

Deteksjon av kromosomavvik i formalinfiksert og parafininnstøpt autopsimateriale fra fostre ved hjelp av FISH

Av Borgny Ytterhus, Overingeniør ved Institutt for Laboratoriemedisin, barne- og kvinnesykdommer (LBK), Det medisinske fakultet (DMF), Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU).

Ingeborg Engesvold, Bioingeniør I, Avdeling for patologi og medisinsk genetikk, St. Olavs Hospital.

Christina Vogt Isaksen, Overlege, Avdeling for patologi og medisinsk genetikk, St. Olavs Hospital og førsteamanuensis ved LBK, DMF, NTNU.

E-post: ingeborg.engesvold@stolav.no

Artikkelen er fagfellevurdert etter Bioingeniørens retningslinjer.

Innledning

Ved over halvparten av spontanaborter foreligger det en alvorlig kromosomfeil, mens dette er tilfelle ved kun fem prosent av dødfødte. Dette betyr at de fleste befruktninger med kromosomfeil tapes i løpet av svangerskapet (1). De fleste numeriske kromosomavvik hos fostre er assosiert med strukturelle utviklingsavvik (2). I de tilfeller der en ved obduksjon av et foster får

mistanke om kromosomfeil, er dette viktig å verifisere. Det er mindre risiko for gjentakelse av utviklingsavvik dersom de skyldes en kromosomfeil, dette har derfor stor betydning ved genetisk veiledning av foreldre.

Trisomi 13, 18, 21 eller numerisk avvik i X og Y kromosomet utgjør til sammen 60 – 70 prosent av alle numeriske kromosomavvik som forårsaker spontanabort eller intrauterine dødsfall (3). Fluorescerende in situ hybridisering (FISH) er en teknikk som anvendes som supplement til karyotyping ved prenatal fostervannsdagnostikk for å detektere de vanligste aneuploidiene (trisomier, monosomier og polyploidier). Det er en sensitiv metode for deteksjon av antall kromosomkopier i interfase-kjerner (3,4,5) ved at fluorescensmerkete kromosomspekifikke prober hybridiseres til komplementære DNA-sekvenser. Produktet visualiseres i et fluorescensmikroskop. I sjeldne tilfeller er formalinfiksert og parafininnstøpt vev (parafinblokker) fra fosterobduksjoner det eneste tilgjengelige materiale for å detektere mistenkt aneuploidi. Interfase FISH kan da utføres ved å isolere hele cellekjerner fra parafinblokker. Kjernene må i slike tilfeller alltid forbehandles (permeabiliseres) før hybridiseringen med prober (4).

Hybridiseringsbetingelsene for FISH på obduksjonsmateriale

Sammendrag

Spontanaborter eller intrauterine dødsfall som skyldes kromosomavvik er i 60-70 prosent av tilfellene forårsaket av trisomi 13, 18, 21 eller Turner syndrom. Fluorescerende in situ hybridisering (FISH) med sentromer- og lokusspesifikke prober for kromosom 13, 18, 21, X og Y ble utført på formalinfiksert og parafininnstøpt materiale fra ti aborterte fostre med utviklingsavvik der en mistenkte kromosomfeil.

Kromosomavvik ble detektert i fire av ti tilfeller. To fostre viste seg å ha trisomi 21 (Down syndrom), ett hadde trisomi 18 (Edward syndrom) og et pikefoster monosomi X (Turner syndrom). I seks kasus ble det ikke detektert avvik for noen av de undersøkte probene.

Optimal forbehandling av kjerner fra obduksjonsmateriale med et kommersielt kit (Histology FISH Accessory Kit) førte til vellykket hybridisering på 91,4 prosent av preparatene.

Denne forbehandlingen har forenklet FISH på obduksjonsmateriale i de tilfellene der prenatal karyotyping ikke foreligger.

Nøkkelord:

Fluoriserende in situ hybridisering
Isolerte kjerner
Kromosomavvik
Autopsimateriale

Abstract

Spontaneous abortions or intrauterine foetal deaths are in 60-70 percent of the cases caused by trisomy 13, 18, 21 or Turner syndrome. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with centromere or locus specific probes for chromosome 13, 18, 21, X and Y was performed on formalin-fixed and paraffin-embedded material from ten aborted fetuses with suspected chromosome abnormality.

A chromosome aberration was detected in four of ten cases. Two foetuses were identified as trisomy 21 (Down syndrome), one had trisomy 18 (Edward syndrome) and one female fetus had monosomy X (Turner syndrome). In six cases no abnormality was detected for any of the probes examined.

Optimal pre-treatment of nuclei from autopsy material with a commercial kit (Histology FISH Accessory Kit) resulted in successful hybridization in 91.4 percent of the specimens.

In cases not previously karyotyped, this pre-treatment has simplified the implementation of FISH on autopsy material.

Key words:

Fluorescence in situ hybridization
Isolated nuclei
Chromosomal abnormality
Autopsy material

som er formalinfiksert og parafininnstøpt, er mindre optimale enn ved bruk av biopsimateriale eller ferskt vev (3,5). Siden det kan ta lang tid fra fosterdød til obduksjon, vil materialet ha ulik grad av autolyse og DNA degradering. I tillegg medfører lang oppbevaringstid på formalin ytterligere fragmentering og depurinerings (basetap) av DNA. Optimal forbehandling av kjernepreparatene er helt nødvendig for vellykket hybridisering og på grunn av varierende forhold behøves ofte separate justeringer for hvert enkelt kasus (6). Det finnes få publikasjoner som omhandler FISH på parafininnstøpt obduksjonsmateriale, og tidligere forbehandlingsmetoder beskriver repeterte enzymbehandling av cellekjernene før hybridisering (3,4,5). Andre har vist at forbehandling med en kombinasjon av varm glyserol og/eller buffer, i tillegg til enzymbehandling, er gunstig (5,6,7). En svensk studie har vist at det er ekstra viktig å benytte kombinert forbehandling dersom preparatet er fra autopsimateriale (5). Vår erfaring med FISH som beskrevet av Kopf et al (4) før den nye forbehandlingen ble tatt i bruk, var på autopsimateriale kun vellykket med sentromerprober (CEP) (3). Det ble ofte nødvendig med individuell behandling i form av repeterte enzymbehandling og rehybridisering. Med lokusspesifikke (LSI) prober ble FISH som regel mislykket.

Det er så vidt vi vet ingen andre patologilaboratorier i Norge som utfører FISH på materiale fra fosterobduksjoner. Vi presenterer her resultater der vi har optimalisert den metoden vi etablerte i 1997 (3,4) ved å benytte en mer effektiv forbehandling av ekstraherte hele kjerner fra parafinblokker med et nyere, kommersielt tilgjengelig kit.

Materiale og metode

Materialet er fra fostre med utviklingsavvik og mistanke om numerisk kromosomfeil, men der det ikke tidligere er utført karyotyping på grunn av uventet spontanabort eller intrauterin fosterdød. Det er benyttet formalinfiksert og parafininnstøpt vev fra ti obduksjoner i tidsperioden 2004-2008. Det ble rekvirert FISH med tanke på de vanligste aneuploidiene og materialet ble hybridisert med fluorescensmerkete CEP-prober spesifikke for kromosom 18, X og Y, og LSI-prober spesifikke for kromosom 13 og 21.

Undersøkelse av kromosom 18 ble rekvirert for samtlige ti kasus, X og Y kromosomundersøkelse for sju kasus og kromosom 21 og 13 for åtte kasus hver. Histologiske hematoxylin-erytrosin-safran (HES) fargede snitt fra parafinblokker fra sju kasus ble evaluert i lysmikroskop med hensyn på vevsautolyse. Vevets autolysegrad varierte fra lett (+), moderat (++) til uttalt (+++) (3). For tre kasus var autolysegrad ukjent. I de fleste tilfellene var thymus det organet med størst celledetthet som var best bevart og ble derfor brukt til FISH. Placenta og nyre ble valgt i noen kasus.

Isolering av hele kjerner fra parafinblokk:

Snitting, deparafinering og isolering av hele kjerner fra parafinblokk ble utført som beskrevet hos Kopf et al (4). Det ble benyttet 100-200 µl suspensjon av isolerte kjerner i 0,1 x SSC (Abbott Molecular Inc) ved tillaging av kjernepreparater på Superfrost®

Pluss objektglass med Shandon Cytospin® 4 Cytoentrifuge. Kvalitetskrav til kjernepreparat beskrevet av probeleverandør Vysis (Abbott Molecular Inc) med hensyn på morfologi og antall ble fulgt.

Ny forbehandlingsmetode:

Kjernepreparat ble forbehandlet som beskrevet i manualen og med reagenser fra Histology FISH Accessory Kit, K5599 (Dako, Glostrup, Danmark). Kort beskrevet ble det først inkubert i 10 minutter i Vial 1 fra kit (Pre-treatment Solution) oppvarmet til kokepunktet, og deretter enzymbehandlet med Vial 2 fra kit (Pepsin) ved romtemperatur i fem minutter.

Co-denaturering og hybridisering:

Temperatur og tid for alle prober var som beskrevet av Kopf et al (4) og det ble anvendt Dako Hybridizer (Dako, Glostrup, Danmark). Hybridisering ble utført med følgende fluorescensmerkete DNA-prober fra Vysis, Abbott Molecular Inc:

Kromosom 13 spesifikk probe LSI®13 (13q14) Spectrum Green™ DNA Probe, kat. no 30-192018. Proben er locusspesifikk og består av et sett med overlappende kloner som dekker RB1-genet som er 180 kb, og i tillegg dekker proben 110-170 kb i 5'-retning og 120 kb i 3' retning for genet.

Kromosom 21 spesifikk probe LSI 21® 21 Spectrum Orange™ DNA Probe, kat. no 30-190002. Proben er locusspesifikk og inneholder DNA-sekvenser komplementære til loci D21S259, D21S341 og D21S34 (21q22.13-q22.2).

Kromosom 18 spesifikk probe CEP 18 (D18Z1) Spectrum Green™ DNA Probe, kat. no 32-112018. Proben er sentromerspesifikk, består av Alpha Satellite DNA og hybridiserer til repeterte satellitt DNA-sekvenser lokalisert nær sentromeren i kromosom 18, 18p11.1-q11.1

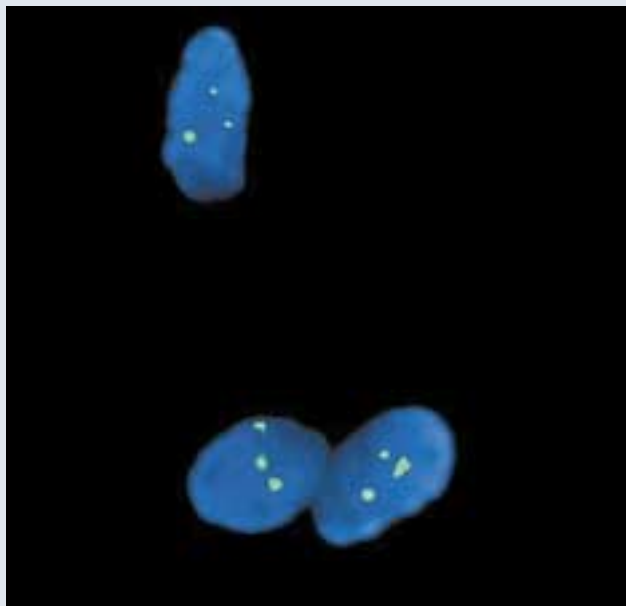
Kromosom X og Y spesifikke prober CEPX (DX21) Spectrum Green/Y (DY23) Spectrum Orange Alpha Satellite DNA Probe, kat. no 32-111054. Proben er sentromerspesifikk, består av Alpha Satellite DNA og hybridiserer til repeterte satellitt DNA-sekvenser lokalisert nær sentromeren i kromosom X, xp11.1-q11.1 og i kromosom Y, yp11.1-q11.1.

Posthybridiseringsvask av preparat:

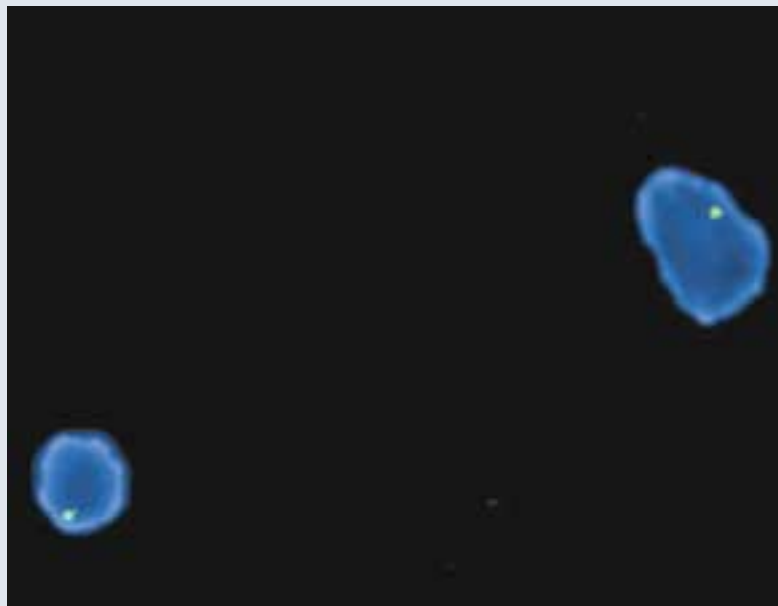
2 x SSC (Abbott Molecular Inc) pH 7,0 i tre minutter ved romtemperatur med påfølgende kontrastfarging av kjerner med DAPI fra Histology FISH Accessory Kit.

Deteksjon av hybridiseringsresultat for de spesifikke kromosomer:

Fluorescenssignaler i 200 enkeltliggende kjerner i hvert preparat ble telt på 600X forstørrelse i Nikon Eclipse 90i fluorescensmikroskop med exitasjonsfilter for FITC (for prober merket med Spectrum Green), TRITC (for prober merket med Spectrum Orange) og DAPI (for blå kontrast i kjernene). Vysis retningslinjer for signaltelling ble fulgt. Minimum 70 prosent av kjernene måtte være entydige for å stille en sikker diagnose, det vil si 70 prosent av kjernene måtte ha to signal for å være disomi, tre signal for å være trisomi eller ett signal for å være monosomi (3).



Figur 1. Kjerner med tre signaler forenlig med trisomi 18. Kromosom 18 spesifikk probe CEP 18 Spectrum green.



Figur 2. Kjerner med ett signal forenlig med Turner syndrom. Kromosom X spesifikk probe CEP X Spectrum green.

Resultater

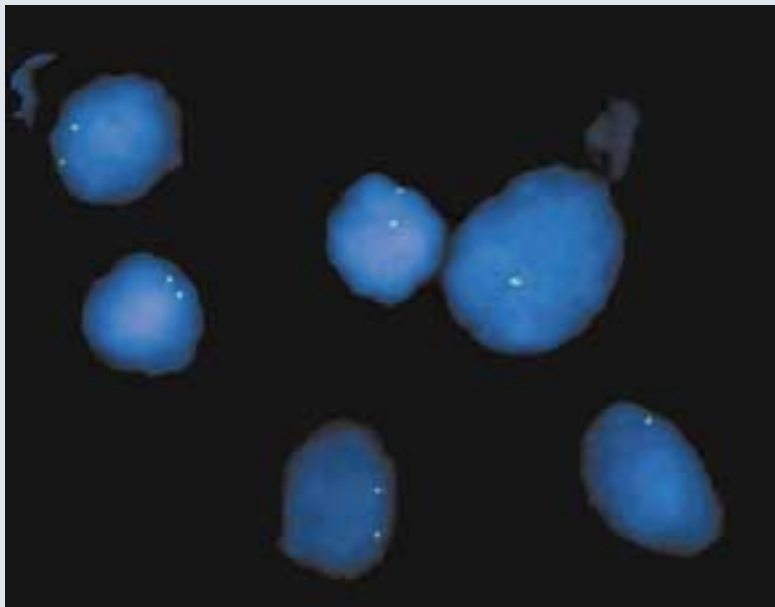
Numerisk kromosomavvik ble detektert i fire av ti kasus. I to tilfeller forelå det trisomi 21 (Down syndrom), i ett tilfelle trisomi 18 (Edward syndrom) og hos et pikefoster forelå det monosomi X (Turner syndrom). I de resterende seks kasus ble det ikke detektert avvik for noen av de undersøkte kromosomer.

Tabell 1 viser FISH-resultater for ti kasus med til sammen 35 hybridiseringer der alle kjernepreparatene ble forbehandlet med Histology FISH Accessory Kit. 32 (91,4 prosent) av hybridise-

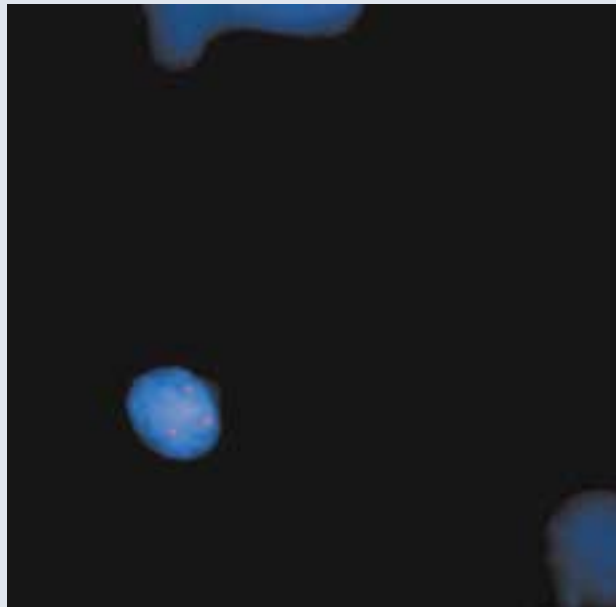
ringene var vellykket, tre (8,6 prosent) var mislykket. Deteksjon av antall kopier av kromosom 18, X og Y med CEP18 og CEP XY (sentromerspesifikke prober) var vellykket for alle utførte hybridiseringer. Ved mikroskopering var det tydelige fluorescenssignaler i enkeltliggende hele kjerner. Ett preparat viste ikke tilfredsstillende fluorescenssignaler for CEP 18-probe etter første forsøk, men ble vellykket etter ekstra pepsinbehandling og rehybridisering. Ni preparater viste to signaler for CEP 18-probe i hver opptelte kjerne, det vil si normalt antall kromosom 18,

Tabell 1. Hybridiseringsresultater med bruk av forbehandlingskit Histology FISH Accessory Kit fra DAKO

Preparat nr.	Hybridiseringsresultat				Ekstra pepsinbehandling	Antall ganger rehybridisert	Autolysegrad*
	LSI-probe 13	CEP-probe 18	LSI-probe 21	CEP-probe XY			
1	Ikke utført	Disomi	Disomi	XX	Nei	–	++
2	Ikke utført	Disomi 1)	Trisomi	Ikke utført	Nei	–	+++
3	Mislykket	Disomi	Mislykket	XY	Preparat LSI 13 og LSI 21	2	+++
4	Disomi	Disomi	Disomi	XX	Nei	–	+
5	Disomi 1)	Disomi	Disomi	Ikke utført	Nei	–	++
6	Disomi 1)	Disomi	Mislykket	Ikke utført	Preparat LSI 21 (2X), CEP 18 (1X)	3	+++
7	Disomi	Disomi	Trisomi	XX	Nei	–	++
8	Disomi	Disomi	Disomi	XO (Turner)	Nei	–	Ikke kjent
9	Disomi	Disomi	Disomi	XX	Nei	–	Ikke kjent
10	Disomi	Trisomi	Disomi	XY	Nei	–	Ikke kjent



Figur 3. Kjerner med to signaler forenlig med disomi 13. Kromosom 13 spesifikk probe LSI 13 Spectrum green.



Figur 4. Kjerne med tre signaler forenlig med trisomi 21. Kromosom 21 spesifikk probe LSI 21 Spectrum orange.

mens ett preparat viste tre signaler, det vil si tre kromosom 18 som er forenlig med trisomi 18 (figur 1). Hybridisering med CEP X og Y probe mot X og Y kromosom ble utført på sju kasus. Her viste seks preparat normale kjønnskromosomer med henholdsvis fire preparat med XX (piker) og to med XY (gutter). Ett preparat (en pike) hadde monosomi X ved optelling, forenlig med Turner syndrom (figur 2).

Deteksjon av antall kopier av kromosom 13 og 21 med LSI 13 og LSI 21 (lokusspesifikke prober) var også mulig for de fleste utførte hybridiseringer. Ved mikroskopering var signalene i enkeltliggende hele kjerner tydelige, men noe mindre og svakere enn signalene for sentromerprober.

Av åtte hybridiseringer med LSI 13 var sju vellykkede og en mislykket. Alle preparatene med vellykkede hybridiseringer for kromosom 13 viste to signaler i hver optelte kjerne, det vil si normalt antall (figur 3). Det mislykkede preparatet ble pepsinbehandlet fem minutter ekstra (totalt 10 minutter) og rehybridisert, men hybridisering lyktes ikke. For hybridisering med LSI 21 ble åtte preparater vellykkede, seks av dem viste normalt antall signaler, mens to viste tre signaler, forenlig med trisomi 21 (figur 4). To preparater ble mislykkede selv etter ekstra pepsinbehandling.

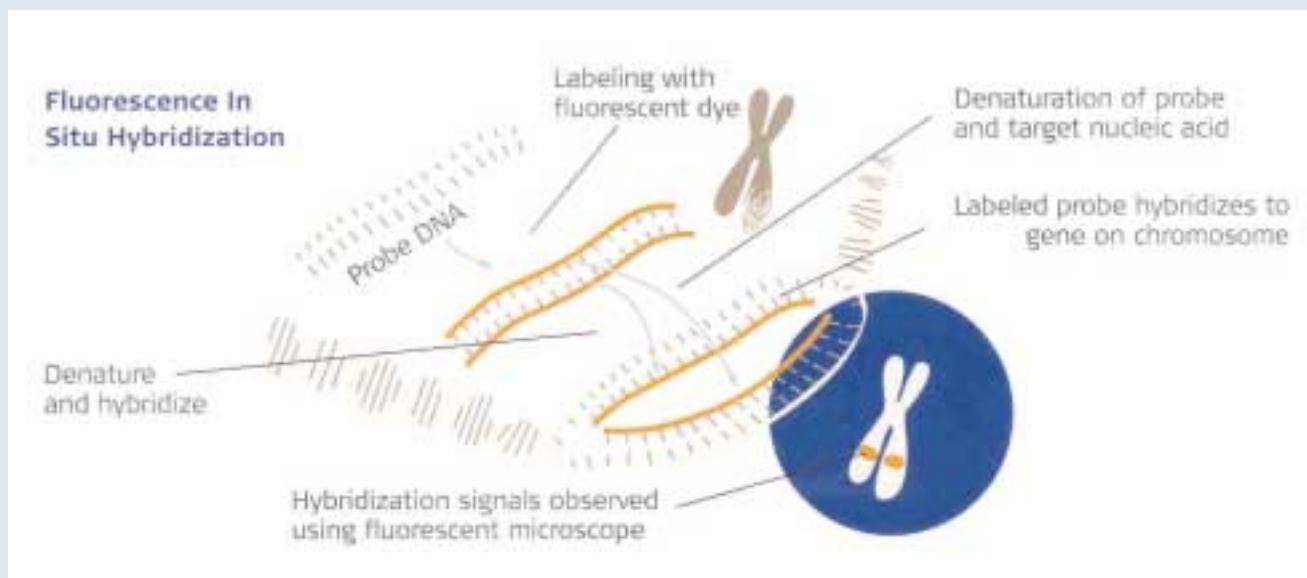
Diskusjon

FISH på preparat fra formalinfiksert og parafininnstøpt materiale gir mulighet for genetisk informasjon når karyotype ikke er tilgjengelig (3,8). FISH med kromosomspekifikke prober gir mulighet til presis informasjon om antall kromosomkopier, men probenes spesifisitet innebærer at de kun hybridiseres til komplementær DNA-sekvens. Dette begrenser analysen idet den ikke gir informasjon om andre loci enn de som probene er spesifikke for. I vårt materiale har vellykket FISH med bruk av spesifikke prober påvist kromosomavvik i fire av ti kasus. I de

kasus der hybridiseringsresultatene er vellykket og viser normalt antall kopier for de undersøkte kromosomene, kan det likevel ikke utelukkes andre kromosomavvik. For ett kasus er hybridisering vellykket med CEP 18 og CEP XY som viser normalt antall kromosomkopier, men fordi hybridisering med LSI 13 og LSI 21 er mislykket, kan ikke trisomi 13 eller trisomi 21 utelukkes.

FISH kan utføres både på parafinsnitt, på isolerte kjerner eller på tissue microarray (TMA). Deteksjon av numeriske avvik er en kvantitativ analyse og preparater med isolerte kjerner er derfor best egnet og ble brukt i denne analysen. Det er betraktelig enklere å evaluere og telle signaler i et preparat som består av hele enkeltliggende kjerner enn i et parafinsnitt der mange celler overlapper hverandre og der kjerner kan være delte på grunn av snittingen. Det er vist at opp til 10 – 30 prosent av kjernene har mistet ett eller begge signal der det skal være to (5). Dette kan gjøre analyser med spørsmål om numeriske kromosomavvik usikre, da det kreves at minimum 70 prosent av kjernene må være entydige for å stille riktig diagnose (3).

De ti kasus som er presentert her, er fra ulike patologilaboratorier med egne protokoller for behandling av obduksjonsmateriale til formalinfiksering og parafininnstøping. Autolysegrad varierer med tiden som er gått fra fosterdød til formalinfiksering, og oppbevaringstid på formalin varierer. Disse to variablene representerer den største hindringen for vellykket analyse. Det er kjent at det er vanskeligere å lykkes med FISH på første forsøk på materiale fra parafinblokker enn hvis man har ferskt vev (5). Deteksjon av spesifikke kromosomer med FISH forutsetter at mål-DNA sekvensen i materialet til analyse er tilstrekkelig intakt for hybridisering med komplementær probe. DNA i obduksjonsmateriale viser ulik grad av fragmentering og depurering på grunn av autolyse og lang oppbevaringstid på formalin (6). Hvis mål-DNA er for ødelagt til at den spesifikke proben kan hybridiseres til sekvensen, kan FISH umulig lykkes uansett



FISH: Dobbeltrådet DNA i kjerner til analyse og i fluorescensemerket spesifikk probe denatureres (splittes til enkelttrådet DNA). Proben hybridiseres til komplementært område i mål-DNA og visualiseres i fluorescensmikroskop med passende filter. Figur gjengis med tillatelse fra Dako.

forbehandlingsmetode. Sannsynligvis er dette tilfelle for preparatene fra kasus 3 og 6 der hybridisering med LSI 13 og LSI 21 var mislykket. Uttalt autolyse i disse tilfellene hadde sannsynligvis innvirkning på resultatet, likevel lyktes hybridiseringer med CEP 18 og CEP XY. At hybridisering lyktes med sentromerproben, men ikke med de lokusspesifikke probene, skyldes muligens at repeterte alphasatellitt DNA-sekvenser lokalisert nær sentromeren sannsynligvis er bedre bevarte enn sekvenser komplementære til de lokusspesifikke probene.

Formalinfiksering danner kryssbindinger mellom proteinmolekyler i kjernen og mellom proteiner og DNA. Kryssbindingene hindrer proben i å penetrere inn i kjernen og hybridiseres til mål-DNA (6).

Optimal forbehandling med Histology FISH Accessory Kit er oppnådd med 32 vellykkede av totalt 35 hybridiseringer. Forbehandlingen har resultert i preparater med tilgjengelig mål-DNA sekvens. Mest sannsynlig bryter den varme bufferen som finnes i Histology FISH Accessory Kit opp formalinkryssbindingene mer effektivt enn tidligere metoder. Enzymbehandling av preparatene fjerner avfallsstoffer fra autolyse og rydder vei slik at proben lettere kan penetrere og hybridisere til mål-DNA. Preparat fra kasus 3 hybridisert med LSI 13 og LSI 21 var mislykket, selv med ekstra enzymbehandling og rehybridisering. På kasus 6 lyktes heller ikke rehybridisering med LSI 21 etter ekstra enzymbehandling av preparat. Sannsynligvis skyldes dette autolyse.

Posthybridiseringsvask av preparater med autolyse og fragmentert DNA bør være skånsom for å unngå å vaske vekk spesifikke hybridiseringer, det vil si lav stringens i 2XSSC i romtemperatur. Imidlertid var det nødvendig å vaske mer med høyere stringens pga uspesifikke signal i preparater på kasus 2, 5 og 6, (0,4x SSC ved 65 °C i to minutter ble benyttet).

Konklusjon

Ny forbehandlingsmetode med bruk av Histology FISH Accessory Kit har forenklet deteksjonen av antall kromosomer i obduksjonsmateriale som er formalinfiksert og paraffinnstøpt. Forbedring av det viktige forbehandlingstrinnet ved FISH gjør at færre preparater trenger individuell behandling før hybridisering med spesifikke prober.

Analysen bidrar til kartlegging og statistikk av numeriske kromosomanomalier og foreldre kan forsikres om at det er lav gjentagelsesrisiko ved senere graviditet.

Referanser

1. Gelehrter TD, Collins FS. Principles of Medical Genetics. Baltimore, Maryland. Williams&Wilkins 1990.
2. Isaksen CV et al. A correlative study of prenatal ultrasound and post-mortem findings in fetuses and infants with an abnormal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2000;16:37-45.
3. Isaksen CV, Ytterhus B, Skarsvåg S. Detection of trisomy18 on formalin-fixed and paraffin-embedded material by fluorescence in situ hybridization. *Pediatr Dev Pathol*, 2000;3:249-55.
4. Kopf I et al. A rapid and simplified technique for analysis of archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anticancer Res*, 1996;16:2533-36.
5. Petersen BL, Sørensen MC, Pedersen S, Rasmussen M. Fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue: optimizing the method. *Appl Immunohistochem Molecul Morphol*, 2004;12:259-65.
6. Hyytinen E et al. Improved technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors by fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*, 1994;16:93-99.
7. Choi-Hong SR et al. Twin pregnancies with complete hydatidiform mole and coexisting fetus: use of fluorescent in situ hybridization to evaluate placental X- and Y-chromosomal content. *Hum Pathol*, 1995;26:1175-80.
8. Slagel DD, Bromley CM, Benda JA. Detection of chromosomal abnormalities in the dysmorphic fetus using fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol*, 1995;26:1241-44.