyrészsarcomák diagnosztikájában egyre inkább rutinszerű szerepet kap a transzlokációk kimutatása vagy FISH, vagy PCR módszerrel. További újabban leírt transzlokációkat figyelhetünk meg haemangiopericytomában $t(12;19)$ (23) és óriássejtes in-hüvelytumorban $t(1;2)$, valamint praenatalis myofibroblastos tumorban $t(2;11;2)$ (17).

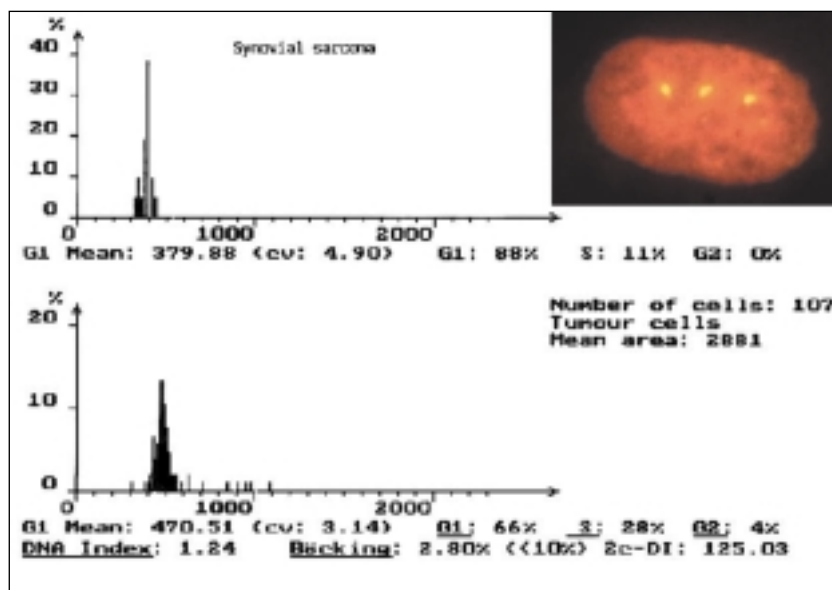
Nem csupán diagnosztikus jelentősége van a citogenetikai elemzésnek a gastrointestinalis stromalis tumorok (GIST) esetén, hiszen a mind benignus, mind malignus GIST-oknál megtalálható 14q-deléció mellett az 1-es és 9-es kromoszóma-vesztés szinte kizárólag a malignus GIST-okra jellemző (4, 5). További érdekes prognosztikai faktornak számíthat meningeomák esetén a 22-es kromoszóma numerikus FISH vizsgálata, amennyiben a 22-es monoszómia a jobb prognózisú nem recidiváló meningeomákra, míg a 22-es tri- vagy tetraszómia sokkal agresszívabb viselkedésre utal (10).

Szintén komoly prognosztikai jelentősége van neuroblastomák esetén az N-myc-amplifikációnak és az 1p-deléciónak (20). Tornóczky Tamással közös munkánk eredménye az alveolaris lágyrészsarcoma citogenetikai feltérképezése, ami 17q-deléció mellett 1-es és 7-es triszómiával, illetve 6-os, 8-as és 18-as monoszómiával jellemezhető (19).

Az említetteken kívül még természetesen számos ritka lágyrésztumor karakterizálható jelleg-



6. ábra. Peridiploid-aneuploid DNS-tartalmú synovialis sarcoma hisztogramja, az inzertben 18-as triszómiával



zetes citogenetikai eltéréssel (chondroid lipoma, lipoblastoma stb.), de ezek részletes felsorolására nincs mód. Ismert viszont az a tény is, hogy bizonyos lágyrészsarcomák, különösen a pleiomorph típusok, igen komplex citogenetikai eltéréseket mutatnak, így ezek vizsgálatának nagyobb gyakorlati jelentősége nincs.

Összefoglalóan: a lágyrésztumorok esetében megállapítható, hogy a FISH technikával kimutatható citogenetikai eltéréseknek igen komoly, főleg diagnosztikai, de adott esetben prognosztikai jelentősége is van.

Emlőtumorok

Az emlőtumorok kialakulásának korai fázisában egyes numerikus kromoszómaeltéréseknek komoly szerepe van ugyan (1, 11 és 17-es aneuszómia) (21), mégis az emlőcarcinomák esetén a legnagyobb jelentőségű a Her-2/neu-amplifikáció kimutatása, hiszen ez alapozza meg a trastuzumab (Herceptin) kezelést (7. ábra) (9, 13, 16). Bár alapvetően immunhisztokémiai meghatározásról van szó (az overexpresszió fehérje-termékének kimutatása), igen hasznos kiegészítőnek számít a FISH reakcióval végzett amplifikációmeghatározás, különösen, ha nem egyértelmű +++ erős-szerű immunreakcióról van szó. További fontos szerep jut a FISH technikának, ha pl. távoli metastasist akarunk vizsgálni – vajon az Her-2-pozitív-e – és csupán aspirációs citológiai anyag áll rendelkezésünkre. Ebben az esetben szinte az egyetlen megbízható lehetőség a FISH. Jelenleg 40 emlőcarcinoma összehasonlító FISH és immunhisztokémiai vizsgálatát végezzük, kiegészítve DNS-méréssel. Tapasztalatunk, hogy a normális 2 szignál mellett az amplifikáció mértéke jól kvantitálható, hiszen pontosan megmondható, hogy 2-szeres, 4-szeres, 8-szoros stb. vagy igen kifejezett amplifikációról van-e szó. Jelen pillanatban a kifejezett amplifikáció mellett nem tudjuk pontosan, hogy mi a jelentősége a mérsékelt amplifikációnak (adható-e kezelés). A párhuzamos DNS-meghatározás pedig azért fontos, mert pl. 4 szignál esetén, ha a daganat tetraploid, akkor ez nem jelent amplifikációt.

Bár messze a legnagyobb jelentősége a Her-2-amplifikációnak az emlőtumorok esetében van, újabban számos más epithelialis tumorokat is vizsgálunk, nyilvánvalóan a potenciális kezelhetőség reményében. Ilyen értelmű összefüggést találtak a gastrointestinalis carcinomák mintegy negyedénél (14), valamint a hólyagcarcinomák esetén (12), viszont a nem kissejtes tüdőrákoknál hasonló eredményeket nem találtak.

Vesetumorok

Talán éppen a vesetumorok esetében igazolódott legjobban a citogenetika jelentősége, hiszen ma már alapvetően citogenetikai alapon osztályozzuk a különböző vesetumorokat, sőt a vesetumorok progresszióját is jól lehet karakterizálni. Pl. papillaris adenomákban 7-es és 17-es triszómia jellemző és progresszió során (papillaris carcino-

ma) újabb kromoszóma triszómiák jelennek meg, pl. 16-os, 12-es és 20-as, különböző gyakorisággal (8. ábra). A klasszikus világossejtes carcinomák ezzel szemben 3p-delécióval jellemezhetők leginkább, míg a chromophob carcinomáknál számos kromoszómavesztés található, olyannyira, hogy ez hypodiploid-aneuploid DNS-tartalmat eredményez (8). Néha nagy segítséget jelent az oncocy-

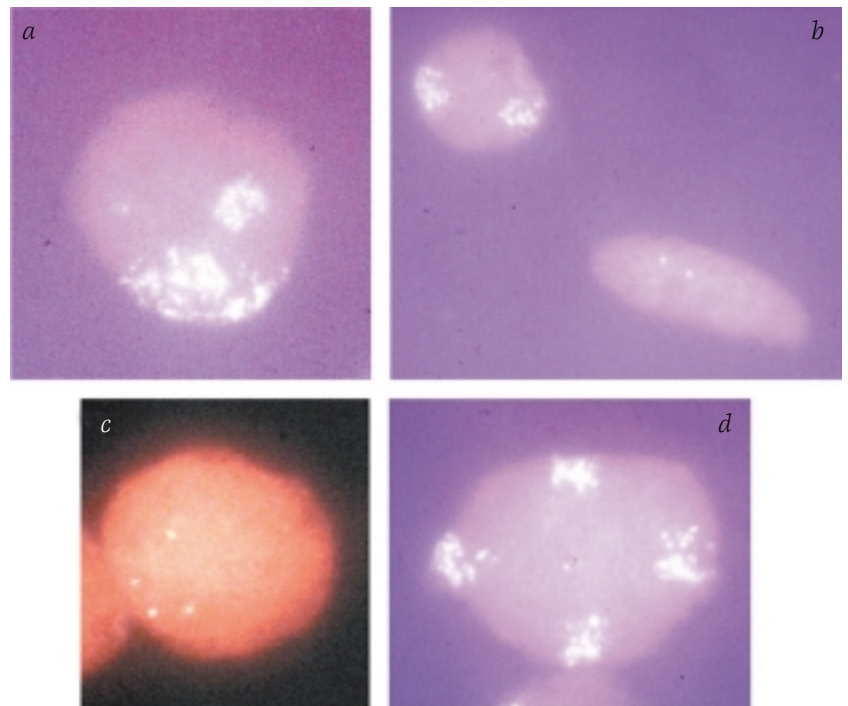
7. ábra.

a. masszív Her-2-amplifikáció, a szignálok összecsapódtak, megszámlálhatatlannak (emlőcarcinoma).

b. normális fibroblast (2 szignál) mellett masszív Her-2-amplifikációt mutató emlőcarcinoma sejt

c. négy szignál látható a tumorsejtben, de ez nem jelent amplifikációt, mert a daganat tetraploid volt (Her-2 próba)

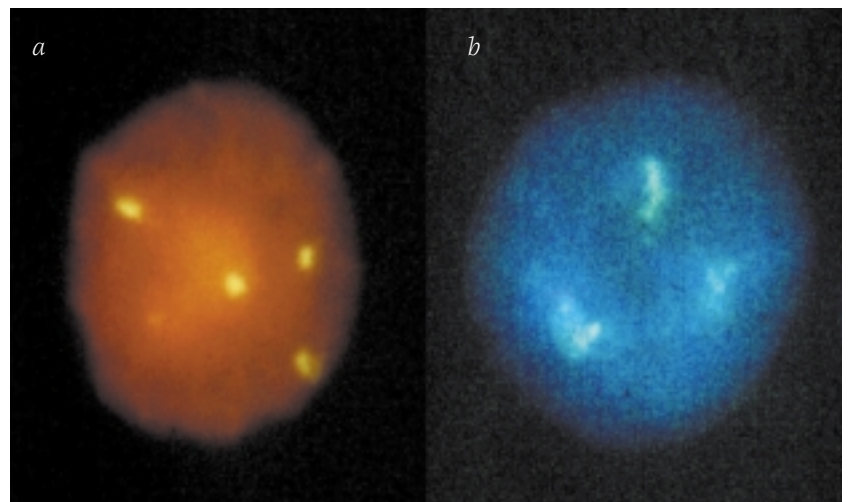
d. 4 „pólusú” masszív Her-2-amplifikáció



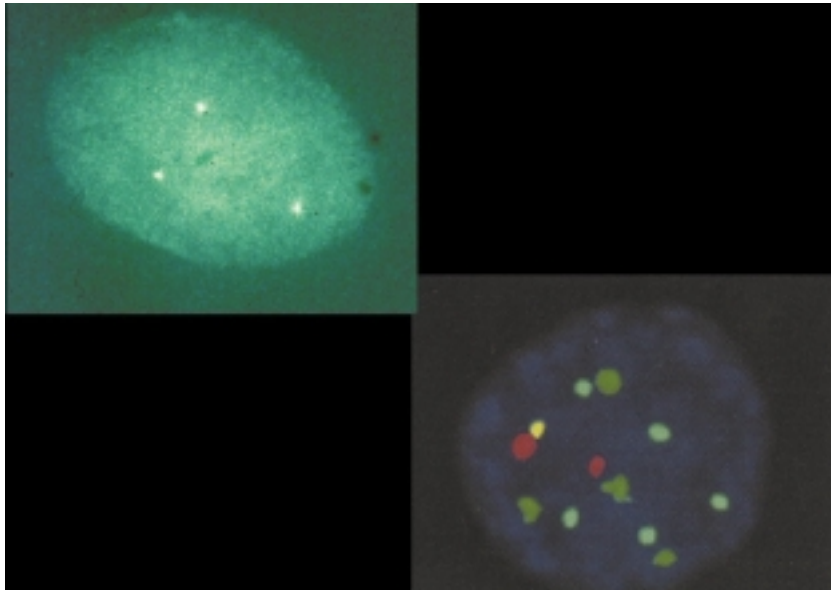
8. ábra.

a) konvencionális renál cell carcinoma 4 szignállal, a daganat tetraploid volt, 3p-deléció nem volt igazolható

b) papillaris vesesejtes rák jellegzetes 17-es triszómiával



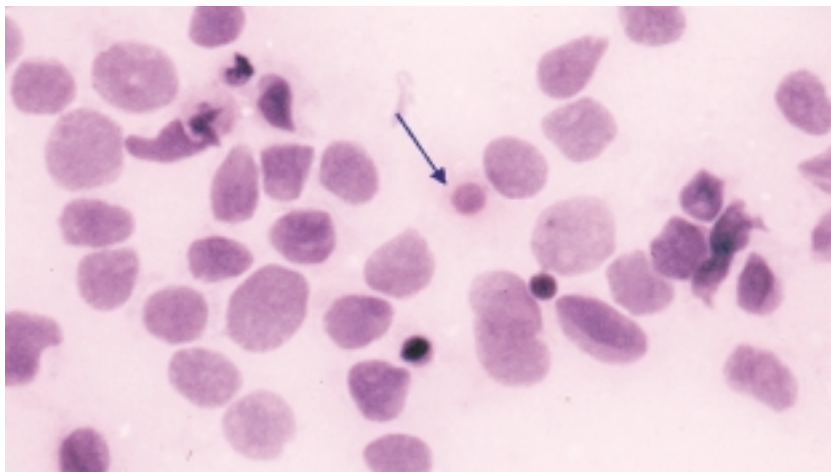
9. ábra. Felső kép: 7-es triszómia transitionalis sejtes hólyagcarcinómában, míg az alsó kép egy multikolor digitális FISH képet mutat szintén transitionalis sejtes hólyagcarcinómában. Sárga: 1 szignál, azaz 9p21-es deléció, piros: 2 szignál, azaz normális 3-as kromoszómaszám, aqua: 5 szignál, azaz 5 17-es kromoszómát igazol, zöld: 4 szignál, azaz a 7-es kromoszóma tetraszómiás.



10. ábra. A 9p21-es lokuszra specifikus próba sematikus feltüntetése mellett a transitionalis carcinoma sejtjében csak egy sárga szignált láthatunk, mely igazolja a 9p21-es deléciót



11. ábra. Spermatoctás seminoma citológiai képe. A nyíllal jelzett kis sejtek haploid DNS-tartalmat mutatnak.



toma-oncocyster carcinoma elkülönítésében a citogenetikai vizsgálat, hiszen a benignus oncocytomák nem hordoznak kimutatható citogenetikai eltéréseket.

Osztályunkon rutinszerűen végezzük a vesetumorok DNS-mérését (ezidáig kb. 30 eset) és ezt kiegészítjük 7-es és 17-es kromoszóma FISH vizsgálattal. A kettő kombinációja igen jól alkalmazható, ugyanis 7-7 triszómia esetén papillaris carcinomáról van szó, ha nincs 7-17-es eltérés, akkor konvencionális renal cell carcinoma a diagnózis, hypodiploid DNS-tartalom és 7-es, 17-es monoszómia esetén viszont chromophob carcinomáról van szó. Ha a daganat oncocyster jellegű, diploid, nincs 7-es, 17-es eltérés és 3p-deléció, akkor megerősíthetjük a benignus oncocytoma diagnózist. Nyilvánvalóan a kérdés azonban még messze nem lezárt, amit mutat a témában megjelenő újabb és újabb publikációk nagy száma, ezek közül talán a legfrissebb t(X;1) (p11;q21) kimutatása egy esetleges renal cell carcinoma szubtypusban (25), illetve a ritka és diagnosztikus nehézséget jelentő collecting duct carcinoma, ahol 1, 2, 9, 11 és 18-as kromoszómavesztés mellett 16 és 20 kromoszómatöbblet volt igazolható (22).

Hólyagtumороk

Hólyagtumороk esetén különös jelentősége van a FISH vizsgálatoknak, hiszen egy ideális vizsgálati anyag, a vizelet, vagy pedig a hólyag mosófolyadék áll rendelkezésre. Természetesen a cél a carcinoma minél korábbi kimutatása, vagy éppen a recidívák igazolása. A különböző egyéb módszerekkel kombinált cystoscopos eljárások igen nagy százalékban képesek kimutatni a korai carcinomát vagy a korai recidívát. A FISH reakcióval kimutatható citogenetikai eltérések pedig még további nagy segítséget jelenthetnek a tumorszerű elváltozások elkülönítésében. A Vysis cég fejlesztett ki egy négyféle próbát alkalmazó multicolor FISH kitet (UroVysion), amivel egyidejűleg vagyunk képesek a 3-as, 7-es és 17-es kromoszómák numerikus eltérését detektálni, valamint a 9p21-es deléciót kimutatni (9, 10. ábra) (2, 3). Próbaként a Vysis cégtől rendelkezésre állt egy kit, amivel 10 esetet tudtunk megvizsgálni. A kezdeti szerény eredmények fényesen igazolták, hogy az UroVysion kittel igen megbízhatóan mutathatók ki a transitionalis sejtes carcinomák. 7 transitionalis sejtes carcinómában találtunk numerikus kromoszómaszaporulatot (tri- vagy tetraszómia), 3-as, 7-es és/vagy 17-es próbákkal, valamint többnyire ehhez társuló 9p21-es deléciót egyik vagy mindkét allélon. Ugyanakkor az egy inflammatorikus pseudotumorban, az egy laphám és adenocarcinomában mindezek az elváltozások nem voltak megfigyelhetők. Más, nagyobb anyagot felölelő vizsgálatok bizonyították, hogy a transitiocellularis carcinoma progressziója során már a pT1-es stádiumban gyakorlatilag 100%-os a fentebb említett citogenetikai eltérések valamelyikének detektálhatósága, ami a progresszióval egyre több kromoszómát érint.

Germinalis tumorok

A germinalis tumorok többnyire igen komplex kariotípust mutatnak, viszont csaknem mindig megtalálható a i(12p) izokromoszóma. Saját vizsgálatainkban a FISH technikát igen speciális módon alkalmaztuk spermocytás seminómák esetén (11, 12. ábra) (18).

Alapkonceptiónk az volt, hogy az eredeti feltevezésnek megfelelően ezen különleges daganatoknál lényegében a meiosis „rekapitulációja” történik, azaz az egyéb morfológiai jellegzetességek mellett kellene egy haploid tumorsejt-populációt is találni. Citofotometriás DNS-méréssel valóban sikerült is egy kicsiny haploid populációt elkülöníteni, de annak igazolása, hogy ezek valóban haploid sejtek, a FISH technikával volt lehetséges. E kicsiny sejtekben ugyanis (amit a korábbiakban csupán sejtterméleknek gondoltak) konzekvensen monoszómiát lehetett kimutatni 1-es, 7-es, 8-as, 17-es, 21-es kromoszóma próbákkal, ami lényegében igazolta a haploid jellegét.

Egyéb más szolid tumorok

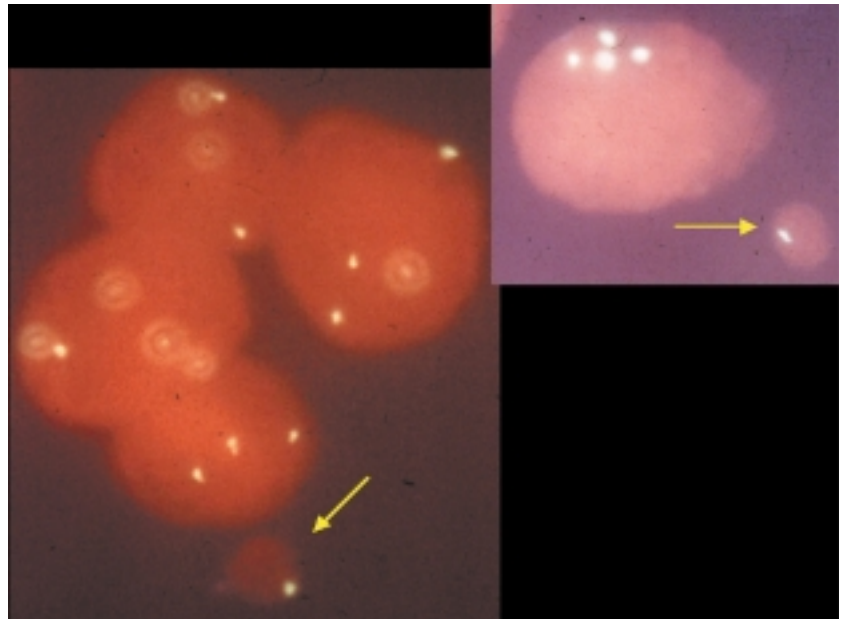
Számos más tumorféleséget vizsgálnak napjainkban, nyilvánvalóan felsorolásukra nincs lehetőség. Mégis talán érdemes megemlíteni, hogy a diagnosztikus nehézséget okozó oncocyter pajzsmirigy-tumoroknál a 7-es és 12-es kromoszómatöbblet mellett, a 22-es kromoszóma vesztese jellemzőnek tűnik a Hürthle-sejtes carcinómák esetén (6, 11).

Összefoglalva, a FISH diagnosztika a molekuláris patológia egyik igen jól használható eszközévé vált, melynek mindennapi rutin használata csupán idő kérdése, legalábbis a patológia egyes területein.

Irodalom

1. Bentivegna A, Venturin M, Gervasini C, et al. Identification of duplicated genes in 17q11.2 using FISH on stretched chromosomes and DNA fibers. *Hum Genet* 109:48-54, 2001
2. Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, et al. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol* 116:79-86, 2001
3. Cianciulli AM, Bovani R, Leonardo C, et al. DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH: prognostic implications. *Eur J Histochem* 45:65-71, 2001
4. Debiec-Rychter M, Sciort R, Pauwels P, et al. Molecular cytogenetic definition of three distinct chromosome arm 14q deletion intervals in gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 32:26-32, 2001
5. Debiec-Rychter M, Lasota J, Sarlomo-Rikala M, et al. Chromosomal aberrations in malignant gastrointestinal stromal tumors: correlation with c-KIT gene mutation. *Cancer Genet Cytogenet* 128:24-30, 2001
6. Erickson LA, Jalal SM, Goellner JR, et al. Analysis of Hurthle cell neoplasms of the thyroid by interphase fluorescence in situ hybridization. *Am J Surg Pathol* 25:911-918, 2001
7. Fauth C, Speicher MR. Classifying by colors: FISH-based genome analysis. *Cytogenet Cell Genet* 93:1-10, 2001
8. Iqbal MA, Akhtar M, Ulmer C, et al. FISH analysis in chromophobe renal-cell carcinoma. *Diagn Cytopathol* 22:3-6, 2000

12. ábra. Spermocytás seminoma FISH képe. A nagyobb képen 1-es kromoszómára, a kisebbben a 8-as kromoszómára specifikus próbák szignáljai láthatók. Míg a nagy tumorsejtek tetraszómiásak mind az 1-es, mind a 8-as kromoszómára, addig a nyíljal jelzett kis haploid sejtek 1-es és 8-as monoszómiát mutatnak.



9. Lehr HA, Jacobs TW, Yaziji H, et al. Quantitative evaluation of HER-2/neu status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization and by immunohistochemistry with image analysis. *Am J Clin Pathol* 115:814-822, 2001
10. Maillou A, Diaz P, Sayagues JM, et al. Gains of chromosome 22 by fluorescence in situ hybridization in the context of an hyperdiploid karyotype are associated with aggressive clinical features in meningioma patients. *Cancer* 92:377-385, 2001
11. Mazzucchelli L, Burckhardt E, Hirsiger H, et al. Interphase cytogenetics in oncocytic adenomas and carcinomas of the thyroid gland. *Hum Pathol* 31:854-859, 2000
12. Ohta JI, Miyoshi Y, Uemura H, et al. Fluorescence in situ hybridization evaluation of c-erbB-2 gene amplification and chromosomal anomalies in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 7:2463-2467, 2001
13. Orvieto E, Dei Tos AP. Measurement of HER-2/neu in breast cancer: which methodologic approach? *Pathologica* 93:183-188, 2001
14. Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest* 19:554-568, 2001
15. Sági Z, Antal I, Turi A, et al. Synovialis sarcoma kettős jelölésű fluorescens in situ hibridizációs vizsgálata. *Orv Hetil* 140:2691-2694, 1999
16. Simon R, Nocito A, Hubscher T, et al. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 93:1141-1146, 2001
17. Sirvent N, Hawkins AL, Moeglin D, et al. ALK probe rearrangement in a t(2;11;2)(p23;p15;q31) translocation found in a prenatal myofibroblastic fibrous lesion: toward a molecular definition of an inflammatory myofibroblastic tumor family? *Genes Chromosomes Cancer* 31:85-90, 2001
18. Summersgill BM, Jafer O, Wang R, et al. Definition of chromosome aberrations in testicular germ cell tumor cell lines by 24-color karyotyping and complementary molecular cytogenetic analyses. *Cancer Genet Cytogenet* 128:120-129, 2001
19. Tornóczky T, Kálmán E, Sági Z, et al. Cytogenetic abnormalities of alveolar soft-part sarcomas using interphase FISH: trisomy for chromosome 7, monosomy for chromosome 8 and 18 seem to be characteristic of the tumour. *Virchows Arch* 438:173-180, 2001

20. Tornóczky T, Vass JA, Kajtár P, et al. Kompetitív polimeráz láncreakció: új lehetőség az N-myc amplifikáció mértékének meghatározására. *Orv Hetil* 141:27-30, 2000
21. Tsukamoto F, Miyoshi Y, Egawa C, et al. Clinico-pathologic analysis of breast carcinoma with chromosomal aneusomy detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer* 93:165-170, 2001
22. Verdorfer I, Culig Z, Hobisch A, et al. Characterisation of a collecting duct carcinoma by cytogenetic analysis and comparative genomic hybridisation. *Int J Oncol* 13:461-464, 1998
23. Waters BL, Panagopoulos I, Allen EF. Genetic characterization of angiomatoid fibrous histiocytoma identifies fusion of the FUS and ATF-1 genes induced by a chromosomal translocation involving bands 12q13 and 16p11. *Cancer Genet Cytogenet* 121:109-116, 2000
24. Weier HU. DNA fiber mapping techniques for the assembly of high-resolution physical maps. *J Histochem Cytochem* 49:939-948, 2001
25. Zattara-Cannoni H, Daniel L, Roll P, et al. Molecular cytogenetics of t(X;1)(p11.2;q21) with complex rearrangements in a renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 123:61-64, 2000

Terry Fox „Fuss a Rákkutatásért” Alapítvány



*The Terry Fox Run – a fun event in which to participate
Cancer research – a worthwhile cause to support*

September 22nd – Registration at 10 am at the Stadium on Margit Island

*Terry Fox Futás – Egy esemény, amin szórakoztató részt venni
Rákkutatás – Egy ügy, amit érdemes támogatni*

Szeptember 22. – Regisztráció délelőtt 10 órakor a margitszigeti stadionnál

Tisztelt Kutatók és Orvosok!

A Kanadai Kereskedelmi Kamara és a Kanadai Nagykövetség 2002-ben ismét megrendezi a Terry Fox Futást **szeptember 22-én**. A Terry Fox Futás jótékony célú rendezvény. **A rendezvény során összegyűjtött pénzt a magyar rákkutatás támogatására fordítják.**

Az elmúlt öt évben a Terry Fox Futás több mint 170 000 USD-t gyűjtött és juttatott a magyarországi rákkutatás céljaira berendezések vásárlására.

Várjuk azon kutatók és orvosok pályázatát, akik rákkutatásban vesznek részt.

- Az adomány összegét csak orvosi műszer megvásárlására ajánljuk fel, nem fogyasztási cikkekre.
- Az igényelt műszer kizárólag a rákkutatást kell szolgálja, egyéb általános laboratóriumi műszerek, melyek a rákkutatás mellett más célt is szolgálnak, nem elfogadhatók.
- A 2002-ben elfogadott pályázatokhoz összesen 12 millió forintig tudunk hozzájárulni. Az intézménynek igazolnia kell, hogy az esetleg felmerülő további költségeket fedezi.
- A győztes pályázótól elvárjuk, hogy részt vegyen a Terry Fox Futás népszerűsítésében, a futáson, valamint a november elején rendezendő köszönetnyilvánító fogadáson.

A Terry Fox Futás ugyan nemzetközi rendezvény, a központja mégis Kanada. A pályázatokat a Kanadai Terry Fox Alapítvány nézi át, illetve bírálja el. A jelentkezéseket angol nyelven kell benyújtani olyan formanyomtatvány(ok)on, amelyet az Alapítvány biztosít.

Pályázási határidő: 2002. május 17.

További információ és jelentkezési lapok:

Kathy Casey
Ügyvezető igazgató
Kanadai Kereskedelmi Kamara,
Magyarország
Tel.: 1-239-8169 / Fax: 1-239-8170
kathy.casey@ccch.hu

Clara Bor
az Alapítvány elnöke
Terry Fox „Fuss a Rákkutatásért”
Alapítvány
Tel.: 1-374-5253 / Fax: 1-239-8170
info@ccch.hu