

# Zytogenetische und molekularzytogenetische Methoden in der Pränataldiagnostik

Jede pränataldiagnostische Analyse unterliegt in Deutschland dem Gendiagnostikgesetz (GenDG, [1]). Darunter fallen alle nichtinvasiven Standardmethoden einschließlich Ultraschall (US), wenn eine „genetische Fragestellung“ vorliegt. Das GenDG gilt auch dann, wenn der US in eine der üblichen Risikoberechnungsmethoden eingeht, wie Ersttrimesterscreening und Triple-Test. Natürlich fallen auch die Untersuchungen von kindlichem Material, gewonnen durch eine invasive Methode, wie Fruchtwasser-, Nabelschnur- oder Chorionzottenpunktion [2] unter das GenDG. Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, dass neuerdings auch die nichtinvasive Untersuchung von kindlicher freier DNA aus mütterlichem Blut möglich ist, die ebenfalls unter das GenDG fällt. Dieses auf Next Generation Sequencing (NGS) basierende Verfahren wird in diesem Heft gesondert behandelt. Den Autoren dieses Artikels ist es aber ein Anliegen, an dieser Stelle zu betonen, dass dieser „Non-invasive-prenatal-aneuploidy-testing“(NIPT)-Ansatz zytogenetische Verfahren derzeit keinesfalls ersetzen kann. Bei dem NIPT-Ansatz handelt es sich um eine „targeted“, also gezielte Untersuchung auf die häufigsten numerischen Aberrationen des 2. Schwangerschaftstrimenons. Neuerdings sind auch einige häufige Mikrodeletionserkrankungen mit abgedeckt. Allerdings ist man bei jedem „Targeted“-Ansatz sozusagen „blind“ für mögliche andere genomische Umbauten ([3]; s. auch Artikel „NGS Screening“ in diesem Heft).

Wie eingangs erwähnt, ist die Grundlage jeder invasiven Pränataldiagnostik eine Untersuchung von kindlichem Ma-

terial nach einer Chorionzotten-, Fruchtwasser- oder Nabelschnurpunktion und die anschließende Durchführung einer zytogenetischen sowie ggf. molekularzytogenetischen Chromosomenanalyse. Die Gründe hierfür sind die Folgenden: die Zytogenetik bietet nicht nur den i) einfachsten, ii) schnellsten und iii) einzigen Weg einer genomweiten Analyse, *ohne* eine bestimmte genetische Veränderung gezielt nachweisen zu wollen. Mittels Zytogenetik kann man iv) balancierte und v) unbalancierte Rearrangements nachweisen sowie auf vi) Einzelzellniveau nach Mosaiken suchen. Die Haupteinschränkung der Zytogenetik ist ihr relativ niedriges Auflösungs-niveau (~ 10 Mb; [2, 4]). Durch den Einsatz molekularzytogenetischer Sonden und SONDENSSETS [5] kann diese Limitierung teilweise überwunden werden. Submikroskopische Imbalancen können prinzipiell auch durch „array-comparative genomic hybridization“ (Array-CGH [6], s. auch „Pränataler Array: Indikationen, Bewertung“ in diesem Heft) erfasst werden, welche jedoch sinnvollerweise erst nach der Durchführung einer zytogenetischen Analyse oder zumindest eines vorgeschalteten Schnelltests auf die häufigsten Aneuploidien (Trisomien 13, 18 und 21) eingesetzt werden könnte bzw. sollte. Im Folgenden sind die zytogenetischen und molekularzytogenetischen Verfahren und SONDENSSETS zusammengefasst, welche derzeit routinemäßig Anwendung finden. Zudem wird deren Bedeutung in der Diagnostik genauer diskutiert.

## Zytogenetische und molekularzytogenetische Verfahren

Zytogenetische und molekularzytogenetische Methoden erlauben neben der Identifikation numerischer Chromosomenaberrationen auch eine Beschreibung struktureller Veränderungen, wie z. B. Inversionen, Duplikationen, Deletionen und Translokationen. Die sichere Erkennung solcher derivativer Chromosomen ist zum einen abhängig von der Art der Aberration und wird zum anderen sehr stark von dem zu untersuchenden Gewebe und der erzielbaren Auflösung bei der Chromosomenpräparation bestimmt. Zur Befundung und Erstellung eines Karyotyps ist nach wie vor die Beurteilung durch erfahrene und spezialisierte Zytogenetiker notwendig. Diverse Versuche, diesen Prozess zu automatisieren, waren bislang nicht erfolgreich. Die molekulare Zytogenetik wird in der Pränataldiagnostik in der Regel erst dann eingesetzt, wenn eine Fragestellung nicht mittels Zytogenetik lösbar ist.

Das Standardwerk zur Beschreibung von Chromosomen und deren Veränderungen ist die aktuelle Ausgabe des *International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013)* [7]. Darüber hinaus sind für deutsche zytogenetische Laboratorien die S2-Leitlinie für humangenetische Diagnostik [8] sowie die Richtlinie der Bundesärztekammer (RiliBÄK, [9]) und das oben bereits genannte GenDG [1] verbindlich, um ein qualitativ hohes und vergleichbares Niveau der angebotenen Diagnostik zu gewährleisten.

## Chromosomenbänderungsverfahren

Chromosomen werden üblicherweise im Lichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung nach Einsatz verschiedener Färbetechniken untersucht.

Die Standarddarstellung der Chromosomen erfolgt üblicherweise in der GTG-Bänderung (*G-bands by Trypsin using Giemsa*); alternativ ist auch eine R-Bänderung möglich, die ein reverses Bandenmuster zu den GTG-Banden erzeugt [2].

Mittels GTG-Bänderung können nur solche Veränderungen nachgewiesen werden, welche eine Verschiebung oder Größenvariation der Bandenabfolge (Grauwertabstufungen) oder des Zentromer-Index bedingen. Die GTG-Bänderung der Chromosomen erlaubt eine Bruchpunktcharakterisierung mit einer Genauigkeit von 5–10 Mb. Durch bestimmte Kulturbedingungen kann ein „high-resolution banding“ erzielt werden mit einer Auflösung von ca. 3 Mb. Grundsätzliche Studien zur Entstehung der GTG-Banden finden sich bei Claussen et al. [4].

Daneben gibt es eine Reihe differenzierender Färbungen, die spezifische Bereiche der Chromosomen anfärben, wie z. B. die CBG-Färbung (*C-Bands by Bariumhydroxide using Giemsa*) für die Darstellung heterochromatischer Bereiche (Zentromere, zentromernahe Heterochromatinblöcke, Satelliten der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen) oder die NOR-Färbung (Nukleolus-organisierende-Regionen) zur Färbung der „aktiven“ Satellitenstiele an den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen [2]. Beide Methoden können dazu beitragen, euchromatische und somit evtl. klinisch bedeutsame, von heterochromatischen Imbalancen, sog. Normvarianten, zu unterscheiden. Auch können strukturelle Veränderungen unter Beteiligung von heterochromatischem Material genauer charakterisiert werden, was in der Regel durch den Einsatz von Array-CGH oder NGS-basierenden Methoden nicht möglich ist.

## Pränatale Zytogenetik

Die vorgeburtliche Chromosomenuntersuchung bedarf immer einer invasiven

Methode zur Gewinnung kindlichen Ausgangsmaterials und ist mit einem gewissen Eingriffsrisiko verbunden. Letzteres hängt in hohem Maße von der angewendeten Methode und der Erfahrung des Punktierenden ab. Allgemein wird dieses Risiko für Amniozentese und Chorionzottenbiopsie zwischen 0,5 und 1 % angegeben [10].

Die Darstellung von Chromosomen durch Bänderungsmethoden ist auf vitale Zellen im Untersuchungsmaterial und deren Kultivierung angewiesen. Details zum methodischen Ablauf finden sich in der einschlägigen Literatur [2]. Zusätzlich steht durch die ohnehin durchzuführende Kultivierung genug Ausgangsmaterial für weiterführende molekularzytogenetische und ggf. molekulargenetische (s. unten) Untersuchungen zur Verfügung. Darüber hinaus ist es sinnvoll, im Rahmen der Qualitätssicherung, im Sinne einer Überprüfbarkeit der Ergebnisse und v. a. zur Abklärung von Mosaiken und deren mögliche Differenzierung zu Kulturartefakten, einen Teil der Primärprobe zu archivieren. In diesem Zusammenhang sollte beachtet werden, dass nach GenDG tatsächlich eine sofortige Vernichtung des Probenmaterials nach einer pränatalen Untersuchung vorgeschrieben ist. Für eine längere Probenaufbewahrung muss ausdrücklich das Einverständnis der Patientin eingeholt werden.

Besondere interpretatorische Herausforderungen stellen Mosaik sowie mütterliche Kontamination und Kulturartefakte dar, die ausführlich im Artikel „Chromosomale Mosaik in der klinischen Zytogenetik – diagnostische Probleme“ diskutiert werden [11]. An dieser Stelle sollen die drei am häufigsten angewendeten Methoden vorgestellt werden: Im Jahr 2013 erfolgten laut Aqua-Institut [12] bundesweit 9894 Amniozentesen und 3465 Chorionzottenbiopsien bei insgesamt 658.735 Schwangeren; für die Chordozentese liegen leider keine Daten vor (Hinweis: Die Zahlen des Aqua-Institutes basieren nur auf Schwangerschaften mit Klinikgeburt; [12]). Demnach wurden Amniozentesen in 15 % und Chorionzottenbiopsien in 5,2 % der Schwangerschaften in Deutschland durchgeführt.

## Chorionzottenbiopsie

Die Chorionzottenbiopsie ist die zeitigste, invasive Methode, bei der ca. 10–20 mg Chorionzottengewebe routinemäßig zwischen der 11. und 13. Schwangerschaftswoche (SSW) entnommen werden. Punktionen um die 10. SSW gehen mit einem erhöhten Risiko für Extremitätenfehlbildungen einher. Bei späteren Punktionen spricht man von Plazentabiopsien, die u. U. kaum oder keine Spontanmitosen in der Kurzzeitkultur zeigen [2]. Mit der Zunahme an nichtinvasiven Risikoscreenings im 1. Trimenon, wie dem Ersttrimesterscreening (s. Artikel „Nichtinvasive Pränataldiagnostik – ETS und NGS-basierte Tests“ in diesem Heft), dem hochauflösenden Ultraschall (s. Artikel „Ultraschalldiagnostik: Standards und neue Marker“ in diesem Heft) oder den Untersuchungen zellfreier fetaler DNA aus dem Blut der Mutter, wird die Chorionzottenbiopsie immer häufiger zur sehr frühen Abklärung eines festgestellten erhöhten Risikos eingesetzt. Juristisch sollte hierbei beachtet werden, dass nach § 15 Absatz 1 GenDG [1], sofern es sich nicht um geschlechtsspezifische Indikationen handelt und auffällige Ergebnisse die Gonosomen betreffend vorliegen, eine Geschlechtsangabe erst nach der 12. bzw. 14. SSW erfolgen darf.

Bei Chorion-/Plazentamaterial handelt es sich um extraembryonales Material des ektodermalen Trophoblasten (Kurzzeitkultur; d. h. 1 bis 2 Tage) bzw. des mesenchymalen Kerns (Langzeitkultur; d. h. 10 bis 20 Tage), welches somit im Ergebnis nicht zwingend den Karyotyp des Fetus widerspiegelt und zu falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen bezüglich des kindlichen Karyotyps führen kann. In ca. 1 % der Fälle liegt eine Kontamination mit mütterlichen Zellen und in ca. 1–2 % der Fälle ein auf die Plazenta beschränktes Mosaik vor.

Die Bandenauflösung der Chromosomen in der Kurzzeitkultur reicht nur zur Beurteilung von sog. grob-strukturellen Aberrationen. Deshalb ist für den abschließenden Befund die Langzeitkultur maßgeblich. Ein Vorteil der Kurzzeitkultur ist jedoch die schnelle Erfassung numerischer Aberrationen nach ca. einem Tag [2]. Bei bekannten elterlichen Translokationen ist mittels der „Fluoreszenz-in-

situ-Hybridisierung“ (FISH)-Technik an Kurzzeitkulturpräparaten auch ein Abschluss bzw. Nachweis von unbalancierten Karyotypen möglich.

### Amniozentese

Die Fruchtwasserpunktion ist die häufigste angewendete invasive Methode zur Gewinnung von vorgeburtlichen kindlichen Zellen. Bei den Fruchtwasserzellen handelt es sich in erster Linie um fetale Zellen der Haut und des Urogenitaltraktes, deren Menge mit zunehmenden Schwangerschaftsalter steigt.

Der ideale Zeitpunkt für die Amniozentese (ca. 10–20 ml) liegt zwischen der 15. und 20. SSW (*post menstruationem*). Frühere Punktionen tragen ein deutlich erhöhtes Risiko, sodass eine Chorionzottenbiopsie meist günstiger ist. Zudem kann die Auswertung bei früher Amniozentese durch die geringe Zellzahl erschwert sein. Bei späten Amniozentesen kann „Zelldebris“ die Kultivierung und Auswertung behindern. Die Bearbeitungszeit hängt also von verschiedenen Faktoren ab, wie das eben genannte Schwangerschaftsalter, die Kultivierungsmethode (In-situ- oder Flaschenkultur [11]) und ggf. die Notwendigkeit zusätzlicher Untersuchungen (Beispiele s. unten). Durchschnittlich beträgt die Bearbeitungszeit etwa 8 bis 14 Tage. Erste Ergebnisse können jedoch schon nach einem sog. Schnelltest an unkultivierten Fruchtwasserzellen innerhalb von 24 h (s. unten) vorliegen; Ergebnisse an kultivierten Zellen, die als vorläufiger Befund mitgeteilt werden können, stehen häufig bereits nach 6 bis 7 Tagen zur Verfügung [2].

Daneben bietet das Fruchtwasser die Option für weitere Untersuchungen, wie die Bestimmung des  $\alpha$ -Fetoproteins (AFP) oder der Acetylcholinesterase (AChE) zur Beurteilung von ggf. verdeckten Neuralrohrdefekten [2].

### Chordozentese

Bei der Nabelschnurpunktion werden fetale, heparinisierte Lymphozyten ab der ca. 20. SSW gewonnen. Diese können innerhalb von 2 bis 3 Tagen analog zur postnatalen Lymphozytenkultivierung und Präparation aufgearbeitet werden. Die Chordozentese eröffnet zusätzlich die Möglichkeit weiterer Bluttests, z. B. Test

medgen 2014 · 26:391–397 DOI 10.1007/s11825-014-0022-2  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

A. Weise · K. Mrasek · T. Liehr

## Zytogenetische und molekularzytogenetische Methoden in der Pränataldiagnostik

### Zusammenfassung

Zytogenetische und ergänzende molekularzytogenetische Methoden sind nach wie vor die am häufigsten angewendeten Verfahren zur Abklärung möglicher genetischer Ursachen von pränatalen sonographischen Auffälligkeiten und/oder erhöhten Risikowerten basierend auf nichtinvasiven Voruntersuchungen. Ein Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten der pränatalen Chromosomenanalyse wird in diesem Artikel gegeben.

Invasiv gewonnenes kindliches bzw. plazentares Material wird zur Darstellung der Chromosomen kultiviert, mit verschiedenen Bänderungstechniken angefärbt und kann anschließend für weiterführende molekular-

zytogenetische Methoden, z. B. bei bestimmten Indikationen oder auch parallel an Interphasekernen unkultivierter Zellen, verwendet werden. Eine Kombination aus zytogenetischen und molekularen Methoden erlaubt außerdem bei Abortuntersuchungen, auch bei nichtkultivierbaren Zellen, den Ausschluss bzw. Nachweis der häufigsten Ursachen für Frühaborte. Im Rahmen der humangenetischen Beratung erlaubt dies eine bessere Einschätzung eines Wiederholungsrisikos.

### Schlüsselwörter

Pränatale Zytogenetik · Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) · Fruchtwasser · Chorion · Nabelschnurblut · Abort

## Cytogenetic and molecular cytogenetic methods in prenatal diagnostics

### Abstract

Cytogenetic and supplementary molecular cytogenetic techniques are still the most frequently applied methods for assessment of genetic causes of prenatal sonographic abnormalities and/or elevated risk values of previous non-invasive investigations. This article provides an overview on prenatal chromosomal analysis.

Invasively obtained fetal and placental material are cultured and chromosomes are prepared and stained by various banding techniques. Subsequently the material can be subjected to further molecular cytogenetic methods or probe sets according to the indications. Uncultured cells obtained by the in-

vasive procedure may also be used in parallel for interphase molecular cytogenetic studies. Furthermore, a combination of cytogenetic and molecular methods permits the investigation of most common genetic causes for first trimester abortions in cases of non-cultivable cells; the latter can be an important basis for genetic counseling of the affected families.

### Keywords

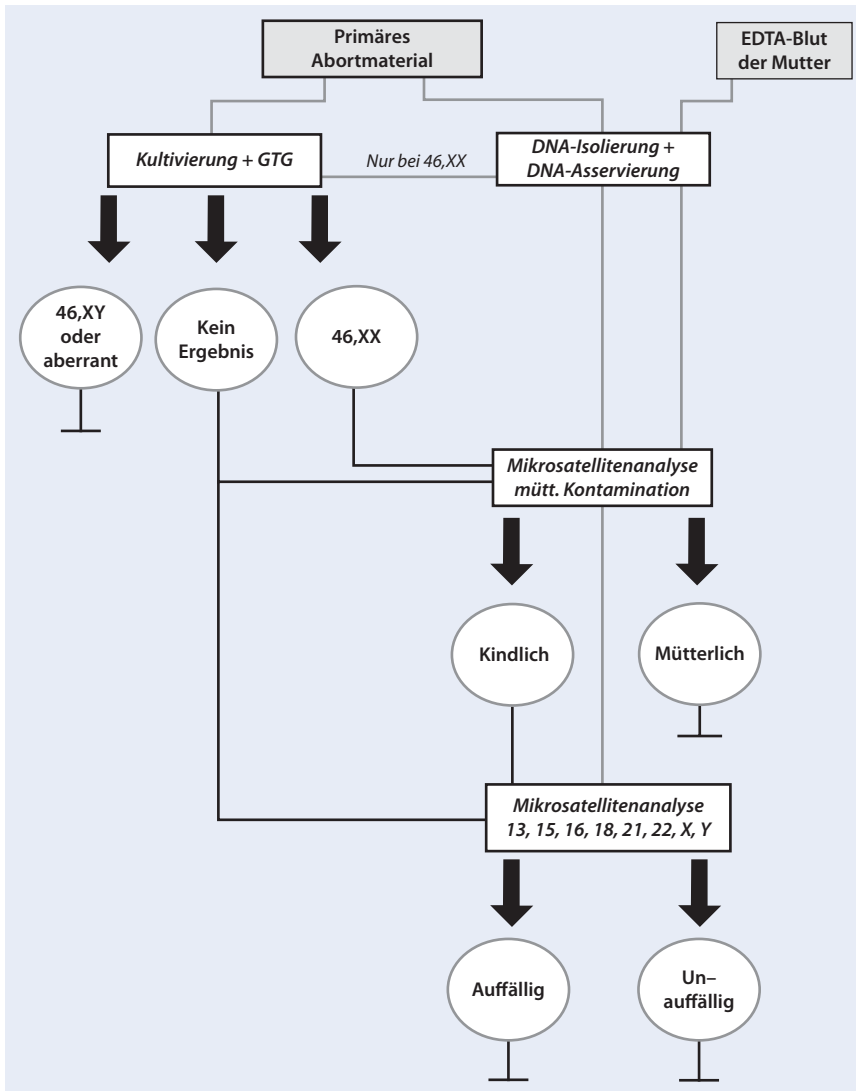
Prenatal cytogenetics · Fluorescence in situ hybridization (FISH) · Amniotic fluid · Chorion · Cord blood · Abortion

zur Ermittlung der Sauerstoffsättigung oder den Kleihauer-Betke-Test [2].

### Abort

Abortmaterial besteht v. a. bei frühen SSW häufig aus mütterlichen und kindlichen Anteilen. Eine mikroskopische Gewebedifferenzierung ist hier oft nicht möglich; zudem haben bei intrauterinem Fruchttod mütterliche Zellen einen Wachstumsvorteil in Kultur gegenüber den absterbenden fetalen Zellen. Daher ist bei einem unauffälligen weiblichen Karyotyp ein Kontaminationsausschluss (Vergleich mit DNA aus mütterlichem

EDTA-Blut) mittels Mikrosatellitenanalyse notwendig, um die Aussagekraft des zytogenetischen Befundes einschätzen zu können. Hierzu ist es sinnvoll, das Abortgewebe vor der Kultivierung zu teilen und aus einem Teil dieses Gewebes DNA zu gewinnen. Ein Vorschlag zum Vorgehen bei der Untersuchung von Abortmaterial ist in **Abb. 1** dargestellt. Seit Einführung dieses Vorgehens in unserer Einrichtung im Jahr 2012 konnten ~ 53 % der Aborte  $\leq 10$ . SSW mit weiblichen unauffälligen Karyotyp vollständig oder z. T. der Mutter zugeordnet werden.



**Abb. 1** ▲ Vorschlag zum Vorgehen bei Abortmaterial ≤ 10. SSW: Nach Eingang der Probe wird diese aufgeteilt; aus einem Teil und aus dem mütterlichen EDTA-Blut wird DNA isoliert. Der andere Teil wird für die Karyotypisierung (= GTG) kultiviert. Wird in der Zytogenetik ein unauffälliger männlicher Karyotyp oder ein auffälliger männlicher oder weiblicher Karyotyp erhoben, ist die Analyse abgeschlossen. Wird jedoch ein unauffälliger weiblicher Karyotyp festgestellt, wird von dem kultivierten Abortmaterial DNA isoliert und mit DNA aus mütterlichen EDTA-Blut und DNA aus dem primären Abortmaterial zusammen ein Kontaminationsausschluss (Mikrosatellitenanalyse) durchgeführt. Wird nach der Analyse keine maternale Kontamination des kultivierten und unkultivierten (primären) Untersuchungsmaterials festgestellt, so wird das primäre oder kultivierte Abortmaterial zusammen mit dem mütterlichen Blut mithilfe des Abort-Mikrosatelliten-Sets (für die Chromosomen: 13, 15, 16, 18, 21, 22, X und Y) untersucht. Erreicht man kein Zellwachstum und erhält damit kein Ergebnis in der Chromosomenanalyse, wird an der isolierten und asservierten DNA des Primärmaterials ein Kontaminationsausschluss mittels Mikrosatelliten durchgeführt. Handelt es sich um durchgängig kindliches Material, kommt das „Abort-Mikrosatelliten-Set“ zur Anwendung. Abschließend wird ein Befund erstellt

Ein weiterer Vorteil des in **Abb. 1** gezeigten Ablaufschemas ist es, dass selbst bei negativem Kulturverlauf die Möglichkeit zur Abklärung häufiger Aneuploidien in Aborten mittels qPCR (Aneuploidien der Chromosomen: 13, 15, 16, 18, 21, 22, X und Y) besteht. In unserer Einrichtung konnten so in 20% der kulturnegati-

ven Aborte eine ursächliche Aneuploidie (z. B. Trisomie 16) nachgewiesen werden.

Bei Aborten nach der 10. SSW, wo eine gewebliche Differenzierung häufig möglich ist, sollte neben einer Kultur aus eindeutig embryonalen/fetalen Strukturen auch eine Kultur aus Chorion/Plazenta angelegt werden, da Zellen hieraus häu-

fig am längsten vital sind. Allerdings gelten dann die oben genannten Besonderheiten und Einschränkungen für dieses nicht durchgängig kindliche Gewebe. Bei erfolgreicher Kultivierung gewinnt man jedoch einen Einblick in mögliche Unterschiede/Mosaik zwischen Plazenta und Embryo [2].

## Molekulare Zytogenetik

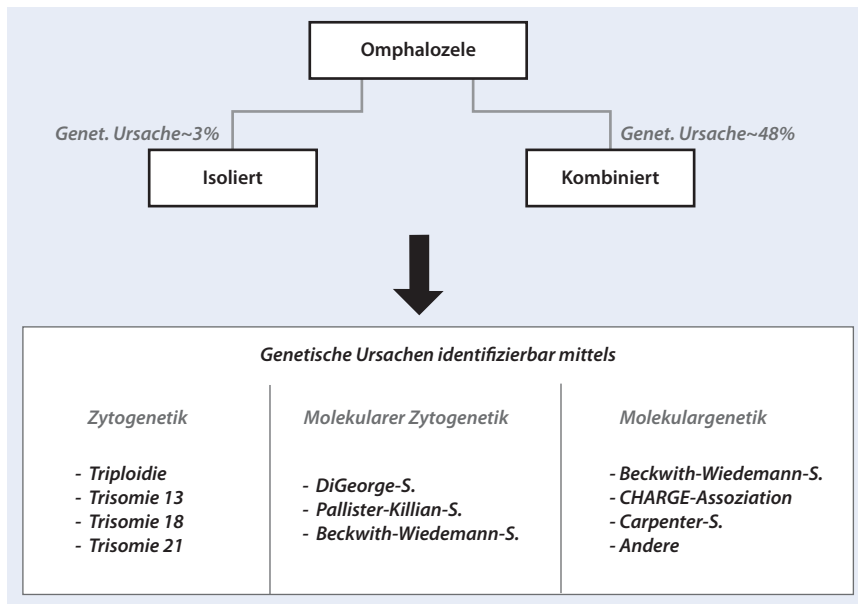
Die molekulare Zytogenetik umfasst historisch gesehen zwei Grundtechniken: die „Primer-in-situ-labeling“ (PRINS)- und die „Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung“ (FISH)-Technik. In der Routinediagnostik wird heute fast ausschließlich die FISH-Technik angewendet [13]. Im Folgenden sind die Sonden/Sondensets nach Indikationen zusammengefasst, welche heute routinemäßig in der Pränataldiagnostik zum Einsatz kommen.

## Aneuploidie-Diagnostik per FISH-Schnelltest

Der „pränatale Schnelltest“ ermöglicht den Nachweis bzw. Ausschluss der häufigsten autosomalen Trisomien (13, 18 und 21) des Menschen im 2. Trimenon der Schwangerschaft sowie die gleichzeitige Bestimmung des chromosomalen Geschlechts. Die Analyse erfolgt an unkultivierten Fruchtwasserzellen, ausnahmsweise auch an Chorionzellen. Ein Ergebnis kann der Schwangeren hier innerhalb von 18–48 h nach Amniozentese mitgeteilt werden, während sie für den Erhalt des Ergebnisses der Zytogenetik oft 10 bis 20 Tage einkalkulieren muss. Die Bedeutung dieses Testes liegt bei unauffälliger Sonographie und/oder anderen unauffälligen Testergebnissen von Vorbefunden wie Biochemie oder AFP-Wert in einer psychischen Entlastung der Schwangeren. Bei auffälliger Sonographie und/oder aberranten Testergebnissen besteht die Option, einen von der Schwangeren gewünschten Abbruch ggf. in einer früheren SSW durchführen zu können [14].

Für den Interphase-FISH-basierenden Test stehen Sonden von unterschiedlichen kommerziellen Anbietern zur Verfügung. In der Regel werden für den FISH-Schnelltest lokusspezifische und zentromerspezifische Sonden eingesetzt. Obwohl die Aussagekraft des FISH-basie-





**Abb. 2** ▲ Das Flussdiagramm zeigt einen Vorschlag zum Vorgehen beim pränatalen Vorliegen einer Omphalozele: Eine genetische Ursache für eine Omphalozele ist in ~3% der isoliert auftretenden und in ~48% der Fälle zu erwarten, die in Kombination mit anderen Symptomen imponieren [21]. Mittels Zytogenetik (einschl. „pränatalem Schnelltest“) können die möglichen Ursachen Triploidie sowie Trisomie 13, 18 oder 21 nachgewiesen werden. Bei unauffälligem Karyotyp wären an unkultivierten Fruchtwasserzellen ein Pallister-Killian-Syndrom und an kultivierten Fruchtwasserzellen Mikrodeletionen in den kritischen Regionen des DiGeorge- und des Beckwith-Wiedemann-Syndroms auszuschließen. Mittels Molekulargenetik kann weiterhin auf eine paternale uniparentale Disomie 11, einen Methylierungsdefekt oder Punktmutationen im *CDKN1C*-Gen zum Ausschluss eines Beckwith-Wiedemann-Syndroms gescreent werden. Weiterhin ist eine CHARGE-Assoziation an Zellkultur mittels eines „Luteinizing-hormone-releasing-hormone“(LHRH)-Nachweises möglich. Weitere Syndrome wie das Carpenter-Syndrom, die mit einer Omphalozele einhergehen können, sind derzeit diagnostisch nicht erfassbar

renden Testes im Vergleich zu auf MLPA („multiplex ligation dependent probe amplification“) oder qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) basierenden molekulargenetischen Verfahren unstrittig am höchsten und wenigsten artefaktanfällig ist, ersetzen die beiden letztgenannten Verfahren aus Kostengründen mehr und mehr den FISH-basierenden „pränatalen Schnelltest“. Der FISH-basierende „pränatale Schnelltest“ hat folgende Vorteile: Es können Hinweise auf kleine, numerisch aberrante Mosaik erzielt werden, und in der Regel erzielt der Test nur informative Ergebnisse. Bei den molekulargenetischen Methoden sind kleine Mosaik schwer oder gar nicht erfassbar, und Mikrosatellitentests mittels qPCR können zu nichtinformativen Ergebnissen (bei gleichen Allelen der Eltern) führen [14].

### Herzfehler in der Sonographie

Zeigt die Sonographie einen Herzfehler auf, so kann dies ein Hinweis auf ein zugrunde liegendes genetisches Syndrom

sein. Dies gilt umso mehr, wenn das Vitium nicht isoliert ist, sondern weitere sonographische Auffälligkeiten vorliegen.

Werden die Trisomien 13, 18 oder 21 sowie weitere grobstrukturelle chromosomale Umbauten aufgrund des zytogenetischen Ergebnisses ausgeschlossen, sollte am kultivierten Fruchtwasser eine FISH-Analyse zum Ausschluss einer Mikrodeletion in 22q11.2 (DiGeorge-Syndrom – OMIM 188400 [15]) angeboten werden. Für den Nachweis des DiGeorge-Syndroms sind den Autoren mindestens 8 unterschiedliche Sonden verschiedener kommerzieller Anbieter bekannt. Insbesondere bei der pränatalen FISH-Diagnostik sollten Sonden ausgewählt werden, die tatsächlich innerhalb der kritischen Region („DiGeorge syndrome critical region gene 2“) liegen. Aufgrund der Seltenheit scheint derzeit der FISH-Test bezüglich einer Mikrodeletion in 10p14 pränatal aus unserer Sicht eher nicht indiziert.

Bei Vorliegen der sog. Ebstein-Anomalie sollte auch eine FISH-Diagnostik

Hier steht eine  
Anzeige.

 Springer

zum Ausschluss des Mikrodeletionssyndroms 1p36 (OMIM 607872 [15]) durchgeführt werden. Weiterhin ist neben einer Reihe weiterer genetischer Ursachen, als zweithäufigste Ursache für Herzfehler nach dem Down-Syndrom, an ein Noonan-Syndrom (OMIM 163950 [15]) zu denken, welches molekulargenetisch nachweisbar ist.

### Omphalozele in der Sonographie

Wird sonographisch eine isolierte Omphalozele oder auch eine mit weiteren sonographischen Auffälligkeiten auftretende Omphalozele nachgewiesen, und der Karyotypbefund ist unauffällig, sollten mittels FISH-Diagnostik das DiGeorge-Syndrom (OMIM 188400 [15]; s. Abschn. „Herzfehler in der Sonographie“) und das Pallister-Killian-Syndrom (PKS, OMIM 601803 [15]) ausgeschlossen werden. Für den Nachweis eines PKS kann eine Zentromer-12-spezifische Sonde zusammen mit einer lokusspezifischen Sonde für 12p (für die Beurteilung von PKS-Fällen mit Neozentromer) an unkultivierten Fruchtwasserzellen verwendet werden. Unkultiviertes Fruchtwasser sollte aus dem Grund untersucht werden, da das zusätzliche Isochromosom 12p in Zellkultur die Tendenz zeigt, verloren zu gehen, und somit nach Kultivierung u. U. nicht mehr nachweisbar ist. Schließlich ist bei Auftreten einer Omphalozele an das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (OMIM 130650 [15]) zu denken, welches eher selten als Deletion oder Rearrangement der kritischen Region, aber in Form einer uniparentalen Disomie (UPD) bzw. eines Methylierungsdefektes vorliegen kann und molekulargenetisch nachweisbar ist. Weitere mögliche Differenzialdiagnosen werden in einem Überblick (■ **Abb. 2**) zusammengefasst.

### Weiterführende FISH-Studien wegen chromosomaler Umbauten

Werden in der zytogenetischen Analyse chromosomale Rearrangements gefunden, so sind weiterführende FISH-Studien indiziert [5]. Im Wesentlichen sind es drei Grundtypen von Umbauten, die weitere Analysen nach sich ziehen können: Nachweis einer balanciert erscheinenden Chromosomenaberration (erbt oder de novo), einer zentromernahen Auffälligkeit oder eines zusätzlichen Markerchromo-

soms. In allen drei Fällen ist eine Elternuntersuchung hilfreich. Wird hierbei bei einem der beiden klinisch unauffälligen Elternteile dieselbe Auffälligkeit gefunden, so kann ggf. auf weiterführende FISH-Untersuchungen verzichtet werden. Ist das Ereignis de novo aufgetreten, sollte die molekulare Zytogenetik eingesetzt werden, um das Rearrangement genauer zu charakterisieren und klinisch einordnen zu können. Bei Beteiligung der Chromosomen 6, 7, 11, 14, 15 oder 20 an einem chromosomalen Umbau sollte auch immer an die theoretische Möglichkeit des Vorliegens einer uniparentalen Disomie mit klinischer Relevanz gedacht werden [16].

#### a. Ererbte balanciert erscheinende Translokationen

Balanciert erscheinende Translokationen, welche bei einem Elternteil nachgewiesen werden, sollten bei diesem mittels FISH unter Einsatz der beteiligten Ganzchromosomensonden und ggf. einer geeigneten Subtelomersonde untersucht werden. In den meisten Fällen wird sich bestätigen, dass es sich tatsächlich um ein einfaches Translokationsereignis von zwei Chromosomen handelt. In seltenen Fällen findet man aber kryptische, komplexe Rearrangements [17]. Sollten Letztere nachgewiesen werden – z. B. Nachweis der Beteiligung von drei Chromosomen am Umbau anstelle der vermuteten zwei – sollte das werdende Kind daraufhin untersucht werden, ob es das komplette oder nur Teile des Rearrangements erbt hat.

#### b. De novo balanciert erscheinende Translokationen

Balanciert erscheinende Translokationen, die bei keinem der Elternteile nachgewiesen werden können, bringen folgende interpretatorische Probleme:

- die Frage eines möglichen Keimzellmosaiks bei einem Elternteil,
- die Frage der korrekt zugeordneten Vaterschaft und
- die Frage nach kryptischen Imbalancen im Bruchpunktbereich.

Während die ersten zwei Fragen nur im Befund diskutiert werden können, steht – ungeachtet der derzeitigen abrechnungs-

technischen Probleme – mit der pränatalen Array-CGH ein Verfahren bereit, eine balancierte De-novo-Translokation von einer unbalancierten zu unterscheiden [18]. Natürlich mag die Interpretation von kleinsten Imbalancen im Bruchpunktbereich hier Schwierigkeiten bereiten (s. auch aCGH in der Pränataldiagnostik, dieses Heft).

#### c. Zentromernahe chromosomale Auffälligkeiten

In der pränatalen Zytogenetik bisweilen auffallende zentromernahe chromosomale Aberrationen sind in den meisten Fällen Heterochromatinvarianten einschließlich der Varianten der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen. Neben den oben genannten zytogenetischen Verfahren NOR- und CBG-Färbung sowie Elternuntersuchung kann auch der Einsatz der FISH-Technik indiziert sein. Insbesondere gilt dies beim Auftreten von nichtererbten Zentromervarianten im Bereich des kurzen Arms von Chromosom 16 sowie bei De-novo-Varianten bzw. Vergrößerungen an einem kurzen Arm eines akrozentrischen Chromosoms. Neben harmlosen De-novo-Vergrößerungen von Satelliten-DNA können solche zytogenetische Befunde auch auf eine krankheitsverursachende, euchromatische Imbalance hinweisen [19].

#### d. Kleine überzählige Markerchromosomen

Sofern ein kleines überzähliges Markerchromosom sowohl pränatal beim werdenden Kind als auch bei einem zugehörigen klinisch unauffälligen Elternteil nachgewiesen wurde, kann es am ehesten als unproblematisch angesehen werden. Ausnahmen stellen kleine überzählige Markerchromosomen dar, welche durch den McClintock-Mechanismus verursacht wurden (s. hierzu <http://ssmctl.com/mcclintock.html>). Insgesamt ist man daher auf der sicheren Seite, wenn man die chromosomale Herkunft sowohl ererbter als auch von de novo auftretender kleiner überzähliger Markerchromosomen so genau wie möglich aufklärt. Etwa 70 % der kleinen überzähligen Markerchromosomen stammen von einem akrozentrischen Chromosom ab: etwa 40 % al-

ler kleinen überzähligen Markerchromosomen von #15, etwa 20 % von #22 [20].

## Ausblick

Durch die vielseitigen neueren Methoden der nichtinvasiven pränatalen Diagnostik wird die Zahl der invasiven Eingriffe zwar im Sinne einer optimierten Schwangerschaftsvorsorge weiter zurückgehen; die zytogenetische und die molekularzytogenetische Erfassung von chromosomalen Umbauten werden aber auch künftig essenzielle Säulen der Pränataldiagnostik sein. In diesem Zusammenhang kann nicht genug betont werden, dass alle verfügbaren nichtinvasiven Methoden der Pränataldiagnostik lediglich eine Risikoangabe, meist bezogen auf Trisomie 21, darstellen, zu deren Verifizierung eine invasive Methode empfohlen wird. Dies gilt sowohl für das Ersttrimesterscreening wie auch für das NIPT an zellfreier kindlicher DNA (plazentaren Ursprungs) aus dem Blut der Mutter.

## Korrespondenzadresse

### Dr. A. Weise

Institute of Human Genetics  
Jena University Hospital  
Friedrich Schiller University  
Kollegiengasse 10, 07743 Jena  
Anja.Weise@med.uni-jena.de

## Einhaltung ethischer Richtlinien

**Interessenkonflikt.** A. Weise, K. Mrasek und T. Liehr geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine Studien an Menschen oder Tieren.

## Literatur

1. Gendiagnostikgesetz vom 31. Juli 2009 (BGBl. I S. 2529, 3672), das durch Artikel 2 Absatz 31 u. Artikel 4 Absatz 18 des Gesetzes vom 7. August 2013 (BGBl. I S. 3154) geändert worden ist: <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/gendg/gesamt.pdf>. Zugegriffen: 4. Nov. 2014
2. Weise A, Liehr T (2009) Pre- and postnatal diagnostics and research on peripheral blood, chorion, amniocytes and fibroblasts. In: Liehr T (Hrsg) Fluorescence in situ hybridization (FISH) – application guide. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio, S 53–60
3. Boon EM, Faas BH (2013) Benefits and limitations of whole genome versus targeted approaches for noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies. *Prenat Diagn* 33:563–568
4. Claussen U, Michel S, Mühlhig P, Westermann M, Grummt UW, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T (2002) Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenet Genome Res* 98:136–146
5. Liehr T, Weise A, Hamid AB et al (2013) Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 13:251–255
6. Lichtenbelt KD, Knoers NV, Schuring-Blom GH (2011) From karyotyping to array-CGH in prenatal diagnosis. *Cytogenet Genome Res* 135:241–250
7. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M (Hrsg) (2012) ISCN 2013 – an international system for human cytogenetic nomenclature. (2013) Karger, Basel
8. Stuhmann-Spangenberg M, Engels H, Fritz B, Gabriel H, Gläser D, Henn W, Liehr T, Miller K, Rieder H (2011) S2-Leitlinie Humangenetische Diagnostik. *Medgen* 23:281–323
9. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Stand: 23.08.2013: <http://www.bundesaerztekammer.de/page.asp?his=1.120.121.1047.6009>. Zugegriffen: 4. Nov. 2014
10. Tabor A, Alfirevic Z (2010) Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther* 27:1–7
11. Weise A, Klein E, Mrasek K (2014) Chromosomale Mosaik in der klinischen Zytogenetik. *Med Gen online first*. doi:10.1007/s11825-014-0011-5
12. Aqua Institut (2014) Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2013, 16/1 – Geburtshilfe Qualitätsindikatoren: [https://www.sgg.de/downloads/QIDB/2012/AQUA\\_16n1\\_Indikatoren\\_2012.pdf](https://www.sgg.de/downloads/QIDB/2012/AQUA_16n1_Indikatoren_2012.pdf). Zugegriffen: 4. Nov. 2014
13. Liehr T, Pellestor F (2014) Molecular cytogenetics: the standard FISH and PRINS procedure. In: Liehr T (Hrsg) Fluorescence in situ hybridization (FISH) – application guide. Springer, Berlin Heidelberg New York, Tokio, S 23–34
14. Weise A, Liehr T (2008) Fluorescence in situ hybridization for prenatal screening of chromosomal aneuploidies. *Expert Rev Mol Diagn* 8:355–357
15. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
16. Liehr T (2014) Uniparental disomy (UPD) in clinical genetics. A guide for clinicians and patients. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio
17. Liehr T, Heller A, Eichhorn KH et al (2004) Inherited cryptic chromosomal aberrations may be more easily detected in their balanced forms: a case report with hidden der(1)t(1;17)(q44;p13.2). *Prenat Diagn* 24:1022–1024
18. Vialard F, Molina Gomes D, Leroy B et al (2009) Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: another experience. *Fetal Diagn Ther* 25:277–284
19. Liehr T (2014) Benign & pathological chromosomal imbalances: microscopic and submicroscopic copy number variations (CNVs) in genetics and counseling. Academic Press, Amsterdam
20. Liehr T (2012) Small supernumerary marker chromosomes (sSMC). A guide for human geneticists and clinicians; with contributions by UNIQUE (The Rare Chromosome Disorder Support Group). Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio
21. Snijders RJ, Brizot ML, Faria M, Nicolaidis KH (1995) Fetal exomphalos at 11 to 14 weeks of gestation. *J Ultrasound Med* 14:569–574