

Zukunft der Zytogenetik

In dieser Themenschwerpunktausgabe wird versucht, das breite Feld der Zytogenetik darzustellen. Zytogenetische Analysen sind seit der Entwicklung von Bänderungstechniken durch Lore Zech und Mitarbeiter [2] zu Beginn der 1970er Jahre ein elementarer Eckpfeiler in der humangenetischen Diagnostik. Die traditionellen Bänderungsanalysen werden seit Jahrzehnten ohne wesentliche Änderungen in den jeweiligen Anwendungsprotokollen durchgeführt. Trotzdem hat sich die Zytogenetik in den vergangenen 2 Jahrzehnten durch Einführung immer neuerer Techniken dramatisch und grundlegend geändert. Im Vergleich zu vielen molekulargenetischen Untersuchungen unterscheidet sie sich in 2 wesentlichen Punkten:

1. Viele zytogenetischen Techniken sind in der Lage, das gesamte Genom zu untersuchen (obwohl viele Techniken, sowohl aus dem FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) als jetzt auch im Arraybereich auch nur für bestimmte Regionen eingesetzt werden).
2. Viele dieser Techniken erlauben die Analyse eines Genoms auf Einzelzellniveau, was mit der Mehrheit molekulargenetischer Techniken nicht möglich ist.

Die Beiträge in dieser Ausgabe beschäftigen sich schwerpunktmäßig mit diesen neuen Entwicklungen.

Neue Dimensionen im Bereich des Auflösungsvermögens

Die neuen Techniken, mit denen die Zytogenetik erweitert wurde, hatten das Ziel, das Auflösungsvermögen kontinuierlich zu verbessern. Im ersten Beitrag in dieser Ausgabe von Karsten Held et al. wird eindringlich beschrieben, wie die Einfüh-

rung der Qualitätssicherung in der Zytogenetik die Bänderungsanalysen verbessert hat. Durch diese Maßnahmen wurde zweifellos in vielen Fällen eine Diagnose ermöglicht, die sonst aufgrund mangelnder Präparatequalität nicht hätte gestellt werden können. Andererseits bleibt das Auflösungsvermögen auch von sorgfältig ausgeführten Bänderungsanalysen noch immer im Megabasenbereich, was für viele Fragestellungen wie die Identifizierung von Mikrodeletionen nicht ausreicht.

Aufgrund der Begrenztheit der konventionellen Zytogenetik war es nicht überraschend, dass molekulare Ansätze sehr rasch ihren Einzug in die Zytogenetik fanden. Die „Molekulare Zytogenetik“ bezieht sich im Wesentlichen auf Techniken, die die FISH einsetzen, und diese haben spektakulär die zytogenetischen Einsatzmöglichkeiten erweitert. Mehrere Beiträge in dieser Ausgabe (Schröck et al., Bacher u. Haferlach, Liehr) beschreiben den Einsatz der FISH-Techniken, die heute in der Diagnostik von klinischen Fällen und besonders in der Abarbeitung komplexer chromosomaler Veränderungen nicht mehr wegzudenken sind. Erst mit ihrer Hilfe konnten Regionen des Genoms auch in nicht zyklierenden Zellen, also im inaktiven Interphasekern analysiert werden. Neben neuen diagnostischen Möglichkeiten bahnte diese „Interphasezytogenetik“ [3] den Weg, mehr über die epigenetischen Mechanismen der Genregulation auf der Ebene einer höheren Ordnungsstruktur der Chromatinarchitektur zu erfahren. In einem Artikel von Cremer et al. [3] wird diese wichtige Anwendung diskutiert. Die mit dieser Technik gewonnenen 3D-Analysen stellen in einer besonderen Art und Weise so etwas wie ein Alleinstellungsmerkmal der Zytogenetik dar, da nur

über einen solchen Ansatz die 3D-Struktur des Genoms analysiert werden kann.

Ein weiterer revolutionärer Fortschritt in der molekularen Zytogenetik wurde mit der Etablierung der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) [4, 6] erreicht. Diese Technik wurde entwickelt, um Aussagen über die Kopienzahl verschiedener genomischer Abschnitte in einer Zellpopulation zu machen. In bestimmten Situationen können Zellen einer konventionellen Zytogenetik nicht zugänglich sein, weil sich beispielsweise aus den betreffenden Zellen keine oder nur schwer Metaphasenpräparate herstellen lassen. Ein klassisches Anwendungsbeispiel hierfür ist die Zytogenetik aus Zellen solider Tumoren, da diese nur mit einer relativ aufwändigen technischen Infrastruktur isoliert werden können. Darüber hinaus können während der Kultivierungen Artefakte auftreten. Wie bei anderen zytogenetischen Untersuchungsverfahren auch, gehörte deshalb die Erreichung einer maximalen Auflösung zu den zentralen Forschungsfragestellungen. Da die CGH anfänglich auf Metaphasenpräparaten durchgeführt wurde, lag das Auflösungsvermögen im zytogenetischen Bereich (etwa 10 Mb). Deshalb wurden die Untersuchungen auf Arrayplattformen übertragen [8, 10] mit der Konsequenz, dass ganz neue Dimensionen für die Analyse von Chromosomen oder Genomen erreicht werden konnten. Mehrere Beiträge in dieser Ausgabe beschäftigen sich deshalb mit der Array-CGH: für die klinische Diagnostik (Rauch) als auch im Hinblick auf Anwendungen aus dem Bereich der Charakterisierung von Tumorgenomen (Weber), die aufgrund der deutlich verbesserten Auflösung zahlreiche neue Erkenntnisse gebracht haben.

Welche Bereiche umfasst „Zytogenetik“ heute?

Durch die Übertragung der CGH auf Arrayplattformen wird immer wieder die Frage gestellt, ob Array-CGH überhaupt noch eine zytogenetische oder nicht vielmehr eine molekulare Technik sei. Diesbezüglich ist anzumerken, dass die CGH von Arbeitsgruppen entwickelt wurden, die sich speziell mit molekularer Zytogenetik intensiv beschäftigt hatten [4, 6]. Die Array-CGH wurde von denselben Arbeitsgruppen etabliert [8, 10], sodass diese Techniken aus dem zytogenetischen Bereich kommen. Array-CGH-Resultate beschreiben nicht nur Kopienzahlveränderungen [heute häufig als „copy number variations“ (CNV) bezeichnet], die in einem Genom auftreten können, sondern mit einem nie zuvor da gewesenen Auflösungsvermögen auch die Morphologie von Chromosomen. Deshalb sollte nicht hinterfragt werden, ob Array-CGH überhaupt noch Zytogenetik ist. Die bessere Sichtweise ist wahrscheinlich, dass Array-CGH immer noch Zytogenetik ist, aber das Auflösungsvermögen für die Chromosomenanalyse jetzt molekulare Dimensionen erreicht hat, sodass diese beiden Arbeitsgebiete (Zytogenetik und molekulare Genetik) immer näher zusammenrücken und die traditionelle Abgrenzung zwischen diesen methodischen Bereichen obsolet ist [11].

CNV und Array-CGH: scheinbar unendlich viele neue Fragen

Eine faszinierende Erkenntnis der Array-CGH war, dass offenbar jeder Mensch Deletionen und Duplikationen, z. T. von erheblicher Größe und Gengehalt hat. Der Beitrag von Reinhard Ullmann schildert den diesbezüglichen Wissensstand und macht deutlich, dass wir mit unseren Versuchen, den Einfluss dieser CNV für Phänotypmerkmale und Krankheitsempfänglichkeit zu begreifen, erst am Anfang stehen. Große Konsortien haben sich bereits etabliert, um diese Fragestellungen mit entsprechenden Fallzahlen anzugehen.

Ein weiterer faszinierender Aspekt sind erste Berichte, dass CNV in der Mitose vielleicht nicht stabil weitergegeben werden und Menschen somit eine soma-

tische CNV-Mosaikkonstellation aufweisen könnten [1, 9]. Auch wenn diese ersten Berichte mit Sicherheit noch durch weitere Studien bestätigt werden müssen, sind in diesem Zusammenhang Optionen, die Array-CGH auch auf kleinste Zellmengen oder sogar auf einzelne Zellen nach gleichmäßiger Amplifikation des gesamten Genoms anzuwenden, wie sie in dem Beitrag von Geigl vorgestellt werden, von besonderer Relevanz.

Die Kartierung der CNV beim Menschen und anderen Spezies und die Analyse ihres Einflusses auf Merkmale wird mit Sicherheit noch für viele Jahre ein spannendes Forschungsfeld bleiben, und die Ergebnisse werden eine hohe Relevanz für zahlreiche medizinische Fächer haben.

Ausblick: zukünftige Entwicklungen

Aussterben der konventionellen Bänderungszytogenetik?

Eine zentrale Frage, die immer wieder gestellt wird, ist, ob die Array-CGH die konventionelle Zytogenetik vollständig ersetzen wird. Sie wird mit Sicherheit die Art und Weise der Chromosomenanalyse im klinischen Routinealltag nachhaltig verändern, aber nicht vollständig ersetzen können. Besteht bei einem Neugeborenen beispielsweise der Verdacht auf ein Down-Syndrom, würde die Array-CGH nur in der Lage sein, eine Trisomie 21 zu bestätigen oder auszuschließen. Das Ergebnis würde aber keinen Rückschluss erlauben, ob es sich um eine freie oder um eine Translokationstrisomie handelt, obwohl dies für die Beratung bezüglich des Wiederholungsrisikos eine essenzielle Information darstellt. Bei der Fragestellung „unerfüllter Kinderwunsch“ bzw. „Abklärung mehrerer Aborte“ wird bei dem betroffenen Paar in der Regel eine Chromosomenanalyse durchgeführt, um balancierte Chromosomenbauten auszuschließen. Auch diese würden durch Array-CGH nicht erfasst werden. Somit gibt es bestimmte Fragestellungen, die trotz aller bekannten und unumstrittenen Vorzüge der Array-CGH mit dieser Technik nicht beantwortet werden können, sodass

die konventionelle Zytogenetik bestimmt nicht vollständig aussterben wird.

Array-CGH in der pränatalen Diagnostik?

Eine besonders umstrittene Frage ist, ob die Array-CGH für pränatale Fragestellungen eingesetzt werden sollte. In der pränatalen Diagnostik stehen numerische Veränderungen im Vordergrund, die speziell mit der Array-CGH erfasst werden können. Des Weiteren würde die Array-CGH die Kultivierung der Zellen ersparen, sodass Befunde schneller erstellt werden können. Zurzeit stehen viele dem Einsatz der Array-CGH in der pränatalen Diagnostik sehr kritisch gegenüber, weil noch nicht bekannt ist, in welcher Relation die Kopienveränderungen vieler CNV zu möglichen Erkrankungen stehen. Aus Angst vor Erhebung eines Befunds, der schwer oder nicht interpretierbar ist, wird deshalb die Array-CGH für pränatale Anwendungen von vielen abgelehnt. Diese Argumentation übersieht natürlich, dass auch mittels konventioneller Zytogenetik immer wieder schwer interpretierbare Befunde erhoben werden, wie beispielsweise de novo aufgetretene Translokationen, die mit dem Auflösungsvermögen konventioneller zytogenetischer Techniken balanciert erscheinen. Die Beratung bezüglich eines Fehlbildungsrisikos aufgrund einer scheinbar balancierten Chromosomenkonstellation bezieht sich in der Regel nur auf empirische Daten und ist deshalb mit Sicherheit keine exakte Abschätzung und beunruhigt ein ratsuchendes Paar in vielen Fällen. Es besteht kein Zweifel, dass der Wissensstand bezüglich der Interpretation von Array-CGH-Daten in den kommenden Jahren deutlich zunehmen wird. Wenn dieser Stand ein gewisses Niveau erreicht haben wird, wird sich die Frage des Einsatzes der Array-CGH in der pränatalen Diagnostik neu stellen, und wahrscheinlich wird sie mittel- oder langfristig auch dort ihren Einsatz finden.

Internationale Vernetzung der Zytogenetik

Der „klassische konventionelle Zytogenetiker“ war eine Person mit jahrelanger Erfahrung, die z. T. einen großen Zeit-

aufwand für die Interpretation von Bandenmustern investierte. Kolleginnen oder Kollegen am gleichen Institut wurden zwar häufig zur Befunderstellung mit herangezogen, aber in der Regel erfolgte die Befundinterpretation durch einen kleinen Personenkreis. Mit der Array-CGH haben sich schnell internationale Konsortien gebildet [DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources; <https://decipher.sanger.ac.uk/>), ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of unbalanced Chromosome Aberrations; <http://www.ecaruca.net/>)], in die die Daten eingegeben und verglichen werden können. Der Vorteil ist, dass Bruchpunkte genau bestimmt werden und nicht mehr vom Chromosomenkondensationsgrad, subjektiver Interpretation oder anderen Faktoren abhängen, sodass Daten, die in verschiedenen Labors erhoben werden, jetzt deutlich besser vergleichbar sind. Durch gleichzeitige Eingabe klinischer Parameter kann jetzt eine erheblich verbesserte Korrelation zwischen einem Befund und möglichen Konsequenzen etabliert werden. Diese „Internationalisierung“ der Zytogenetik wird in den kommenden Jahren deutlich zunehmen und dazu führen, dass Labors, die ihre Befunde als „Einzelkämpfer“ erheben, immer seltener werden. Weiterhin wird dies dazu führen, dass die Ergebnisse der Array-CGH leichter interpretierbar werden, weil das Wissen über mögliche Konsequenzen bestimmter CNV kontinuierlich zunehmen wird. Nutznießer werden die Betroffenen und ihre Angehörigen sein, da sich so die Qualität der human-genetischen Beratung verbessern wird.

Zukünftige Arrayplattformen und „next generation sequencing“

Schon jetzt gibt es eine Vielzahl unterschiedlichster Arrayplattformen, die sich in der Größe der Zielregionen [z. B. BAC („bacterial artificial chromosome“), PAC („plant artificial chromosome“) oder Oligoklone] oder bezüglich der Anzahl von Proben auf einem Array z. T. beträchtlich voneinander unterscheiden. So genannte SNP-Arrays ermöglichen neben der Bestimmung von Kopienzahlen auch die Erfassung des Allelstatus, sodass beispiels-

medgen 2008 · 20:349–352 DOI 10.1007/s11825-008-0129-4
© Springer Medizin Verlag 2008

M.R. Speicher

Zukunft der Zytogenetik

Zusammenfassung

Der Themenschwerpunkt dieser Ausgabe der Zeitschrift „Medizinische Genetik“ ist der gegenwärtigen Entwicklung der Zytogenetik gewidmet. Die klassische Bänderungsanalyse, die seit Jahrzehnten in der humangenetischen Routinediagnostik eine zentrale Position einnimmt, wird anhand qualitätssichernder Maßnahmen dargestellt. Verschiedene Beiträge beschreiben die molekulare Zytogenetik, die im Wesentlichen auf der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) beruht. Die Einführung der vergleichenden genomischen Hybridisierung [„comparative genomic hybridization“ (CGH)], speziell auf Arrayplattformen, hat die Zytogenetik revo-

lutioniert und erlaubt die Bearbeitung völlig neuer Fragestellungen. Ein besonderer Schwerpunkt der Zytogenetik, der sie von vielen anderen molekularen Techniken unterscheidet, ist, dass sie Analysen auf Einzelzellniveau ermöglichen. Mit dem vorliegenden Heft wird auch versucht, mögliche zukünftige Entwicklungen der Zytogenetik aufzuzeichnen.

Schlüsselwörter

Bänderungsanalyse · Molekulare Zytogenetik · Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) · „comparative genomic hybridization“ (CGH) · Einzelzellniveau

Future of cytogenetics

Abstract

This issue of the journal „Medizinische Genetik“ emphasizes the current development of cytogenetic technologies. Changes in classical banding analysis, which has been a cornerstone of routine human genetics diagnostics for decades, are illustrated by means of quality assurance measures. Several contributions in this issue describe molecular cytogenetic technologies, which are based on fluorescence in situ hybridization (FISH). The introduction of comparative genomic hybridization, especially on various array platforms, revolutionized cytogenetics even further and now allows researchers to address entirely

new questions and problems in human genetics. An especial stronghold of cytogenetics that distinguishes it from other molecular technologies is the option to perform analyses on a single-cell level. In this issue, possible future developments in cytogenetics are also discussed.

Keywords

Banding analysis · Molecular cytogenetic technologies · Fluorescence in situ hybridization (FISH) · Comparative genomic hybridization · Single-cell level

weise auch uniparentale Disomien erfasst werden können. Welche Arrayplattform sich langfristig für die Routinediagnostik durchsetzen wird, hängt neben rein wirtschaftlichen Gesichtspunkten wie Kosten und Erstattungsmöglichkeiten durch die Krankenkassen sicherlich davon ab, welches Auflösungsvermögen für die Routine überhaupt sinnvoll ist. Da es momentan diesbezüglich keinen Standard gibt, kommen in den verschiedenen Labors die unterschiedlichsten Arrayvarianten zum Einsatz. Im diagnostischen Bereich hätte eine Standardisierung der verwendeten Arrays mit Sicherheit Vorteile und sollte deshalb auch angestrebt werden.

Obwohl die Array-CGH noch eine relativ junge Technik ist, zeichnet sich am Horizont bereits ein neues Technologiespektrum ab, das das Potenzial einer weiteren Revolutionierung hat und evtl. nicht nur die Array-CGH, sondern auch andere molekular-zytogenetische Techniken verdrängen könnte. Gemeint sind verschiedenste, neue Hochdurchsatzsequenzierungsverfahren, die teilweise auch unter dem Begriff des „next generation sequencing“ zusammengefasst werden und ein kürzlich erschienenenes Editorial in Nature bereits zur Frage veranlasste: „The death of microarrays?“ [5]

Diese Techniken könnten in naher Zukunft die rasche Sequenzierung eines gesamten Genoms zu einem Preis von etwa 1000 EUR ermöglichen. Da diese Sequenzierungsverfahren auch quantitative Daten liefern, also Angaben über die Kopienzahl von sämtlichen Regionen im Genom, schließen sie automatisch die Ergebnisse, die mit Array-CGH erhoben werden können, mit ein [7].

Wie schnell sich diese Techniken entwickeln und durchsetzen werden, speziell für Anwendungen in der Routinediagnostik, ist derzeit schwer abzuschätzen, aber dass dieses Methodenspektrum Einzug in die Humangenetik finden wird, ist unbestritten. Dadurch wird sich die humangenetische Diagnostik weiter grundlegend verändern. Trotzdem wird für die Zytogenetik als eine ihr eigene Domäne die besondere Fähigkeit bleiben, Aussagen über den Status des Genoms einzelner Zellen machen zu können. Für dieses Potenzial sind auch die Hochdurchsatzsequenzierungsverfahren keine Konkur-

renz, sodass sich die Zytogenetiker auch zukünftig um ihre Existenz keine Sorgen machen müssen.



M.R. Speicher

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. M.R. Speicher
Institut für Humangenetik,
Medizinische Universität Graz,
Harrachgasse 21/8, A-8010 Graz
Österreich

Literatur

1. Bruder CE, Piotrowski A, Gijsbers AA et al (2008) Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am J Hum Genet* 82:763–771
2. Caspersson T, Zech L, Johansson C (1970) Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Exp Cell Res* 62:490–492
3. Cremer T, Landegent J, Brückner A et al (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 L1.85. *Hum Genet* 74:346–352
4. Kallioniemi A., Kallioniemi OP, Sudar D et al (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818–821
5. Ledford H (2008) The death of microarrays? *Nature* 455:847
6. Manoir S du, Speicher MR, Joos S et al (1993) Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90:590–610
7. Mardis ER (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* 24:133–141
8. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D et al (1998) High resolution analysis of DNA copy number variations using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207–211
9. Piotrowski A, Bruder CE, Andersson R et al (2008) Somatic mosaicism for copy number variation in differentiated human tissues. *Hum Mutat* 29:1118–1124
10. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S et al (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399–407
11. Speicher MR, Carter NP (2005) The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 6:782–792