

# Übersicht über das aktuelle Methodenspektrum im Rahmen der tumorzytogenetischen Labordiagnostik bei hämatopoietischen Neoplasien



Das Spektrum an Untersuchungsmöglichkeiten in der tumorzytogenetischen Labordiagnostik hat sich in den vergangenen Jahrzehnten wesentlich verändert und erweitert. Noch bis vor 15-20 Jahren war die konventionelle (= klassische) Chromosomenuntersuchung unter Verwendung des Lichtmikroskops die einzig verfügbare Technik in der Tumorzytogenetik und damit auch die einzige Methodik, die man im Rahmen einer zytogenetischen Diagnostik „wählen“ konnte. Mit der Einführung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) wurde dann eine zweite Untersuchungsmethodik etabliert; diese wird überwiegend ergänzend eingesetzt, wenn die konventionelle Chromosomenuntersuchung kein eindeutiges Resultat ergibt. Die molekulare Chromosomenuntersuchung auf der Basis von Microarray hat in der jüngeren Vergangenheit als nunmehr dritter methodischer Ansatz Eingang in die tumorzytogenetische Labordiagnostik gefunden.

Diese stete Erweiterung des Methodenspektrums hat einerseits zu einer nicht unerheblichen Verbesserung in der Diagnostik per se, andererseits aber auch zu einer gewissen Verunsicherung bezüglich einer sinnvollen Anforderung durch den Auftraggeber geführt.

Aus diesem Grund stellen wir in dieser Uebersicht die verschiedenen Methoden mit ihren Nachweismöglichkeiten sowie den jeweiligen Vor- und Nachteilen sowie sonstigen Limitierungen aus labortechnischer Sicht vor. Rein molekulargenetische Untersuchungsverfahren werden in dieser Zusammenstellung nicht berücksichtigt.

## Konventionelle (= klassische) Chromosomenuntersuchung

Die konventionelle Chromosomenuntersuchung beurteilt die Zahl und die Grobstruktur von Chromosomen unter Verwendung des Lichtmikroskops; sie erlaubt einen groben chromosomalen Gesamtüberblick und erkennt grössere Imbalancen (z.B. Deletionen, Duplikationen) sowie Rearrangements (z.B. Translokationen, Inversionen). Bei letzteren bleibt jedoch oft ungeklärt, ob diese balanciert oder mit einer zusätzlichen Imbalance im Bereich der Bruchstellen einhergehen.

## Vorteile der konventionellen Chromosomenuntersuchung:

- Uebersicht über alle Chromosomen und Nachweis von lichtmikroskopisch erkennbaren Chromosomenanomalien (sowohl Imbalancen als auch Rearrangements) oberhalb des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops.
- direkte „sichtbare“ Beurteilung der individuellen Chromosomen
- bei lymphoproliferativen Neoplasien konnte in den vergangenen Jahren die Proliferation und damit der Nachweis von pathologischen Zellklonen durch verbesserte In-vitro-Stimulationen gesteigert werden.

## Limitierungen respektive Einschränkungen der konventionellen Chromosomenuntersuchung:

- das Auflösungsvermögen liegt bei Chromosomenpräparaten von Tumorpatienten häufig bei ca. 10 Millionen Basenpaaren; d.h. Veränderungen, die kleiner sind (kryptisch), lassen sich idR nicht oder nicht eindeutig erkennen.
- Strukturauffälligkeiten im Grenzbereich des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops
- Die Beschreibung einer Chromosomenveränderung unter Verwendung der zytogenetischen Banden erlaubt nur eine grobe Grössenabschätzung.
- Das Ergebnis basiert auf einer quantitativ kleinen Zahl an ausgewerteten Metaphasen (20 bis 25); d.h. schwächere Mosaikbefunde unter 10 bis 20% können übersehen werden.
- Die Methodik bedingt obligat eine vorausgegangenen In-vitro-Zellkultur; dabei kann eine selektiv variierende Proliferation von unterschiedlichen Zellklonen nicht ausgeschlossen werden, was zu einer quantitativen Ueber- oder Unterrepräsentation bis hin zum Nichterkennen eines pathologischen Zellklons führen kann.
- Im Extremfall kann ein völliges Wachstumsversagen in der Zellkultur eine konventionelle Chromosomenanalyse komplett verhindern.

### Kosten der konventionellen

#### Chromosomenuntersuchung:

- Die Kosten bewegen sich gemäss aktueller Analysenliste (Version Juli 2015; verbindlich für die gesamte Schweiz) zwischen 850 und ca. 1000 Taxpunkten (TP; 1 TP = 1 CHF).
- Eine zusätzliche molekulare Chromosomenuntersuchung und/oder ergänzende FISH-Analysen werden im Rahmen der unten genannten Aufwendungen gesondert verrechnet.

### Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die FISH-Technik überprüft selektiv das Vorliegen von Imbalancen sowie Rearrangements sowohl oberhalb als auch unterhalb des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops. Diese Methodik liefert aber keinen generellen Ueberblick über alle Chromosomen, sondern erlaubt nur eine punktuelle Aussage. FISH-Analytik ist sowohl an Metaphasepräparaten sowie – in Abhängigkeit vom verwendeten Sondentypus – auch an Interphasekernen möglich.

Das Auflösungsvermögen liegt bei FISH-Analysen in Abhängigkeit von der jeweiligen Sondengrösse bei ca. 0.5 Millionen Basenpaaren.

#### Vorteile der FISH-Untersuchung:

- Detaillierte Ueberprüfung einer eindeutig definierten Fragestellung im Rahmen einer Chromosomenanomalie ober- und unterhalb des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops
- ein Einsatz ist – je nach Fragestellung – auch an Interphasekernen möglich; damit ist diese Methodik teilweise unabhängig von In-vitro-Zellkulturen und den damit verbundenen Einschränkungen.

#### Limitierung respektive Einschränkung der FISH-Untersuchung:

- Auffälligkeiten ausserhalb der Nachweisbereiche bzw. unterhalb der Nachweisgrenzen der eingesetzten Sonden sind idR nicht erkennbar; d.h. FISH erlaubt ein „scharfes“ Bild eines einzelnen Details, während das Gesamtbild im Dunkeln bleibt.
- keine Grössenabschätzung der gefundenen Chromosomenanomalie
- Bei Abklärung mehrerer möglicher Chromosomenanomalien in Abhängigkeit von der klinischen Fragestellung (z.B. MDS, CLL) ist eine Reihe von parallel oder sequentiell durchzuführenden Hybridisierungen notwendig (Reihen-FISH-Untersuchung).
- FISH-Untersuchungen werden meist ergänzend zu anderen zytogenetischen Analysetechniken eingesetzt. In speziellen Situationen ist aber auch ein alleiniger FISH-Einsatz möglich.
- FISH an Metaphasen unterliegt den gleichen Limitierungen in Zusammenhang mit der In-vitro-Zellkultur wie bei der konventionellen Chromosomenuntersuchung (siehe oben); Metaphase-FISH basiert idR auf der Analyse von 10 bis 20 Metaphasen.
- FISH an Interphasekernen (auch möglich ohne In-vitro-Kultur) bedingt ein statistisch basiertes Interpretationsvorgehen unter Verwendung von laborinternen Cut-off-Leveln.

Je nach Sondentypus sind die Grenzen bei vorhandenen Mosaikbefunden unterschiedlich: bei Imbalancen idR >10%; bei Rearrangements >5%. Die Cut-off-Level gelten standardmässig nur für die Gesamtzellzahl; bei der Analyse von Subpopulationen verlieren sie ihre Gültigkeit. Eine Interphase-FISH-Auswertung basiert idR auf der Auswertung von mindestens 200 Kernen.

- Die Durchführung von Interphase-FISH und Metaphase-FISH können in Zusammenhang mit der In-vitro-Kultivierung zu unterschiedlichen Ergebnissen führen; gleiches gilt für Interphase-FISH und konventioneller Chromosomenanalyse.
- Der alleinige Einsatz von selektiven FISH-Untersuchung erlaubt zwar die Ueberprüfung von wichtigen Indikations-typischen Anomalien, liefert aber keine Hinweise auf mögliche atypische Auffälligkeiten.

#### Kosten der FISH-Untersuchung:

- Eine Einzel-FISH-Analyse wird mit 350 Taxpunkten pro Sonde verrechnet, wobei pro untersuchter Zielregion eine spezifische FISH-Sonde verstanden wird; eine Translokationssonde, die zwei verschiedene Genregionen überprüft (zwei Zielregionen) wird demgemäss mit 700 Taxpunkten verrechnet. Kontrollsonden werden nicht verrechnet.
- Gemäss Analysenliste können maximal 5 Sonden verrechnet werden.

### Molekulare Chromosomenanalyse (Microarray)

Die molekulare Chromosomenanalyse basiert auf der Microarray-Technologie und ist damit unabhängig vom Lichtmikroskop als Auswertungssystem. Diese Technik überprüft genomweit das Vorliegen von Imbalancen und „copy-neutral loss of heterozygosity“ (CN-LOH). Das Auflösungsvermögen variiert in Abhängigkeit der verwendeten Array-Plattform und wird in der tumorzytogenetischen Diagnostik auf durchschnittlich 400 kb eingestellt; der Microarray liefert damit – ebenso wie die konventionelle Chromosomenuntersuchung – einen Gesamtüberblick über alle Chromosomen, jedoch bei einer vergleichsweise erheblich gesteigerten Auflösung.

#### Vorteile der molekularen

#### Chromosomenuntersuchung:

- Uebersicht über alle Chromosomen und Nachweis von Imbalancen sowie CN-LOHs ober- und unterhalb des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops
- genaue Grössenabschätzung der nachgewiesenen Auffälligkeiten
- Je nach verwendeter Array-Plattform ist auch der Nachweis von „copy-neutral loss of heterozygosity“ (CN-LOH) möglich, die weder mittels FISH noch mittels konventioneller Chromosomenuntersuchung erkannt werden können.

- Die An-/Abwesenheit von Imbalancen nach Microarray und dem Hinweis auf ein Rearrangement nach konventioneller Chromosomenuntersuchung kann bei der Entscheidung, ob das Rearrangement balanciert oder unbalanciert ist, hilfreich sein.
- unabhängig von jeglichen In-vitro-Zellkulturen; die Verwendung von DNA aus der Ausgangsprobe vermeidet mögliche kulturbedingte quantitative Verzerrungen.
- idR eine kürzere Bearbeitungszeit bis zum primären Befund (im Vergleich zur konventionellen Chromosomenuntersuchung)

Limitierung respektive Einschränkung der molekularen Chromosomenuntersuchung:

- kein Nachweis von balancierten Rearrangements (Translokationen, Inversionen); es werden ausschliesslich genomische Imbalancen (Deletionen, Duplikationen) sowie LOHs erkannt.
- Der Microarray ist semiquantitativ; d.h. eine „exakte“ quantitative Abschätzung der Ergebnisse ist nicht möglich. In Abhängigkeit von der Grösse der betroffenen Region können Mosaikbefunde gegebenenfalls bis unter 15% erkannt werden, sollten aber im Zweifelsfalle mit einer Einzel-FISH-Analyse überprüft werden.
- keine direkte „sichtbare“ Beurteilung der Chromosomen

Kosten der molekularen Chromosomenuntersuchung:

- Die Kosten für eine genomische Analyse auf der Basis der Microarray betragen gemäss Analysenliste pauschal 2800 TP.
- Sollten zusätzliche Einzel-FISH-Analysen notwendig sein, so sind deren Kosten in der genannten Pauschale nicht mit inbegriffen.
- Eine zusätzliche konventionelle Chromosomenuntersuchung wird ebenfalls separat verrechnet.

**Einsatz der verschiedenen Untersuchungstechniken in der tumorzytogenetischen Labordiagnostik**

Jede der vorgestellten Methoden kann einerseits überlappende, andererseits aber auch zusätzliche Informationen zum Genotyp in der Tumorzytogenetik beisteuern. Ein sinnvoller Einsatz der verschiedenen Techniken – unabhängig ob isoliert oder in Kombination – hängt ganz wesentlich von der klinischen Fragestellung sowie der individuellen Situation (Erstdiagnose, Verlaufskontrolle bei stabilem respektive verändertem klinischen Verlauf, aus Voruntersuchungen bekannte Chromosomenanomalien, unklare klinische Situation etc.) des Patienten ab. So stellt die konventionelle Chromosomenuntersuchung bei akuten Leukämien sowie bei Indikationen, bei denen nur eine respektive wenige Chromosomenanomalien indikationstypisch sind (z.B. CML, follikuläres Lymphom, Mantelzelllymphom) die Methode der Erstuntersuchung dar, verbunden mit der Option, dass weitere Methoden ergänzend (z.B. FISH bei

erkennbaren Rearrangements und/oder Microarray bei komplex aberranten Situationen) nachträglich zum Einsatz kommen können. Allerdings berücksichtigen aktuelle Publikationen sowie die WHO-Klassifikation 2008 zunehmend auch Daten aus einer molekularen Chromosomenanalyse.

Bei klinischen Fragestellungen, bei denen per se eine grössere Anzahl an möglichen Imbalancen zur Ueberprüfung anstehen (z.B. MDS, CLL) bietet sich auch heute schon die molekulare Chromosomenuntersuchung als Erstanalyse an; diesem tragen wir dahingehend Rechnung, dass wir bei diesen beiden genannten Indikationen initial eine molekulare Chromosomenanalyse durchführen. Ergänzende Einzel-FISH-Analysen (z.B. Ueberprüfung auf mögliche balancierte Rearrangements) sind möglich, während eine konventionelle Chromosomenuntersuchung zusätzliche Hinweise auf atypische Rearrangements liefern kann.

Selbstverständlich steht es jedem Auftraggeber frei, aufgrund der ihm bekannten klinischen Situation zu entscheiden, welchen methodischen Ansatz er für eine tumorzytogenetische Untersuchung bei vorgegebener Indikation wählt; dabei sind wir bemüht, gemäss den uns übermittelten klinischen Angaben und der aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisse das bestmögliche Untersuchungsergebnis für den Patienten zu liefern. Wir sind generell offen für individuelle Absprachen vor, während und nach einer laufenden Untersuchung. Je nach angewandeter Technik weisen wir auf mögliche methodische Limitierungen im Befundbericht hin und geben weitergehende Empfehlungen.

Abschliessend bedanke ich mich im Namen des Labors für Tumorzytogenetik ganz herzlich für Ihr Interesse an unserer Arbeit und hoffe, mit diesen Ausführungen zum allgemeinen Verständnis in der tumorzytogenetischen Labordiagnostik beigetragen zu haben. Für Rückfragen und ergänzende Erläuterungen stehe ich Ihnen selbstverständlich gerne zur Verfügung.

Basel, im November 2015

---

Bei Rückfragen oder weiterem Informationsbedarf wenden Sie sich bitte an das Sekretariat der Medizinischen Genetik: T +41 (0)61 265 36 20