Schweiz Med Forum 2006;6:1164–1165

Medizinische Genetik: Die Chromosomenuntersuchung – auf dem Weg vom Mikroskop zum Array-Scanner

Peter Miny
Abteilung Medizinische Genetik, Universitäts-Kinderspital beider Basel (UKBB), Basel

Einleitung – geschichtlicher Hintergrund

Die Chromosomenuntersuchung, die mikroskopische Beurteilung der Anzahl und der Struktur der Chromosomen, gilt als die klassische medizinisch-genetische Labormethode schlechthin [1]. Ihre Verbreitung in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts und die Definition der chromosomalen Syndrome haben nicht unwesentlich zur schliesslichen Anerkennung der Medizinischen Genetik als Spezialdisziplin FMH und FAMH beigetragen. Bereits rund ein bis zwei Jahrzehnte später jedoch, mit dem Aufkommen molekulargenetischer Untersuchungstechniken, wurde ihr baldiges Aussterben und der Ersatz durch fortschrittlichere – nämlich molekulare – Methoden prophezeit. Die klassische Zytogenetik erschien plötzlich altmodisch und wenig attraktiv.
Um so Erstaunlicheres zeigt eine aktuelle Bestandesaufnahme von 2005: Die klassische Chromosomenuntersuchung ist nach wie vor weltweit eine der am häufigsten angewendeten medizinisch-genetischen Laboruntersuchungen überhaupt. Sie ist noch immer der Goldstandard beim pränatalen Ausschluss von Aneuploidien und die Grundlage fast jeder fortgeschrittenen molekularzytogenetischen Routinediagnostik. Zwar haben verbesserte Kulturmedien die Untersuchungsdauer verkürzt und CCD-Kameras Fotoapparat und Schere verdrängt, doch die traditionellen Schritte der Chromosomenpräparation sind seit bald 50 Jahren praktisch unverändert geblieben. Soweit die Erfolgsgeschichte. Andererseits haftet der Kunst einer perfekten Chromosomenpräparation noch immer ein gewisses Odium von Hokuspokus an und gilt als Domäne von Eingeweihten. Auch andere Schattenseiten konnten über die Jahre nur graduell erhellt werden. Chromosomenuntersuchungen sind kaum automatisierbar, vergleichsweise sehr arbeitsaufwendig und damit kostenintensiv. Das Auflösungsvermögen selbst eines sehr guten Mikroskops ist begrenzt. Alle Chromosomenstrukturanomalien, die kleiner als ungefähr fünf Millionen Basenpaare sind (abhängig vom Kontraktionsgrad der Chromosomen), bleiben zwangsläufig unentdeckt.

Abbildung 1
Karyogramm einer Metaphase nach GTG-Bänderung (G-bands by trypsin using Giemsa): Ausgangsmaterial der konventionellen Chromosomenuntersuchung.

Neue Untersuchungsmethoden

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Molekulare Methoden, vor allem die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), haben die klassischen zytogenetischen Techniken seit den achtziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts ergänzt, nicht jedoch ersetzt. Chromosomenuntersuchungen wurden wieder populär, eine Fülle neuer Methoden entstand. Die Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten spezifischen DNA-Sonden auf Chromosomenpräparate verbesserte das «Auflösungsvermögen» der zytogenetischen Diagnostik auf Defektgrössen von einigen Kilobasen, allerdings beschränkt auf die untersuchte Chromosomenregion. Die klinische Anwendung führte zur Definition von über 100 Mikrodeletions- und einigen Mikroduplikationssyndromen. Früher unklassifizierbare komplexe Strukturaberrationen oder überzähliges chromosomales Material unklarer Herkunft konnten fortan charakterisiert werden. Selbst wenn der Fortschritt in Teilbereichen der Routinediagnostik eindrücklich war, blieb der Erfolg in anderen begrenzt, weil eine möglichst zutreffende klinische Verdachtsdiagnose zwingend erforderlich ist. In Zeiten, in denen ein Grossteil aller Chromosomendiagnostik an eingesandten Proben mit mehr oder weniger detaillierten Angaben zur Klinik und damit zur Indikation durchgeführt wird, bleibt dies ein gravierendes Handicap. Auch an der Notwendigkeit

der aufwendigen Chromosomenpräparation hat sich wenig geändert.
Zu gross ist die Zahl methodischer Weiterentwicklungen der FISH-Technik, von denen manche ihren Platz in sehr speziellen Anwendungsbereichen gefunden haben, um hier eine Übersicht zu geben [2]. Einige, die auf einer methodisch unterschiedlichen erreichten differentiellen Anfärbung von Chromosomen oder Chromosomenregionen an Metaphasen beruhen, haben das Ziel, komplexe Strukturaberrationen, wie sie beispielsweise in der Tumorzytogenetik auftreten, besser darzustellen, als dies durch die konventionelle Bänderung möglich war (Abb. 1). Allen gemeinsam ist jedoch letztlich die Begrenzung des Auflösungsvermögens, die eine weite Verbreitung in der Routinediagnostik verhindert hat.

Comparative genomic hybridisation (CGH)

Bei einer dieser Methoden, nämlich der comparative genomic hybridisation (CGH), werden Test-DNA und normale DNA unterschiedlich fluoreszenzmarkiert auf normale Metaphasen hybridisiert. Durch Messung des Intensitätsverhältnisses der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe können Dosisunterschiede, also Deletionen und Duplikationen, im Mikroskop sichtbar gemacht werden.
Die CGH ist vermutlich jene Methode, welche die Tür zu einer neuen Ära der Chromsomendiagnostik aufgestossen hat. Statt konventionell präparierte Metaphasen werden in den letzten Jahren Arrays von klonierten DNA-Fragmenten mit bekannter Lokalisation verwendet. Mit der Geburt der Array-CGH ist das Mikroskop durch Array-Scanner ersetzt worden. Durch die grosse Zahl der verwendeten DNA-Fragmente lässt sich das Auflösungsvermögen der Untersuchung im Vergleich zur konventionellen CGH enorm steigern. Zahlreiche Publikationen belegen die prinzipielle Tauglichkeit des Verfahrens nicht nur in der Tumorzytogenetik, sondern auch bei konstitutionellen Chromosomenanomalien. Die gezielte Auswahl von DNA-Fragmenten erlaubt zudem eine Feinanalyse bestimmter Chromosomenregionen oder bei spezifischen klinischen Fragestellungen. Technische Unzulänglichkeiten, eine fehlende Standardisierung und hohe Kosten haben allerdings bislang eine weite Verbreitung der Methode in der Routinediagnostik behindert.

Oligonukleotid-Arrays

In jüngster Zeit wurde der Ansatz einer arraybasierten Chromosomendiagnostik durch eine weitere Option ergänzt. Sie beruht auf hochauflösenden Oligonukleotid-Arrays, die in der Untersuchung von Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotid polymorphisms, SNP) in der Genomforschung verbreitet sind (z.B. GeneChip® der Firma Affymetrix). Im Gegensatz zur Array-CGH ist lediglich eine minimale Menge Test-DNA (250 ng) für die Hybridisierung erforderlich. Unterschiede in der Kopienzahl werden in einem komplexen statistischen Verfahren durch den Vergleich mit Kontrollen ermittelt. Zusätzlich können uniparentale Disomien sowie ein Heterozygotieverlust (loss of heterozygosity, LOH) diagnostiziert werden. Kürzlich wurde vom erfolgreichen Einsatz eines Chips mit über 100 000 SNPs bei der Diagnostik von konstitutionellen Chromosomenanomalien berichtet [3]. Die Methode stösst damit in eine neue Dimension des Auflösungsvermögens für einen Screening-Ansatz vor.

Schlussfolgerungen

Konventionelle Chromosomenuntersuchungen zeichnen sich durch eine sehr hohe diagnostische Sicherheit aus. Die neuen arraybasierten Methoden müssen diese in der klinischen Routinediagnostik erst noch unter Beweis stellen. Zudem sind sie gegenwärtig für eine Diagnostik von balancierten Chromosomenstrukturaberrationen oder eines Mosaizismus nicht oder nur bedingt geeignet. Die Frage der natürlichen Variabilität der Kopienzahl (copy-number polymorphism, CNP) ist bislang nur ungenügend untersucht worden. Noch sind die Geräte- und Testkosten vergleichsweise hoch. Trotzdem ist der Beweis der generellen Tauglichkeit der neuen Methoden längst erbracht. Erstmals in der bald 50jährigen Geschichte der Chromosomendiagnostik wird ein Konzept erkennbar, das die Chromosomenpräparation und die mikroskopische Untersuchung in weiten Bereichen der klinischen Diagnostik als Methode der ersten Wahl ersetzen kann. Es gehört nicht viel Phantasie dazu, sich vorzustellen, dass beispielsweise ein pränataler Aneuploidieausschluss per Chip nach einer Grossserienproduktion schon bald kostengünstiger möglich sein wird, als dies heute der Fall ist. Der Nachteil der Nichtentdeckung balancierter Anomalien wird vermutlich durch ein wesentlich höheres Auflösungsvermögen, also durch die Möglichkeit der Diagnose bislang unsichtbarer Strukturanomalien, mehr als aufgewogen.
Ist dies das Ende der konventionellen Chromosomenuntersuchung? Eher nicht. Die klassischen ZytogenetikerInnen können sich freuen, dass ihre Kunst auch in der Routinediagnostik zwar seltener, dafür aber vermutlich noch lange Zeit gefragt sein wird.

Korrespondenz:
Prof. Dr. med. Peter Miny
Abteilung Medizinische Genetik
Universitäts-Kinderspital
beider Basel (UKBB)
Römergasse 8
CH-4005 Basel
peter.miny@unibas.ch

Literatur

1 Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. Nat Rev Genet. 2002;3:769–78.
2 Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. Nat Rev Genet. 2005;6:782–92.
3 Slater HR, Bailey DK, Ren H, Cao M, Bell K, Nasioulas S, et al. High-resolution identification of chromosomal abnormalities using oligonucleotide arrays containing 116,204 SNPs. Am J Hum Genet. 2005;77:709–26.