

Artikelen

Enkele toepassingen van de interfase in situ hybridisatie techniek met DNA-probes in het hematologisch laboratorium

K. van LOM¹, E.M.E. SMIT², R. SLÄTER² en B. LÖWENBERG¹

Met de interfase In Situ Hybridisatie (ISH) techniek kunnen specifieke nucleïnezuursequenties in het DNA van morfologisch intacte cellen zichtbaar worden gemaakt. Hiermee kunnen numerieke of structurele chromosoomafwijkingen worden herkend. Sommige cytogenetische afwijkingen zijn specifiek voor een bepaalde hematologische maligniteit en leveren een bijdrage aan het stellen van diagnose en prognose. Toepassing van ISH is mogelijk op routinematig gekleurde bloed- en beenmerguitstrijkjes. ISH gecombineerd met cytologie (May-Grünwald Giemsa) of immunologie geeft informatie over het celtype waar de chromosomale afwijking zich in bevindt. Zo kunnen chronisch lymfatische leukemie cellen worden gescreend op de aanwezigheid van een extra chromosoom 12. Deze afwijking is geassocieerd met een atypische celmorfologie. Chronisch myeloïde leukemie en acute lymfatische leukemie cellen kunnen worden gescreend op een translocatie van chromosoom 9 met 22, t(9;22) (het Philadelphia chromosoom). Met probes specifiek voor de geslachtschromosomen kan na een beenmergtransplantatie worden beoordeeld of de hematologische cellen afkomstig zijn uit het transplantaat, mits donor en ontvanger van verschillend geslacht zijn. Dit chimerisme onderzoek is bruikbaar voor het evalueren van de uitgroei van het transplantaat.

In dit artikel wordt kort ingegaan op het principe, de methode en toepassing bij de diagnose van patiënten met hematologische maligniteiten.

Trefwoorden: in situ hybridisatie; cytologie; immunologie.

De maligne aandoeningen van het hematopoïetisch systeem zijn vaak geassocieerd met specifieke cytogenetische afwijkingen. In normale cellen worden 46 chromosomen (23 paren) aangetroffen. Bij hematologische maligniteiten kunnen zowel numerieke chro-

mosoom afwijkingen (d.w.z. winst of verlies van een chromosoom), als structurele chromosoom afwijkingen (bijv de uitwisseling van DNA tussen twee of meerdere chromosomen, translocaties) voorkomen. Verlies van chromosoom 7 (monosomie 7) of de winst van extra chromosoom 8 (trisomie 8) wordt geregeld gezien bij het myelodysplastisch syndroom (MDS) en de acute myeloïde leukemie (AML) (1,2). Ook myeloproliferatieve aandoeningen kunnen dergelijke cytogenetische afwijkingen vertonen. Trisomie 12 komt frequent voor bij de chronisch lymfatische leukemie (CLL) (3,4). Een bekend voorbeeld van een structurele afwijking is de translocatie tussen chromosoom 9 en 22, t(9;22) (het Philadelphia chromosoom). Deze afwijking komt zowel bij de chronisch myeloïde leukemie (CML) als bij de acute lymfatische leukemie (ALL) voor (5,6). Herkenning van de chromosomale afwijking is belangrijk voor de diagnostiek en in sommige gevallen de prognose. Bovendien kan de afwijking dienen als merker voor vervolgonderzoek om het effect van de behandeling te beoordelen.

Bij de conventionele cytogenetische technieken worden cellen met behulp van kweektechnieken in deling (metafase) gebracht. De individuele chromosomen worden aangekleurd (gebanded) en op afwijkingen beoordeeld. Zowel numerieke als structurele afwijkingen worden herkend. Met deze techniek echter worden uitsluitend delende cellen beoordeeld. Niet delende (interfase) cellen kunnen niet worden geanalyseerd. Om die reden zijn de resultaten van de metafase analyse niet altijd representatief voor de totale celpopulatie (7,8).

Interfase cytogenetica kent deze beperking niet (9). Een van de gebruikte technieken is de interfase In Situ Hybridisatie (ISH) (10). Deze techniek is gebaseerd op het enkelstrengs maken van DNA bij hoge temperaturen. Bij afkoeling vindt hereniging van de DNA strengen plaats. Ook complementair DNA van buitenaf (probe) zal zich binden (hybridiseren). Is de probe voorzien van een reporter molecuul zoals biotine dan kan deze na hybridisatie gedetecteerd worden, bijv met avidine-fluorochroom. In chromosomen en in de kern is de gehybridiseerde probe vervolgens herkenbaar als een kleine gekleurde vlek ("spot").

Voor vele regio's in een chromosoom is complementair DNA als probe beschikbaar. Afhankelijk van de klinische vraagstelling wordt de probekeuze bepaald.

Afdeling Hematologie¹ en Afdeling Klinische Genetica en Celbiologie², Academisch Ziekenhuis, Erasmus Universiteit Rotterdam

Correspondentie: K. van Lom, Afdeling Hematologie, L419, Academisch Ziekenhuis Rotterdam, Dr. Molewaterplein 40, 3015 GD Rotterdam.
Ingekomen: 08.04.97

Cellen kunnen worden gescreend op de aanwezigheid van een specifieke chromosomale afwijking maar de uitslag van het conventionele metafase onderzoek kan ook aanleiding zijn tot het gericht toepassen van interfase ISH voor de detectie van een of meerdere chromosoomafwijkingen. Overigens sluit een positief ISH resultaat andere chromosomale afwijkingen natuurlijk niet uit.

De combinatie van ISH met al langer bestaande cytologische en immunologische technieken maakt het mogelijk de cytogenetische afwijking te herleiden tot een cytologisch of immunologisch geïdentificeerde cel (11,12).

Historie

De In situ hybridisatie techniek is in 1969 ontwikkeld door Pardue en Gall en door John et al (13,14). De te hybridiseren probe werd gemerkt met radio-isotopen en de gevormde hybriden gedetecteerd met behulp van auto-radiografie. Uitsluitend repeterende basepaar volgordes die geïsoleerd konden worden uit muizen DNA, viraal DNA of ribosomaal RNA werden gebruikt als probe.

Door de introductie en verbetering van onder andere clonage technieken zijn probes voor vele regio's in het genoom beschikbaar gekomen (15,16). Tegelijkertijd werden technieken ontwikkeld om de probes met stabielere merkers dan radio-isotopen te modificeren. (17-21). Op dit moment is inbouw van biotine of digoxigenine gemodificeerde nucleïne-zuren in de probe met behulp van DNA of RNA polymerases de meest gebruikte methode (18,19). Deze techniek staat bekend onder de naam "nicktranslatie". Dankzij de ontwikkelingen in de immunocytochemie kunnen de geïndiceerde probes worden aangekleurd met fluorochromen, enzymen of colloïdaal goud (22-24). Eventueel kan het verkregen ISH signaal nog worden versterkt (25). Ook werden methodes ontwikkeld om fluorochroom of enzym gemerkte nucleotiden in de probe te introduceren (26,27). Voordeel hiervan is dat de probes direct na hybridisatie kunnen worden gedetecteerd. ISH is nu toepasbaar op metafase en interfase chromosomen met een of meerdere probes. Ook kan de techniek worden gecombineerd met cytologie en immunologie (11,12).

Techniek

Probes

Er worden verschillende soorten DNA-probes gebruikt voor het aantonen van numerieke en structurele chromosoom afwijkingen (28). Probes die de repeterende basepaar volgordes in de centromeer regio (de verbindingsplaats tussen de korte en lange arm van een chromosoom) herkennen zijn vaak chromosoom specifiek en daarmee geschikt voor het aantonen van verlies of winst van een chromosoom. De basepaar volgordes kunnen honderd tot duizenden keren in de centromeer regio voorkomen. Hechting van een probe aan deze regio resulteert in een hybride die enkele duizenden kilobasparen groot is en duidelijk herkenbaar is als ISH spot. Voor veel chromosomen zijn centromeerprobes commercieel verkrijgbaar.

Zogenaamde "single copy probes" bevatten een basepaarvolgorde die maar één keer in het genoom voorkomt. Indien er probes beschikbaar zijn die bijvoorbeeld breukpunten van chromosomen herkennen bij translocatie dan kunnen deze gebruikt worden voor het aantonen van chromosoom fusies.

Probes die grote stukken van een chromosoom of een heel chromosoom (chromosome paintings) herkennen worden minder vaak gebruikt in interfase ISH. De hybridisatiespots zijn groot en moeilijker te beoordelen.

Meerdere technieken zijn beschreven om de probes te voorzien van een reporter molecuul (10). De meest gebruikte techniek is de "nicktranslatie": in het DNA worden breuken gemaakt met behulp van het enzym DNase waarna met DNA-polymerase, nucleotiden en een gemerkt dUTP nieuwe DNA-strengen worden gesynthetiseerd. Het dUTP kan gebonden zijn aan een reporter molecuul zoals biotine of digoxigenine dat later met indirecte immunocytochemische methodes zichtbaar wordt gemaakt. Het dUTP kan ook direct gekoppeld zijn aan een fluorochroom of enzym. De meeste commercieel verkrijgbare DNA-probes zijn al voorzien van een reporter molecuul, fluorochroom of enzym.

Preparaten en fixatie

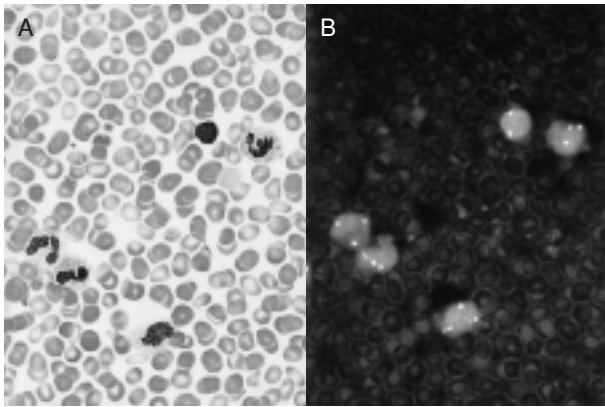
De ISH techniek kan worden toegepast op routinematige gemaakte bloed- en beenmergpreparaten. Mits goed verpakt kunnen de preparaten enkele maanden bij -20°C worden bewaard (11). Meerdere fixatietechnieken zijn bruikbaar zoals aceton/methanol, azijnzuur/methanol, formaldehyde of de May-Grünwald-Giemsa (MGG) kleuring.

Voorbehandeling

Endogene enzyminactivatie is bij gebruik van een enzym als merker meestal niet nodig. De hoge temperaturen tijdens het enkelstrengs maken van het cellulaire DNA denatureren de meeste eiwitten. Om achtergrond aankleuring te verminderen worden de preparaten voorbehandeld met RNase. Proteolytische behandelingen met pepsine, protease en zoutzuur zijn op routinematig gemaakte bloed- en beenmergpreparaten niet aan te raden. De morfologie van de cellen wordt bedorven en de kans bestaat dat de cellen loslaten van het objectglas. Eventueel kan voor het maken van de preparaten het objectglas worden voorzien van een laag poly-l-lysine om adhesie van de cellen aan het glas te vergroten.

Denaturatie en hybridisatie

Het enkelstrengs maken (denatureren) van het cellulaire DNA dient te gebeuren met behoud van de morfologie van de cel. Denaturatie in alkalisch milieu is bijna geheel vervangen door verhitting met behulp van het smeltpunt verlagende formamide. De preparaten worden enkele minuten in $\pm 70\%$ formamide van 70-80°C ondergedompeld. Onder dezelfde omstandigheden wordt het DNA van de probe gedenu-reerd. Indien de probe op het preparaat wordt aangebracht kan de denaturatie tegelijkertijd plaatsvinden. Een verwarmingsplaat met een constante temperatuur



Figuur 1. A: MGG-gekleurd bloed van een patiënt met myeloproliferatieve aandoening; B: ISH toegepast op dezelfde cellen met een probe, specifiek voor chromosoom 8. De segmenten geven met drie spots de trisomie weer; in de lymfocyt zijn twee chromosomen 8 te zien.

is dan een vereiste. Als de probe groot is en naast de specifieke basepaarsequenties ook veel basepaarvolgordes bevat die op alle chromosomen voorkomen, is voorbehandelen met ongelabeld competitie-DNA gewenst. Hechting van de probe aan alle chromosomen wordt hiermee onderdrukt. Het hybridiseren gebeurt meestal overnacht bij 37°C, maar kortere hybridisatietijden zijn ook mogelijk.

Post-hybridisatie

Post-hybridisatiewasstappen moeten de ruis die non-specifieke hybridisatie geeft verminderen. De stringentie van het wassen is afhankelijk van zoutconcentratie en temperatuur. Hoe hoger de temperatuur en hoe lager de zoutconcentratie hoe stringenter de wasstap.

Detectie

Voor de niet-radioactieve detectie van de gemerkte probes worden zowel fluorochromen, enzymen als colloïdaal goud gebruikt (12). Met fluorochromen als fluoresceïne isothiocyanate (FITC), Texas Red of amino-methylcoumarin-acetic acid (AMCA) wordt een hoge sensitiviteit en een hoge signaalresolutie bereikt. Nadelen zijn de uitdoving van de signalen bij aanstraling en de autofluorescentie van sommige cellen. Enzymen als peroxidase of alkalische fosfatase kennen deze bezwaren niet en hebben bovendien als voordeel dat de hybridisatiespots met een conventionele lichtmicroscopie kunnen worden beoordeeld. Microscopie voor de detectie van colloïdaal goud is binnen de meeste laboratoria niet voorhanden. Deze methode zal niet verder worden behandeld.

Bij gebruik van meerdere probes wordt gebruik gemaakt van verschillend gekleurde fluorochromen of enzymen.

Met immunocytochemische technieken kunnen de ISH-spots ook worden versterkt. Een recente ontwikkeling is de "catalyzed reporter deposition" techniek (CARD). Deze amplificatietechniek is gebaseerd op de afzetting van gebiotinyleerd tyramine (BT) op de plaats van de probe. Het BT kan vervolgens gevisualiseerd worden met fluorochroom of enzym gemerkt

avidine. De intensiteit van de ISH-spot neemt daarvoor sterk toe (29-30).

Bij gebruik van fluorochromen worden de preparaten ingebed in een "anti-fade" oplossing en een kern aankleurende stof zoals propidiumjodide of 4,6 diamidino-2-phenyl-indole (DAPI). Bij gebruik van enzymen kunnen cellen worden tegengekleurd met bijv. hematoxiline of methylgroen.

Beoordeling

In normale cellen met twee kopieën van een chromosoom verwacht men bij gebruik van een chromosoom specifieke centromeerprobe twee ISH-spots per cel. Door inefficiënte hybridisatie of door co-localisatie van twee spots zal in in diploïde cellen niettemin in $\pm 5\%$ minder dan 2 spots te zien zijn (11). Omgekeerd zal in $\pm 2\%$ van de cellen een verhoogd aantal hybridisatiespots worden waargenomen. Deze afwijkende waarneming kan worden veroorzaakt worden door een te hoge probeconcentratie of aspecifieke hybridisatie. Vanwege deze referentiewaarden kan een monosomie 7 dus worden opgepikt indien bij meer dan 5% van de cellen één hybridisatiespot wordt aangetoond. Naar analogie kan een trisomie worden herkend indien bij meer dan 2% van de cellen 3 hybridisatiespots per cel worden gezien.

Wanneer breekpuntspecifieke probes worden gebruikt om chromosoomtranslocaties aan te tonen en tweekleurendetectie dan zullen in normale cellen twee keer twee spots worden gezien die los van elkaar liggen. In $\pm 3\%$ van de normale cellen zal een "fusie spot" te zien zijn (31-32). Het percentage normale cellen met een afwijkend aantal spots of "fusie spot" is afhankelijk van de specificiteit van de probe en de celrijckdom van het preparaat. Een hoge cellulariteit en daarmee compacte kernen geven meer kans op "fusiespots".

Deze referentiewaarden dienen per laboratorium en per probe bepaald te worden. De percentages geven aan dat de techniek minder geschikt is voor de detectie van minimale residuale ziekte.

Interfase ISH in combinatie met andere technieken

Het identificeren van cellen met een chromosomale afwijking is mogelijk door cytologie en interfase ISH te combineren. Preparaten worden eerst met MGG gekleurd en de cellen worden vastgelegd op dia of video. Daarna wordt op het zelfde preparaat ISH toegepast. Het ISH resultaat wordt tegelijkertijd met de cytologie (dia of video) beoordeeld (11) (figuur 1). Voor het simultaan beoordelen van immunofenotype en een chromosoom in een interfase-cel zijn vele technieken beschreven (12). Een daarvan is de APAAP/FISH techniek (33,34). Deze techniek gebruikt het alkalische fosfatase-anti alkalische fosfatase (APAAP) detectiesysteem. De monoclonale antistof wordt gedetecteerd met behulp van APAAP en een azo-dye kleuringsprocedure. Dit resulteert in een rood gekleurd precipitaat dat zichtbaar is met doorvallend licht maar ook in de fluorescentie microscoop bij gebruik van een FITC filter combinatie. Het APAAP-complex blijft op de cel aanwezig tijdens de ISH-pro-

cedure. Als APAAP wordt gebruikt ten behoeve van de immunofenotypering en FITC als merker in de ISH-procedure dan resulteert dit in het zichtbaar maken van het immunofenotype (APAAP=rood) en het genotype (FITC=groen) in de zelfde interfase-cel.

Detectie van fluorescerende ISH-spots met behulp van flowcytometrie heeft als voordeel dat grote aantallen cellen kunnen worden beoordeeld (35,36). Daarvoor worden cellen (kernen) in suspensie gehybridiseerd. De combinatie van ISH en flowcytometrie is bruikbaar in het chimerisme onderzoek: cellen positief of negatief voor een Y chromosoom kunnen worden onderscheiden.

Enkele toepassingen

Chronisch lymfatische leukemie (CLL)

Bij $\pm 20\%$ van de patiënten met B-CLL wordt een trisomie 12 gevonden (3,4). Deze chromosoomafwijking is geassocieerd met een atypische celmorfologie. De analyse van metafase chromosomen wordt bemoeilijkt door een lage mitose-activiteit van de tumorcellen. Met interfase ISH, eventueel gecombineerd met cytologie of immunofenotypering, is het afwijkende karyotype snel te herkennen.

Chronisch Myeloïde Leukemie (CML)

Het Philadelphia chromosoom is bewijzend voor de diagnose CML. De uitwisseling van het Abelson (Abl) gen op chromosoom 9 (q34) met het "breakpoint cluster region" (BCR) gen op chromosoom 22 (q11) resulteert in het BCR-Abl fusiegen op chromosoom 22. Dit fusiegen codeert voor een 210 kD fusie-eiwit dat waarschijnlijk een centrale rol speelt in de pathogenese van de leukemie. Voor zowel de regio van het BCR-gen als het Abl-gen zijn probes beschikbaar. Als BCR met FITC (groen) wordt aangekleurd en Abl met Texas Red (rood), dan zal bij fusie van de twee genen een rood-groene spot ontstaan. (32).

Acute lymfatische leukemie (ALL)

Het Philadelphia chromosoom is ook aanwezig bij $\pm 30\%$ van de volwassen patiënten met een ALL (6). Bij deze patiënten is het soms moeilijk voldoende beenmerg te aspireren voor het conventionele metafase-onderzoek. De ISH-techniek kan dan worden toegepast op depjes van de beenmergbiopsie.

Chimerisme

Indien bij beenmergtransplantatie donor en ontvanger van tegenovergesteld geslacht zijn, kan het X en Y chromosoom dienen als merker voor vervolgstudies. Met probes welke specifiek zijn voor de geslachtschromosomen kan volledig donorchimerisme, partieel chimerisme of afstoting van het transplantaat worden vastgesteld (35,36).

Interfase in situ hybridisatie is in combinatie met celidentificatie technieken een belangrijk hulpmiddel geworden binnen de diagnostiek en het vervolgen van hematologische maligniteiten.

Dankwoord.

Wij zijn Dr. Ir. A.A.M. Ermens, Diaconessenhuis, Eindhoven, erkentelijk voor zijn commentaar.

Literatuur

1. Morel P, Hebbbar M, Lai JL, Duhamel A, Preudhomme C, Wattel E, Bauters F, Fenaux P. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia*, 1993; 7: 1315-1323.
2. Mrózek K, Heinonen K, Chapelle A de la, Bloomfield CD. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Sem Oncol*, 1997; 24: 17-31.
3. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, Hamblin T, Lens D, Swansbury GJ, Catovsky D. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996; 92: 382-388.
4. Criel A, Verhoef G, Vlietinck R, Mecucci C, Billiet J, Michaux L, Meeus P, Louwagie A, Van Orshoven A, Van Hoof A, Boogaerts M, Van den Berghe H, De Wolf-Peeters C. Further characterization of morphologically defined typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study on 390 cases. *Br J Haematol* 1997; 97: 383-391.
5. Zhao L, Kantarjian HM, Van Oort J, Cork A, Trujillo JM, Liang JC. Detection of residual proliferating leukemic cells by fluorescence in situ hybridization in CML patients in complete remission after interferon treatment. *Leukemia* 1993; 7: 168-171.
6. The groupe Français de cytogénétique Hématologique. Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: Correlations with hematologic findings and outcome. A collaborative study of the groupe français de cytogénétique hématologique. *Blood* 1996; 87: 3135-3142.
7. Han K, Lee W, Harris CP, Kim W, Shim S, Meisner LF. Quantifying chromosome changes and lineage involvement in myelodysplastic syndrome (MDS) using fluorescent in situ hybridization (FISH). *Leukemia* 1994; 8: 81-86.
8. Poddighe PJ, Moesker O, Smeets D, Awwad BH, Ramaekers FCS, Hopman AHN. Interphase cytogenetics of hematological cancer: comparison of classical karyotyping and in situ hybridization using a panel of eleven chromosome specific DNA probes. *Cancer res* 1991; 51: 1959-1967
9. Cremer T, Landegent J, Brückner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson P, Ploeg M van der. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet* 1986; 74: 346-352.
10. Boehringer Mannheim. Nonradioactive in situ hybridization application manual. 1996; 2e editie.
11. Lom K van, Hagemeyer A, Smit EME, Löwenberg B. In Situ hybridization on May-Grünwald Giemsa stained bone marrow and blood smears of patients with hematologic disorders allows detection of cell lineage specific cytogenetic abnormalities. *Blood* 1993; 82: 884-888.
12. Speel EJM, Ramaekers FCS, Hopman AHN. Cytochemical detection systems for in situ hybridization and the combination with immunocytochemistry. 'Who is still afraid of red, green and blue?' *Histochem J* 1995; 27: 833-858.
13. Gall G, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 63: 378-381.
14. John H, Birnstiel M, Jones K. RNA-DNA hybrids at the cytogenetical level. *Nature* 1969; 223: 582-587.

15. Harper ME, Ullrich A, Saunders GF. Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Chromosoma* 1981; 83: 431-439.
16. Sacchi N, Schiaffonati L, Magnani I, Pappalardo C, Hughes AJ, Darfler M, Hoogveen AT. Detection and subcellular localization of an AML1 chimeric protein in the t(8;21) positive acute myeloid leukemia. *Oncogene* 1996; 12: 437-444.
17. Bauman JGJ, Wiegant J, Borst P, Van Duijn P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labeled RNA. *Exp Cell Res* 1980; 138: 485-490.
18. Langer PR, Waldrop AA, Ward DA. Enzymatic synthesis of biotin labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6633-6637.
19. Kessler C. The digoxigenin system: principle and applications of the novel non-radioactive DNA labeling and detection system. *Bio Technol Int* 1990; 183-194.
20. Hopman AHN, Wiegant J, Tesser GI, Duijn P van. A non radio-active in situ hybridization method based on mercu-rated nucleic acid probes and sulfhydryl-hapten ligands. *Nucl Acids Res* 1986; 14: 6471-6488.
21. Landegent JE, Jansen in de Wal N, Baan RA, Hoeijmakers JHJ, Ploeg M van der. 2-acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences. *Exp Cell Res* 1984; 153: 61-72.
22. Haughland RP. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 1994, molecular probes INC.
23. Graham RC, Karnovsky MJ. The early stages of absorption of injected horse radish peroxidase in the proximal tubulus of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 1966; 14: 291-302.
24. Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochem* 1971; 8: 1081-1084.
25. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2934-2938.
26. Dirks RW, Van de Rijke FM, Fujishita S, Van der Ploeg M, Raap AK. Methodologies for specific intron and exon RNA localization in cultured cells by haptenized and fluorochromized probes. *J Cell Sci* 1993; 104: 1187-1197.
27. Wiegant J, Wiesmeijer CC, Hoovers JMN, Schuurin E, d'Azzo A, Vrolijk J, Tanke HJ, Raap AK. Multiple and sensitive in situ hybridization with rhodamine-, fluorescein-, and coumarin-labeled DNAs. *Cytogenetic Cell Genet* 1993; 63: 73-76.
28. Poddighe PJ, Ramaekers FCS, Hopman AHN. Interphase cytogenetics of tumours. *J of Pathol* 1992; 166: 215-224.
29. Kerstens HMJ, Poddighe PJ, Hanselaar AGJM. A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. *J Histochem and cytochem* 1995; 43: 347-352.
30. Raap AK, Corput MPC van de, Vervenne RAW, Gijlswijk RPM, Tanke HJ, Wiegant J. Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Human Molec Genet* 1995; 4: 529-534.
31. Lom K van, Hagemeyer A, Vandekerckhove F, Greef GE de, Sacchi N, Löwenberg B. Clonality analysis of hematopoietic cell lineages in acute myeloid leukemia and translocation (8;21): only myeloid cells are part of the malignant clone. *Leukemia* 1997; 11: 202-205.
32. Arnoldus EPJ, Wiegant J, Noordermeer IA, Wessels JW, Beverstock GC, Grosveld GC, Ploeg M van der, Raap AK. Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. *Cytogenet Cell Genet* 1990; 54: 108-111.
33. Speel EJM, Schutte B, Wiegant J, Ramaekers FCS, Hopman AHN. A novel fluorescence detection method for in situ hybridization, based on the alkaline phosphatase-fast red reaction. *J Histochem and cytochem* 1992; 40: 1299-1308.
34. Price CM, Kanfer EJ, Colman SM, Westwood N, Barrett AJ, Greaves MF. Simultaneous genotypic and immunophenotypic analysis of interphase cells using dual-color fluorescence: a demonstration of lineage involvement in polycythemia vera. *Blood* 1992; 80: 1033-1038.
35. Dekken H van, Hagenbeek A, Bauman JG. Detection of host cells following sex-mismatched bone marrow transplantation by fluorescent in situ hybridization with a Y-chromosome specific probe. *Leukemia* 1989; 3: 724-728.
36. Arkesteijn GJA, Erpelinck SLA, Martens ACM, Hagenbeek A. Chromosome specific DNA hybridization in suspension for flowcytometric detection of chimerism in bone marrow transplantation and leukemia. *Cytometry* 1995; 19: 353-360.

Summary

Some applications of Interphase in situ hybridization using DNA probes in the haematological laboratory. Lom K van, Smit EME, Släter R, Löwenberg B. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 3-7.

Using the interphase in situ hybridization (ISH) technique, the presence of specific nucleic acid sequences can be detected in the DNA of morphologically intact cells. ISH can be used to demonstrate numerical or structural chromosomal abnormalities. Some of these cytogenetic aberrations are known to be specific for a certain type of haematological malignancy and their presence can contribute to the diagnosis and the assessment of the prognosis of the patient. ISH can be applied to routinely stained blood and bone marrow smears. When combined with cytology (May-Grünwald Giemsa) or immunology ISH can provide information on celltype and karyotype at the same time. For example chronic lymphocytic leukaemia cells can be screened for the presence of an extra chromosome 12, an abnormality associated with an atypical cell morphology. Chronic myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia cells can be screened for the translocation between chromosomes 9 and 22, t(9;22) (the Philadelphia chromosome). Following allogeneic bone marrow transplantation, ISH with probes specific for the sex chromosomes can be used to investigate whether the blood cells originate from the transplant, provided donor and recipient are of the opposite sex. This type of investigation is useful for evaluating the engraftment of donor arrived hematopoiesis.

Here we briefly describe the principle, method and applicability of ISH to haematological malignancies.

Keywords: in situ hybridization; cytology; immunology.