

# Fluorescenční in-situ hybridizace (FISH)

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je molekulárně genetická metoda umožňující lokalizaci a identifikaci specifických úseků DNA. Nádorové mutace totiž nemusejí být pouze na úrovni záměny jednotlivých bazí, ale může také docházet k přeskupení, ztrátě, anebo zmnožení větších úseků DNA, či celých chromozomů. Tyto změny nacházíme nejen u leukémií a jiných druhů nádorů, ale mohou být i příčinou různých vývojových poruch a syndromů.

Jednotlivé delece (ztráty), amplifikace (zmnožení) či translokace (změna lokalizace) DNA úseků byly nejprve detekovány pomocí klasického barvení chromozomů (například barvivem Giemsa). Později byly vyvinuty metody barvení umožňující vytvořit na každém chromozomu sérii pruhů, která je pro každý chromozom specifická. Tím bylo zvýšeno rozlišení metody a bylo možno odhalovat i změny menšího rozsahu.

Rychlou a přesnou detekci počtu kopií chromozomů, genů, či jednotlivých úseků DNA, počtu translokací i mikrodelecí umožnila metoda FISH. Na DNA přítomnou ve vzorku se za určitých podmínek váže (hybridizuje) jednovláknová DNA značená fluorescenční značkou (tzv. sonda). Tato sonda se specificky váže na DNA s komplementární (přesně opačnou) sekvencí. Chceme-li detekovat například počet kopií určitého genu, použijeme sondu obsahující sekvenci tohoto genu. Sonda se naváže v tolika kopiích, kolik kopií genu je přítomno ve vyšetřovaném vzorku. Počet kopií daného genu je detekován ve fluorescenčním mikroskopu jako počet fluorescenčních signálů v jádře.

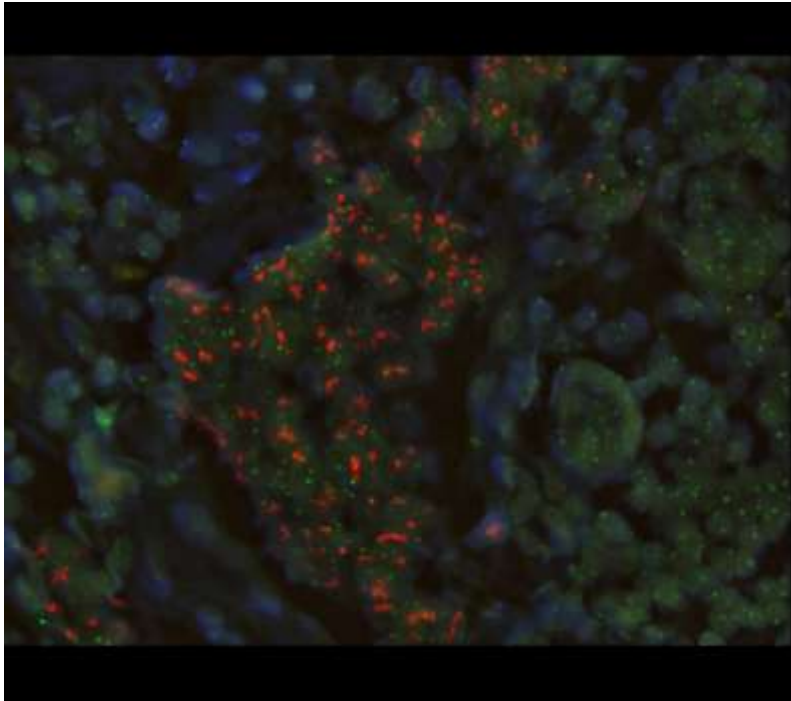
Obměnou FISH jsou další metody, například mnohobarevná FISH umožňující vybarvit každý chromozom specifickou barvou, a tím detekovat i drobné strukturální změny.

Jednou z metod příbuzných FISH je komparativní genomová hybridizace (CGH). U této metody slouží jako sonda fluorescenčně označená DNA celého genomu vyšetřované tkáně. Takto označená DNA (například červeně) se porovnává se srovnávací DNA, která je označena jinou barvou (například zeleně). Obě DNA se smíchají v poměru 1:1 a hybridizují se na fyziologické chromozomy. Změna barvy fluorescence je počítačově vyhodnocena. Je-li ve vyšetřované DNA přítomno zmnožení (amplifikace) genu, či části DNA sekvence, převažuje v odpovídající části chromozomu červená fluorescence. Je-li přítomna delece (ztráta) genu, či DNA sekvence, převažuje ve výsledné oblasti chromozomu zelená fluorescence.

V současné době se FISH vyšetření v onkodiagnostice provádí zejména pro stanovení prognózy pacienta, nebo při výběru vhodné léčby. Jako příklad lze uvést karcinom prsu, kde zvýšení počtu kopií genu HER2 je podmínkou pro nasazení cíleného léku Herceptin (trastuzumab). Dalším příkladem může být přítomnost translokací genů ALK, či ROS1 u karcinomu plic, která předpovídá účinnost léčby

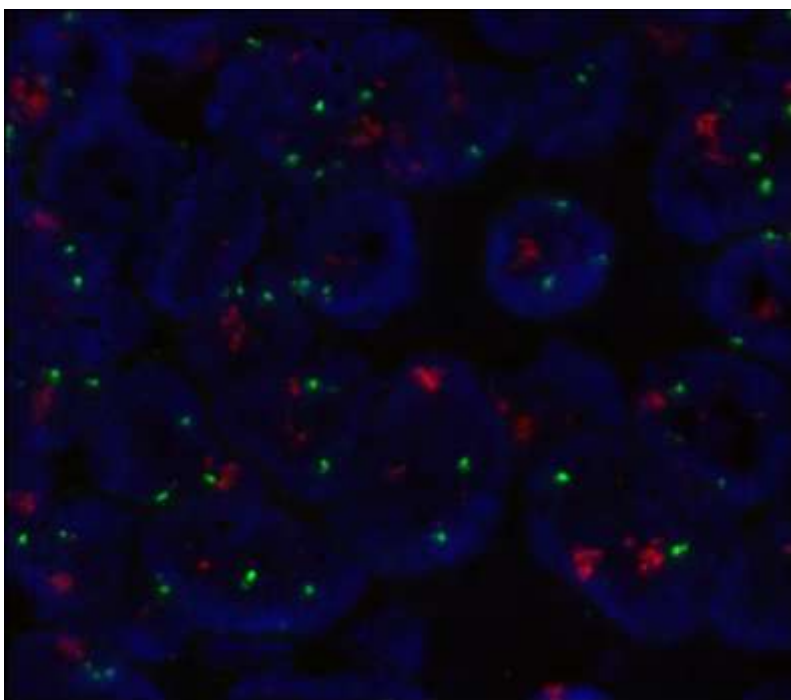
tyrosinkinasovými inhibitory, např. Crizotinibem. Na Ústavu molekulární a translační medicíny se diagnostikují metodou FISH i další nádorová onemocnění jako jsou např. karcinomy kolorekta, sarkomy, nádory CNS, karcinom žaludku apod. Svůj význam mají stále metody proužkovací a CGH, a to zejména ve vyšetřování leukémií, lymfomů, či v prenatální diagnostice.

Obr. 1 FISH1



FISH1; FISH2: Záznam metody FISH. Zelená sonda značí centromeru chromozomu, Červená sonda konkrétní gen. Pomocí těchto dvou sond se určí, zda je zmnožený samotný gen anebo celý chromosom.

Obr. 2 FISH2



Obr. 3 CGH: Záznam z komparativní genomové hybridizace

