

Das Selbstverständnis der Zytogenetik im Wandel der Zeit

Oskar A. Haas, Forschungsinstitut für krebskranke Kinder und Ludwig Boltzmann-Institut für Zytogenetische Diagnostik, St. Anna Kinderspital, Wien

Zusammenfassung

In den folgenden Artikeln präsentieren wir die Errungenschaften der Zytogenetik und ihre Bedeutung für verschiedene Bereiche der Medizin, Biologie und Grundlagenforschung. Die rasanten technischen Entwicklungen reichen von den Bänderungsmethoden über die computerunterstützte Bildanalyse bis zu den vielfältigen Methoden der Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Diese methodischen Fortschritte waren eine wesentliche Voraussetzung, daß neben den Chromosomen nun sowohl der Interphasekern als auch die nackte DNA der zytogenetischen Analyse zugänglich wurde.

Schlüsselwörter

Chromosomen, Zytogenetik, Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Summary

In the following articles we present the cytogenetic achievements and their significance for various fields of medicine, biology and basic science. The rapid technical developments range from the banding techniques over the computer-aided image analysis to the manifold methods of fluorescence in situ hybridization. These methodical developments were a prerequisite that, in addition to chromosomes, also the interphase and the naked DNA became accessible for cytogenetic analysis.

Keywords

Chromosomes, cytogenetics, fluorescence in situ hybridization (FISH)

Was ist Zytogenetik?

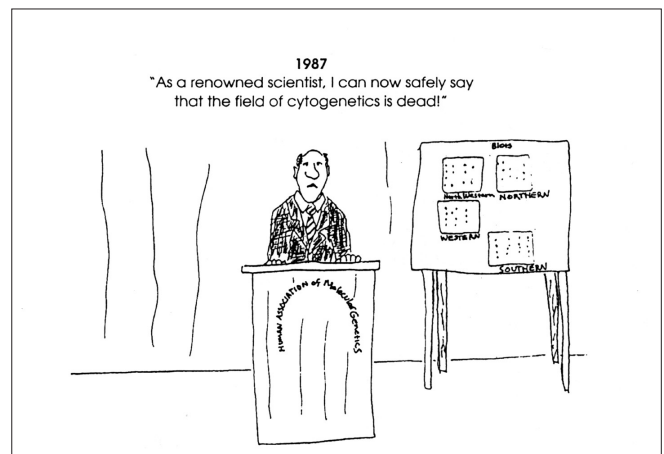
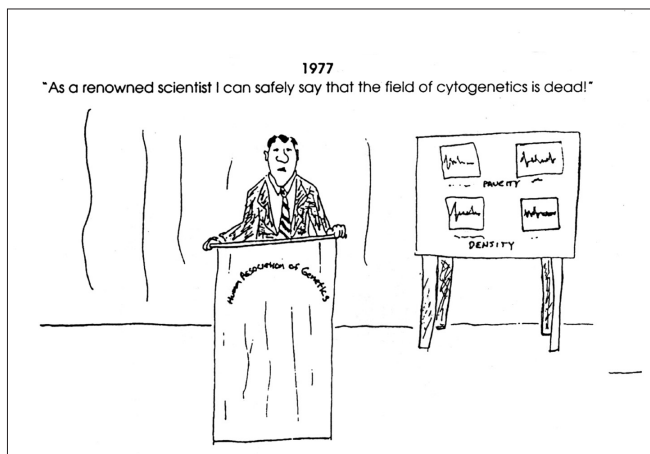
Die Zytogenetik beschäftigt sich mit der mikroskopischen Analyse des genetischen Materials, welches in mitotischen Zellen in Form von Chromosomen vorliegt. Diese haben eine für jede Spezies charakteristische Zahl und Form. Abgesehen von wenigen Ausnahmen, leiten sich alle Erkenntnisse der Zytogenetik prinzipiell von der Analyse einzelner Zellen ab. Dies verursacht einerseits einen beträchtlichen Aufwand und hat den Nachteil, daß davon generelle Schlüsse abgeleitet werden müssen. Andererseits bieten solche Untersuchungen aber auch wesentliche Vorteile, da man auf Einzelzellniveau Erkenntnisse gewinnen kann, die sonst mit keiner anderen Methode erzielbar sind.

Klassische Zytogenetik

Mitosen bzw. Chromosomen gewinnt man durch Kultivierung vitaler Zellen. Ihre Zahl und Qualität hängt dabei von vielen, zum Teil nur bedingt kontrollierbaren Faktoren (Art und Qualität des eingesetzten Zellmaterials, Kulturbedingungen, Nährmedien) ab. Daneben spielen Umweltbedingungen wie Luftfeuchtigkeit und Temperatur auch beim Präparationsprozeß eine ebenso große Rolle, wie das Können und die Motivation der damit beschäftigten Person (Spurbeck et al. 1996). Die Beurteilung, Analyse und Interpretation der Präparate setzt neben der entsprechenden Schulung eine große Erfahrung voraus, da Chromosomen je nach Präparations- und Bänderungsqualität und aufgrund vieler polymorpher Normvarianten sehr unterschiedlich aussehen können. Im Gegensatz zu vielen anderen, gut

standardisier- und reproduzierbaren technischen Labormethoden, war, ist und bleibt daher die zytogenetische Analyse in gewissem Sinne auch eine sehr subjektive interpretatorische „Kunst“.

Am Anfang aller genetischen Untersuchungen steht die Zytogenetik. Keine andere Methode kann einen besseren globalen Überblick über die vielfältigen möglichen genetischen Störungen verschaffen und Hinweise auf deren Ursache liefern. Nachdem die normale Chromosomenzahl des Menschen im Jahre 1956 von Tjio und Levan mit 46 fixiert war, wurden zuerst numerische, in der Folge aber auch charakteristische strukturelle Veränderungen entdeckt, welche mit bestimmten klinischen Syndromen oder neoplastischen Erkrankungen assoziiert waren (Hsu 1979). Die Entwicklung von Bänderungsmethoden anfangs der siebziger Jahre half dann wesentlich, strukturelle Anomalien besser zu definieren. Jedoch blieb vor allem bei komplexen Veränderungen noch immer viel Spielraum für individuelle Interpretationen. Datenbanken, in denen die Ergebnisse zytogenetischer Untersuchungen gesammelt wurden, dienen als Nachschlagewerke, aber auch als Grundlage für statistische Auswertungen (Borgaonkar 1997; Mertens et al. 1997). Sie halfen die Spreu vom Weizen zu trennen und bestimmte Krankheitsbilder über die Zytogenetik neu zu definieren. Das Aufkommen von Bildanalysegeräten vereinfachte und verkürzte die Auswertung der Präparate wesentlich.



Molekulare Zytogenetik

Aber erst die Verschmelzung von molekularen und zytogenetischen Methoden in Form der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) Mitte der achtziger Jahre, brachte einen revolutionären Durchbruch, welche nun die Zytogenetik auch in vielen neuen Bereichen salonfähig machte. Diese erstaunlichen methodischen Entwicklungen führten dazu, daß Chromosomen und Chromosomenabschnitte individuell eingefärbt und damit auch viel besser identifiziert und zugeordnet werden konnten (Ried et al. 1998). Unter optimalen Bedingungen kann man zur Zeit schon bis zu 96 verschiedene Farben simultan verwenden (Tanke et al. 1999). Die FISH eröffnete viele neue, fast unglaubliche Möglichkeiten. Diese reichen von der mikroskopischen Detektion von sehr kurzen Gensequenzen, welche sich sogar nur in einzelnen Nukleotiden unterscheiden müssen (O’Keefe et al. 1997; Lizardi et al. 1998), der Kartierung von Genen und Genabschnitten auf isolierten DNA-Fäden (Heng and Tsui 1998) bis zum Nachweis quantitativer Chromosomenanomalien aus Material, welches konventionellen zytogenetischen Untersuchungen nicht zugänglich ist (Kallioniemi et al. 1994). Solche Informationen können bereits auch aus einzelnen Interphasekernen gewonnen werden (Klein et al. 1999). Mittels Mikrodisektion kann man aber auch sehr spezifische FISH-Proben aus einzelnen Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitten herstellen (Müller-Navia et al. 1995). Beide Methoden eröffnen ungeahnte neue Perspektiven für Grundlagenforschung und diagnostische Anwendungen.

Die FISH machte nun auch den Interphasekern der zytogenetischen Analyse zugänglich (Tab 1). Dies verbessert einerseits die Diagnostik in vielen Bereichen, ermöglicht aber auch neue Ansätze, die Struktur, die Verpackung und die Interaktion der Chromosomen im Zellkern zu studieren (Cremer et al. 1996). Besondere Methoden erlauben funktionelle Untersuchungen, wie z. B. jene der Transkription, wobei sogar Abschnitte einzelner RNA Moleküle sichtbar gemacht und analysiert werden können (Femino et al. 1998; Nutt et al. 1999).

Ob Microarrays noch zum zytogenetischen Bereich im weitesten Sinne zu zählen sind, kann diskutiert werden. Es handelt sich jedoch auch bei diesen Techniken um eine mikroskopische Analyse genetischen Materials, welche auf Gewebeschnitten, einzelnen Zellen, isolierter DNA oder RNA durchgeführt werden kann. Die Entwicklungen auf diesem Gebiet, welche ursprünglich von zytogenetischen Labors ausgingen, sind zur Zeit kaum abzuschätzen. Mithilfe der Chip-Technologie können gleichzeitig eine Vielzahl von Genen im Hinblick auf mögliche Sequenz- oder Expressionsunterschiede, aber auch genomische Imbalancen untersucht werden (Solinas-Toldo et al. 1997; Pinkel et al. 1998).

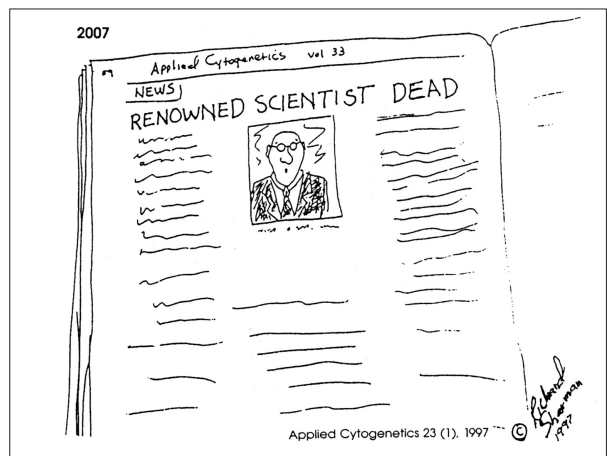
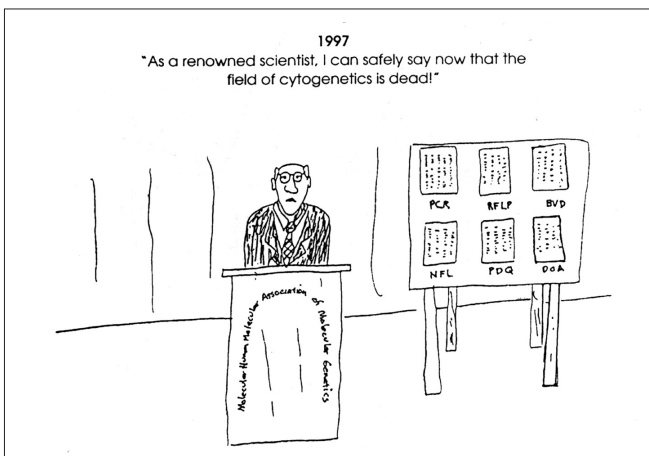
Perspektiven

Bedeutet diese Entwicklungen das Ende der konventionellen Zytogenetik? Die computerunterstützte Chromosomenanalyse und die vielen phantastischen FISH-Techniken, bei denen keine Chromosomen mehr direkt un-

tersucht werden müssen, lassen dies fast vermuten. Auf den ersten Blick können sie solide zytogenetische Kenntnisse vollkommen ersetzen. Problematisch wird es allerdings schon bei Methoden wie der CGH und der 24 Farben FISH, wo man nur mit fundiertem zytogenetischen Wissen auch die von den Bildanalysegeräten gelieferten Ergebnisse kritisch beurteilen, kontrollieren und interpretieren kann. Ebenso zeigte auch die Auswertung der ersten Rundversuche zur Qualitätskontrolle von einfachen diagnostischen FISH-Untersuchungen, daß man auch für solche „banale“ Untersuchungsmethoden beträchtliche Erfahrung braucht, um alle technischen und interpretatorischen Probleme, welche dabei auftauchen können, zu bewältigen. Eine fundierte zytogenetische Ausbildung und Schulung ist daher auch für molekulare Zytogenetik wünschenswert und notwendig.

Ausbildung

Trotz der vielen intellektuell anspruchsvollen Tätigkeiten im zytogenetischen Labor gibt es erstaunlicherweise in den deutschsprachigen Ländern jedoch weder eine entsprechend kontrollierte Ausbildung noch besondere Vorschriften dafür. In der Regel werden medizinisch-technische AssistentInnen in den Labors angeleitet, in denen Sie arbeiten. Dabei wird natürlich überwiegend Wert auf praktische Tätigkeiten gelegt und weniger auf eine ebenso wichtige, theoretische Ausbildung. Die zunehmende Verbreitung der FISH schafft einen vermehrten Bedarf an kompetentem Laborpersonal. Spätestens diese Entwicklung sollte daher Anlaß sein, ähnlich



Tab 1

Die wichtigsten Applikationen der FISH

Metaphase und Chromosomen

- Erfassung, Bestätigung und Charakterisierung von zytogenetisch identifizierten Chromosomenrearrangements
- Dechiffrieren von komplexen Karyotypanomalien
- Nachweis des chromosomalen Ursprungs von Markerchromosomen
- Lokalisierung, Kartierung und Ordnen von Gensequenzen auf Chromosomen

Interphase

- direkter und indirekter Nachweis von Chromosomen(anomalien) und Gensequenzen
 - numerische Anomalien
 - Deletionen, Duplikationen und Amplifikationen
 - Genrearrangements (z.B. Translokationen und Inversionen)
- Chimärismus
 - Nachweis kindlicher Zellen im mütterlichen Blut
 - Bestimmung der Herkunft von Spender- und Empfängerzellen nach Knochenmarktransplantation
- Nachweis definierter Zellpopulationen
 - Mosaik
 - minimale Resterkrankung bei Leukämien
- Bestimmung des Genotyps immunphänotypisch definierter Zellpopulationen
 - direkt: FISH
 - indirekt: FISH auf FACS-sortierten Zellpopulationen

Fiber-FISH

- Genkartierung
- direkter Nachweis der Art und des Ausmaßes von Gendeletionen
- Untersuchungen von Genrearrangements
- Positionsklonierung

wie in den USA, eine spezielle Ausbildungsordnung für (zyto)genetische Assistenten zu schaffen. Im akademischen Bereich findet die Zytogenetik zumindest im Rahmen der Ausbildung zum Facharzt für Humangenetik, bzw. zum Fachhumangenetiker Berücksichtigung. Die vor zwei Jahren gegründete „European Cytogeneticists Association (ECA)“ versucht neben den wissenschaftlichen auch berufspolitische Belange aller mit Zytogenetik befaßten Personen zu vertreten. Eine wesentliche Aufgabe dabei ist die Verbesserung und Vereinheitlichung der zytogenetischen Ausbildung im Europäischen Raum. Ein erster kleiner Schritt dazu ist die Schaffung des „European University Diplomas in Molecular Cytogenetics“. Daneben müssen aber auch auf nationaler Ebene die nötigen politischen, rechtlichen und technischen Voraussetzungen geschaffen werden, um endlich auch auf diesem Gebiet eine allgemein anerkannte Ausbildungsmöglichkeit zu etablieren.

Stellenwert der Zytogenetik in der Medizin

Diese vielen methodischen und technischen Errungenschaften haben dazu geführt, daß sich die Zytogenetik seit Ihren Anfängen vor 43 Jahren in kaum vorhersehbarer und phantastischer Art und Weise weiterentwickelt hat (Hsu 1979). Mit ihren Ergebnissen hat sie nicht nur wesentlich das Fach der Humangenetik bereichert, sondern auch direkt und indirekt zu Fortschritten in vielen anderen Wissensgebieten beigetragen. Viele medizinische Erkenntnisse, welche in einer spezifischen

Diagnostik, verbesserten Patientenbetreuung und auch neuen therapeutischen Ansätzen münden, resultieren aus den Ergebnissen von zytogenetischen Untersuchungen, oft auch von einzelnen Indexpatienten, bei denen eine krankheitsassoziierte Chromosomenanomalie gefunden wurde. Als Beispiele seien die Duchenne'sche Muskeldystrophie und die familiäre Polyposis Coli genannt (Monaco et al. 1985; Herrera et al. 1986). Mit den nachfolgenden Artikeln soll versucht werden, einen Überblick über die vielfältigen Möglichkeiten der Zytogenetik zu geben und den Beitrag, den sie in vielen Bereichen der Medizin zu leisten imstande ist, entsprechend zu würdigen. Es soll demonstriert werden, daß die Zytogenetik aus mehr als den zwei, bereits im Allgemeinbewußtsein verankerten Chromosomenanomalien, der konstitutionellen Trisomie 21 und dem Philadelphia-Chromosom, besteht. Vielleicht gelingt es uns mit unseren Darstellungen auch, die einzigartigen Möglichkeiten der Zytogenetik, welche doch oft als „primitives und überholtes Gegenstück“ der Molekulargenetik angesehen wird, aufzuzeigen. Daneben soll dem Leser aber auch etwas von der Ästhetik, Faszination und Eleganz der konventionellen Zytogenetik und insbesondere auch der vielfältigen FISH-Techniken vermittelt werden.

Literatur

Borgaonkar DS. A catalog of chromosomal variants and anomalies (1997) Vol. ed. Wiley-Liss., New York.

Cremer C, Munkel C, Granzow M, Jauch A, Dietzel S, Eils R, Guan XY, Meltzer PS, Trent JM, Langowski J, Cremer T (1996) Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations. *Mutat Res* 366: 97-116.

Femino AM, Fay FS, Fogarty K, Singer RH (1998) Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science* 280: 585-590.

Heng HH, Tsui LC (1998) High resolution free chromatin/DNA fiber fluorescent in situ hybridization. *J Chromatogr A* 806: 219-229.

Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA (1986) Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 25: 473-476.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chrom Cancer* 10: 231-243.

Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G (1999) Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4494-4499.

Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC (1998) Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet* 19: 225-232.

Mertens F, Johansson B, Hoglund M, Mitelman F (1997) Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* 57: 2765-2780.

Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldridge J, Fischbeck KH, Bartlett R, Pericak-Vance MA, Roses AD, Kunkel LM (1985) Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature* 316: 842-