

medgen 2008 · 20:361–366
 DOI 10.1007/s11825-008-0130-y
 Online publiziert: 13. November 2008
 © Springer Medizin Verlag 2008

E. Schröck · A. Frensel · E. Gerlach · A. Stadler · K. Hackmann · S. Tinschert · W. Werner
 Institut für Klinische Genetik, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität, Dresden

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in der human-genetischen Diagnostik

Technische Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH beruht auf dem komplementären Aufbau der DNA-Doppelhelix. Gezielt hergestellte, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte DNA-Sonden und die chromosomale DNA der Zellen des Patienten werden mittels Hitze einzelsträngig gemacht (■ **Abb. 1**). Im Verlauf der nachfolgenden Rehybridisierung finden komplementäre DNA-Sequenzen zueinander, wodurch sich die (im Überschuss zugegebenen) markierten DNA-Sonden an die Patienten-DNA anlagern (■ **Abb. 1**).

Aufgrund der Errungenschaften des humanen Genomprojekts steht eine Plethora von DNA-Sonden für maßgeschneiderte Experimente zur Verfügung. Neben kommerziell angebotenen Sonden können BAC („bacterial artificial chromosome“), Fosmide und Plasmide mit Inserts menschlicher DNA wie auch die DNA einzeln sortierter Chromosomen mit verschiedenfarbigen Fluoreszenzfarbstoffen direkt markiert werden. In sichtbaren wie auch in nahe ultravioletten und infraroten Wellenlängenbereichen können eine Vielzahl von Farbstoffen genutzt werden. Darüber hinaus werden nichtfluoreszierende Haptene verwendet, die an Nukleotide gekoppelt sind, z. B. Digoxin-dUTP (Digoxindesoxyuraciltriphosphat) oder Biotin-dUTP. Diese Nukleotide werden statt dTTP (Desoxythymidintriphosphat) mittels Nicktranslation oder PCR (Polymerasekettenreaktion)-Methoden in die DNA

der Sonden eingebaut. Nach Anlagerung der komplementären DNA-Sonden an die DNA des Patienten werden Fluoreszenzfarbstoffe an die Haptene gebunden. Diese sind dann, wie die bereits direkt an die DNA gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, im Mikroskop sichtbar.

Die überwiegend automatisierte digitale Bildaufnahme und softwaregestützte Bildbearbeitung gestatten eine zügige Auswertung und Beurteilung der FISH-Ergebnisse. Mit Hilfe von Scanningtechnologien und durch die Nutzung von Softwarepaketen zur Strukturerkennung ist es auch im Routinelabor möglich geworden, Metaphasefinder einzusetzen und die Bildaufnahmen von einer Vielzahl von Interphasekernen zu automatisieren.

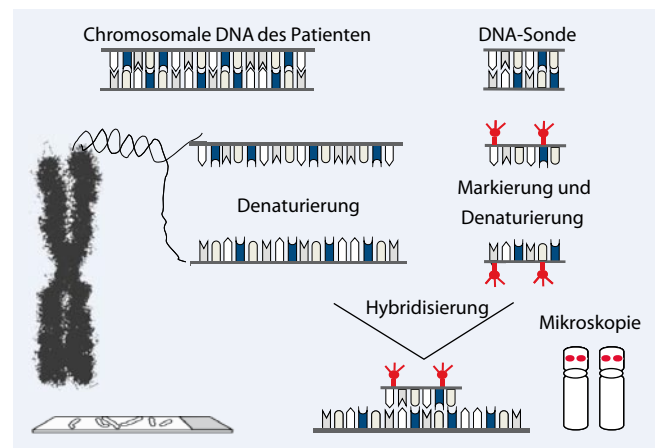
Labors, die FISH-Analysen in der genetischen Diagnostik durchführen (<http://www.hgqn.org>), beteiligen sich an

Ringversuchen zur Qualitätssicherung von Ergebnissen und Befundinterpretationen (vgl. [2] in diesem Heft).

Pränataler FISH-Schnelltest

Der vorgeburtliche Test dient zur schnellen Feststellung einer numerischen Aberration der Chromosomen 13, 18 und 21 sowie X und Y nach Amniozentese, Chorionzottenbiopsie oder Fetalblutpunktion. Die Analyse wird auf Wunsch der werdenden Mutter durchgeführt, wenn ein auffälliger Ultraschallbefund festgestellt wurde und/oder nach auffälligem Ersttrimesterscreening bzw. wenn die Schwangere aufgrund ihres Alters ein erhöhtes Risiko für ein Kind mit einer numerischen Chromosomenaberration aufweist. Innerhalb von wenigen Stunden liegt ein Ergebnis vor (■ **Abb. 2a**, Trisomie 21 bei einem männlichen Fetus).

Abb. 1 ▶ Übersicht über die Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung



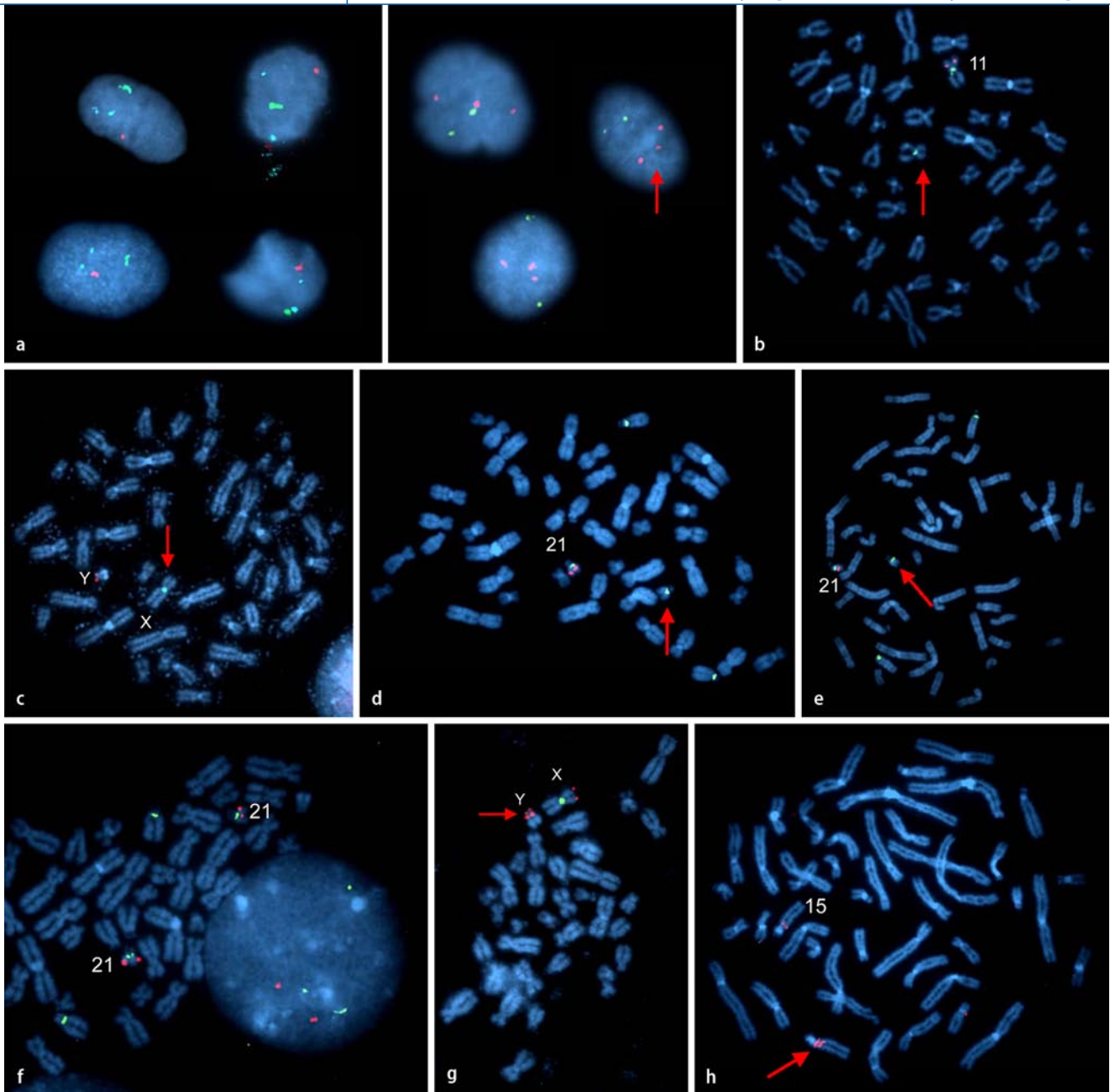


Abb. 2 **a** Trisomie 21 (roter Pfeil) in pränatalem FISH-Schnelltest bei männlichem Fetus, links Signale für Chromosom 18 (hellblau), X (grün), Y (rot), rechts Signale für Chromosom 13 (grün) und 21 (rot), **b** Mikrodeletion 11p13 (roter Pfeil) einschließlich *PAX6*- und *WT1* (Wilms-Tumor)-Gen, grün fluoreszierende Sonde, rot Sonde für die Region 11p13, **c** De-novo-Deletion (etwa 500 kb) des *SHOX*-Gens (roter Pfeil), FISH-Analyse mit rot markierten DNA-Sonden cos34F5 für Exon 1–5 des *SHOX*-Gens in Xp22.33, normale Darstellung der Telomere, der PAR1-Region, des *STS*- und des *KAL1*-Gens auf X-Chromosom (grün markiertes Zentromer), aber auch Nachweis von Zellen mit Duplikation in der PAR1-Region des Y-Chromosoms beim gleichen Patienten (**g**), **d–f** Bestätigung einer familiären Kopienzahlvariation nach Molekularer Karyotypisierung: **d** Deletion von 40 kb auf Chromosom 21 (roter Pfeil) bei phänotypisch auffälligem Kind, Nachweis mit Fosmid G248P87926D3 (DNA-Sonde mit etwa 40 kb Insertgröße), **e** Zellen des Vaters mit ebenfalls vorliegender Deletion (roter Pfeil), **f** Zellen der Mutter mit 2 Signalen (unauffällig), **g** Duplikation in PAR1-Region des Y-Chromosoms (roter Pfeil, cos2.1B, 2,1 Mb entfernt von Ypter) bei Patient mit nachgewiesener *SHOX*-Deletion (**c**), **h** Bestätigung einer partiellen, 6,6 Mb großen Duplikation des Chromosoms 15 (roter Pfeil) mit Hilfe von Fosmiden (rot, WI2-930P19), weitere Erläuterungen s. Text

Parallel zum pränatalen FISH-Schnelltest werden Zellen des Fetus kultiviert, um mittels Chromosomenbänderungsanalyse das Ergebnis des pränatalen FISH-Schnelltests zu verifizieren und zusätzlich

alle Chromosomen strukturell zu beurteilen. Dabei ist es auch möglich, zwischen einer freien Trisomie 21 (häufig) und einer Translokationstrisomie (selten) zu unterscheiden.

Die pränatale Bestimmung numerischer Aberrationen wird seit einiger Zeit auch mit Hilfe der MLPA („multiplex ligation-dependent probe amplification“)- statt der FISH-Technik durchgeführt. In

Einzelfällen ist es möglich, dass ein Mosaikbefund zu einem unklaren MLPA-Ergebnis führt, das dann mit Hilfe der FISH-Analyse gesichert werden kann.

Identifizierung von Mikrodeletionen und -duplikationen

Für mehr als 30 Mikrodeletions- und -duplikationssyndrome sind die phänotypischen Merkmale inzwischen gut bekannt. Der Klinische Genetiker ist dadurch in der Lage, bei einem Menschen mit einem auffälligen Phänotyp eine Verdachtsdiagnose zu stellen, die dann je nach Verfügbarkeit der DNA-Sonden und PCR-Kits entweder mittels FISH- oder MLPA-Technologie abgeklärt wird. So zeigt **Abb. 2b** eine Mikrodeletion 11p13 einschließlich des *PAX6*- und des *WT1*-Gens. Eine De-novo-Deletion des *SHOX*-Gens mit einer Größe von etwa 500 kb ist aus **Abb. 2c** ersichtlich.

Bei nicht einzuordnendem Phänotyp können Mikrodeletionen und -duplikationen durch die hoch auflösende Molekulare Karyotypisierung mittels Arraytechnologie aufgedeckt werden (vgl. [4] in diesem Heft). Dabei kann es sich um De-novo-Aberrationen, aber auch um familiäre Varianten und Kopienzahlpolymorphismen handeln. Neben der molekularen Analyse der Eltern kann der unabhängige Nachweis dieser Chromosomenveränderungen beim Patienten und seinen Eltern entweder mittels quantitativer PCR-Technologie oder mittels FISH-Untersuchungen erfolgen. **Abb. 2d–f** zeigen z. B. eine Deletion von 40 kb auf dem Chromosom 21 des phänotypisch auffälligen Kindes, die mit einem Fosmid (DNA-Sonde mit etwa 40 kb Insertgröße) nachgewiesen wurde. Die Zellen der Mutter (**Abb. 2e**) weisen 2 Signale auf, während nur ein vorhandenes Signal beim phänotypisch unauffälligen Vater eine Deletion wie bei seinem Kind anzeigt (**Abb. 2f**). Die Interpretation des Ergebnisses in Bezug auf die Bedeutung für den Phänotyp des Kindes ist damit jedoch noch nicht möglich. Es besteht einerseits die Möglichkeit, dass die Deletion eine familiäre Normvariante darstellt und eine andere, derzeit unbekanntes Mutations im Genom des Kindes den Phänotyp verursacht. Andererseits ist es aber auch

medgen 2008 · 20:361–366 DOI 10.1007/s11825-008-0130-y
© Springer Medizin Verlag 2008

E. Schröck · A. Frensel · E. Gerlach · A. Stadler · K. Hackmann · S. Tinschert · W. Werner
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in der humangenetischen Diagnostik

Zusammenfassung

Die humangenetische Diagnostik umfasst eine Vielzahl von Verfahren, die sich aufgrund ihrer spezifischen Einsatzbedingungen und Anwendungsmöglichkeiten gegenseitig ergänzen. Mit der stetigen Entwicklung neuer Methoden ist es sinnvoll und notwendig, etablierte Techniken auf den Prüfstand zu stellen. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine Standardmethode in der genetischen Diagnostik und Forschung. Abhängig vom Design der Sonden ist es möglich, ganz individuell DNA-Abschnitte oder auch das gesamte Genom im Fluoreszenzmikroskop in Metaphasechromosomen, in Interphasezellkernen, in Gewebeschnitten oder in lebenden Zellen sichtbar zu machen. Besonders häufig wird die FISH-Technik in der humangenetischen Diagnostik für die Darstellung und Analyse von Mikrodeletionen, Translokationen, Inversionen und Insertionen, also von Strukturaberrationen

der Chromosomen, sowie für die Charakterisierung von Markerchromosomen, zur Kartierung von Chromosomenbruchpunkten und zum Aneuploidiescreening im „pränatalen FISH-Schnelltest“ eingesetzt. Die Stärke der Methode liegt dabei in der Untersuchung einzelner Zellen, sodass auch genetisch heterogene Zellpopulationen (Mosaik) im untersuchten Gewebe mit hoher Sicherheit festgestellt oder ausgeschlossen werden können. Außerdem ist es möglich, die morphologischen und immunologischen Eigenschaften der Zellen bei der Auswertung zu berücksichtigen, sodass genetische Veränderungen bestimmten Zellarten zugeordnet werden können.

Schlüsselwörter

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung · FISH · Genetische Diagnostik · Chromosomenaberrationen · Molekulare Zytogenetik

Fluorescence in situ hybridization in human genetic diagnostics

Abstract

The field of genetic diagnostics incorporates a variety of methods that complement each other. Therefore, the development of new methods calls for a review of the advantages and limitations of established and new technologies. Fluorescence in situ hybridization (FISH) is routinely applied in genetics. Custom-designed and commercially available probes allow for nearly unlimited and targeted visualization of genomic DNA using either metaphase spreads, interphase nuclei, tissue sections, or living cells. FISH applications are particularly important for the detection of structural rearrangements such as microdeletions, translocations, inversions, and in-

sertions, as well as for identification of marker chromosomes, characterization of chromosome breakpoints, and prenatal aneuploidy testing. Furthermore, the analysis of genetic heterogeneity, including mosaicism, is accomplished by evaluating single cells. FISH may also be combined with fluorescent antibodies against cell surface markers and correlated to specific morphologic features of cells and tissues.

Keywords

Fluorescence in situ hybridization · FISH · Genetic diagnostics · Chromosomal aberrations · Molecular cytogenetics

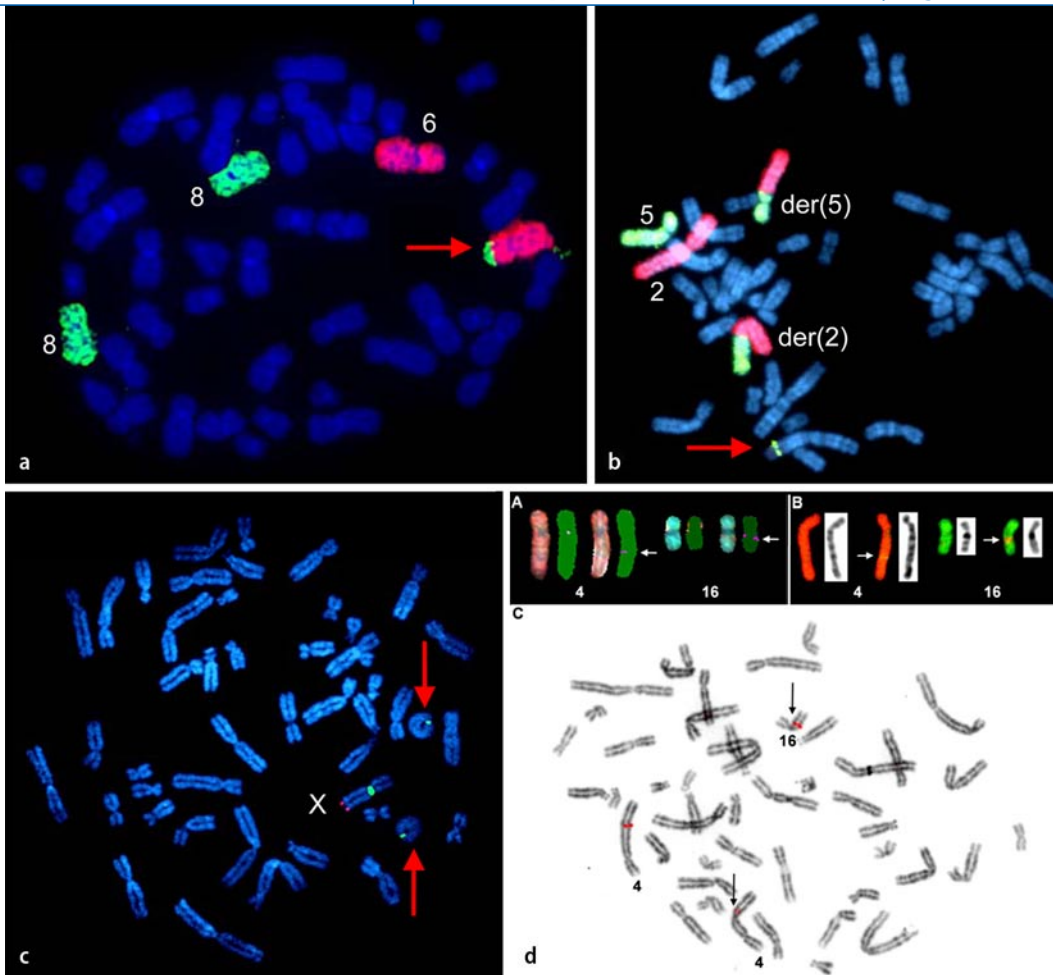


Abb. 3 **a** Unbalancierte Translokation $der(6)t(6;8)$ (roter Pfeil) bei einem Patienten mit in der Chromosomenbänderungsanalyse normalem Karyotyp, aber Nachweis einer partiellen Deletion 6p sowie einer partiellen Duplikation 8q durch Molekulare Karyotypisierung, **b** komplexe Translokation der Chromosomen 2 und 5 mit Insertion eines Bruchstücks von Chromosom 5 in den kurzen Arm von Chromosom 1 (roter Pfeil), **c** Charakterisierung eines Ringchromosoms X (roter Pfeil, in 1 von 38 Metaphasen doppelt vorhanden), Einengung der Bruchpunkte auf p- und q-Arm mit Hilfe der Zentromer- und weiteren spezifischen DNA-Sonden, dadurch Nachweis des Verlusts der Xpter- und der Xqter-Regionen im Ringchromosom, **d** Kartierung von Chromosomenbruchpunkten mittels FISH beim Vater (A SKY-Analyse, B Chromosomenpainting) eines Patienten mit unbalancierter Insertion $ins(16;4)$, Vater zeigt balancierte reziproke Insertion zwischen den Chromosomen 4 und 16, rot BAC-Signale: normales Signal auf Chromosom 4, gesplittetes Signal auf Chromosom 4 und 16 (schwarzer Pfeil), weitere Erläuterungen s. Text

möglich, dass die Deletion beim Kind etwas größer ist als beim Vater oder dass der Vater eine weit schwächere Ausprägung des Phänotyps aufweist. Es werden noch eine Reihe von Studien erforderlich sein, bevor wir die Bedeutung solcher familiärer Kopienzahlvarianten verstehen lernen. Mit Hilfe weiterer umfangreicher Untersuchungen wäre es möglich, die jeweiligen Bruchpunkte in diesem Fall bei Vater und Kind zu charakterisieren.

Die Verifizierung von Duplikationen kleiner als 300 kb ist besonders schwierig und gelingt heute noch nicht in allen Fällen routinemäßig, weder mit FISH- noch mit PCR-Techniken. **Abb. 2g** zeigt ei-

ne Duplikation der PAR₁-Region des Y-Chromosoms des gleichen Patienten mit der *SHOX*-Deletion (**Abb. 2c**) und **Abb. 2h** eine partielle Duplikation des Chromosoms 15. Hier wurden erneut Fosmide eingesetzt, die jeweils nahe der Bruchpunkte einer 6,6 Mb großen Duplikation platziert wurden. Es handelte sich dabei ebenfalls um eine mittels Molekularer Karyotypisierung festgestellte Aberration.

Charakterisierung struktureller Chromosomenaberrationen

Die FISH-Technologie ist insbesondere geeignet, um strukturelle Chromosomenveränderungen aufzudecken. Dies wird in **Abb. 3a** verdeutlicht. Die Molekulare Karyotypisierung zeigte bei einem normalen Ergebnis der Chromosomenbänderungsanalyse eine Deletion im Telomerbereich des kurzen Arms von Chromosom 6 und eine partielle Duplikation des langen Arms von Chromosom 8. DNA-Sonden für die Chromosomen 6 und 8 wurden in einer FISH-Analyse eingesetzt, um die Strukturveränderungen darzustellen.

Dadurch wurde gezeigt, dass der zusätzliche Abschnitt des Telomerbereichs des langen Arms von Chromosom 8 den fehlenden Telomerbereich des kurzen Arms von Chromosom 6 ersetzt. Daraus resultierte ein sehr ähnliches Bandenmuster zwischen 6pter und 8qter, weshalb diese unbalancierte Translokation mittels der Chromosomenbänderungsanalyse nicht erkannt werden konnte.

Die FISH-Technologie ist die Methode der Wahl für die Charakterisierung von strukturellen Chromosomenaberrationen, die nicht mit Kopienzahlveränderungen einhergehen oder zusätzliche Bruchpunkte in anderen Regionen verursachen. In **Abb. 3b** ist eine Translokation der Chromosomen 2 und 5 zu erkennen. Bei diesem Patienten war jedoch zusätzlich ein Bruchstück des Chromosoms 5 in den kurzen Arm von Chromosom 1 inseriert. Demzufolge sind in die Beurteilung der Genotyp-Phänotyp-Beziehungen nicht nur 2, sondern 4 Bruchpunkte und damit weitere Genorte einzu beziehen. Dieser Befund hätte ohne die FISH-Analyse nicht erkannt werden können. Komplexe Chromosomenveränderungen werden aufgrund der verbesserten FISH-Techniken und der großen Menge an verfügbaren DNA-Sonden häufiger als vermutet gefunden.

FISH-Untersuchungen sind auch in der Analyse der Mechanismen der Entstehung von strukturellen Aberrationen unverzichtbar. Als Beispiel sei hier die Untersuchung bei den Eltern von Patienten mit Inversion, Deletion und Duplikation der Telomerregion des kurzen Arms von Chromosom 8 [inv dup del(8p)] genannt. Dabei wurde deutlich, dass die Inversion 8p23 im heterozygoten Zustand in 26% der europäischen und in 39% der japanischen Population zu finden ist [1, 5] und dass dieser Polymorphismus das Risiko für das Auftreten eines derivativen Chromosoms 8 erhöht.

Bestimmung von Markerchromosomen

Mittels Chromosomenbänderungsanalyse nicht zu charakterisierende Markerchromosomen sind ein weiteres typisches Einsatzgebiet für die FISH-Diagnostik. Die Auswirkung auf den Phänotyp ist ab-

hängig von der Struktur des Markerchromosoms und der Größe der enthaltenen kodierenden DNA-Sequenzen, eine sichere Vorhersage kann gegenwärtig in der vorgeburtlichen Diagnostik nicht getroffen werden. Die meisten Markerchromosomen sind sehr klein („small supernumerary marker chromosomes“, sSMC) und dadurch nur mittels FISH oder Molekularer Karyotypisierung zu analysieren. In **Abb. 3c** sind 2 aberrante Ringchromosomen sichtbar, die unter Nutzung einer Zentromer- und weiterer spezifischer DNA-Sonden als Ringchromosomen und der(X) charakterisiert wurden. Der Bruchpunkt im Xp-Arm liegt in Xp22.32 zwischen dem *STS*- und *KAL1*-Gen – dies führt zum Verlust von etwa 7–8 Mb. Bei der Lokalisation des Bruchpunkts im Xq-Arm konnte gezeigt werden, dass die Chromosomenregion Xq28, einschließlich des *MTM1*-, des *L1CAM*-Gens und der pseudoautosomalen Region 2 (PAR2), deletiert ist. Dies führt zum Verlust von minimal 5,3 Mb des Xq-Arms. Die simultane Hybridisierung der Subtelomersonden für den kurzen und langen Arm von Chromosom X ergab, dass auch die Xpter- und die Xqter-Regionen in dem Ringchromosom verloren gegangen waren. Nur eine von 38 untersuchten Metaphasen wies 2 Ringchromosomen auf, alle anderen 37 Metaphasen je eine Kopie des normalen X-Chromosoms und eine Kopie des Ringchromosoms X auf.

Kartierung von Chromosomenbruchpunkten

Für die möglichst genaue Kartierung von Bruchpunkten ist die FISH-Technologie gegenwärtig ebenfalls unverzichtbar.

Beispiel. Bei einem Patienten mit gering ausgeprägter geistiger Entwicklungsverzögerung und nur wenig auffälligem Phänotyp war mit der Chromosomenbänderungsanalyse eine untypische Bande auf dem langen Arm des Chromosoms 16 aufgefallen. Mittels SKY-Analyse wiesen wir beim phänotypisch unauffälligen Vater des Kindes, der das gleiche auffällige Chromosom trug, eine reziproke Insertion zwischen den Chromosomen 4 und 16 nach. Beim Kind ergab sich folgerichtig eine unbalancierte Situation, denn der Va-

ter hatte nur das veränderte Chromosom 16 weitergegeben. Die Molekulare Karyotypisierung mittels BAC-Arrayanalyse bewies eine partielle Deletion des Chromosoms 16 und eine partielle Duplikation des Chromosoms 4. Die 4 Bruchpunkte wurden anschließend mittels FISH-Analysen unter Nutzung von BAC-Sonden bestimmt (**Abb. 3d**). Dazu wurden für alle 4 Bruchpunktregionen jeweils mehrere BAC-Sonden hybridisiert, bis jeweils für einen BAC ein Teil des Signals auf Chromosom 4, der andere auf Chromosom 16 sichtbar war [3].

Ausblick

Die FISH-Technologie hat in der genetischen Diagnostik in den letzten 20 Jahren einen breiten Raum eingenommen. In jüngster Zeit wurden spezielle, auf PCR-Technologien basierende molekulargenetische Techniken und die Arrayanalysen entwickelt, die nun für einen großen Teil der bisher mittels FISH durchgeführten Untersuchungen eingesetzt werden. So wird z. B. die Subtelomer-FISH-Analyse nahezu vollständig durch die Molekulare Karyotypisierung ersetzt, ebenso auch der pränatale FISH-Schnelltest durch MLPA-Analyse.

Dennoch ist zu erwarten, dass es auch in den nächsten Jahren noch eine Vielzahl von Indikationen für FISH-Untersuchungen geben wird, insbesondere für die Aufklärung struktureller und komplexer Chromosomenaberrationen einschließlich der Charakterisierung von Markerchromosomen und die Kartierung von Bruchpunkten bei balancierten Translokationen.

Die faszinierenden Möglichkeiten der immer genaueren Aufklärung der genotypischen Veränderungen durch die Entwicklung der genomweiten Technologien erfordert eine sehr gute Kenntnis der Vorzüge und Grenzen der einzelnen zytogenetischen, molekular-zytogenetischen und molekulargenetischen Methoden. Dadurch wird es möglich, die genetische Diagnostik gezielt im Interesse der Patienten, der Ratsuchenden und ihrer Familien einzusetzen und immer häufiger die genetischen Ursachen der jeweiligen Phänotypveränderungen aufzuklären zu können.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. E. Schröck

Institut für Klinische Genetik,
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus,
Technische Universität Dresden,
Fetscherstraße 74, 01307 Dresden
evelin.schrock@tu-dresden.de

Danksagung. Die hier dargestellten Analysen wurden im Rahmen der Diagnostik an unserem Institut durchgeführt. Für die Zusendung des Patientenmaterials möchten wir uns sehr herzlich bedanken bei Frau Dr. Dipl. Biol. B. Seipel, Bioscientia, Institut für Medizinische Diagnostik GmbH, Ingelheim; Frau Dr. med. S. Ebner, Gemeinschaftspraxis für Gynäkologie und Humangenetik, Regensburg; Frau Dr. med. S. Reif, Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Frau OÄ Dr. med. G. Kamin, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Dresden; Frau Dr. med. A. Pypfer, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Dresden; und den Mitarbeiter/-innen der Genetischen Ambulanz des Instituts für Klinische Genetik, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Dresden.

Literatur

1. Giglio S, Broman KW, Matsumoto N et al. (2001) Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 68: 874–883
2. Held KR, Brandt S, Eiben B (2008) 20 Jahre externe Qualitätssicherung in der Zytogenetik: Langzeitauswirkungen auf die Untersuchungsqualität der teilnehmenden Labors aus Deutschland, Österreich und der Schweiz. *Med Genet* 4
3. Matthaai A, Werner W, Gerlach EM et al. (2005) Small reciprocal insertion detected by spectral karyotyping (SKY) and delimited by array-CGH analysis. *Eur J Med Genet* 48: 328–338
4. Rauch A (2008) Array-CGH in der klinischen Diagnostik. *Med Genet* 4
5. Shimokawa O, Kurosawa K, Ida T et al. (2004) Molecular characterization of inv dup del(8p): analysis of five cases. *Am J Med Genet A* 128: 133–137

Hier steht eine Anzeige.