

# Die molekulare Zytogenetik: Konkurrenz, Ersatz oder Ergänzung der konventionellen Zytogenetik?

Peter Lichter<sup>1</sup>, Michael R. Speicher<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Deutsches Krebsforschungszentrum  
Abteilung Organisation komplexer  
Genome, Heidelberg

<sup>2</sup> Institut für Anthropologie und  
Humangenetik, Ludwig-Maximili-  
ans Universität München

## Zusammenfassung

Die Ansätze und Methoden der Molekularen Zytogenetik haben das Spektrum der in zellulären Präparaten nachzuweisenden chromosomalen Aberrationen erheblich erweitert. Die Sensitivität der Analysen ist gegenüber konventionellen Verfahren häufig erhöht. Viele dieser Methoden stellen eine sinnvolle Ergänzung zur Chromosomen-Bänderung dar, wie z.B. das 24-Farben-Chromosomen-Painting für die Analyse interchromosomal rearrangierter Markerchromosomen. In Fällen, in denen geeignete Metaphase-Zellen nicht präpariert werden können, löst die Interphase-Zytogenetik die Chromosomen-Bänderung mit der zunehmenden Kenntnis über die zu untersuchenden kritischen genomischen Regionen ab. Nettoverlust bzw. -gewinn an chromosomalem Material können über CGH ermittelt werden. Dahingegen bleibt die konventionelle Bänderungsanalyse nach wie vor eine zentrale und meist auch kostengünstigere Standardmethode für viele Fragestellungen der prä- und postnatalen Diagnostik sowie der Analyse von Tumoren mit geeigneten Metaphasezellen. Die Perspektiven mit den neuen Methoden der Padlock-Hybridisierungs-Sonden sowie der Matrix-CGH unter Verwendung von DNA-Chips werden diskutiert.

## Schlüsselwörter

Molekulare Zytogenetik, multiplex-FISH, SKY, Interphase-Zytogenetik, CGH, Padlock-Sonden, DNA-Chips

## Summary

*The molecular cytogenetic approaches and techniques have greatly broadened the spectrum of chromosomal aberrations detectable in cellular preparations. The sensitivity of these methods is often superior compared to conventional procedures. Several of these techniques nicely supplement chromosome banding studies: the analysis of interchromosomally rearranged marker chromosomes by 24 color chromosome painting may serve as an example. In cases where adequate metaphase cells are difficult or impossible to prepare, chromosome banding is being substituted by interphase cytogenetics using FISH, a development paralleled by the increasing knowledge about the critical region(s) to be investigated. Net loss or gain of chromosomal material can be analyzed by CGH. However, conventional banding analysis remains an important and by enlarge cheaper standard method for many diagnostic requests in pre- and postnatal diagnostics as well as in the analysis of tumors with adequate metaphase cells. Perspectives of two new approaches, padlock hybridization probes and matrix-CGH using DNA-Chip-technologies, are discussed.*

## Keywords

*Molecular cytogenetics, multiplex FISH, SKY, interphase cytogenetics, CGH, Padlock-probes, DNA chips*

Die Untersuchung chromosomaler Veränderungen anhand gebänderter Chromosomen ist seit vielen Jahren der Goldstandard der zytogenetischen Diagnostik. Die Methode beruht auf der Präparation von Chromosomen aus mitotischen Zellen, die sich in der Metaphase oder der Prophase der Zellteilung befinden. Die Protokolle sind außerordentlich robust, können jedoch nur von gut trainiertem Personal durchgeführt werden. Die gegenwärtigen Entwicklungen bei der Automatisierung solcher Analysen haben große Fortschritte gemacht. Beispielsweise sind Instrumente kommerziell erhältlich, die ein schnelles automatisiertes Auffinden von Metaphase-Zellen ermöglichen. Dennoch erlauben selbst die besten automatisierten Karyotypisierungsverfahren, die alle auf digitaler Bildanalyse beruhen, keine voll automatisierte Diagnostik: Die „angebotenen“ Karyotypen müssen stets von kompetentem Fachpersonal überprüft und korrigiert werden, so daß die Vorteile dieser „Karyotypisierer“ mehr im Zeitgewinn und in der vereinfachten Speicherung und Archivierung der zytogenetischen Daten liegen.

Die Chromosomen-Bänderung ist ein rein zytologisches Verfahren, dessen Auflösung weitgehend von der Qualität der jeweiligen Chromosomen-Präparation abhängt. Im Gegensatz dazu verbindet die in situ Hybridisierung zytologische und molekulare Informationen: Durch die direkte Sichtbarmachung bereits molekular charakterisierter DNA-Abschnitte in zellulären Präparaten kann das diagnostische Potential signifikant gesteigert

werden. Die Auflösungsgrenze wird dabei nicht nur von der Chromosomen-Präparation, sondern auch von den Eigenschaften der Hybridisierungssonden (Länge, genomische Distanz zu anderen Markern) beeinflusst. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ist aufgrund der hohen Sensitivität, der räumlichen Auflösung der Signale und der Möglichkeit, multiple Sonden zu kombinieren und differentiell in zellulären Präparaten nachzuweisen, besonders populär geworden. Neben den Anwendungen in der Zellbiologie und der Evolutionsforschung, ist die FISH insbesondere für die Diagnose chromosomaler Veränderungen von großer Bedeutung. Im folgenden möchten wir das Potential der verschiedenen diagnostischen FISH-Protokolle im Vergleich zur Chromosomen-Bänderungsanalyse erörtern.

Während numerische Chromosomen-Aberrationen und solche strukturellen Aberrationen, die zur Neukombination größerer chromosomaler Bereiche führen, nach Bänderung mitotischer Chromosomen gut diagnostizierbar sind, ist das Verfahren für eine Reihe anderer Situationen limitiert,

a) da die Information im wesentlichen auf der Untersuchung dunkler und heller Banden basiert, und so chromosomale Umbauten, die zum gleichen Bänderungsmuster führen, nicht erkannt werden können; ein

klassisches Beispiel sind die kryptischen Translokationen telomernaher Banden, die in der genetischen Beratung bei Fällen geistiger Retardierung gefunden wurden;

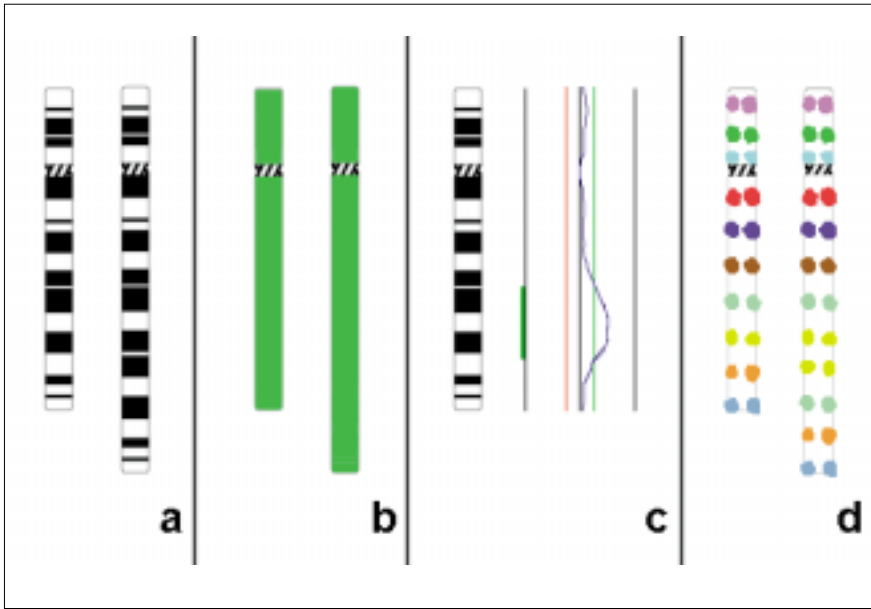
b) da aufgrund der kondensierten Organisation der genomischen DNA in mitotischen Chromosomen mikroskopisch erkennbare Chromosomenbanden mehrere Megabasenpaare DNA enthalten, so daß die Auflösung des Verfahrens je nach Präparation bei 5–10 Mbp liegt und subtile Veränderungen nicht entdeckt werden können; bekannte Beispiele hierfür sind fusionierte Gene bzw. Gensegmente in Tumorzellen, die in der Mehrheit der entsprechenden Tumoren aufgrund der klar erkennbaren Translokations-Chromosomen diagnostizierbar sind (z.B. die bcr-abl-Genfusion bei der t(9;22) in der chronisch myeloischen Leukämie, die durch das aberrante Philadelphia-Chromosom erkannt wird), die aber in einem bestimmten Prozentsatz des jeweiligen Tumortyps nicht mit sichtbaren chromosomalen Veränderungen einhergehen, da das entsprechende Fusionsgen offenbar in einem zu kleinen Chromosomenstück zu liegen kommt.

#### **Von einzelnen FISH Sonden zur 24-Farben Hybridisierung**

Der Siegeszug der FISH für diagnostische Anwendungen begann, als es

erstmalig gelang, komplexe DNA unter Suppression repetitiver DNA-Elemente hochspezifisch zu hybridisieren, und so beispielsweise individuelle Chromosomen mit chromosomen-spezifischen DNA-Pools anzufärben („Painting“) (Carter et al. 1996 und darin enthaltene Referenzen). Schon recht bald wurden Strategien entwickelt, welche die Anzahl der simultan hybridisierten und differentiell nachweisbaren DNA-Sonden erheblich erhöhen. Bei Einsatz weniger Fluorochrome werden die unterschiedlichen Sonden anhand einer spezifischen Kombination der Fluorochrome oder durch unterschiedliche Verhältnisse kombinierter Fluorochrome identifiziert (s. Carter 1996 und darin enthaltene Referenzen). Inzwischen gelang die Realisierung einer 24-Farben-FISH für die simultane Darstellung der 22 Autosomen und der beiden Geschlechtschromosomen des menschlichen Genoms in jeweils unterschiedlichen Farben. Mittlerweile wurden drei Techniken namens multiplex-FISH (M-FISH: Speicher et al. 1996), „Spectral Karyotyping“ (SKY: Schröck et al. 1996) und „COmbined Binary RAtio labelling“ (COBRA: Tanke et al. 1999) publiziert. Diese 24-Farben-FISH-Paints erlauben die Untersuchung des gesamten Chromosomensatzes, insbesondere in Zellen mit zahlreichen komplexen Umbauten, die mit klassischen Bänderungsverfahren nicht mehr vollständig aufgeschlüsselt werden können. Auf diese Weise kann

Anzeige



**Abb 1**  
**Identifizierung einer strukturellen Anomalie mit unterschiedlichen Methoden**

- a) GTG-Bänder zeigen zusätzliche Bänder innerhalb des langen Armes von einem Chromosom 12. Aufgrund des Bandenmusters allein kann nicht entschieden werden, ob es sich um eine inter- oder intrachromosomale Veränderung handelt.
- b) 24-Farben FISH zeigt eine homogene Anfärbung beider, des normalen und des derivativen Chromosoms. Somit liegt eine Duplikation von Chromosom 12 Material vor. Um welchen Abschnitt es sich dabei handelt, kann aber durch die Verwendung der chromosomen-spezifischen DNA-Bibliotheken allein nicht entschieden werden.
- c) CGH erlaubt die exakte Kartierung der überrepräsentierten Region, läßt aber keine Aussage zu, ob eine direkte oder invertierte Duplikation vorliegt. Bei einem Mosaik, das in weniger als 50% Prozent aller Zellen auftritt, wäre das CGH-Profil sogar unauffällig.
- d) Ein Vielfarben-Bar-Code erlaubt die exakte Klassifizierung der intrachromosomalen Aberration (hier: invertierte Duplikation).

die chromosomale Zusammensetzung von Markerchromosomen bestimmt werden. In der Tumorzytogenetik erlauben die 24-Farben-FISH-Prints eine rasche Analyse einer großen Anzahl von Metaphasezellen unabhängig von der Komplexität der Veränderungen. Dies wird nicht nur völlig neue Aussagen zur Klonalität der Tumoren erlauben, sondern könnte auch die Identifizierung neuer, nicht zufällig auftretender Bruchpunkte erleichtern. Bis heute hängen auch diese Analysen allerdings von der Qualität der Chromosomenspreitungen ab. Darüberhinaus gibt es eine Reihe von chromosomalen Veränderungen, die mit Chromosomen-Prints nicht detektierbar sind: intrachromosomale Rearrangements wie para- und perizentrische Inversionen, kleine Insertionen und kleine Duplikationen. Der Nachweis kryptischer Translokationen in telomernahen Bereichen hängt ab von der Qualität der Printing-Proben, die für einige Sonden-Generierungen im Telomerbereich sehr schlecht ist, von dem Kondensationsgrad der Chromosomen und von der Zusammensetzung der Fluorochrome ab.

In vielen diagnostischen Situationen werden 24 Farben nicht immer notwendig sein. Bei einer Anzahl von Fragestellungen ist unser Wissen bereits so umfangreich, daß ein Hybridisierungstest für bestimmte, am Krankheitsgeschehen beteiligte Loci, sinnvoller und wesentlich kostengünstiger ist als ein globaler Screeningtest über das gesamte Genom hinweg.

**Region-spezifische Sonden,**

**Bar-Codes**

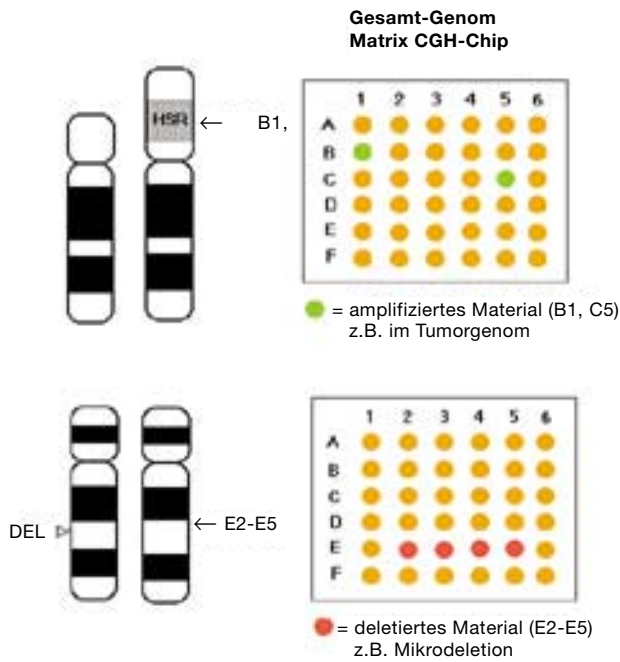
Region-spezifische DNA-Proben erlauben beispielsweise eine sehr viel bessere Diagnose von Bruchereignissen (s.o. Fusionsgene) unabhängig von der Sichtbarkeit chromosomaler Umbauten. Der simultane Einsatz zahlreicher region-spezifischer Sonden in unterschiedlichen Farben wurde in der Vergangenheit mit dem Codierungsprinzip durch Strichmuster verglichen. Deshalb erhielt dieser Ansatz den Namen „chromosomal bar codes“ (Lengauer et al. 1993). Die Anwendung chromosomen-spezifischer Bar-Codes erleichtert die Identifikation von Deletionen oder Duplikationen und die Analyse intrachromosomaler Aberrationen, die mit 24-Farben-FISH-Prints übersehen werden könnten (siehe Abb 1). Bar-Codes können für die optimale Beantwortung bestimmter Fragestellungen zusammengestellt werden. Gegenwärtig möglich sind DNA-Sondensätze für hämatologische Fragestellungen oder für die prä- oder postnatale Diagnostik. Bar-Code Sondensätze sind derzeit nicht kommerziell erhältlich. Bandenspezifische YAC-Klone sind aber über öffentlich zugängliche Datenbanken und Probenkollektionen erhältlich (s. CEPH oder das Ressourcenzentrum des Deutschen Humangenomprojekts).

**Interphase-Zytogenetik**

Ein besonderer Vorteil der FISH ist durch die Möglichkeit gegeben, mit geeigneten Sonden (s. Lichter und Ward 1990) die Diagnose charakteristischer chromosomaler bzw. genomischer Veränderungen an Zellkernen von Interphasezellen vornehmen zu

können. Dieser als Interphase-Zytogenetik bezeichnete Ansatz (Cremer 1986) spielt insbesondere dann eine Rolle,

- a) wenn Metaphasezellen nicht oder nur in unzureichender Qualität zu präparieren sind, wie dies bei vielen soliden Tumoren und bei einigen Leukämien und Lymphomen der Fall ist, bei denen maligne Tumorzellen nur ungenügend über Mitogene stimulierbar sind oder ebenfalls vorhandene nicht-maligne Zellen leichter stimuliert werden;
- b) wenn die Gefahr der Entstehung von sekundären genomischen Veränderungen, die mit in vitro Kulturbedingungen assoziiert sind, vermieden werden soll;
- c) wenn ein „Monitoring“ von residuellen malignen Zellen in Tumorpatienten während und nach einer Therapie durchgeführt werden soll, und hier nicht nur der Nachweis sondern insbesondere die Frequenz der Zellen mit bestimmten tumorassoziierten genomischen Veränderungen eine Rolle spielen; und
- d) wenn die für eine Diagnose notwendige Zeit minimiert werden soll; klassisches Beispiel ist der Nachweis der relativ häufigen Trisomien 13, 18 und 21 in der pränatalen Diagnostik (Lichter et al. 1988), der an Chorionzotten-Biopsiematerial oder in amniotischen Zellen nach Fruchtwasserentnahme möglichst direkt, d.h. ohne Stimulierung und Kultivierung der Zellen, erfolgen



**Abb 2**  
**Schematische Darstellung des Potentials der Matrix-CGH bei Verwendung eines gesamt-genomischen DNA-Chips**

Unterschiedlich markierte Testgenom- (grün) und Kontrollgenom-DNA (rot) werden gemeinsam gegen den Chip hybridisiert; überrepräsentierte Sequenzen (z.B. im Tumortestgenom) erscheinen mehr grün fluoreszierend während unterrepräsentierte Sequenzen rot sind.

soll, um einen eventuell sich daraus ergebenden Schwangerschaftsabbruch möglichst frühzeitig durchführen zu können.

Eine Auswertung der FISH-Experimente erfolgt unter dem Mikroskop über die Anzahl bzw. die räumliche Beziehung der Hybridisierungssignale in einer Serie von mehreren hundert Zellkernen. Da die zu untersuchenden Zellkerne häufig räumlich ausgedehnt sind, müssen die Signale in einer Reihe von Fokusebenen erfaßt werden. In jüngster Zeit entstanden automatisierte Verfahren für die Durchführung solcher Auswertungen von Regionenspezifischen Sonden an gespreiteten Zellen oder Zellkernen. Gegenwärtig wird an automatisierten Auswertverfahren von Chromosomen-Paints in dreidimensional konservierten Zellkernen sowie an Auswertungen von hybridisierten Gewebeschnitten z.B. mittels der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie gearbeitet. Eine dreidimensionale Vielfarben-Einzelzellanalyse könnte in solchen Fällen interessant sein, in denen der mitotische Index sehr niedrig ist und keine oder nur wenige Präparate zur Verfügung stehen.

#### Fiber-FISH

Die schnelle und genaue Kartierung von DNA-Sonden auf Chromosomen mittels FISH (Lichter et al. 1990) wurde in der Genomforschung breit angewendet. Im Zuge der Entwicklung höher auflösender FISH-Kartierungsprotokolle, wurden eine Reihe von Verfahren entwickelt, die auf der Präparation extendierter DNA (Fiber-FISH) beruhen (für Referenzen s. Car-

ter 1996). Die meisten dieser Protokolle haben eine Auflösung von einigen bis einigen hundert Kilobasenpaaren, so daß sie eine hochauflösende Feinkartierung erlauben, indem der Abstand oder der Überlappungsgrad benachbarter DNA-Segmente bestimmt wird. Daneben hat diese Methode sich auch als Standardtest für die Integrität klonierter genomischer DNA-Fragmente (z.B. für die Frage nach intrafragmentarischen Deletionen in YACs) etabliert. In jüngster Zeit konnten diagnostische Anwendungen aufgezeigt werden, bei denen beispielsweise chromosomale Bruchpunktregionen über alternierend gefärbte, benachbarte DNA-Fragmente dargestellt werden und über eine Veränderung dieses Hybridisierungsmusters nicht nur das Bruchereignis sondern das unmittelbar vom Bruchpunkt betroffene Gensegment bestimmt werden kann (Kluin und Schuurin, 1997). Eine solche spezialisierte Bruchpunktanalyse über einen hochauflösenden Bar-Code geht natürlich weit über das Potential einer Chromosomenbänderung hinaus.

#### Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH)

Der Ansatz der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH, engl. Comparative Genomic Hybridization) erlaubt eine umfassende Analyse von Zugewinn beziehungsweise Verlust von chromosomalem Material. Hierbei wird die gesamtgenomische DNA zum Beispiel aus einer zu untersuchenden Tumorzellpopulation auf normale Metaphase-Chromosomen hybridisiert. DNA-Segmente, die im Tumorgenom

über- oder unterrepräsentiert sind, erscheinen dabei als stärkere bzw. schwächere Signale. Diese werden durch Vergleich mit den Signalintensitäten der gleichzeitig hybridisierten, unterschiedlich markierten (normalen) genomischen DNA bestimmt (Kallioniemi et al. 1992, du Manoir et al. 1993). Da das Verfahren unabhängig von der Kultivierung von Tumorzellen oder der Verfügbarkeit geeigneter DNA-Sonden ist, hat es zu einem Boom in der Tumorzytogenetik geführt, im Zuge dessen zahlreiche neue rezurrenente chromosomale Veränderungen gefunden wurden. Insbesondere die hohe Sensitivität für den Nachweis von DNA-Amplifikationen führte zur Identifizierung einer Reihe zuvor nicht diskutierter Gene mit pathogenetischer Relevanz bei bestimmten Tumorentitäten. Die Limitierungen der Methode liegen in der Tatsache, daß nur Nettoverluste oder -gewinne gemessen werden und daher balancierte Aberrationen nicht nachgewiesen werden können. Darüber hinaus können Veränderungen, die nur in einem kleinen Subklon vorkommen, nicht sicher nachgewiesen werden, da die Analyse nicht auf dem Einzelzellniveau erfolgt. In einigen Studien konnte auch gezeigt werden, daß selbst an kleinen, physikalisch angereicherten (z.B. über Mikrodissektion) Zellpopulationen nach Anwendung universeller PCR-Protokolle, selbst an archiviertem Material CGH-Untersuchungen gemacht werden können (s. Speicher et al. 1995). Obwohl mittlerweile leistungsfähige Bildanalyse-systeme erhältlich sind, welche die spezialisierte CGH-Analyse erleichtern, so ist das Verfahren doch technisch sehr

aufwendig und kann nur von gut trainierten Personen durchgeführt werden. Darüber hinaus ist die Auflösung der Methode ähnlich wie bei der Chromosomenbänderung, das heißt einfache Gewinne und Verluste sind erst ab ca. 10 Mbp Größe nachweisbar. Ausnahme bilden hier die in Tumoren auftretenden Genamplifikationen: in Bänderungsanalysen indizieren homogen gefärbte Regionen (HSRs, engl. homogeneously stained regions) oder „double minute“ Chromosomen (DMIN) die Existenz solcher Amplifikationen, ohne jedoch Information über die im Amplikon enthaltenen genomischen Abschnitte liefern zu können. Im Gegensatz dazu wird durch CGH die chromosomale Lokalisation des amplifizierten Bereichs aufgezeigt, so daß das Amplikon sofort auf relativ wenige Kandidatengene eingeschränkt werden kann (Joos et al. 1993). Die bisherigen CGH-Untersuchungen haben ge-

zeigt, daß solche Amplifikationen weit- aus häufiger als erwartet sind und sich nur in der Minderheit der Fälle in HSRs oder DMINs zytogenetisch manifestieren.

#### **Matrix-CGH**

Aufgrund der angesprochenen Limitierungen wurde das CGH-Protokoll bisher nicht Routine-diagnostisch eingesetzt. Das neuentwickelte Verfahren der Matrix-CGH umgeht diese Limitierungen, da sowohl die Auflösung radikal verbessert wird, als auch die Automatisierbarkeit des Verfahrens gegeben ist (Solinas-Toldo et al. 1997). Bei diesem Ansatz werden die Zielchromosomen durch eine Matrix aus geordneten immobilisierten DNA-Fragmenten ersetzt. Durch die Verwendung solcher „Arrays“, können Verluste und Zugewinne mit einer Auflösung von 75–100 kbp nachgewiesen werden, multiple Amplifikationen so-

gar mit einer Auflösung von <40 kbp. Während die Methode gegenwärtig in mehreren Laboratorien optimiert wird, zeigen die bisherigen Anwendungen schon jetzt das Potential der Methode auf. Im wesentlichen werden 3 Typen von DNA-Chips für die Matrix-CGH entstehen:

- a) DNA-Chips, deren Ziel-DNAs genomisch benachbart sind (d.h. aus DNA Contigs) für die Untersuchung von Mikrodeletionen und Überrepräsentationen; so können einerseits pathogenetisch relevante, veränderte Chromosomenregionen eingeeengt und einer positionellen Klonierungsstrategie zugänglich gemacht werden, andererseits können subgenische Mikrodeletionen z.B. bei der Duchenne'schen Muskeldystrophie oder beim DiGeorge-Syndrom analysiert werden.

b) Ein DNA-Chip der repräsentativ für das gesamte menschliche Genom ist, scheint mit dem Fortschreiten des Humangenomprojekts plausibel zu werden; wie in Abb 2 dargestellt, würde ein solcher Chip unmittelbar die genomischen Sequenzen identifizieren, die an Amplifikationen beteiligt oder in Deletionen enthalten sind. Ein solcher Gesamtgenomchip wäre ein ideales Screening-Werkzeug für Mikrodeletionen in der klinischen Genetik, insbesondere für solche Fälle, in denen die chromosomale Bänderung nur ungenügend auflösen kann. Dies ist besonders bei Verdacht auf chromosomale Aberrationen trotz scheinbar normalen Karyotyps von Bedeutung.

c) In der nahen Zukunft ist die Entwicklung von DNA-Chips zu erwarten, deren Design spezifischen kli-

nischen Fragestellungen angepaßt ist. Beispielsweise können die Ziel-DNA-Sequenzen so ausgesucht werden, daß sie alle bekannten, mit einem bestimmten Tumor assoziierten genomischen Gewinne oder Verluste abfragen. Dies ist insbesondere dann von großer Wichtigkeit, wenn die Veränderungen einen prädiktiven Wert besitzen und Therapieentscheidungen beeinflussen. Ein anderes Niveau der Analyse würde durch Chips erreicht, die alle Gene mit onkogenem Potential, beispielsweise alle Protoonkogene und Tumorsuppressorgene für eine standardisierte Analyse menschlicher Tumoren enthalten.

#### **Verbesserte Sensitivität durch „Padlock-Sonden“**

Mit sogenannten „Padlock-Sonden“ ist in jüngster Zeit eine neue Generation von FISH-Sonden entwickelt wor-

den, die in der Lage ist, Unterschiede in Nukleotidsequenzen in nur einer Basenpaarung zu identifizieren (Nilsson et al. 1997). Padlock-Sonden werden so konstruiert, daß die beiden Randabschnitte einer Oligonukleotidkette komplementär zu zwei aufeinanderfolgenden Abschnitten der genomischen Zielsequenz sind. Unter geeigneten Bedingungen hybridisieren die beiden Zielsequenzen an die komplementäre Region im Genom. Die Enden des Oligonukleotids werden so in unmittelbarem Kontakt gebracht. Die Enden der Sonde werden dann durch eine thermostabile Ligase verbunden: es entsteht eine zirkuläre Sonde. Dieser Schritt ist entscheidend für die Spezifität der Reaktion, denn der Unterschied einer einzelnen Base ändert bereits die Konfiguration der DNA und verhindert die Ligation. Aufgrund der helikalen Struktur der DNA umfaßt die zirkuläre Sonde die DNA wie ein Vor-

hängeschloß („Padlock“). Dadurch entsteht eine extrem stabile Struktur, die selbst bei weiteren DNA-Denaturierungen ihre Lokalisation beibehält. Mit einer solchen Methodik kommt ein lange gehegter Traum der Zytogenetiker in den Bereich der Möglichkeit, der zytologische Nachweis kleiner genomischer Veränderungen bis auf das Niveau einzelner Punktmutationen sichtbar zu machen. Damit verbunden ist das Potential, die parentalen Chromosomenregionen unterschiedlich darzustellen. Eine solche Unterscheidung konnte bisher nur bei vorliegenden Größen-Polymorphismen der Heterochromatinblöcke vorgenommen werden. Eine Darstellung von Basenpaarunterschieden würde jedoch eine nahezu beliebige Analyse des parentalen Ursprungs veränderter Chromosomenbereiche erlauben. Diese Möglichkeit spielt sowohl bei der Diagnose von Krankheitsgenen, die dem Imprinting unterliegen, als auch bei der Untersuchung von Tumoren, bei denen bestimmte Allelverluste auftreten, eine wichtige Rolle. Ein beeindruckendes Beispiel der Leistungsfähigkeit der Padlock-Sonden war der Nachweis einzelner Nukleotidveränderungen in einem repetitiven DNA-Element bei verschiedenen Individuen eines Familienstammbaums (Nilsson et al. 1997).

### Konkurrenz, Ersatz oder Ergänzung?

Wie aus dem oben Ausgeführten hervorgeht, ist die im Titel gestellte Frage nur nach der jeweiligen Zielrichtung der zytogenetischen Untersuchung differenziert zu beantworten. Bei manchen Fragestellungen, wie z.B. der Charakterisierung nicht identifizierbarer chromosomaler Regionen in aberranten Karyotypen, stellt Vielfarben-FISH eine sinnvolle Ergänzung zur Chromosomenbänderung dar. Bei der Analyse ausgewählter genomischer Regionen in Tumoren, in denen keine geeigneten Metaphase-Zellen präpariert werden können, ist die Interphase-Zytogenetik der Chromosomen-Bänderung weit überlegen und muß dort als Goldstandard angesehen werden. Weitergehende hochauflösende Bruchpunkt-Untersuchungen durch Fiber-FISH sind eher eine nachgeschaltete Ergänzung. Trotz des Po-

tentials der CGH und des noch größeren Potentials der gerade entstehenden Matrix-CGH-Chips muß bedacht werden, daß nur Nettoverluste und -gewinne nachgewiesen werden. Während diese Methoden ideal zum Screenen nach Genamplifikationen sind, können balancierte Rearrangements nicht erkannt werden. Auch bei der Diskussion über den Einsatz von Matrix-CGH Chips für die pränatale Diagnostik der häufigsten Trisomien darf nicht vergessen werden, daß viele Mosaikfälle sich einer solchen Analyse entziehen würden. Nicht zuletzt wird der Kostenfaktor die Auswahl der zytogenetischen Methode bestimmen. Da konstitutionelle Trisomien in der Bänderungsanalyse leicht identifizierbar sind, wird sich die Anwendung eines teuren Vielfarben-FISH Protokolls oft erübrigen. Sofern sich fetale Zellen jedoch in ausreichendem Maße aus dem mütterlichen Blut gewinnen lassen werden und damit die bisherigen risikoreichen Prozeduren zum Erhalt fetalen Gewebes für die pränatale Diagnostik umgangen werden können, wird eine Interphase-Zytogenetik an den fetalen Zellen neue Bedeutung bekommen und auch einen höheren finanziellen Aufwand der zytogenetischen Diagnostik rechtfertigen.

### Danksagung

Wir möchten uns bei allen Kollegen entschuldigen, die wir aus Platzgründen nicht angemessen zitieren konnten.

### Literatur

Carter NP (1996) Fluorescence in situ hybridization-state of the art. *Bioimaging* 4: 41-51

Cremer T, Landegent J, Brückner A, Scholl HP, Scharidin M, Hager HD, Devilee P, Pearson P, van der Ploeg M (1986) 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* 74: 346-352

du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, and Cremer T (1993) Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90: 590-610

Joos S, Scherthan H, Speicher MR, Schlegel J, Cremer T, Lichter P (1993) Detection of amplified genomic sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Hum Genet* 90: 584-589

Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:

818-821

Kluin PH, Schuurung E (1997) FISH and related techniques in the diagnosis of lymphoma. *Cancer Surv* 30: 3-20

Lengauer C, Speicher MR, Popp S, Jauch A, Taniwaki M, Nagaraja R, Riethman HC, Donis-Keller H, d'Urso M, Schlessinger D, Cremer T (1993) Chromosomal bar codes constructed by fluorescence in situ hybridization with Alu-PCR products of multiple YAC clones. *Hum Mol Genet* 2: 505-512

Lichter P, Cremer T, Tang CC, Watkins PC, Maniatis L, Ward DC (1988) Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9664-9668

Lichter P, Ward DC (1990) Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age? *Nature* 345:93-95

Lichter P, Tang CC, Call K, Hermanson G, Evans GA, Housman D, Ward DC (1990) High resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* 247: 64-69

Nilsson M, Krejci K, Koch J, Kwiatkowski M, Gustavsson P, Landegren U (1997) Padlock probes reveal single-nucleotide differences, parent of origin and in situ distribution of centromeric sequences in human chromosomes 13 and 21. *Nature Genet* 16: 252-255

Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494-497

Speicher MR, Jauch A, Walt H, du Manoir S, Ried T, Jochum W, Sulser T, Cremer T (1995) Correlation of microscopic phenotype with genotype in a formalin-fixed, paraffin-embedded testicular germ cell tumor with universal DNA amplification, comparative genomic hybridization, and interphase cytogenetics. *Am J Pathol* 146: 1332-1340

Speicher MR, Ballard SG, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genet* 12:368-375

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399-407

Tanke HJ, Wiegant J, van Gijlswijk RPM, Bezroukove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk (1999) New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA: COmbined Binary RAtio labelling. *European J Hum Genet* 7:2-11

### Korrespondenzadresse

Dr. Peter Lichter  
Deutsches Krebsforschungszentrum  
Im Neuenheimer Feld 280  
69120 Heidelberg  
Fax 06221-424639  
p.lichter@dkfz-heidelberg.de