



## **Klinische Anwendung der Array-CGH (Microarrays, „Genchips“) in der Pränataldiagnostik**

Maximilian Schmid, Barbara Pertl, Christoph Duba, Michael Speicher

### **Zusammenfassung:**

In den letzten Jahren haben sich die Methoden der genetischen Analyse rasant weiterentwickelt. In der Pränataldiagnostik ist die klassische Chromosomenanalyse durch ein weiteres Verfahren mit einem deutlich besseren Auflösungsvermögen, der sogenannten „Array-CGH“ (engl.: comparative genomic hybridization, CGH; deutsch: vergleichende genomische Hybridisierung) ergänzt worden. Die Array-CGH ist in der Lage, auch sehr kleine Verluste (sogenannte „Deletionen“) oder Gewinne (sogenannte „Duplikationen“) an Chromosomen nachzuweisen, die mit der herkömmlichen Chromosomenanalyse nur schwer oder gar nicht erkannt werden können. Diese numerischen Veränderungen werden auch Kopienzahlvarianten (engl.: copy number variations [CNVs]) genannt. Der große Vorteil der Array-CGH besteht im verbesserten Auflösungsvermögen, ein Nachteil ist jedoch, dass die Bedeutung von CNVs nicht in allen Fällen leicht zu bestimmen ist. Trotzdem wird erwartet, dass die Array-CGH die konventionellen zytogenetischen Verfahren in der Pränataldiagnostik in naher Zukunft ablösen werden.

### **Hintergrund:**

Seit den 1970er Jahren ist die Karyotypisierung das Standardverfahren in der pränatalen genetischen Diagnostik. Dabei werden die fetalen Chromosomen nach Behandlung mit Trypsin und dem Farbstoff Giemsa (GTG-Färbung) mikroskopisch untersucht. Chromosomenaberrationen werden dabei jedoch nur oberhalb einer bestimmten Größe (ca. 4 - 5 Millionen Basenpaare) erkannt. Viele krankheitsverursachende Veränderungen liegen in ihrer Ausdehnung aber unterhalb dieser Auflösungsgrenze. Solche Mikrodeletionen und Mikroduplikationen sind häufig Ursache für syndromale Erkrankungen, die mit Fehlbildungen und/oder mentaler Retardierung einhergehen können. Die Array-CGH, auch molekulare Karyotypisierung genannt, ermöglicht es solche submikroskopischen Veränderungen zu erkennen. Dabei ist anzumerken, dass monogenetische Erkrankungen die auf einer



Veränderung der DNA-Basensequenz beruhen auch mittels Array-CGH nicht erkannt werden.

### **Methode:**

Das Prinzip der Array-CGH beruht auf einer Hybridisierung farblich markierter DNA an ein Raster von immobilisierten DNA-Fragmenten, die bestimmten chromosomalen Regionen im Genom entsprechen. Patienten- und Referenz-DNA werden unterschiedlich markiert und gemeinsam auf den Microarray („Genchip“) hybridisiert. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten jeder einzelnen Sonde gibt Aufschluss über die Kopienzahl der entsprechenden DNA Abschnitte. Abweichungen von der Norm („copy number variations“, kurz CNVs) können so erkannt werden. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mittels einer speziellen Software, die es erlaubt genaue Angaben über den Zugewinn oder Verlust von Erbmaterial zu machen. Bei der Auswertung und Interpretation der Daten hinsichtlich der klinischen Relevanz spielt die Datenbankenrecherche eine große Rolle.

### **Anwendung in der Pränataldiagnostik:**

In rezenten Studien konnte nun auch für die Pränataldiagnostik gezeigt werden, dass mittels Array-CGH die Detektionsrate krankheitsrelevanter Chromosomenaberrationen im Vergleich zu herkömmlichen zytogenetischen Verfahren wesentlich verbessert werden kann. Wegweisend für den Einsatz der Array-CGH in der Pränataldiagnostik ist vor allem eine prospektive Studie, die am Columbia University Medical Center in New York und 28 weiteren US-Zentren durchgeführt worden ist<sup>1</sup>. Im Rahmen dieser Studie wurden die Ergebnisse von Array-CGH und Karyotypisierung an 4.406 Proben aus Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie verglichen. Die Array-CGH war in 98,8% der Fälle technisch erfolgreich; 87,9% der Proben konnten ohne Gewebekultur, also besonders rasch, analysiert werden. Alle Aneuploidien und unbalancierten Translokationen wurden mittels Array-CGH erkannt. Es konnte darüber hinaus eine höhere Detektionsrate krankheitsrelevanter Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden. In Fällen, bei denen eine Auffälligkeit im Ultraschall vorlag (z.B. Fehlbildungen) wurde eine zusätzliche Detektionsrate von 6% beschrieben. Bei sonstigen Indikationen (z.B. auffälliges Ersttrimester Screening) lag die zusätzliche Detektionsrate bei 1,7%. Insgesamt lässt sich aus den vorliegenden Daten

ableiten, dass die Array-CGH umso eher eine zusätzliche Chromosomenaberration aufdeckt, umso schwerwiegender die Auffälligkeit im Ultraschall bzw. die Fehlbildung ist. Hier ist auch zu erwähnen, dass außerdem eine erhöhte Nackentransparenz eine mögliche Indikation für eine Array-CGH darstellt. Bei einer Nackentransparenz  $>3,5\text{mm}$  (i.e.  $> 99.$  Perzentile) wurde eine zusätzliche Detektionsrate klinisch signifikanter Chromosomenaberrationen von bis zu 8.3% beschrieben <sup>2</sup>.

Aufgrund der hohen Auflösung hat die neue Methode das Potenzial auch Mikrodeletionen und Mikroduplikationen (CNVs) aufzudecken, deren klinische Bedeutung derzeit nicht klar ist. Dies liegt daran, dass das Erbgut jedes - auch gesunden - Menschen CNVs aufweist, sodass es auch CNVs gibt, die keinerlei Auswirkungen für die Empfänglichkeit oder Ausprägung für mögliche Erkrankungen oder Symptome haben. Somit gibt es, wenn CNVs entdeckt werden, drei Interpretationsmöglichkeiten:

- 1) Ein CNV ist mit hoher Wahrscheinlichkeit „pathogen“, also ursächlich verantwortlich für die Ultraschallauffälligkeiten oder andere Probleme in der bestehenden Schwangerschaft.
- 2) Ein CNV ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht pathogen und kann als eine harmlose Variante eingestuft werden.
- 3) Bei einem CNV ist eine Unterscheidung zwischen pathogen und nicht pathogen sehr schwierig oder derzeit sogar unmöglich. Diese CNVs werden als VOUS bezeichnet (variants of unknown significance).

In allen Fällen wird versucht, eine möglichst genaue Zuordnung der CNVs zu erreichen. Zur Unterscheidung pathogener bzw. nicht pathogener CNVs werden folgende Parameter herangezogen:

- Ist die Veränderung neu aufgetreten oder schon bei einem Elternteil vorhanden? Lässt sich ein CNV auch bei einem der beiden Eltern nachweisen, spricht dies eher für eine Variante ohne Konsequenzen für den Phänotyp.
- Es wird an Hand von internationalen Datenbanken überprüft, ob der gefundene CNV schon einmal beschrieben wurde und wie die Bedeutung dieses CNVs von Kolleginnen und Kollegen interpretiert wurde.

- Es werden Gene innerhalb der CNV Region identifiziert und überprüft, ob es Hinweise gibt, dass die Funktion eines dieser Gene die Ultraschallauffälligkeiten, die beim Feten gefunden werden, erklären kann.
- Sowohl Größe als auch Position eines CNVs im Genom werden zusätzlich zur Beurteilung der Pathogenität hinzugezogen.

Ein Nachteil der Array-CGH besteht vor allem im Bereich der unzureichenden Diagnose von balancierten Translokationen, niedriggradigen Mosaiken und der Triploidie. Daher wird ein Microarray oft nach oder in Kombination mit herkömmlichen zytogenetischen Verfahren (Fluoreszenz in situ-Hybridisierung [FISH], Karyotypisierung) angewendet. Umstritten ist derzeit ob jeder Patientin, die eine invasive pränatale Diagnostik in Anspruch nimmt, die Durchführung einer Array-CGH angeboten werden muss. Klar ist, das insbesondere bei Vorliegen einer oder mehrere Fehlbildung oder einer Nackentransparenz >99. Perzentile über die Möglichkeit einer Array-CGH bzw. einer weiterführenden genetischen Beratung aufgeklärt werden sollte.

### **Beratung:**

Die Möglichkeit der Aufdeckung von VOUS im Rahmen einer Array-CGH unterstreicht vor allem die Wichtigkeit der Einhaltung der gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf eine adäquate Beratung vor und nach einer pränatalen genetischen Analyse. Dabei ist insbesondere auf diagnostischen Möglichkeiten und Grenzen der Methode, die Möglichkeit der Generierung von „Zufallsbefunden“, sowie die Möglichkeit der Aufdeckung genetischer Veränderungen unklarer Bedeutung hinzuweisen.



## Literatur:

1. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D, Grobman WA, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb AN, Thom EA, Beaudet AL, Ledbetter DH, Shaffer LG, Jackson L. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012 Dec 6;367(23):2175-84.

2. Leung TY, Vogel I, Lau TK, Chong W, Hyett JA, Petersen OB, Choy KW. Identification of submicroscopic chromosomal aberrations in fetuses with increased nuchal translucency and apparently normal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011 Sep;38(3):314-9.

Ass.-Prof. Priv.-Doz. Dr. Maximilian Schmid  
Abteilung für Geburtshilfe und feto-maternale Medizin  
Universitätsklinik für Frauenheilkunde  
Medizinische Universität Wien  
Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien  
Währinger Gürtel 18-20  
1090 Wien

Ao.Univ.Prof. Dr. Barbara Pertl  
Pränatalzentrum Graz Ragnitz  
Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Medizinische Universität Graz  
8010 Graz

Univ.Doiz. Dr. Hans-Christoph Duba  
Humangenetische Untersuchungs- und Beratungsstelle  
Landes- Frauen- und Kinderklinik Linz  
Krankenhausstraße 26 – 30  
4020 Linz

Univ. Prof. Dr. Michael Speicher  
Institut für Humangenetik  
Medizinische Universität Graz  
Harrachgasse 21  
8010 Graz