

Molekularzytogenetische Methoden und Array-Diagnostik in der Pränatalmedizin

Trotz guter nichtinvasiver Screeningmethoden gibt es immer noch eine Reihe von Indikationen, in denen eine invasive pränatale Diagnostik notwendig wird. Üblicherweise werden Chorionzotten, Amniozyten oder Nabelschnurblut im Rahmen der invasiven Diagnostik i. d. R. zunächst zytogenetisch untersucht. Weiterführend stehen verschiedene molekularzytogenetische Methoden zur Verfügung. In dieser Übersicht soll vorgestellt werden, unter welchen Indikationen molekularzytogenetische Methoden in der Pränatalmedizin heute zum Einsatz kommen und wie sich diese Verfahren gegenseitig ergänzen.

Nichtinvasive pränatale Diagnostik

Eine wesentliche Zielsetzung der Pränataldiagnostik ist es, die Zahl der invasiven Eingriffe zahlenmäßig so gering wie möglich zu halten, da jeder invasive Eingriff das Risiko des Verlusts des Fetus in sich trägt. Durch wesentliche Fortschritte bezüglich der Möglichkeiten der (Fein-)Ultraschalluntersuchung (Sonographie) sowie der Untersuchungen von Hormonkonzentrationen im mütterlichen Blut (serologische Untersuchungen), wurde die Anzahl der invasiven fetalen Untersuchungen innerhalb der letzten Jahre um 20% [9] bis 50% (eigene unpubl. Daten 1990–2011) reduziert. Im Rahmen des sog. Ersttrimesterscreenings wurden Ultraschall und Blutuntersuchungen miteinander kombiniert und das individuelle Risiko für eine chromosomale Fehlverteilung errechnet. Dennoch gibt es im-

mer noch eine Reihe von Indikationen, in denen eine invasive pränatale Diagnostik notwendig oder von der Schwangeren gewünscht wird. Zu nennen sind neben auffälliger Sonographie und/oder auffälligem Ersttrimesterscreening immer noch erhöhtes mütterliches Alter sowie besondere Beunruhigung der Schwangeren. Chorionzotten, Amniozyten oder (selten) Nabelschnurblut werden im Rahmen der invasiven Diagnostik i. d. R. zunächst zytogenetisch untersucht. Weiterführende Untersuchungen werden heute routinemäßig angeboten. Neben molekularzytogenetischen Methoden, welche seit Jahren verwendet werden, findet auch die Array-Diagnostik mehr und mehr Einzug in die Pränatalmedizin.

Zu erwähnen ist außerdem der Fokus der Entwicklung im Bereich des „next-generation sequencing“. Diese Sequenzier-technik ermöglicht den Nachweis geringer Mengen fetaler DNA im Blut der Mutter und durch bioinformatische Berechnungen eine Bestimmung der Kopienzahl einzelner Chromosomen. Bislang sind bereits die ersten, vielversprechenden Publikationen für die Chromosomen 13, 18 und 21 veröffentlicht [2, 3].

Molekularzytogenetische Methoden in der Pränatalmedizin

Die molekulare Zytogenetik arbeitet in erster Linie mit der Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Das Prinzip der FISH-Technik beruht auf der Hybridisierung zweier DNA Moleküle. Dabei ist die Sonde fluoreszenzmarkiert und bindet an die DNA der Zellen (Ziel-

DNA) auf einem Objektträger. Es gibt eine Reihe verschiedener Sonden und Sonden-sets, die je nach Fragestellung zum Einsatz kommen können (Übersicht bei [11]). Entsprechend der Fragestellung werden im Folgenden die molekulare Zytogenetik und deren Einsatz in der pränatalen Diagnostik besprochen.

Pränataler Schnelltest

Im Fall einer sonographischen Auffälligkeit und/oder mütterlicher psychischer Indikation ist der Erhalt eines schnellen zytogenetischen Ergebnisses nach Entnahme von kindlichem Gewebe hochgradig indiziert. Sofern keine Chorionbiopsie oder Nabelschnurblutentnahme durchgeführt wurde, ist mit einem entsprechenden Ergebnis erst nach 10–14 Tagen zu rechnen. Der sog. „pränatale Schnelltest“ schafft hier Abhilfe. Unkultivierte Fruchtwasserzellen werden hierbei direkt präpariert und mittels einer FISH-Analyse für die Chromosomen 13, 18, 21, X und Y untersucht; diese Chromosomen sind an den häufigsten numerischen Aberrationen des 2. Trimenons beteiligt. Durch Auswertung von 30–50 Interphasekernen unter dem Fluoreszenzmikroskop können mit über 98%iger Sicherheit Aneuploidien der untersuchten 5 Chromosomen innerhalb von 24 h (oder weniger) ausgeschlossen werden. Die 2%ige Unsicherheit ergibt sich u. a. aus Problemen wie dem möglichen Auftreten von zentromerischen Heteromorphismen, der Unmöglichkeit, partielle von kompletten Trisomien zu unterscheiden, oder einer Mosaikproblematik [15].

Die Deutsche Gesellschaft für Human-genetik war weltweit die erste Fachgesellschaft, die bereits 1998 eine Leitlinie zum „pränatalen Schnelltest (FISH)“ herausgegeben hat [7]. Das FISH-Verfahren wurde inzwischen vielerorts durch das weit kostengünstigere, auf quantitativer Fluoreszenz-Polymerasekettenreaktion (QF-PCR) beruhende, molekulargenetische Verfahren ersetzt, welches die Länge von sog. „short-tandem-repeats“ (STR) auf den zu untersuchenden Chromosomen analysiert. Hierzu ist anzumerken, dass ein kindlicher Karyotyp 45,X unter Verwendung des entsprechenden Markersystems nur eingeschränkt verlässlich nachweisbar ist. Die Wahrscheinlichkeit für eine Fehlansage bei einem normalen weiblichen Genotyp diesbezüglich beträgt 1:907 [6].

Mosaikausschluss

Findet sich in der zytogenetischen Analyse an kindlichem kultiviertem Zellmaterial ein Hinweis auf ein Mosaik, ist die FISH die Methode der Wahl um eine weitere Abklärung vorzunehmen. In der pränatalen Zytogenetik können Einzelzell-/Einzelklonaberrationen auftreten, welche kulturbedingt sind. Hier kann mittels FISH unter Auswahl geeigneter Sonden die numerische oder strukturelle Aberration einfach an einer größeren Zahl an Zellen überprüft werden – je nach Fragestellung können neben Metaphasen auch Interphasekerne für die Auswertung herangezogen werden. Ist eine Interphase-FISH möglich, kann auch das unkultivierte Fruchtwasser für die Klärung der Frage nach einem Kulturartefakt oder einer tatsächlich im kindlichen Gewebe vorliegenden Aberration mit untersucht werden. Beispielsweise brachte dieses Vorgehen bei einem Karyotyp 47,XY,+2[4]/46,XY[16] das Ergebnis, dass in unkultivierten Fruchtwasser keine Zellen mit drei Chromosom-2-zentromerspezifischen Signalen nachgewiesen werden konnten. Somit waren die Zellen mit der Trisomie 2 in der Zellkultur entstanden und reflektierten nicht ein Zellmosaik im werdenden Kind. In der Regel nicht zielführend ist es jedoch, z. B. bei einem Karyotyp 47,XY,+21[17]/46,XY[3] und einem Sonographiebefund, der für

ein Down-Syndrom spricht, noch unkultiviertes Fruchtwasser oder Nabelschnurblut zu untersuchen, denn der Mosaikstatus kann in jedem Körpergewebe anders sein.

Für den Ausschluss/Nachweis einer sog. mütterlichen Kontamination, also dem Vorliegen von mütterlichen Zellen im Punktat, kann die Interphase-FISH an unkultiviertem Fruchtwasser i. d. R. nur dann weiter helfen, wenn sonographisch ein männlicher Fetus vorliegt. In seltenen Ausnahmefällen können auch bekannte Zentromerpolymorphismen u. U. zur Unterscheidung zwischen kindlichen und mütterlichen weiblichen Zellen weiterhelfen.

Mikrodeletionsausschluss

Bei Auftreten eines Herzfehlers beim werdenden Kind wird von den punktierenden Ärzten zunehmend auch die Möglichkeit des Vorliegens von spezifischen Mikrodeletionserkrankungen in Erwägung gezogen. Namentlich wird hier eine Untersuchung zum Ausschluss eines DiGeorge-Syndroms (OMIM #188400), insbesondere in der DGS-I-kritischen Region in 22q11.2, angefragt. Bei sonographischem Verdacht auf eine Epstein-Anomalie ist außerdem der Ausschluss einer Deletion in 1p36 (OMIM #607872) indiziert.

Abklärung von strukturellen Chromosomenaberrationen/Markerchromosomen

Der Nachweis eines mittels Zytogenetik allein nicht aufzuklärenden chromosomalen Umbaus beim werdenden Kind erfordert weiterführende Untersuchungen. Neben der ebenfalls zytogenetischen Elternuntersuchung kann dies bedeuten, dass molekularzytogenetische Methoden zum Einsatz kommen.

Bei strukturellen Umbauten kann eine FISH-Untersuchung Hinweise geben, ob diese balanciert oder unbalanciert sind. Bei elterlich übertragenen strukturellen Umbauten, besonders bei Inversionen, kann mittels FISH u. U. besser eine Inversionsschleifenbildung während der Meiose ausgeschlossen werden [1]. Auch komplexere Translokationsereignisse wie Mehrfachtranslokationen können mögli-

cherweise erst nach Einsatz der FISH erkannt werden [11].

Die FISH ist in jedem Fall die Methode der Wahl, wenn ein kleines überzähliges Markerchromosom („small supernumerary marker chromosome“, sSMC) nachgewiesen wird. Hier stehen neben Chromosomenmikroseizierung und reverser FISH insbesondere Vielfarben-FISH-Verfahren zur Verfügung, mit denen deren chromosomale Herkunft und euchromatischen Anteile nachgewiesen werden können [11, 12, 13]. Es ist anzumerken, dass ~30% der sSMC im Mosaik vorliegen und daher eine Array-CGH-Diagnostik („comparative genomic hybridization“, komparative genomische Hybridisierung) bei sSMC nicht unbedingt zielführend sein muss. Auch können sSMC nur aus Heterochromatin bestehen und mit der Array-CGH daher nicht charakterisierbar sein. Letzteres kann deshalb problematisch sein, da ~5% der sSMC mit einer uniparentalen Disomie (UPD) einhergehen können und hierfür die chromosomale Herkunft auch eines nichteuchromatischen sSMC abgeklärt sein muss.

Grenzen der Methodik

Neben den genannten Vorteilen der FISH – insbesondere die Einzelzellanalyse bei Mosaikkaryotypen – hat die molekulare Zytogenetik auch ihre Grenzen, die man je nach Anwendung kennen und bedenken muss. Beim pränatalen Schnelltest werden Zentromersonden zum Nachweis der Chromosomen 18 (D18Z1), X (DXZ1) und Y (DYZ1) eingesetzt. Die Zielsequenzen dieser Sonden sind in seltenen Fällen heteromorph. Folglich können die Sequenzen in Einzelfällen auf Chromosomen fast völlig fehlen oder auf anderen Chromosomen zusätzlich vorhanden sein, was zu falsch-positiven oder falsch-negativen Resultaten führen kann. Unter anderem deshalb empfehlen die Leitlinien des BVDH mit der GfH, dass Ergebnisse des pränatalen Schnelltests immer nur vorläufigen Charakter haben sollten und nur im Zusammenhang mit dem zytogenetischen Ergebnis endgültig bewertet werden dürfen [16]. Eine Interpretation von Mosaikbefunden und ein Mikrodeletionsausschluss sind bei weiblichen Feten immer dadurch erschwert, dass man eine mütter-

liche Kontamination nur durch eine zusätzliche molekulare Analyse sicher ausschließen kann. Bei strukturellen Chromosomenaberrationen und sSMC kann mittels FISH allein nur in seltenen Fällen eine Chromosomenbruchpunktbestimmung erfolgen. Hierfür ist die Array-CGH-Diagnostik mit ihren hochauflösenden Techniken besser geeignet. Nicht sicher bestimmbar ist mittels FISH in den meisten Fällen auch, ob eine zytogenetisch balanciert erscheinende Aberration auf molekularer Ebene tatsächlich balanciert ist.

Array-Diagnostik in der Pränatalmedizin

Im Jahr 1992 wurde von Kallioniemi et al. [10] eine neue Technik zur Analyse von Chromosomen – die sog. komparative genomische Hybridisierung (CGH) – eingeführt. Dieser technische Fortschritt erlaubt die Analyse aller Chromosomen auf Duplikationen und Deletionen von genomischen Material in einem einzigen Experiment. Hierbei kann auf die sonst häufig kritische und zeitaufwendige Anzucht von Zellen verzichtet werden, da die CGH-Analyse mit isolierter DNA z. B. aus Blut oder Gewebe durchgeführt wird. Die konventionelle CGH basiert auf der gleichzeitigen Hybridisierung von fluoreszenzmarkierter Patienten- (Farbstoff Cy3, grüne Fluoreszenz) und Referenz-DNA (Farbstoff Cy5, rote Fluoreszenz) auf unauffälligen humanen Metaphasechromosomen. Dabei konkurriert die DNA beider Proben um die Bindung an die komplementäre Sequenz. Durch stringentes Waschen wird ungebundene DNA entfernt. Anschließend wird die CGH-Analyse gescannt und bioinformatisch ausgewertet. Durch Quantifizierung und Vergleich der Intensitäten der Fluoreszenzsignale können Deletionen und Duplikationen nachgewiesen werden. Die verhältnismäßig geringe Auflösung von 5–10 Mb und der hohe technische Aufwand verhinderten zunächst den Einzug dieser Technik in die Routinediagnostik.

Erst durch die Entwicklung der Mikroarray-Technik änderte sich dies. Die Metaphasechromosomen wurden ersetzt durch einen Glasträger (Array), auf dem geklonte DNA-Fragmente („bacterial arti-

medgen 2011 · 23:463–468 DOI 10.1007/s11825-011-0308-6
© Springer-Verlag 2011

V. Westrich · T. Liehr

Molekularzytogenetische Methoden und Array-Diagnostik in der Pränatalmedizin

Zusammenfassung

In der pränatalen Diagnostik kommen aktuell neben zytogenetischen Standardverfahren vermehrt molekulare Methoden zum Einsatz. Während die molekulare Zytogenetik im Rahmen der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs(FISH)-Technik seit Jahren routinemäßig in der invasiven vorgeburtlichen Diagnostik eingesetzt wird, wird die Array-Diagnostik gerade erst in dieses Feld eingeführt. FISH wird pränatal meist zur Bestimmung der Größe eines Zellmosaiks, zum Mikrodeletionsausschluss oder zur Abklärung von strukturellen Chromosomenaberrationen durchgeführt. Die Array-CGH („comparative genomic hybridization“, komparative genomische Hybridisierung) wird eher

zurückhaltend verwendet, zumeist zur weiterführenden Abklärung bei sonographisch auffälligen Feten und zur Bruchpunktbestimmung bei zytogenetisch nachgewiesenen chromosomalen Umbauten. In Zukunft wird die Array-CGH sicher noch weiter an Bedeutung gewinnen, stellt aber bereits jetzt schon eine wertvolle Ergänzung zu den diagnostischen Verfahren der Zytogenetik und der bisher verwendeten molekulargenetischen Methoden dar.

Schlüsselwörter

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) · Chromosomen · Zytogenetik · Array-CGH · DNA-Microarrays

Molecular cytogenetic approaches and array diagnostics in prenatal medicine

Abstract

In addition to the widely used cytogenetic standard approaches, molecular methods are being increasingly used in prenatal diagnostics. While molecular cytogenetics, e.g., fluorescence in situ hybridization (FISH), has been used for many years in invasive prenatal diagnostics, array-based diagnostics are only now being implemented in this field. FISH is prenatally applied for determination of size of a mosaic cell clone, for exclusion of a microdeletion, or for further clarification of structural chromosomal aberrations. Array CGH (comparative genomic hybridization) is used more conservatively in prenatal diagnostics, mostly

for further clarification in sonographically abnormal fetuses and to diagnose breakpoints in cases with proven chromosomal changes. In the future, array CGH will gain further importance, but already provides a valuable supplement to the diagnostic approaches of the cytogenetic and the molecular-based methods.

Keywords

Fluorescence in situ hybridization (FISH) · Chromosomes · Cytogenetics · Array comparative genomic hybridization · DNA microarrays

Tab. 1 Einsatzbereiche der einzelnen Methoden – Klassische Zytogenetik, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, BAC-, Oligo- und SNP-Arrays – in der Pränatalen Diagnostik

	Klassische Zytogenetik	FISH	Array		
			BAC-Array	Oligoarray	SNP-Array
Nachweis von Deletionen/ Duplikationen ab...	etwa >5 Mb	etwa 80 Kb	etwa 100 Kb	etwa 30 Kb	etwa 30 Kb
In Abhängigkeit von dem gewählten Array					
Auffälliger Ultraschallbefund	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja
Familiär bekannte Chromosomenveränderungen	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja
Familiär ungeklärte Vorgeschichte von mentaler Retardierung	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja
Weitere Abklärung bei V. a. balancierte Translokation	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
Weitere Abklärung bei V. a. unbalancierte Translokation, genaue Bestimmung der Bruchpunkte	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
Euchromatintragendes Markerchromosom (sSMC)	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Mosaik, i. d. R. bis 30% aberranter Zellanteil	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
LOH/UPD	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja (etwa >5 Mb)

FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; BAC „bacterial artificial chromosome“; SNP „single nucleotide polymorphism“, Einzelbasenpolymorphismen; sSMC „small supernumerary marker chromosome“; LOH „loss of heterozygosity“; UPD uniparentale Disomie.

ficial chromosome“, BAC) von etwa 100–200 kb immobilisiert („gespottet“) wurden [14]. An dem Prinzip der Methode änderte sich nichts. Die Umstellung von Chromosomen auf „gespottete“ DNA-Fragmente führte zu einer schlagartigen Erhöhung der Sensitivität der Methode. In der weiteren Entwicklung wurden die geklonten DNA-Fragmente durch Oligonukleotide ersetzt, dadurch verbesserte sich die Auflösung der Methode noch einmal deutlich. Gleichzeitig wurde ein Verfahren ohne CGH entwickelt, bei dem markierte Patienten-DNA auf einem Oligoarray hybridisiert wird und anschließend die gemessenen Intensitäten gegen die Daten eines größeren Kontrollkollektivs abgeglichen werden. Diese Technik ermöglicht zum einen den Nachweis von Deletionen und Duplikationen zum anderen die Analyse von Einzelbasenpolymorphismen („single nucleotide polymorphism“, SNP) und damit den Nachweis einer UPD. Je nach Wahl der Array-Plattform und des Array-Typs weisen derzeit kommerziell erhältliche BAC-Klon-basierte CGH-Arrays (BAC-Arrays) durchschnittlich eine mittlere Auflösung von 100 Kb bis 1 Mb, oligonukleotidbasier-

te CGH-Arrays (Oligoarrays) und SNP-Arrays eine mittlere Auflösung von etwa 30 Kb und höher auf. Die Nachweisgrenze für LOH („loss of heterozygosity“) beträgt je nach Wahl der Plattform und des Array-Typs 5 Mb und höher.

Anwendungsbereiche und Verfahren

Die Wahl des Arrays ist abhängig von der Fragestellung. Im postnatalen Bereich werden v. a. hochauflösende Oligoarrays verwendet, um chromosomale Imbalancen bei Patienten mit mentaler Retardierung und/oder angeborenen Fehlbildungen bei unauffälliger Karyotypisierung zu diagnostizieren. Für diese Fragestellung ist eine möglichst hohe Auflösung erwünscht; dabei nimmt man in Kauf, dass eine gefundene Imbalance noch nicht charakterisiert und beschrieben wurde und es damit schwer zu interpretieren ist, ob es sich bei der gefundenen Imbalance um eine pathogene Aberration mit klinischen Phänotyp oder um eine benigne Kopienzahlveränderung („copy number variation“, CNV) ohne Krankheitswert handelt [5]. Daher führen die Array-

Analysen oft zu notwendigen Folgeanalysen wie die Untersuchung der Eltern mit einem eigenen Array, spezifischen FISH-Untersuchungen, Real-time-PCR und/oder weiteren Untersuchungsverfahren. Immer wieder bleiben dabei Fälle unklar und der genetische Berater muss ggf. die Ratsuchenden auf einen späteren Zeitpunkt vertrösten, zu dem diese Veränderungen charakterisiert werden. Derzeit bringen die postnatal durchgeführten Array-CGH-Analysen einen diagnostischen Zugewinn von etwa 10–20% im Vergleich zu einer konventionellen Karyotypisierung oder FISH-Untersuchung. Dabei ist die Detektionsrate abhängig von der verwendeten Plattform, dem verwendeten Array und dem untersuchten Kollektiv.

Im pränatalen Bereich wird die Array-Analyse bislang sehr eingeschränkt verwendet. Meist dient diese Technik der weiteren Abklärung bei zytogenetisch nachgewiesenen, balanciert erscheinenden Translokationen und Inversionen. Zunehmend wird die Array-Analyse aber auch bei sonographisch auffälligen Feten, bei Paaren mit bekannter chromosomaler Veränderung und bei Patienten mit familiär ungeklärter Vorgeschichte von mentaler Retardierung oder Entwicklungsverzögerung durchgeführt (■ Tab. 1). Die pränatale Array-Analyse ist sowohl an nativem Fruchtwasser wie auch an kultivierten Amnionzellen innerhalb von 3–5 Tagen möglich. Im Gegensatz zu den Oligoarrays für die postnatale Diagnostik werden bislang im pränatalen Bereich häufiger die BAC-Klon-basierten Arrays verwendet. Diese weisen ein stärker klinisch orientiertes Design mit höherer Auflösung in den krankheitsassoziierten Regionen und geringerer Auflösung in den Regionen benigner CNVs auf. Diese Arrays sind inzwischen gut validiert und bieten leichter zu interpretierende Ergebnisse. In bisherigen Studien beträgt die Detektionsrate von bestätigten, klinisch relevanten Aberrationen 1,3–7,4% und von unklaren Aberrationen 0,6–3,7%. Dabei ist der Vergleich der Studien mit Vorsicht zu betrachten, da die einzelnen Arbeitsgruppen unterschiedliche Parameter verwendet haben [8]. Zunehmend finden mittlerweile auch die Oligoarrays Verwendung in der Pränataldiagnostik, da sie gegenüber den BAC-ba-

sierten Arrays eine deutlich bessere Auflösung und die Möglichkeit der Analyse von sog. SNPs bieten.

In **Abb. 1** ist ein Fallbeispiel dargestellt. Mittels eines BAC-Arrays der Fa. BlueGnome (Cytochip) wurde bei einer Patientin eine etwa 7,2 Mb große Duplikation auf Chromosom 8q24.22-q24.3 sowie eine etwa 2,3 Mb große Deletion auf Chromosom 18q23 nachgewiesen. Diese Veränderungen konnten mittels FISH-Analyse bestätigt werden (**Abb. 2**). Die Untersuchung der Eltern mittels Karyotypisierung und FISH ergab, dass die Mutter balancierte Trägerin einer Translokation (Karyotyp 46,X,t(8,18)(q24.22;q23) ist, die bei ihrer Tochter zur unbalancierten Chromosomenveränderung führte.

Grenzen der Methodik

Neben den genannten Vorteilen der Array-Analyse – insbesondere der Schnelligkeit und der höheren Auflösung gegenüber der klassischen Zytogenetik – hat die Array-Untersuchung auch ihre Grenzen. So können längst nicht alle genetischen Veränderungen, insbesondere diejenigen, die zu einer mentalen Retardierung und Entwicklungsverzögerung führen, mittels Array-CGH-Analyse erkannt werden. Des Weiteren ist die Analyse von Punktmutationen und kleineren Basenveränderungen, die die Ursache vieler monogener Erkrankungen sind – wie z. B. die bei der zystischen Fibrose häufige Mutation F508del – nicht möglich. Ebenso werden balancierte Translokationen und Inversionen sowie weibliche Triploidien nicht entdeckt.

Auch Mosaik sind nur eingeschränkt nachweisbar, und bislang gibt es keine feste Nachweisgrenze. Der geringste bestätigte Mosaikgrad wurde mit einem SNP-Array analysiert und betrug 5% [4]. Dabei ist die Detektionsrate abhängig von der verwendeten Plattform, dem Array-Typ und der Größe der Aberration. Wie bei den postnatalen Fällen stellt der Nachweis bislang noch nicht oder unzureichend beschriebener Aberrationen sowohl bei den BAC- als auch bei den oligobasierten Arrays eine große Herausforderung für das diagnostische Labor und die genetischen Berater dar. Für die Fachärzte für Humangenetik ist es häufig schwer einzuschätzen, welche Konsequenzen die nachgewiesene,

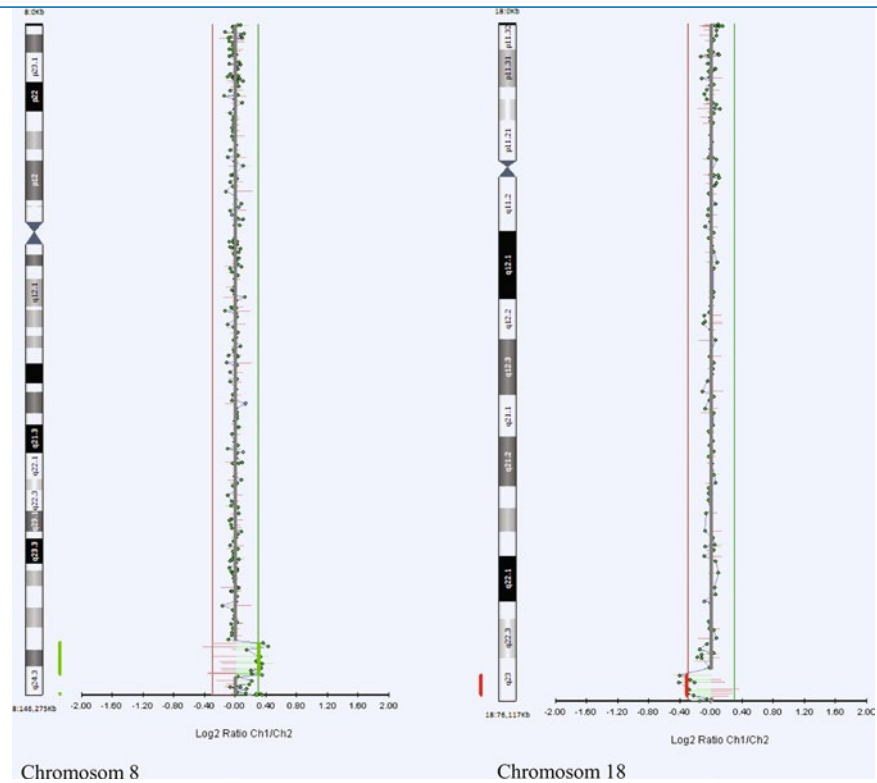


Abb. 1 ▲ Mit einem Cytochip-Array der Fa. BlueGnome konnte eine etwa 7,2 Mb große terminale Duplikation auf Chromosom 8q24.22–8q24.3 (grüner Balken neben der schematischen Chromosomen-darstellung) sowie eine etwa 2,3 Mb große terminale Deletion auf Chromosom 18q23 (roter Balken) nachgewiesen werden. Es liegt eine unbalancierte Translokation mit folgendem Karyotyp vor: 46,X,der(18)t(8,18)(q24.22;q23). Diese Veränderungen wurden mittels FISH Analyse bestätigt (Abb. 2)

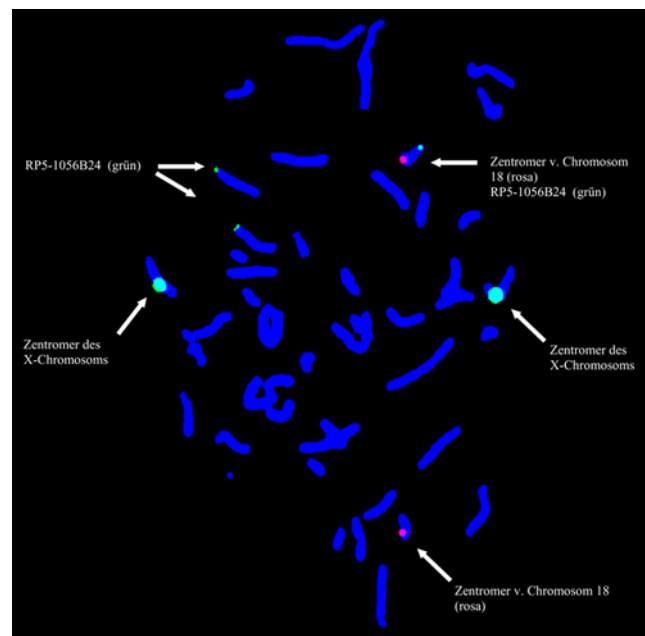


Abb. 2 ▲ Nachweis der unbalancierten Translokation des Kindes aus Abb. 1 mittels FISH. Die großen, grünen Signale markieren das Zentromer der beiden X-Chromosomen. Die rosa Signale markieren die beiden Chromosomen 18. Mit der Sonde RP5–1056B24, die spezifisch den chromosomalen Bereich 8q24.3 bindet und grün markiert ist, werden die 2 Chromosomen 8 nachgewiesen, außerdem findet sich ein zusätzliches Fluoreszenzsignal auf einem Chromosom 18 und weist somit die unbalancierte Translokation nach

nicht beschriebene Veränderung für den Fetus haben wird und welche weitere klinische Betreuung der Patienten notwendig ist. Durch den raschen Zuwachs der in Datenbanken organisierten Informationen über Kopienzahlveränderungen und Beschreibung von klinischen und genetischen Daten verbessert sich die Genotyp-Phänotyp-Korrelation und verringert sich die Anzahl schwer interpretierbarer Ergebnisse zusehends.

Datenbanken

- DECIPHER: <https://decipher.sanger.ac.uk>,
- DGV: <http://projects.tcag.ca/variation/>,
- EARUCA: <http://www.ecaruca.net>,
- 100genome project: <http://www.100genomes.org>.

Fazit für die Praxis

- Nach wie vor stellt die klassische Karyotypisierung bei der invasiven pränatalen Diagnostik den Goldstandard dar, der durch molekularzytogenetische Methoden wie die FISH und Array-Analyse ergänzt wird.
- Dabei liefert die FISH v. a. bei der Diagnostik von Mikrodeletionssyndromen und chromosomalen Mosaiken wertvolle zusätzliche Informationen, da sie punktuell und mit hoher Auflösung einsetzbar ist.
- Für die Verwendung der Array-Techniken gibt es bislang in Deutschland noch keinen gemeinsamen Konsens. Die Array-Analyse wird derzeit in der Pränataldiagnostik v. a. bei unauffälligem Karyotyp und auffälligem Ultraschall angewandt, da die Methode die Analyse des gesamten Genoms in einem Ansatz bei einer bis zu etwa 100-fach verbesserten Auflösung im Vergleich zur zytogenetischen Karyotypisierung analysiert.
- Sowohl die FISH als auch die Array-CGH-Analyse werden zur Bestimmung von Bruchpunkten bei bekannten zytogenetischen Veränderungen verwendet. Die zytogenetische Karyotypisierung, die FISH-Analyse und die Array-Analysen ergänzen sich hervorragend und sollten nicht als Konkurrenten angesehen werden.

Korrespondenzadresse

Dr. V. Westrich
MVZ wagnerstibbe
für Laboratoriumsmedizin, Gynäkologie,
Humangenetik und Pathologie GmbH
Georgstr. 50, 30159 Hannover
viola.westrich@amedes-group.com

Danksagung. Teilweise unterstützt durch die Else Kröner-Fresenius-Stiftung (TL).

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Bhatt S, Moradkhani K, Mrasek K et al (2009) Breakpoint mapping and complete analysis of meiotic segregation patterns in three men heterozygous for paracentric inversions. *Eur J Hum Genet* 17:44–50
2. Chen EZ, Chiu RWK, Sun H et al (2011) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS ONE* 6(7):e21791. doi: 10.1371/journal.pone.0021791
3. Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y et al (2008) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *PNAS* 105:20458–20463
4. Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG et al (2010) Mechanism of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Hum Mol Genet* 19(7):1263–1275
5. Ravel TJL de, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR (2007) What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridization (CGH). *Eur J Pediatr* 166:637–643
6. Donaghue C, Roberts A, Mann K, Ogilvie CM (2003) Development and targeted application of a rapid QF-PCR test for sex chromosome imbalance. *Prenat Diagn* 23:2001–210
7. Eiben B, Claussen U et al (1998) Leitlinien zum „pränatalen Schnelltest (FISH)“ des Berufsverbands Medizinische Genetik e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik e. V. *Med Genet* 10:319
8. Evangelidou P, Sismani C, Ioannides M et al (2010) Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. *Mol Cytogenet* 3:24
9. Hackelöer BJ (2006) Wie notwendig ist invasive Pränataldiagnostik? *Gynakologe* 39:878–882
10. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D et al (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258(5083):818–821
11. Liehr T (2008) Multicolor-fluorescence in situ hybridization – Molecular cytogenetics in nowadays diagnostics and research. *Med Genet* 20:374–378
12. Liehr T (2011) Multicolor FISH literature. <http://www.med.uni-jena.de/fish/mFISH/mFISHlit.htm>. Zugegriffen: 08/2008
13. Liehr T (2011) Small supernumerary marker chromosome (sSMC) homepage. <http://www.med.uni-jena.de/fish/sSMC/00START.htm>
14. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D et al (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20(2):207–211
15. Schröck E, Frensel A, Gerlach E et al (2008) Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung in der humangenetischen Diagnostik. *Med Genet* 20:361–366
16. Weise A, Liehr T (2008) Fluorescence in situ hybridization for prenatal screening of chromosomal aneuploidies. *Expert Rev Mol Diagn* 8:355–357