

medgen 2012 · 24:114–122
DOI 10.1007/s11825-012-0328-x
Online publiziert: 15. Juni 2012
© Springer-Verlag 2012

M. Baudis¹ · M. Giefing^{2,3} · H. Cai¹ · N. Kumar¹ · I. Vater² · J. Richter² · R. Siebert²

¹ Institut für Molekulare Biologie, Universität Zürich

² Institut für Humangenetik, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel & Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

³ Institut für Humangenetik, Polnische Akademie der Wissenschaften, Posen

Array-basierter Nachweis chromosomaler Aberrationen bei malignen Neoplasien

Der Nachweis genetischer Aberrationen gewinnt zunehmend an Bedeutung für die individualisierte Therapie maligner Tumoren. Im Fokus stehen dabei somatische genetische Veränderungen, die während der Tumorentstehung von den Krebszellen erworben wurden und die auf diese beschränkt sind. Zunächst auch als Matrix-CGH bezeichnete Array-CGH (comparative-genomic-hybridization)-Verfahren wurden ursprünglich primär zum Nachweis solcher Aberrationen in Tumoren entwickelt [8, 10]. Im Folgenden sollen die Möglichkeiten und Grenzen heutiger Array-basierter Verfahren zum Nachweis genomischer Imbalancen in Tumoren diskutiert und eine kursorische Übersicht über die Imbalancemuster und deren klinische Bedeutung bei ausgewählten Tumorentitäten gegeben werden.

Methodische Erwägungen zum Einsatz Array-basierter Techniken zum Nachweis chromosomaler Imbalancen bei malignen Neoplasien

Auf die technischen Prinzipien und verschiedenen methodischen Plattformen zum Array-basierten Nachweis chromosomaler Aberrationen wird an anderer Stelle dieses Themenhefts ausführlich eingegangen. Deshalb sollen im Folgenden vorrangig diejenigen methodischen Aspekte diskutiert werden, welche beson-

ders für die Analyse von Tumoren von Bedeutung sind.

Möglichkeiten und Grenzen des Nachweises genetischer Aberrationen in Tumoren mit Array-basierten Verfahren

Die Domäne der Array-basierten Verfahren ist der genomweite und mittel- bis hochauflösende Nachweis chromosomaler Imbalancen, d. h. von Zugewinnen und Verlusten genetischen Materials, in den Tumorzellen. Während die Anwendbarkeit der Methodik auf archivierte bzw. fixierte Gewebe eine prinzipielle Stärke des Verfahrens darstellt, können balancierte Translokationen oder intrachromosomale Rearrangements nur sehr eingeschränkt detektiert werden. Somit entgehen eine Vielzahl klassischer und diagnostisch bedeutsamer chromosomaler Aberrationen der Detektion mit den üblicherweise angewandten Array-Formaten. Das Spektrum reicht hier von der Philadelphia-Translokation t(9;22)(q34;q11) über andere rekurrente Translokationen bei Leukämien und Lymphomen bis hin zu den durch Genome Sequenzierung zunehmend identifizierten balancierten Translokationen bei soliden Tumoren. Solche Aberrationen sind zwar – zumindest bei hämatologischen Neoplasien – i. d. R. durch die tumorzytogenetische Analyse gebänderter Metaphasechromosomen nachweisbar,

die Chromosomenbänderungsanalyse ist aber nicht auf die in der Diagnostik häufig nur zur Verfügung stehenden fixierten Gewebe anwendbar. Deshalb ist eine Kombination Array-basierter Verfahren mit der Interphasezytogenetik im Sinne der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis rekurrenter balancierter Chromosomenveränderungen eine häufig angewandte Variante.

Zu beachtende biologische Besonderheiten bei der Array-basierten Analyse von Tumoren im Vergleich zu Keimbahnanalysen

Maligne Tumoren sind zumeist monoklonale, sich von einer Ursprungszelle ableitende Zellpopulationen. Allerdings können in einem Tumor durchaus mehrere genomisch unterschiedliche Subklone existieren, die aus einem gemeinsamen Ursprungsklon hervorgegangen sind. Ohne Anreicherung der Tumorzellen oder einzelner Tumorzellkompartimente wird bei der Array-basierten Analyse somit primär ein Gemisch von normalen, nichtneoplastischen Zellen und Tumorzellen bzw. Tumorzellsubklonen analysiert. Ist die Anzahl der Zellen mit einer Aberration zu gering, sei es aufgrund eines geringen Tumorzellgehalts des Gewebes oder aufgrund der Beschränkung der Aberration auf einen Subklon, kann diese Veränderung der Detektion entgehen. Macht ein

zu untersuchender Klon weniger als 30–50% des Zellgehalts aus, sollte eine Anreicherung dieser Zellen z. B. per immunologischer Zellsortierung (d. h. „magnetic activated cell sorting“, MACS; „fluorescence-activated cell sorting“, FACS) oder Mikrodissektion erwogen werden. Zudem sollte der Tumorzellgehalt (bzw. Gehalt an Zellen mit einer definierten Aberration) auch in die Interpretation der experimentellen Befunde, z. B. beim Abschätzen der Kopienzahl einer Amplifikation, Eingang finden.

Die klonale Natur der analysierten Zellen muss zudem bei der Interpretation von Kopienzahlvarianten („copy number variants“, CNVs) bedacht werden. Wie auch bei der Analyse von Keimbahn-DNA werden bei der Untersuchung von TumordNA konstitutionelle Kopienzahlvarianten sowohl im Sinne von Polymorphismen als auch von pathogenen Imbalancen detektiert. Diese müssen von somatischen Aberrationen unterschieden werden. Dabei können konstitutionell und somatisch dieselben Genorte deletiert sein, wie z. B. das *SMARCB1*-Gen beim Rhabdoid-Tumor-Prädispositions-Syndrom (RTPS), und sich ggf. das Muster konstitutioneller und somatischer Aberration im Array-Profil addieren.

Darüber hinaus können in der konstitutionellen Analyse als polymorphe CNVs gewertete Aberrationen bei der somatischen Analyse von Tumorzellen diagnostische Bedeutung bekommen. So werden Imbalancen im Bereich der Genorte für T-Zell-Rezeptoren (*TCR*) oder Immunglobuline (*IG*) in der konstitutionellen Analyse i. d. R. als CNV gewertet. Bei der Analyse von Tumoren des lymphatischen Systems haben aber zumeist alle klonalen Zellen dasselbe Rearrangement eines oder mehrerer dieser Genorte, einhergehend mit Verlusten genomischen Materials durch die Rearrangements. Diese Muster können zur Klonalitätsbestätigung, Bruchpunktkartierung und Verkaufskontrolle herangezogen werden [7].

Schließlich muss bedacht werden, dass Tumorzellgenome häufig nicht diploid sind. Bei hyperploiden Genomen führen einfache Zugewinne oder Verluste nicht zu ähnlich starken Ausschlägen der genomischen Profile wie bei diploiden Genomen, was im Kontext des Tumorzell-

medgen 2012 · 24:114–122 DOI 10.1007/s11825-012-0328-x
© Springer-Verlag 2012

M. Baudis · M. Giefing · H. Cai · N. Kumar · I. Vater · J. Richter · R. Siebert
Array-basierter Nachweis chromosomaler Aberrationen bei malignen Neoplasien

Zusammenfassung

Array-basierte Methoden zum Nachweis chromosomaler Imbalancen haben in der vergangenen Dekade zunehmende Bedeutung in der tumorgenetischen Analytik gewonnen. Dabei werden im Wesentlichen auf Array-CGH („comparative genomic hybridization“) und SNP(Single-nucleotide-polymorphism)-Array-basierte Technologien unterschieden, die je nach Fragestellung, Ausgangsmaterial und gewünschter Auflösung Vor- und Nachteile haben. So erlauben SNP-basierte Methoden im Gegensatz zum klassischen Array-CGH-Ansatz den gleichzeitigen Nachweis von chromosomalen Imbalancen und von Verlust der Heterozygotie ohne Veränderung der Kopienzahl („copy-neutral loss of heterozygosity“, CN-LOH). Bei allen Array-basierten Analysen von Tumoren ist zu beachten, dass im

Gegensatz zu den Analysen zum Nachweis konstitutioneller Veränderungen zumeist nicht alle untersuchten Zellen dem neoplastischen Klon oder einem chromosomal aberranten Subklon angehören. Einsatzgebiete von Array-basierten Technologien bei Tumoren sind z. B. die Charakterisierung pathogenetisch relevanter Imbalancen, die Definition von molekularen und klinischen Subgruppen von Tumoren oder die Identifizierung von Targets für eine individualisierte Therapie.

Schlüsselwörter

„Array comparative genomic hybridization“ · Einzelnukleotidpolymorphismus · Verlust der Heterozygotie · Tumorgenetik · Chromosomale Imbalancen

Array-based detection of chromosomal aberrations in malignant neoplasias

Abstract

Over the last decade, array-based methods for the detection of genomic imbalances have gained increasing importance in the field of cancer genetics. With their particular platform-specific advantages and disadvantages, different array comparative genomic hybridization (CGH) and single nucleotide polymorphism (SNP) array-based technologies can be utilized according to the question addressed, the material to be analyzed and the resolution targeted. In contrast to array CGH-based technologies, SNP-based arrays allow the simultaneous detection of copy-neutral loss of heterozygosity in addition to the diagnosis of chromosomal imbalances. In all array-based approaches it should be

borne in mind that tumors are usually a mixture of clonal neoplastic and normal cells and that some aberrations might be subclonal. Applications of array-based imbalance mapping in cancer include the characterization of pathogenetically relevant imbalances, the definition of molecular or clinical subgroups of tumors or the identification of targets for individualized therapy.

Keywords

Array comparative genomic hybridization · Single nucleotide polymorphism · Loss of heterozygosity · Cancer genetics · Chromosomal imbalances

gehalts zusätzlich die Detektion limitieren kann. So führt ein einfacher Zugewinn bzw. Verlust genomischen Materials theoretisch bei 100% Tumorzellgehalt in einem diploiden Tumorgenom zu einer Ratio von 3:2 (also 150%) bzw. 1:2 (also 50%), bei einem tetraploiden Tumorgenom aber nur zu einer Ratio von 5:4 (also 125%) bzw. 3:4 (also 75%). Entsprechend fallen die Profilausschläge im tetraploiden Tumorgenom geringer aus.

Kopienzahlneutraler Verlust der Heterozygotie bzw. partielle uniparentale Disomie in Tumoren

Basierend auf Arbeiten der Gruppe um Bryan Young zu akuten Leukämien ist der Nachweis (partieller) uniparentaler (Iso-) Disomien (pUPD) mittels SNP-sensitiver Array-Technologien in der tumorgenetischen Analyse von diagnostischem Interesse [9]. Im Prinzip geht es hierbei um den Array-basierten Nachweis von Verlusten der Heterozygotie („loss of hetero-

Glossar

(array) CGH: (Array-basierte) „comparative genomic hybridization“/vergleichende genomische Hybridisierung. Als Überbegriff schließen wir dabei auch diejenigen Techniken mit ein, bei welchen lediglich ein Typ von DNA (Tumor oder Referenz) pro Array hybridisiert wird, und der „Vergleich“ mittels bioinformatischer Verfahren zwischen Datensätzen durchgeführt wird.

CNV: „copy number variation“, vererbte Variante in der Kopienanzahl meist kleiner (<1 Mb) genomischer Regionen, welche als rekurrentes Phänomen in der gesunden Population beobachtet wird.

(S)CNA: „(somatic) copy number abnormality“, in der neoplastischen Transformation entstandene regionale genomische Imbalance.

Internetressourcen

- ArrayMap: Oncogenomic array data (<http://www.arraymap.org>)
- Progenetix: Cancer genome data from CGH experiments (<http://www.progenetix.org>)

zygosity“, LOH) ohne eine Deletion, was durch z. B. eine Duplikation des verbleibenden Allels bedingt ist. Auch wenn das Konzept dieses kopienzahlneutralen LOH schon alt und ein bekanntes Prinzip der Tumorsuppressor-Gen-Inaktivierung ist, so hat es durch den Nachweis mittels Array-Technologie im Vergleich zur ursprünglichen Anwendung von Markern für Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) oder für Mikrosatelliten erheblich an Interesse gewonnen. Prinzipiell ist der Nachweis von pUPD/kopienzahlneutralem LOH (beide Begriffe meinen dasselbe) mit allen SNP-basierten Array-Plattformen möglich. Im Optimalfall werden die Allelzustände und Kopienzahl in Keimbahn und Tumorgewebe miteinander verglichen. Solche genomischen Regionen, bei denen SNPs in der Keimbahn heterozygot und im Tumorgewebe homozygot sind, werden entsprechend als LOH bezeichnet; ist die Kopienzahl zudem in beiden Geweben identisch, handelt es sich um kopienzahlneutralen LOH. Liegt keine Analyse korrespondierender Keimbahn-DNA vor, ist auch über die Anwendung bioinformatischer Algorithmen eine Abschätzung möglich, ob eine (langstreckige) Region von pUPD vorliegt. Dazu wird anhand

von Referenzdaten die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass mehrere chromosomal benachbarte SNPs zufällig homozygot sind. Wenn die Zahl der homozygoten SNPs in einem solchen Bereich eine bestimmte Zahl übersteigt und ist dieser genomisch balanciert, ist dies allein aufgrund des Zufalls unwahrscheinlich und es wird eine pUPD detektiert. Allerdings ist hierbei zu bedenken, dass auch konstitutionell solche pUPD-Regionen vorkommen, die insbesondere bei Kindern konsanguiner Eltern durchaus beachtliche Größe annehmen können. Daher werden zumeist allein aufgrund der Analyse von Tumor-DNA keine pUPD-Regionen unter einer Größe von 5 Mb diagnostiziert.

Darüber hinaus ist zu bedenken, dass solche Berechnungen ohne die Analyse der Keimbahn-DNA stark von Laboreffekten, DNA-Qualität und der Auswahl der herangezogenen Kontrollen abhängen kann. Auch Amplifikationen eines Allels können einen LOH ohne Deletion suggerieren, weil das nicht amplifizierte Allel nicht (mehr) ausreichend detektiert wird. Veränderungen der Ploidie schließlich können über Veränderungen der Allelverteilung (z. B. 2:1 bzw. 1:2 bei Triploidie statt 1:1 bei Diploidie) zu analytischen Problemen führen, wobei die Bestimmung der allelspezifischen Kopienzahlen bereits in einigen Analyseprogrammen implementiert ist.

Überlegungen zur Auswahl von Array-Plattformen für die jeweilige Analyse

Die Auswahl der „optimalen“ Array-Plattform für eine geplante tumorgenetische Analyse richtet sich wesentlich nach der zu bearbeitenden Fragestellung, der für diese Fragestellung notwendigen Auflösung und dem verfügbaren Ausgangsmaterial (Abb. 1). Nicht jede Plattform, die in der konstitutionellen Analytik etabliert ist, eignet sich auch für die Untersuchung von Tumoren, weil insbesondere Veränderungen der Ploidie und der tumorinhärente Mosaikstatus (d. h. Mischung von klonalen und nichtneoplastischen Zellen) durch die der Auswertung zugrunde liegenden Algorithmen nicht ausreichend betrachtet werden. Prinzipi-

ell müssen Plattformen ohne (klassische Array-CGH) und mit SNP-Detektion (SNP-Arrays) unterschieden werden, wobei Erstere nur Imbalancen detektieren können, letztere Imbalancen und LOH.

Array-CGH-Plattformen

Für Array-basierte Kopienzahlanalysen von Tumoren finden heute im Wesentlichen Arrays mit langen (>50 bp) Oligonukleotiden (z. B. Agilent, NimbleGen, BlueGnome) bzw. BAC/PAC-Arrays Anwendung (BAC: „bacterial artificial chromosome“; PAC: „P1 artificial chromosome“). Während viele Pionierarbeiten im Bereich der Array-Analyse von Tumoren 3K-BAC/PAC- oder Tiling-BAC/PAC-Arrays quasi als „Standardformat“ verwendeten, ist heute die Zahl der Oligonukleotide und damit die Abdeckung und Auflösung mehr oder minder frei wählbar (Abb. 1, obere drei Kästen; [4, 7]). Zum Teil werden spezifisch Arrays angeboten, die in tumorgenetisch relevanten Regionen eine höhere Zahl von Oligonukleotiden/Klonen haben. Für die hochauflösende Kartierung von fokalen Imbalancen oder Bruchpunkten sind (spezielle) Tiling-Arrays beziehbar [4].

Bei all diesen Ansätzen ist zu bedenken, dass die funktionelle Auflösung der Arrays i. d. R. nicht der physikalischen entspricht, da zumeist die Information mehrerer Oligonukleotide/Klone für den Nachweis einer Imbalance integriert werden muss. Die pure Zahl der Proben auf dem Array oder die Abdeckung bestimmter Regionen sagt somit nicht notwendigerweise etwas über die funktionelle Auflösung aus.

Gerade bei qualitativ limitierter Untersuchungs-DNA, z. B. aus Paraffingewebe oder von mikrodissezierten Zellen, kann die Varianz der Hybridisierungssignale sehr groß sein. Deshalb favorisieren einige Autoren für diese Anwendungen die Nutzung von BAC/PAC-Arrays, da hier die größere Hybridisierungsfläche der BAC/PAC-Klone methodenimmanent für lokale Variationen in der Hybridisierungseffizienz korrigiert. Insgesamt ist somit gerade bei Analysen mit milderer DNA-Qualität die funktionelle Auflösung wesentlich und sollte im Vorfeld experimentell z. B. an Normalgeweben ähnlichen Ursprungs und identischer

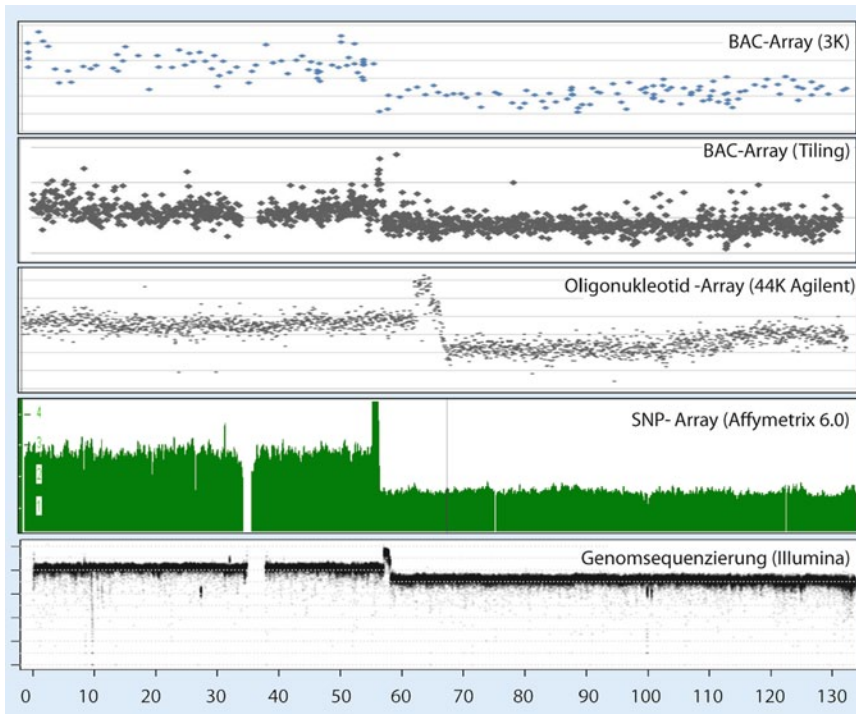


Abb. 1 ▲ Imbalancemuster des Chromosoms 12 der Hodgkin-Lymphom-Zell-Linie L1236, analysiert auf verschiedenen Plattformen in der historischen Entwicklung. Die Anordnung der Proben (X-Achse) entspricht in den verschiedenen Analysen nicht notwendigerweise der physikalischen Position bzw. basiert auf verschiedenen Genomversionen. Dies erklärt die nicht immer identisch erscheinende Position der Imbalancen in den Darstellungen

Aufarbeitung bestimmt werden. Dabei ist auch die Qualität der eingesetzten Kontroll-DNA zu berücksichtigen. Wenn diese anders extrahiert oder markiert wurde, kann dies zu erheblichen Änderungen der Profile führen z. B. in GC(Guanin-Cytosin)-reichen Regionen. Zumeist ist es empfehlenswert, die Kontroll-DNA identisch wie die Tumor-DNA zu präparieren.

SNP-Array-Plattformen

Für die Array-basierte Detektion von SNPs wurden inzwischen eine Reihe verschiedener Techniken entwickelt (■ **Abb. 1**, vierter Kasten). Sie sind sämtlich in der Lage, zuverlässig auch Imbalancen zumindest in hochmolekularer DNA zu identifizieren, wobei die zugrundeliegenden Algorithmen sich bis hin zur Generierung der zur Berechnung notwendigen Kontrolldaten deutlich unterscheiden. Aus Platzgründen kann hier nicht detailliert auf alle Aspekte eingegangen werden.

Eigene Erfahrungen zeigen, dass die Restriktionsverdau-basierten Zweifarbhybridisierungen auf lange Oligonukleo-

tidarrays (z. B. Agilent) insbesondere bei hyperploiden Klonen und DNA aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben (FFPE-Geweben) deutliche Limitationen in der tumorgenetischen Analyse zeigen. Kurze (<30 bp) Oligonukleotidarrays (Affymetrix) werden breit angewandt und sind sowohl zur Kopienzahl- als auch LOH-Bestimmung an qualitativ ausreichender DNA gut geeignet. Da es sich hierbei um eine Einfarbhybridisierung handelt, ist die Verfügbarkeit eines laborinternen Kontrolldatensatzes zur Berechnung von Veränderungen nach unseren Erfahrungen sehr hilfreich zur Verbesserung der funktionellen Auflösung, auch wenn prinzipiell zahlreiche Algorithmen ohne diese laborinternen Kontrollen angewandt werden können.

Inter-Labor-Vergleiche zeigen eine z. T. erhebliche technische Varianz, z. B. bedingt durch unterschiedliche Amplifikationseffizienzen im Markierungsprotokoll; diese haben aber bei entsprechender bioinformatischer Prozessierung und laborinternen Kontrollen z. T. wenig Einfluss auf die biologische Interpretation.

Die Anwendung dieser Arrays auf FFPE-Material ist nur in sehr wenigen Publikationen dokumentiert und nach eigenen Erfahrungen nur in einzelnen Fällen informativ.

Auch die BeadArray-Technologie (Illumina) findet zunehmend Anwendung für die molekulare Karyotypisierung von Tumoren. Die Analyse von FFPE-Material scheint hiermit ebenfalls möglich. Erst kürzlich wurden Arrays eingeführt, die spezifisch für die Analyse von FFPE-Material sind und auf der Anwendung von „molecular inversion probes“ (MIP-Arrays) basieren, aber bislang nur als Custom-Service verfügbar sind (Affymetrix). Die Konkordanz mit langen Oligonukleotidarrays zur Bestimmung von genomischen Imbalancen ist nach eigenen Erfahrungen gut. Aus prinzipiellen Erwägungen ist die gleichzeitige Detektion von Imbalancen und LOH bei Tumoren den reinen Kopienzahl-Arrays überlegen. Allerdings ist die Anwendung von SNP-Arrays auf FFPE-Material und DNA aus mikrodisszierten Zellen schwieriger als aus Frischmaterial, aber dennoch zunehmend möglich.

Anwendungen des Array-basierten Nachweises genomischer Imbalancen bei malignen Neoplasien

Die Analyse von Tumoren war historisch der Ausgangspunkt für die Entwicklung Matrix- bzw. Array-basierter Methoden zum genomweiten Nachweis chromosomaler Imbalancen durch die Arbeitsgruppen von Peter Lichter bzw. Dan Pinkel [8, 10]. Inzwischen sind Datensätze von über 42.000 Array-basierten Analysen in Tumoren verfügbar (<http://www.arraymap.org>; [2, 3]). Das Spektrum der Anwendungen und Fragestellungen ist breit. Im Folgenden seien einige Beispiele genannt

Charakterisierung pathogenetisch relevanter Imbalancen

Durch die Analyse fokaler, d. h. in der physikalischen Größe begrenzter Zugewinne und Verluste wurden in den vergangenen Jahren eine Reihe von Kandidatengen identifiziert, die in die Pathogenese bestimmter Tumorentitäten invol-

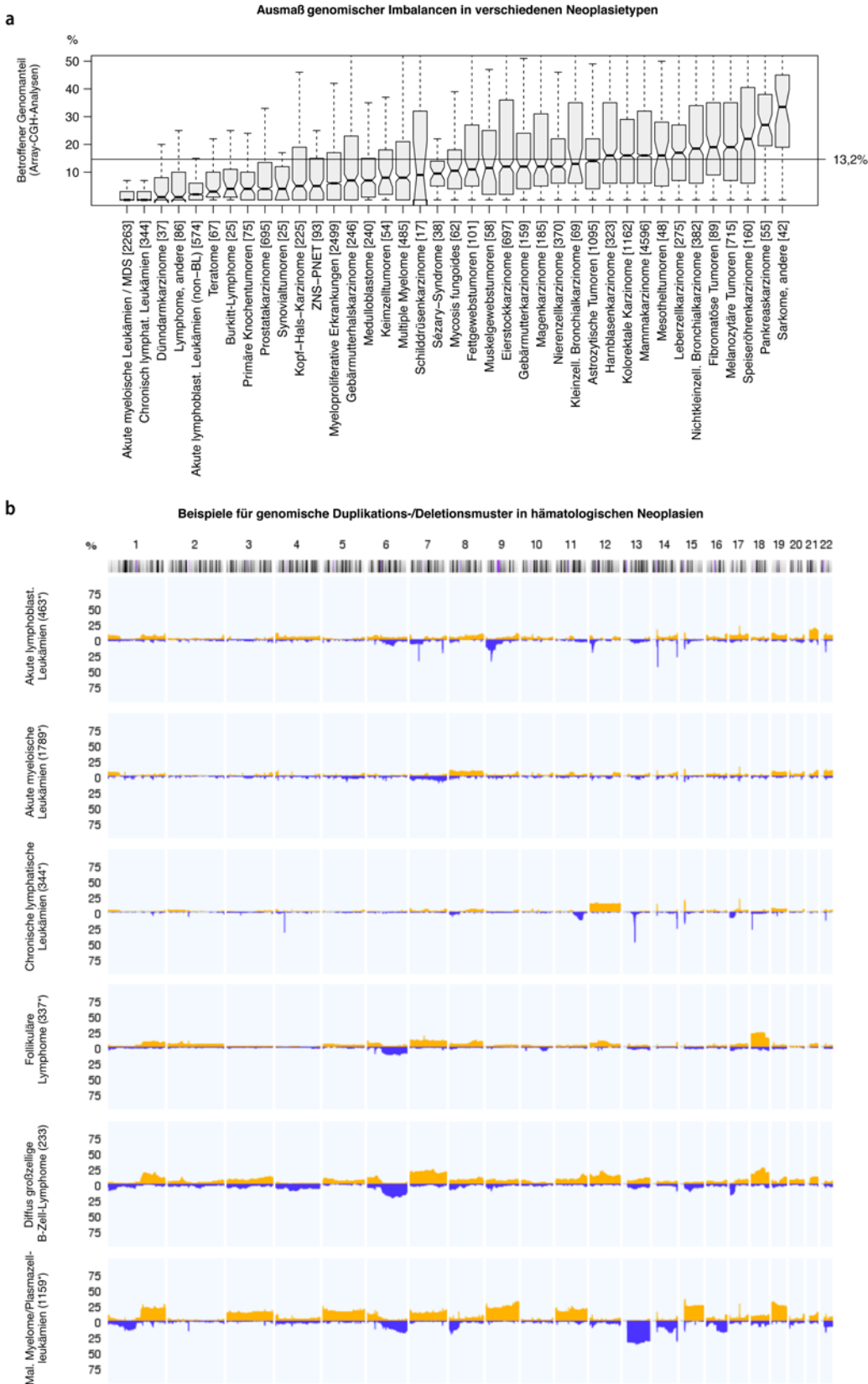


Abb. 2 **a** Komplexität genomischer Imbalancen bei verschiedenen Neoplasien, dargestellt durch von Imbalancen betroffenen Anteil der jeweiligen Tumorgenome. Die *horizontale Linie* zeigt den aus allen Arrays ermittelten Durchschnittswert (13,2%). Die Boxplotgrafik beruht auf einer Bestimmung der von Imbalancen betroffenen Regionen verschiedener Tumorentitäten, basierend auf 22.699 qualitätskontrollierten genomischen Arrays des arrayMap-Projekts (<http://www.arraymap.org>). Diese Daten wurden auch für die folgenden Abbildungen genomischer Imbalanceprofile verwendet. Die *Zahlen in Klammern*

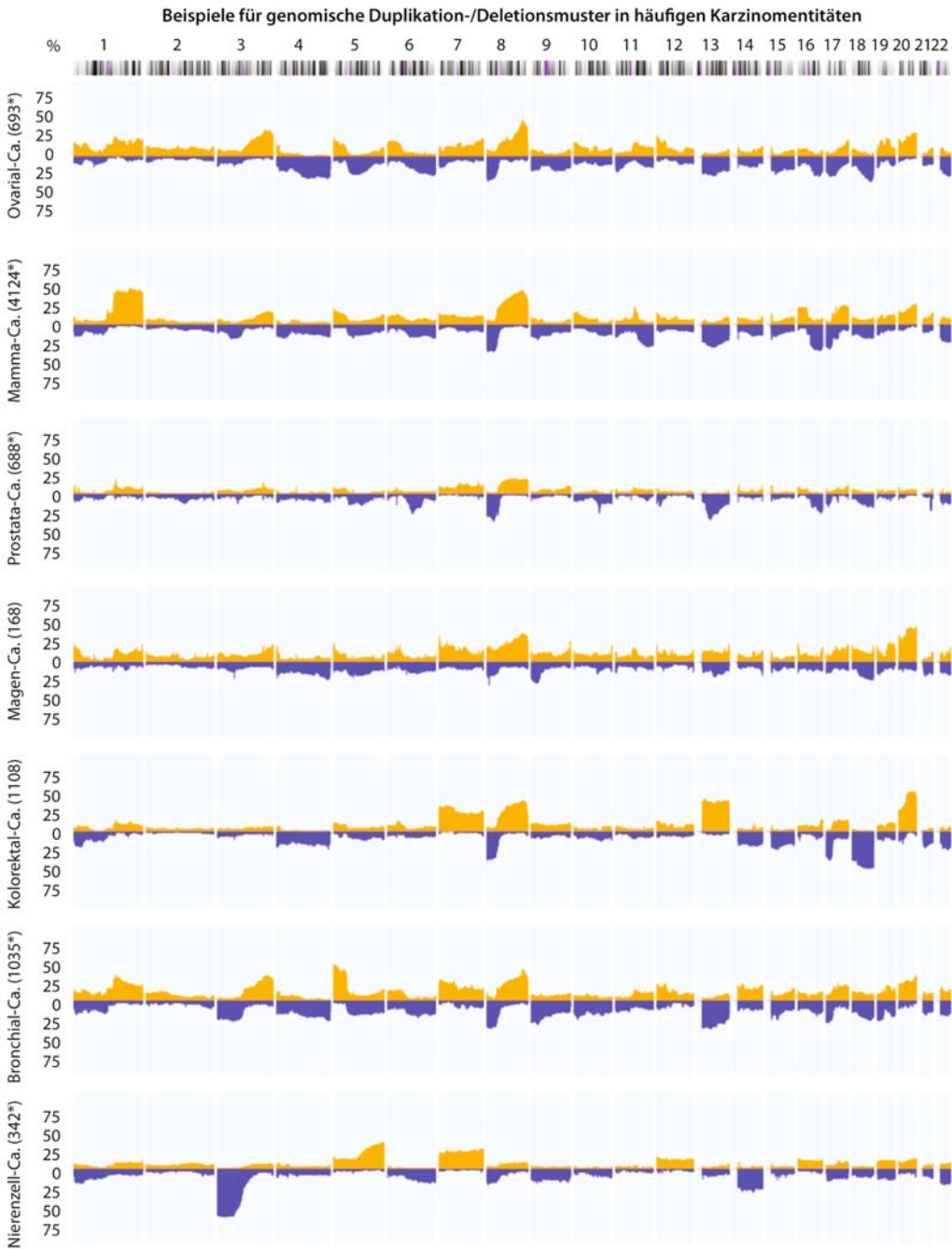


Abb. 3 ▲ Regionale Verteilung genomischer Imbalancen für ausgewählte Karzinomentitäten. Die Abbildung verdeutlicht, dass in soliden Tumoren bestimmte rekurrente genomische Imbalancen in verschiedenen Entitäten beobachtet werden können (z. B. +1q; +7, -8p/+8q; -13q), während andere Imbalancen typisch für einzelne Neoplasien sind (z. B. Zugewinn von Chromosom 13q bei kolorektalen Adenokarzinomen oder Deletionen von 3p bei Nierenzellkarzinomen). Die Zahlen bei den Diagnosen geben die Anzahl der für die Analyse verfügbaren, qualitätskontrollierten Array-Profile an (*bei größerer Anzahl wurden jeweils 300 Datensätzen aus den Ausgangsdaten randomisiert). Farbschema wie in Abb. 2b

bezeichnen die individuellen Experimente in der jeweiligen Tumorkategorie. **b** Genomische Imbalancemuster in hämatologischen Neoplasien. Die Histogramme zeigen die Häufigkeit von regionalen Zugewinnen (Duplikationen, Amplifikationen; *gelb*) und Verlusten (Deletionen eines oder mehrerer Allele; *blau*). Bei akuten Leukämien (ALL und AML) finden sich sehr selten ausgedehnte Imbalancen. Rekurrente Deletionen bzw. Zugewinne sind zumeist sehr klein und betreffen oft Regionen zytogenetischer Rekombinationen oder pathogenetisch relevante Gene. Bei chronisch lymphatischen Leukämien (CLL; Profil 3) finden sich in Untergruppen einzelne Imbalancen, welche z. T. mit bekannten prognostischen Gruppen assoziiert sind (z. B. +12, -13q). In malignen B-Zell-Lymphomen finden sich wiederum Imbalancemuster mit sowohl fokalen Veränderungen als auch einem komplexen Aneuploiditätsmuster (Letzteres insbesondere in malignen Myelomen; letztes Profil). Die Zahlen bei den Diagnosen geben die Anzahl der für die Analyse verfügbaren, qualitätskontrollierten Arrayprofile an (* bei größerer Anzahl wurden jeweils 300 Datensätze aus den Ausgangsdaten randomisiert)

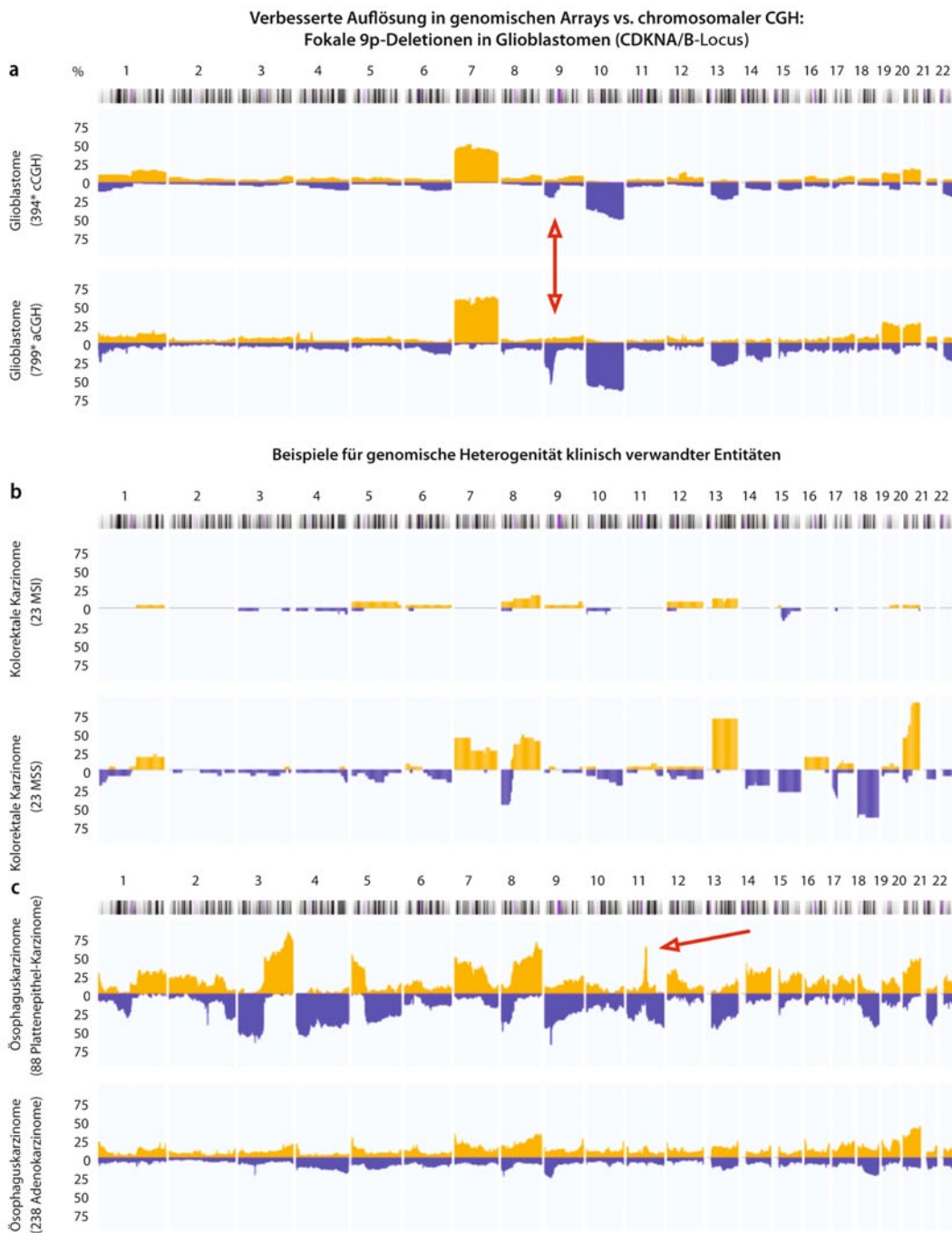


Abb. 4 ◀ Fokale Aberrationen und unterschiedliche Muster chromosomaler Imbalancen bei Tumoren desselben Organsystems. **a** Bei Glioblastomen kann durch hochauflösende Array-Techniken (*unten*) die fokale Deletion der *CDKNA/B*-Region auf 9p wesentlich besser charakterisiert werden, als es mit chromosomalen Techniken (*oben*) möglich war (*Pfeil*). **b, c** Beispiele genomischer Heterogenität innerhalb einer einzelnen bzw. zwischen klinisch verwandten Entitäten. **b** Imbalance-Histogramme von jeweils 23 sporadischen kolorektalen Karzinomen mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und ohne Instabilität (MSS). **c** Gegenüberstellung der Verteilung genomischer Imbalancen bei Plattenepithel- und Adenokarzinomen des Ösophagus. Bei den Plattenepithelkarzinomen ist die häufig beobachtete fokale Amplifikation auf 11q13 hervorgehoben, welche den für Cyclin D1 kodierenden *CCND1*-Genort einschließt (*roter Pfeil*)

viert sind [7]. Beispiele sind fokale Deletionen von Genen der B-Zell-Differenzierung in akuten lymphatischen Leukämien, fokale Imbalancen von Genen des *NFκB*-Signalwegs bei Hodgkin-Lymphomen oder fokale Deletionen von chromatinmodifizierenden Genen in verschiedenen hämatopoetischen und soliden Tumoren.

Definition molekularer Subtypen von Erkrankungen

Innerhalb histopathologisch homogen erscheinender Gruppen von Tumoren konnten durch Array-basierte Analysen unterschiedliche Muster chromosomaler Imbalancen identifiziert werden [5, 6]. Beispielhaft seien hier die Unterschiede im Muster der Zugewinne und Verluste bei diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen vom GCB- und ABC-Sub-

typ genannt. Bei Medulloblastomen haben jüngste genomische Studien maßgeblich zum Verständnis dieser Diagnose als Sammlung unterschiedlicher Entitäten mit zugrunde liegenden definierten molekularen Mechanismen beigetragen.

Identifizierung prognostisch relevanter Imbalancen

Durch hochauflösende Array-basierte Studien wurde gezeigt, dass wiederkeh-

rende Imbalancen prognostische Bedeutung besitzen. Beispielhaft seien die mit einer ungünstigen Prognose assoziierten Deletionen im Bereich des *CRLF2*-Gens bei akuten lymphatischen Leukämien und des *CDKN2A*-Gens bei verschiedenen Lymphomen und Leukämien genannt.

Identifizierung therapeutischer Targets

Amplifikationen von Onkogenen können prädiktiv für das Ansprechen auf bestimmte Therapien und somit für die Therapiestratifizierung sein. Amplifikationen von Genen der *HER*- oder *EGFR*-Familien und zunehmend auch anderer Onkogenfamilien identifizieren potenzielle Therapietargets und tragen zum Verständnis der Mechanismen von Therapieresistenz bei.

Kartierung und Klonierung von Translokationsbruchpunkten

Die Grenzen von Zugewinnen und Verlusten chromosomalen Materials sind bei unbalancierten Translokationen hinweisend auf die Bruchpunkte. Doch auch bei primär balancierten Bruchpunkten können Array-basierte Verfahren zur Charakterisierung hilfreich sein. Dies kann zum einen durch Mikrodisektion und Array-Hybridisierung der derivativen Chromosomen erfolgen. Zum anderen, z. B. bei *IG*- und *TCR*-Translokationen, kann die Charakterisierung der somatischen Rearrangements dieser Loci gefolgt von Verfahren der Polymerasekettenreaktion (PCR) wie der LM-PCR („ligation-mediated polymerase chain reaction“) zur Klonierung der Partner führen. Dieser Ansatz wurde z. B. erfolgreich zur Charakterisierung von Translokationen in T-Zell-Neoplasien eingesetzt [4]. Eine noch nicht vollends geklärte Frage der tumorgenetischen Grundlagenforschung ist der Einfluss spezifischer genomischer Strukturelemente (z. B. repetitive Sequenzelemente) auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens genomischer Rearrangements wie z. B. Translokationen. So mögen Variationen in der Kopienanzahl (CNVs) auch in Tumoren Einfluss auf die Entstehung eines Teils der klonalen genomischen Imbalancen haben.

Klonale Evolution und Verlaufskontrolle

Durch Analyse von sequenziellen Tumormustern desselben Patienten konnten neue Einblicke in die klonale Evolution von Tumoren gewonnen werden. Auch mikrodisezierte zirkulierende Tumorzellen und Metastasen konnten im Vergleich zum Tumorgewebe analysiert und die Mechanismen der Metastasierung so besser beschrieben werden. Schließlich kann im diagnostischen Kontext der Vergleich von zwei Tumoren desselben Patienten Aufschluss darüber geben, ob es sich um eine Zweitneoplasie oder ein Rezidiv handelt.

Imbalancemuster bei verschiedenen Tumorentitäten

Genomische Imbalancen finden sich in der überwiegenden Anzahl maligner Neoplasien und in vielen prämaligen Läsionen. Im Durchschnitt sind mehr als 13% eines Tumorgenoms von diesen Veränderungen betroffen, wobei diese in Anzahl, Ausdehnung und Rekurrenz sehr stark zwischen Tumorentitäten, aber auch individuellen Neoplasien variieren (■ **Abb. 2a**, [1, 2, 3]).

In den bisherigen Untersuchungen genomischer Imbalancen hat sich das Augenmerk stark auf die Analyse lokaler „hot spots“ bzw. „fokaler Aberrationen“ gerichtet, also der minimalen und besonders häufig betroffenen Genomregionen. In der Tat weisen – wie beschrieben – diese Bereiche z. T. auf eine pathophysiologisch relevante Aktivierung von Onkogenen bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Veränderung der Anzahl der genomischen Kopien hin. Andererseits betreffen die ausgedehnten Veränderungen, welche in der Mehrzahl insbesondere bei soliden Tumoren beobachtet werden, potenziell Tausende von Genen. Da die Muster dieser oft von einigen Megabasen bis zu kompletten Chromosomenarmen reichenden, großen Imbalancen eine relative Spezifität für einzelne Tumorentitäten zeigen, kann man grundsätzliche Selektionsvorteile im jeweiligen zellulären Kontext vermuten.

Muster chromosomaler Imbalancen bei hämatologischen Neoplasien

Bei hämatologischen Neoplasien (Leukämien, Lymphomen und anderen klonalen Erkrankungen hämatopoetischer Zellen) finden sich zwei grundsätzliche Varianten genomischer Imbalancemuster (■ **Abb. 2b**):

Insbesondere bei hämatologischen Neoplasien, deren maligne Transformation durch chromosomale Translokationen in hämatopoetischen Vorläuferzellen (z. B. *PML-RARA*, *BCR-ABL*, *TEL-AML1*) oder während Rekombinationseignissen der variablen Antikörper- bzw. Rezeptormoleküle (z. B. *HOXII-TCRA/D*, *MYC-IG*) initiiert werden, finden sich häufig nur sehr wenige Imbalancen. Diese sind dann zudem oft fokale Aberrationen pathogenetisch relevanter Gene, die z. B. bei der akuten lymphatischen Leukämie wesentliche Gene der B-Zell-Entwicklung betreffen. Dieses Muster spricht insgesamt für die Annahme, dass hier nur wenige Aberrationen zur Pathogenese ausreichen (Oligo-Hit-Tumorigenese).

Im Gegensatz dazu stehen hämatologische Neoplasien mit komplexen Mustern an Zugewinnen und Verlusten, wie sie bei myelodysplastischen Syndromen, vielen Lymphomen und multiplen Myelomen beobachtet werden. Dabei betreffen insbesondere genomische Zugewinne immer wieder solche Onkogene, die Partner aktivierender Translokationen in hämatologischen Neoplasien sein können (z. B. *MYC*, *BCL2*, *BCL6*). Zudem ergeben sich zunehmend Hinweise darauf, dass in den genannten Neoplasien, deren Inzidenz signifikant mit dem Alter zunimmt, auch die Komplexität genomischer Veränderungen einen altersassoziierten Anstieg zeigt. Dies legt eine altersassoziierte „Multi-hit-Pathogenese“ dieser Neoplasien nahe und eröffnet neue Fragen der altersabhängigen Veränderungen der DNA-Reparatur und der klinisch-prognostischen Bedeutung chromosomaler Marker im Kontext des Alters [5].

Rekurrente, prognostisch bedeutsame Imbalancen betreffen z. B. den *TP53* und den *CDKN2A*-Genort. Bei der chronisch lymphatischen Leukämie findet sich im Wesentlichen das aus FISH-Analysen gut bekannte Muster an Zugewinnen und

Verlusten, wobei z. B. die prognostische Bedeutung von Deletionen in 13q14 neu diskutiert wird, da mittels Array-basierter Analysen neben Deletionen im Bereich der miRNA-Gene *miR15/miR16* eine zweite Klasse von prognostisch wohl ungünstigeren, weitaus größeren Deletionen unter Beteiligung des *RBI*-Gens identifiziert wurde.

Muster chromosomaler Imbalancen bei soliden Tumoren

Neben chromosomalen Regionen, welche in nahezu allen Neoplasien betroffen sein können (z. B. Zugewinne des langen Arms von Chromosom 8, mit minimal zugewonnenen Regionen im Bereich des *MYC*-Genorts), weisen die verschiedenen Tumorentitäten insgesamt charakteristische Kombinationen genomischer Imbalancen auf (■ **Abb. 3**). Beispielsweise ist bei kolorektalen Karzinomen der dort spezifische Zugewinn von 13q häufig mit einem Zugewinn von 8q kombiniert, während sich bei Mammakarzinomen neben weiteren Imbalancen oft die Kombination von Zugewinnen in 1q und 8q findet. Darüber hinaus zeigen sich fokale Aberrationen, wie Deletionen von *CDKN2A* in 9p (■ **Abb. 4a**) oder Zugewinne in *CCND1* (■ **Abb. 4b**), und subtypspezifische Unterschiede im Imbalancemuster, wie z. B. zwischen Mikrosatelliten-stabilen und -instabilen Kolonkarzinomen oder in histologischen Subtypen von Ösophaguskarzinomen (■ **Abb. 4b, c**). Die prognostische Bedeutung von Imbalancen sollte deshalb immer innerhalb molekularer Gruppen und unter Berücksichtigung der jeweiligen klinischen Parameter und jeweiligen Therapie gewertet werden. Eine ausführliche Darstellung von chromosomalen Imbalancemustern bei soliden Tumoren ist hier nicht möglich, hier sei auf eine früher publizierte Übersicht zu wiederkehrenden Aberrationen und betroffenen Genen verwiesen [1].

Ausblick

Der Array-basierte Nachweis chromosomaler Imbalancen ist inzwischen ein Standardverfahren in der tumorgenetischen Forschung. In verschiedenen europäischen Ländern wird die Array-basierte

Analytik zudem in der Routinediagnostik insbesondere hämatologischer Neoplasien eingesetzt. Obwohl hier klinischer Informationsgehalt und Kosten durchaus den klassischen Verfahren der tumorzytogenetischen Diagnostik gegenüber zumindest ebenbürtig erscheinen, ist eine Einführung in den Leistungskatalog der gesetzlichen und privaten Kassen bisher nicht erfolgt. Da die Auflösung im Vergleich zur konventionellen Chromosomenanalyse zur Detektion von Imbalancen durchaus höher und die genomweite Analyse im Vergleich zur FISH deutlich informativer ist, bietet die Array-basierte Analytik gerade für die Planung individualisierter Therapieregime eine komplementäre Option. Allerdings liefert die komplette Sequenzierung von Tumorgenomen mittels Hochdurchsatz-Sequenzier-Verfahren die Informationen, die Array-basierte Verfahren generieren, neben der eigentlichen Sequenzinformation „quasi nebenbei“ mit (■ **Abb. 1**, fünfter Kasten). Dabei sind die Imbalance-Profilen hochauflösender (letztlich auf die einzelne Base), als die eines Arrays (determiniert auf ein Oligonukleotid) technologisch überhaupt sein können. Somit wird der Einsatzbereich der Array-basierten Diagnostik in der Tumorgenetik im Spannungsfeld von Auflösung, Informativität (auch unerwünschter Informativität von Sequenzierung) und Kosten determiniert werden müssen. Es ist aber durchaus vorstellbar, dass zumindest mittelfristig hochauflösende genomische Arrays als etablierte und effiziente Methode einen starken Bedeutungsgewinn im Rahmen der individualisierten Therapieauswahl erfahren können.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. R. Siebert
Institut für Humangenetik
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
& Universitätsklinikum Schleswig-Holstein,
Campus Kiel
Schwanenweg 24, 24105 Kiel
rsiebert@medgen.uni-kiel.de

Danksagungen. Die Autoren bedanken sich bei allen Kolleginnen und Kollegen, deren Arbeiten im Bereich der Array-basierten Analyse von Tumoren aufgrund von Platzbeschränkungen nicht zitiert werden konnten und die Array-basierte Daten zu <http://www.arraymap.org> beigetragen haben, auf denen die ■ **Abb. 2–4** dieser Arbeit beruhen. Die Analysen, auf denen ■ **Abb. 1** beruht, erfolgten z. T. in Kooperation mit Dr. Jose Ignacio Martin-Subero (Kiel/Barcelona), Dr. R. de Leeuw (Vancouver) und Dr. Matthias Schlesner (DKFZ).

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor weist für sich und seine Koautoren auf folgende Beziehung(en) hin: Die eigenen Arbeiten der Autoren im Bereich der Array-basierten Analyse von malignen Neoplasien wurden gefördert von der Deutschen Krebs-hilfe, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Krebshilfe Schweiz, FEBS, Polish Ministry of Science and Higher Education und der Kinder-KrebsInitiative Buchholz/Holm-Seppensen. RS hat im Rahmen von Forschungsprojekten und Beta-Studien Array-Plattformen der Firmen Affymetrix, Illumina und Agilent getestet.

Literatur

1. Baudis M (2007) Genomic imbalances in 5918 malignant epithelial tumors: an explorative meta-analysis of chromosomal CGH data. *BMC Cancer* 7:226
2. Beroukhim R, Mermel CH, Porter D et al (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463:899–905
3. Cai H, Kumar N, Baudis M (2012) arrayMap: a reference resource for genomic copy number imbalances in human malignancies. *arXiv:1201.2677 [q-bio.GN]*
4. Dittmann K, Przybylski GK, Grabarczyk P et al (2012) Fast approach for clarification of chromosomal aberrations by using LM-PCR and FT-CGH in leukaemic sample. *Acta Haematol* 127:16–19
5. Klapper W, Kreuz M, Kohler CW et al (2012) Patient age at diagnosis is associated with the molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 119:1882–1887
6. Kool M, Korshunov A, Remke M et al (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol* 123:473–484
7. Mestre-Escorihuela C, Rubio-Moscardo F, Richter JA et al (2007) Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* 109:271–280
8. 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* 20:207–211
9. Raghavan M, Lillington DM, Skoulakis S et al (2005) Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 65:375–378
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