



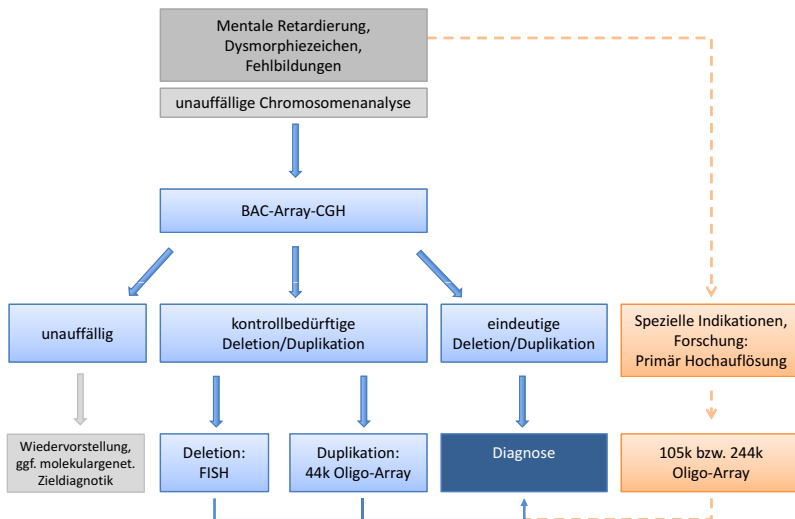
Einsatz der Array-CGH bei der Abklärung von Syndromen in der Pädiatrie

Dipl.-Biol. Uwe Heinrich, Dr. med. Imma Rost

Wissenschaftlicher Hintergrund

Die Array-CGH (**Comparative Genomic Hybridization**) ist inzwischen als wichtiges diagnostisches Verfahren für den Nachweis kleinster Chromosomenveränderungen in der pädiatrischen Genetik etabliert. Mit der konventionellen Karyotypisierung werden nur größere Strukturaberrationen (etwa 5 – 10 Mio Basenpaare) erfasst, kleinere Veränderungen können unter dem Mikroskop jedoch nicht erkannt werden. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass bei ca. 5 – 20% der Patienten mit **Mentaler Retardierung** bzw. **Dysmorphiezeichen** und/oder **Fehlbildungen** mittels Array-CGH submikroskopisch kleine Veränderungen gefunden werden, die als ursächlich für die klinische Symptomatik angesehen werden.

Durch Verwendung von DNA-Sonden (z.B. Bacterial Artificial Chromosomes = BAC-Klone der Firma BlueGnome, UK), die in sehr hoher Dichte auf Glasobjektträgern fixiert sind, lässt sich eine Auflösung von ca. 0,5 – 1 Mio Basenpaare, also etwa zehnfach höher als bei der klassischen Chromosomenanalyse, erreichen. Da Hybridisierungsreaktionen sehr komplex sind, können trotz interner Kontrollen Artefakte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Kontrollbedürftige Befunde sollten daher mit einer zweiten, unabhängigen Methode überprüft werden (**Validierung**). Dies kann mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (**FISH**) erfolgen, wobei dieselben Sonden, die in der Array-CGH auffällig waren, fluoreszenzmarkiert auf einem konventionellen Chromosomenpräparat eingesetzt werden. Damit ist meist der sichere Nachweis einer **Deletion** möglich. Nachteilig ist die Notwendigkeit einer frischen Heparin-Blutprobe für die Lymphozytenkultur und die Chromosomenpräparation.



Flussdiagramm für den Einsatz der Array-CGH in der Routinediagnostik (Heinrich et al.)

Für die Überprüfung von **Duplikationen** ist die FISH weniger geeignet, da eine Verdopplung eines Fluoreszenz-Signals im Mikroskop meist nicht eindeutig zu erkennen bzw. auszuschließen ist. In unserem Haus kommt daher als weniger aufwändige und sichere Methode für



die Validierung von Duplikationen eine **Oligonukleotid-basierte Array-CGH-Plattform** zur Anwendung (sog. Cross Validation). Im Gegensatz zu BAC-Arrays bestehen hier die Sonden aus kurzen 60 Basenpaar-DNA-Stücken, die in noch höherer Dichte auf dem Objektträger fixiert werden können und daher ein Auflösungsvermögen von maximal 9.000 Basenpaaren, also ca. 100fach höher als die des BAC-Array, ermöglichen (z.B. Agilent Technologies, USA).

In anderen Institutionen und bei uns durchgeführte Studien haben gezeigt, dass nur ein sehr geringer Anteil der klinisch relevanten Chromosomenveränderungen kleiner ist als 1 Mb. Folglich kann durch den Einsatz von BAC-Arrays die überwiegende Mehrzahl relevanter Veränderungen nachgewiesen werden. Die begrenzte Zahl an detektierten Veränderungen garantiert für die Routinediagnostik **rasche Bearbeitungszeiten** bei vertretbarem Validierungsaufwand. Zudem stehen für die BAC-Array-CGH inzwischen umfangreiche klinische Datenbanken zur Verfügung, die eine Zuordnung der Analyseergebnisse zu definierten Krankheitsbildern erheblich erleichtern. Der Einsatz von hochauflösenden Oligonukleotid-Arrays ist daher aus unserer Sicht derzeit der Validierung kontrollbedürftiger Befunde, speziellen Fragestellungen (Custom-Arrays, s.u.) und der Forschung vorbehalten. Für die Validierung kontrollbedürftiger Befunde stellen Oligonukleotid-Arrays allerdings eine einfache und schnelle Alternative insbesondere gegenüber der quantitativen PCR dar.

Indikation

Unklare Entwicklungsverzögerung oder Syndrom, insbesondere bei unauffälligem Karyotyp

Anforderung

Array-CGH bei V.a. auf Entwicklungsverzögerung, humangenetisches Gutachten (**GKV**: gelber Ü-Schein Muster 6, **PKV**: blauer Untersuchungsauftrag "Pädiatrische Genetik")

Nach Rückprache: 44 k, 105 k oder 244 k Oligo-Array-CGH (skalierbare Auflösung)

Auf Anfrage: regionspezifische **Custom-Arrays**, z.B. für Bruchpunktbestimmungen bei unbalancierten Aberrationen oder Chromosom X-Chip bei V.a. X-chromosomale Störung

Material

1ml EDTA-Blut, für FISH-Validierung zusätzlich 3 ml Na-Heparin-Blut

Methode

Aus einer EDTA-Blut wird genomische DNA extrahiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die markierte Patienten-DNA wird zusammen mit der markierten Referenz-DNA auf einem Chip aufgetragen und hybridisiert. Die Hybridisierungsergebnisse werden mittels eines Laser-Scanners ausgelesen und mit Hilfe einer speziellen Software ausgewertet.

Dauer der Untersuchung

Ca. 2 Wochen nach Probeneingang

Kosten

Die Abrechnung erfolgt entsprechend EBM-Ziffern 11312 und 11230, bzw. GOÄ-Ziffern 3920, 3924 und 80.

Die Kosten sind bei ärztlicher Indikation Bestandteil der humangenetischen Diagnostik und nicht vom Laborbudget betroffen.

Literatur

Heinrich et al, Eur J Hum Genet (Abstract, *in press*), Fan et al, Hum Mut 28:1124 (2007) / Menten et al, J Med Genet 43:625 (2006) / deVries et al, Am J Hum Genet 77:606 (2005) / Rost et Klein, J Lab Med 29:152 (2005)