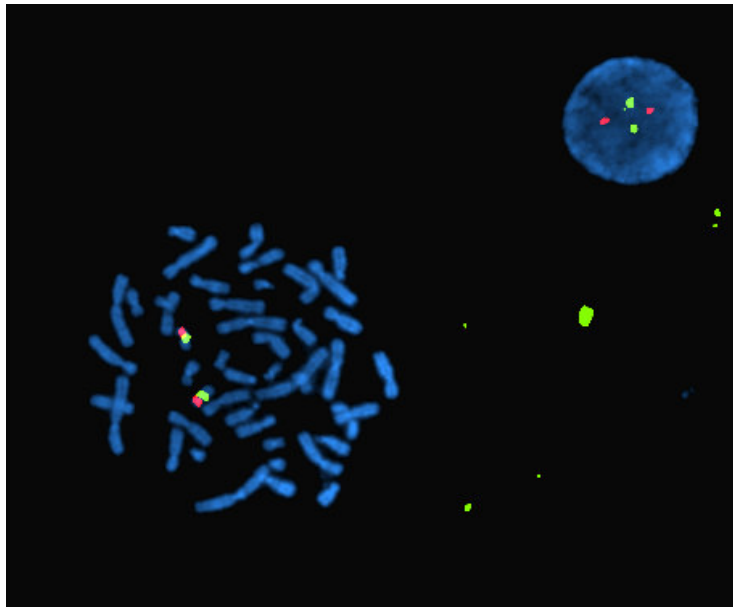


Utredning av ukjente syndromer ved hjelp av moderne cytogenetiske metoder

5. års oppgave i Stadium IV - medisinstudiet ved Universitetet i Tromsø

Stina Michelle Pettersen, MK-04
Hans-Johnny Schjelderup Nilsen, MK-03



Tromsø
September 2008

Veiledere:
Valeria Marton, overlege, dr. med
Mona Nystad, forsker, cand. scient
Medisinsk Genetisk avdeling, UNN/UiTø

Det Medisinske Fakultet
Universitetet i Tromsø

Tekst til figur på forsiden:

Bildet på forsiden viser resultatet av FISH analysen vi selv utførte på laboratoriet. Prøven er normal med tanke på om pasienten har Smith-Magenis Syndrom (SMS) eller ikke. På bildet er kromosomene og en cellekjerne farget blå med *DAPI II*. I tillegg er det brukt probe (rød) for Smith-Magenis regionen som har festet seg til SMS-kritisk region i bånd 17p11.2 på begge kromosom 17. Dette indikerer at personen er normal med henblikk på utredning for Smith-Magenis syndrom. En kontrollprobe merket med grønn fluorescens er også brukt for å identifisere begge kromosom 17.

Forord

Ved 5. året ved medisinstudiet i Tromsø skal studentene skrive en større oppgave med valgfritt tema. Etter litt frem og tilbake, og prøving og feiling slo vi oss sammen og med et mål, og det var å skrive vår 5. års oppgave ved Medisinsk Genetisk avdeling på UNN.

Vi tok kontakt med dr. Valeria Marton og fikk raskt svar om at vi var velkomne. Hun lurte også med seg en kollega av seg, cand.scient. Mona Nystad som skulle være vår biveileder. Av praktiske årsaker siden vi befinner oss på hvert vårt medisinskull måtte arbeidet gjøres så komprimert og effektivt som mulig sommeren 2008. I den forbindelse er vi klar over at vi til tider har skapt hodebry og ekstraarbeid for våre veiledere og andre ved medisinsk genetisk avdeling, og vi vet at uten innsats og hjelp fra dere ville det aldri fungert.

Vi vil rette en stor takk til dr. Valeria Marton for å ha organisert arbeidet vårt og veiledet oss gjennom arbeidet på en utrolig fin måte. I tillegg må vi takke Mona Nystad for å ha gjort en kjempejobb ved å ha oss på laboratoriet ved genetisk avdeling, presentert oss for hele avdelinga og hjulpet oss i skrivinga. Og selvfølgelig takk til alle som jobber på Medisinsk Genetisk avdeling for å ha tatt i mot oss så hjertelig, og i tillegg vært veldig hjelpsomme (vi hadde for eksempel ingen anelse om at man måtte benytte både på-knappen og kneet, for å holde på plass døra, for å få makuleringsmaskinen til å fungere).

I tillegg sender vi en takk til Marius for at du har gått stille i dørene når vi har okkupert stua og datamaskinen din for å arbeide med oppgaven, og for at vi har fått bruke bilen uansett tid på døgnet vi har hatt veiledning.

Tromsø, august 2008.

Stina Michelle Pettersen og Hans-Johnny Schjelderup Nilsen

Resyme:

Genetikk er et fag som tar for seg arvelige og genetiske sykdommer. Viktigheten av genetikk har økt de siste årene, samtidig som det er ervervet nyere og mer spesifikke genetiske undersøkelsesmetoder. Medisinsk genetikk omfatter en klinisk genetisk del og en laboratoriedel. Innenfor laboratoriedelen av genetikken skilles det mellom molekylærgenetikk og cytogenetikk. I denne oppgaven vil vi presentere og drøfte hvordan de ulike nye cytogenetiske metodene fungerer og brukes. Metoder vi spesielt konsentrerer oss om er de cytogenetiske metodene FISH, QF-PCR og matrise-CGH og den molekylærgenetiske metoden MLPA. Ved gjennomgang av litteratur, utførelse av laboratorieanalyser som FISH og QF-PCR og gjennomgang av to pasientkasuistikker ser vi på hvordan de moderne analysemetodene benyttes i utredning ved mistanke om ukjent genetisk sykdom.

Innholdsfortegnelse

Kapittel 1. Innledning	1
1.1 Oppgavens problemstilling	2
1.2 Oppgavens formål	3
1.3 Oppgavens oppbygning.....	3
Kapittel 2. Teoribakgrunn	5
2.1 DNA.....	5
2.1.1 "Polymerase chain reaction".....	5
2.1.2 Sekvensering.....	6
2.1.3 Southern Blot analyse	6
2.1.4 "Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification"	6
2.2 Cytogenetikk	7
2.2.1 Kromosomer	7
2.2.2 Kromosomanalyse	8
2.2.3 Prenatal diagnostikk.....	8
2.3 Sentrale cytogenetiske analyser	10
2.3.1 G-bånd analyse	11
2.3.2 Fluorescens <i>in situ</i> hybridiserings analyse.....	11
2.3.3 "Comparative genomic hybridization"	12
2.3.4 "Quantitative fluorescence polymerase chain reaction"	13
2.4 Klinisk genetikk	14
2.4.1 Arvegang	15
2.4.2 Syndromologi	16
2.4.3 Smith-Magenis Syndrom	17
Kapittel 3. Metode	20
3.1 Litteraturstudie.....	20
3.2 Håndtering av ulike databaser.....	20
3.3 Arbeidsmetoder ved genetisk avdeling	20
3.4 Minikurs i cytogenetikk	21
3.5 Selvført laboratoriearbeid	21
3.5.1 Fluorescens <i>in situ</i> hybridization	22
3.5.2 "Quantitative fluorescence polymerase chain reaction"	22
3.5.3 "Array- Comparative genomic hybridization".....	22
3.6 Pasientkasuistikker.....	23
3.7 Metodenes styrker og svakheter	23
Kapittel 4. Klinisk genetikk og cytogenetikk drar vekslers på hverandre	24
4.1 Pasientkasuistikk 1	24
4.1.1 Sykehistorie	24
4.1.2 Kliniske funn:	25
4.1.3 Sammenlikning av artikler og pasientens sykehistorie.....	25
4.1.4 Cytogenetiske funn	26
4.2 Pasientkasuistikk 2.....	27
4.2.1 Mors sykehistorie, kliniske funn og cytogenetiske funn.	27
4.2.2 Datters sykehistorie, kliniske funn og cytogenetiske funn.	28
Kapittel 5. Oppsummering og diskusjon	30
Figurer	35
Referanseliste	40

Kapittel 1. Innledning

Denne oppgaven handler om medisinsk genetikk, det er den delen av medisinen som tar for seg arvelige og genetiske sykdommer. Medisinsk genetikk er et bredt fagområde som berører veldig mange andre fagområder innen medisinen, og det er ikke til å unngå å støte borti genetikk i andre medisinske spesialiteter som pediatri, gynekologi, onkologi, allmennmedisin, hud, øye, nevrologi med flere. Under profesjonsstudiet i medisin ved Universitetet i Tromsø får en innblikk i genetikk allerede 1. året på studiet. Og det var vel allerede da vi fant en viss fascinasjon for temaet, men så forsvant det litt ut av studiet i noen år før det dukket opp igjen forelesninger og uketjeneste om temaet på høsten, 4. året. Temaet vil for mange muligens virke både tørt og vanskelig å forstå, men når det finnes en engasjert foreleser som forklarer det meste som om det var den enkleste ting i verden og i tillegg nevner på uketjeneste at vi gjerne må komme innom avdelingen og skrive vår 5. års oppgave der, var de fleste barrierer borte. Temaet var interessant, foreleseren ivrig, og avdelingen åpen og hjertelig, når sommeren 2007 kom var avtalen i boks, oppgaven vår skulle handle om medisinsk genetikk.

Faget medisinsk genetikk er et vidt felt. Det innbefatter arvelige sykdommer, syndromer, medfødte misdannelser, psykisk utviklingshemming og prenatal diagnostikk for å nevne noe. I Norge har vi fire genetiske avdelinger, i Nord-Norge ligger denne i Tromsø. Her finnes det både poliklinisk virksomhet og laboratorium som utfører både kromosomanalyser (cytogenetikk) og DNA analyser (molekylærgenetikk). Ved utredning av genetisk sykdom er klinikk, cytogenetikk og molekylærgenetikk tett knyttet sammen. Spesielt nyere metoder av cytogenetikk er vanskelig å skille fra DNA analyser. Denne oppgaven skal i hovedsak ta for seg den delen av genetikken som beskjeftiger seg med kromosomanalyser, altså cytogenetikken.

Kromosomer er sammensatt av lange DNA molekyl og befinner seg i kjernen i cellene. Kromosomer er kun synlig i mikroskopet under celledeling. Normalt antall kromosomer i et menneske er 46 (hvorav to er kjønnskromosomer, og 44 er autosomale kromosomer). Karyotyping er systematisk oppstilling av kromosomene. Kromosomavvik kan sees som for mange eller for få kromosomer, duplikasjoner, delesjoner, translokasjoner, insersjoner og inversjoner. Avhengig av størrelse og lokalisasjon benyttes ulike metoder for å diagnostisere disse.

Påvises det en endring i arvematerialet for eksempel på kromosomene, kan dette ikke kureres, men det å få påvist en slik endring har mye å si for den det gjelder. Pasientene får en diagnose og en bekreftelse på en mistanke om at noe var galt. Det vil være mulig å gi en prognose samt tilpasse oppfølging for hver enkelt pasient. Det vil også være mulig å angi gjentakelsesrisikoen slik at det lettere kan tas stilling til om et par vil forsøke å bli gravid igjen eller ikke. Og få en diagnose vil åpne muligheten for at pasienter og foreldre får opplysninger og kontakt med pasientgrupper og andre i samme situasjon, slik at erfaringer og råd kan utveksles.

Viktigheten av cytogenetikk har økt de siste årene. Samtidig er det ervervet nyere og mer spesifikke undersøkelsesmetoder. I denne oppgaven vil vi forklare hvordan de ulike nye cytogenetiske metodene fungerer og brukes, i tillegg til å knytte de sammen med to pasientkasuistikker for å vise hvordan cytogenetiske analyser benyttes i utredning ved mistanke om genetisk sykdom.

1.1 Oppgavens problemstilling

I utarbeidelse av prosjektbeskrivelsen hadde vi lyst til å arbeide med klinisk og molekylærgenetisk utredning av barn med ukjent syndrom. Etter hvert som arbeidet tiltok ble det klart at problemstillingen var litt for omfattende med tanke på en 5. års oppgaves størrelse. Det var viktig å fokusere på noe mer spesifikt. Vi hadde flere møter og diskusjoner med veileder og biveileder om ulike mer spesifikke deler av medisinsk genetikk, før vi kom frem til at vi ønsket å fokusere mer på de nyeste cytogenetiske undersøkelsene som anvendes per i dag i utredningen av uavklarte genetiske sykdommer.

I utarbeidelsen av oppgaven har vi arbeidet en uke på laboratoriet ved Medisinsk Genetisk avdeling, Universitetssykehuset Nord-Norge sommeren 2008. Vi har i perioden høsten 2007 og våren 2008 gjennomgått relevant litteratur og to pasientkasuistikker som illustrerer hvordan en genetisk utredning foregår. Under arbeidet på laboratoriet ble vi kjent med nye cytogenetiske analyser som er tatt i bruk når det gjelder utredning av ulike kromosomavvik. Dermed ble oppgavens problemstilling definert innenfor cytogenetikken med fokus på de nyeste og moderne cytogenetiske metodene og hvordan disse bidrar i utredningen av pasienter med en mistenkt genetisk sykdom.

1.2 Oppgavens formål

Oppgaven er skrevet som en 5.års oppgave i medisin ved Det Medisinske Fakultet ved Universitetet i Tromsø. Dette er en obligatorisk del av studieforløpet av medisin ved universitetet. Studentene velger hvilket emne det skal fordypes i. I tillegg er et av hovedmålene med oppgaven å lære seg å skrive en større forskningsoppgave slik at det dannes et grunnlag ved eventuell fremtidig forskning. Emnet i vår oppgave, enkelte sentrale cytogenetiske metoder, ble valgt fordi vi var nysgjerrige på genetikken og anså dette som et emne det er stor nytte av å ha kunnskaper i. Denne oppgavens formål er mangfoldig: Som fremtidige virkende leger er det etter vår mening viktig å gjenkjenne syndromer ved komplekse sykdomsbilder. Cytogenetikken er avgjørende i utredningen av slike sykdommer. I tillegg er genetikk et fag med nye og avanserte utredningsmetoder, og kunnskap om dette er til store nytte for å vite hvilke muligheter og begrensninger de ulike analysene har i utredning av en pasient. Vi ville lære oss hvordan utredningen foregår, hva det sees etter og hvordan samspillet mellom klinikken og cytogenetiske utredningsmetoder fungerer. For å kunne beskrive dette hadde vi en praktisk deltakelse i laboratoriearbeid og praktisk ervervelse av enkelte laboratortekniske ferdigheter. Det var viktig for oss å lære håndteringen av ulike genetiske databaser for å finne relevant litteratur om emnet og hvordan vi skulle sile ut den viktige kunnskapen. Sistnevnte er veldig viktig kunnskap å ha med seg i fremtiden når man skal skrive større forskningsoppgaver, men også som et redskap for videre tilnærming av faktakunnskap.

1.3 Oppgavens oppbygning

Oppgaven starter med en innledning som omhandler vårt forhold til oppgaven og en enkel innføring i hva medisinsk genetikk er. Teoridelen omhandler molekylærgenetikk, cytogenetikk, beskrivelse av sentrale cytogenetiske metoder og klinisk genetikk. DNA analyse punktet er veldig generelt og kort fordi oppgaven i hovedsak handler om cytogenetikk, men likevel er punktet viktig i forståelsen av faget genetikk ikke minst med tanke på at cytogenetikken og molekylærgenetikken er så nært knyttet sammen. Under det som omhandler cytogenetikk gis det generell informasjon om kromosomer og hvorfor kromosomanalyser utføres, etter dette er det et punkt som beskriver analysemetodene. Siste del av teoridelen er om klinisk genetikk. Punktet omhandler beskrivelse av arvegang og syndromer, med spesiell vekt på Smith-Magenis Syndrom (SMS). Smith-Magenis syndrom er med for å gi en innføring opp i mot de to pasientkasuistikkene. Den ene pasienten har en

kromosomendring forenelig med SMS, mens den andre pasienten har et funn som ikke tidligere er beskrevet. Etter teoridelen tar vi for oss de ulike metodene om hvordan vi har arbeidet med oppgaven og hvilke styrker og svakheter vi synes våre arbeidsmetoder har hatt. Pasientkasuistikkene presenteres under kapittel 4. I oppsummeringen vil vi ta frem viktige poenger i oppgaven og drøfte hvilke cytogenetiske metoder som egner seg til forskjellige formål.

Kapittel 2. Teoribakgrunn

Teoridelen omhandler cytogenetikk, molekylærgenetikk (DNA) og klinisk genetikk. Vi vektlegger mest teori rundt cytogenetikken fordi det er det oppgaven i hovedsak omhandler. Imidlertid har vi valgt å ta med DNA og klinikk i tillegg for å skape et mer sammenhengende bilde. Vi vil starte med en kort omtale av DNA og molekylærgenetiske analysemetoder.

2.1 DNA

DNA kan utvinnes fra alt biologisk materiale. DNA-analyser kan avdekke både små og større endringer i arvestoffet. Vi vil i denne delen beskrive kort hva DNA er og de mest brukte metodene for DNA-undersøkelse som er PCR, sekvensering, Southern blot analyse og MLPA.

Arvestoffet, DNA, danner grunnlaget for kroppens oppbygning og funksjoner. DNA er bygget opp av nukleinsyrer som består av nukleotider (adenin (A), cytosin (C), guanin (G) og thymin (T)). De danner lange kjeder som er koblet sammen til to tråder som tvinnes sammen til en dobbelhelix. DNA er pakket sammen med histoner og kalles kromatin. Dette utgjør tilsammen et kromosom og er lokalisert i cellekjernene. Rekkefølgen av de fire basene A, C, G og T i et gen bestemmer rekkefølgen av aminosyrene i det proteinet genet koder for. Et gen er en del av DNA som koder for et spesifikt protein eller en del av et protein. Proteiner er byggesteiner i kroppen. Proteiner er bygget opp av ulike aminosyrer. Aminosyrenes plassering og rekkefølge avgjør proteinets struktur, funksjon og størrelse. En feil plassering av en aminosyre kan føre til dannelse av en feil proteinstruktur som igjen kan føre til et enzym som ikke fungerer. En endring i arvestoffet kan derfor føre til en sykdom dersom det involverer et gen.

2.1.1 "Polymerase chain reaction"

"Polymerase chain reaction" (PCR) er en metode som brukes for å lage mange kopier av en bestemt DNA- eller RNA-sekvens (23). Den kan amplifisere store mengder av et fragment på kort tid. Dette gjør den ved først å denaturere DNA tråden. To primere, en til hver DNA tråd, vil binde seg til DNAet. Primerne danner utgangspunkt for den nye DNA-tråden som lages av polymerasen ved at nye nukleotider koples til og danner komplementære bindinger til templatet. Templatet er et molekyl av en nukleinsyre, som et DNA, som er utgangspunkt for syntesen av et makromolekyl som for eksempel DNA. Prosessen kan gjentas ved at DNA på nytt denatureres og har igjen anledning til å binde nye primere og nytt DNA kan kopieres. Dette kan gjentas mange ganger og på denne måten får man amplifisert et fragment. PCR

benyttes til å kopiere gener eller exon for å se størrelsen og eventuelt detektere sykdom hos pasienten.

2.1.2 Sekvensering

Sekvensering er en metode for å oppdage sekvensvariasjoner eller rekkefølgen av nukleotider i et fragment av genomet. Utgangspunktet for DNA sekvensering er ofte et PCR-produkt. Dette kalles DNA templat. Ved sekvensering brukes kun en primer som er komplementær til starten av det området som skal sekvenseres. Primeren danner et utgangspunkt for polymerasen som setter inn komplementære deoksynukleotider (dATP, dCTP, dGTP og dTTP) i forhold til templatet. Det tilsettes også dideoksynukleotider (ddCTP, ddATP, ddGTP og ddTTP) merket med ulik fluorescens og disse gjør at påbygging av flere deoksynukleotider stopper og utnyttes i DNA sekvenseringsmetoden. En vil ende opp med fragmenter av ulik lengde som separeres ved elektroforese og sekvensen på fragmentet kan leses av.

2.1.3 Southern Blot analyse

Southern Blot analyse er en metode som brukes for å finne ut om det er korrekt størrelse og eller mengde av et bestemt DNA område (8). Måten dette gjøres på er først å isolere DNAet, slik at restriksjonsenzymmer kan klippe det opp i mindre fragmenter. Fragmentene er da blitt mindre og skilles fra hverandre ved hjelp av elektroforese gel. Fragmentene overføres til et nylonfilter (dette kalles blotting). En fluorescens merket probe tilsettes og bindes til komplementære DNA sekvenser på filteret. Prosessen foregår i en løsning filteret blir lagt i, og kalles hybridisering. En røntgenfilm legges på blotet og resultatet visualiseres. Southern Blot analyse benyttes til å oppdage store forandringer i DNAet.

2.1.4 “Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification”

”Multiplex ligation-dependent probe amplification” (MLPA) ble først beskrevet i 2002 av Shouten *et al.* (5, 15). MLPA er en metode der først og fremst antall kopier i et genom detekteres. Opptil 45 ulike gener, deler av gener, eksoner eller introner kan detekteres samtidig. Ved MLPA-analyse isoleres DNA fra pasientens blodprøver og spesifikke MLPA-prober tilsettes slik at de hybridiseres til målsekvenser i genomet til pasienten. I MLPA er det ikke nukleinsyrene, men probene som blir amplifisert og kvantifisert. Hver MLPA probe består av to oligonukleotid hemiprober, og disse kobles sammen av en ligase. Produktet etter

ligering amplifiseres ved bruk av PCR. Ved bruk av kapillær elektroforese blir PCR produktene av ulik størrelse (130-480 kb) separert og resultatet av antall allelkopier sammenliknes med en normal-kontroll. Dersom beregninger viser ratio rundt 1 er begge allelene tilstede, mens en ratio 0,5 betyr at et allel er borte. Ved duplikasjon vil ratio være 1.5 (5, 15). Resultatet er ofte tilgjengelig etter 2-3 dager. MLPA kan for eksempel benyttes som screening ved mistanke om genetisk sykdom. Figur 1, side 35, illustrerer prinsippet ved MLPA analysen.

2.2 Cytogenetikk

Denne delen av teorigapittelet omhandler kromosomer og ulike metoder for å analysere kromosomavvik. Siste del av dette kapittelet handler om prenatal diagnostikk. Dette fordi siden kromosomanalyse ofte anvendes ved prenatal diagnostikk. Dessuten er det ved ulike sjeldne og alvorlige arvelige sykdommer, som er diagnostisert med cytogenetiske metoder, ofte aktuelt med er prenatal diagnostikk ved senere svangerskap.

2.2.1 Kromosomer

Kromosomer ligger i cellekjernene og er bygd opp av DNA. Kromosomet kan deles i tre deler; en kort arm (betegnes "p") og en lang arm ("q") og i midten centromer. Ytterst på endene av p- og q- armene finnes subtelomerer og telomere. Mennesket har 46 kromosomer hvorav 2 er kjønnskromosomene X og Y. De to hovedtypene av kromosomavvik er numeriske og strukturelle. Numeriske kromosomavvik kan sees som polyploidier, da er det et helt kromosomsett duplisert (69, XXX) eller som aneuploidier da er det for mange eller for få av et kromosom. Et eksempel på aneuploidi er Downs syndrom (47,XX,+21). Numeriske kromosomavvik kan man oppdage ved å bruke G-bånd analyse. Strukturelle kromosomavvik er:

- Translokasjoner: utveksling av genetisk materiale mellom to ikke homologe kromosomer (25). Kan være balansert og ubalansert. De balanserte kommer ikke til uttrykk fenotypisk før de eventuelt gis videre i ubalansert form og fører til sykdom hos avkom.
- Duplikasjoner: en del av kromosomet er duplisert.
- Inersjoner: et DNA segment fra et kromosom er flyttet til et annet ikke homologt kromosom.

- Inversjoner: et segment av et kromosom snur seg 180 grader rundt, før det fester seg på samme sted igjen.
- Delesjoner: tap av et segment på kromosomet, kan variere i lengde.

Hvor alvorlig kromosomavviket er, avhenger av på hvilket kromosom avviket forekommer og hvor stort avviket er.

2.2.2 Kromosomanalyse

For å kartlegge hvor store kromosomavvikene er og hvor de er plassert gjøres det kromosomanalyse. Kromosomanalyse kan kun utføres på levende celler og disse må stoppes i metafase slik at de kan analyseres. Dette fordi det er kun i celledelingens metafase kromosomene er synlige. Ved karyotypering stoppes celledelingen i metafasen, kromosomene isoleres, farges og analyseres visuelt. Det vil si at man ser på kromosomene i mikroskop og undersøker at antallet og strukturen ikke avviker fra normalt. Kromosomene stilles opp parvis i et karyogram. De mest vanlige cellene som brukes er lymfocytter fra blodprøver (Natrium Heparin blod), amniocytter fra fostervannsprøve, fibroblaster fra hud eller halsener og cytotrofoblastceller fra chorion villus biopsi (13).

Indikasjoner for å utføre kromosomanalyse er (27):

- mental retardasjon, autisme
- store congenitale malformasjoner
- mer enn tre mindre kongenitale malformasjoner
- forsinket vekst
- abnorm pubertetsutvikling
- 3 eller flere spontanaborter
- generell genetisk utredning.

Prenatal diagnostikk er ofte aktuelt for en familie der det påvises en alvorlig genetisk sykdom. Siden cytogenetiske analyser er viktig i den prenatale diagnostikken vil de neste avsnittene omhandle dette.

2.2.3 Prenatal diagnostikk

Prenatal diagnostikk er et tilbud til gravide par med økt risiko for å få et barn med medfødt sykdom slik at de kan få en valgmulighet. Det vil nok føre til at noen velger å ta bort barnet om de får vite at det er sykt, men det kan også føre til at man reduserer engstelsen for sykdom

og gjør at par med høy risiko tør å prøve å få barn, samt forberede par til å ta imot et sykt barn. Svarene vil også være viktig for behandling og oppfølging under graviditeten og kan ha innvirkning hos andre familiemedlemmer når det gjelder risiko for å være bærerfor en arvelig sykdom (16). Indikasjonene for prenatal diagnostikk er (27)

- foreldre som tidligere har fått barn med kromosomabnormitet
- foreldre som tidligere har fått barn med neuralrørsdefekt
- foreldre som tidligere har fått barn med medfødt stoffskiftesykdom, hvor fosterdiagnostikk er mulig.
- foreldre som tidligere har fått barn med alvorlig autosomal recessiv sykdom, autosomal dominant sykdom eller X-bundet recessiv sykdom
- hvor en av foreldrene er bærer av en kromosomabnormitet, og dermed har høy risiko for å få barn med alvorlig utviklingsforstyrrelse
- kvinner som behandles med antiepileptika
- foreldre som har økt risiko for å få barn med kromosomsykdom på grunn av kvinnens alder
- funn ved ultralydundersøkelse under svangerskapet
- på grunnlag av helhetsvurdering

Det er viktig at paret får nøye informasjon om ulike aspekter av prenatal diagnostikk før de bestemmer seg for selve undersøkelsen. Det kreves skriftlig informert samtykke og grundig anamnese før det kan gjøres prenatal diagnostikk og det er viktig å gi informasjon som omhandler feilkilder ved undersøkelsen, hvilken risiko undersøkelsen utgjør for mor og foster, hvor lang tid det vil ta før svar kommer og hvilke alternativer de har i ettertid, og om de har gjort seg noen tanker omkring det. Feilkilder er en risiko som alltid følger med, det kan være maternell tilblending av celler, mosaikisme eller bare usikkert svar (27).

Det skilles mellom invasiv prenatal diagnostikk og non-invasiv prenatal diagnostikk, der non-invasiv oftest brukes først. Non-invasive metoder inbefatter ultralydundersøkelse, dobbelttest, trippeltest og til sist er undersøkelse av føtale celler i maternelt blod (er under utvikling). Denne oppgaven vil kun ta for seg de invasive metodene fordi det er ved disse de cytogenetiske metoder anvendes. De invasive metodene er amniocentese (fostervannsprøve) og chorion villus sample (morkakeprøve) i hovedsak, men det kan i tillegg utføres cordocentese (blodprøve fra navlestrengen), føtoskopi og føtal hud biopsi eller leverbiopsi.

Den optimale perioden for å ta prøve av fostervannet er i uke 15 av graviditeten. Det tar 2-3 uker å få svar på prøven fordi cellene må dyrkes, men det finnes hurtiganalyser som kun gir svar på aneuploidi på de utvalgte kromosomene 13, 18 og 21. Prøven tas transabdominalt, abortrisikoen er ca 0,5-1 % (27). Cellene (amniocytt) kan undersøkes med cytogenetiske metoder både før og etter dyrkning. Det er også mulig å måle nivå av α -fötprotein (AFP) og acetylcholinesterase i fostervannet som markør for neuraltube defekt (10, 22). Mulighetene for tilblending av celler fra mor er tilstede. Som oftest skyldes dette blodtilblending i fostervannet under prøvetakingen (14).

Morkakeprøve kan gjøres både transabdominalt og transcervikalt. Prøven kan tas så tidlig som uke 11 og det vil ta 1-2 uker før svaret foreligger. I forhold til amniocentesen kan den taes tidlig i svangerskapet og resultatet vil foreligge tidligere, dette fører til en mindre belastning dersom paret velger å ta abort. Spontanabortrisikoen er litt høyere enn ved amniocentese (1-2 % (27)). Innblending av mors celler i prøvematerialet oppstår i 1-2 % av prøvene (22).

Behovet for hurtigere analyse og mer spesifikke metoder har ført til bruk av nye cytogenetiske metoder for tidlig prenatal diagnostikk. Det jobbes med å utvikle ikke-invasive metoder for analyse av cellefri føtalt DNA som sirkulerer i morens blodbane (22). Trisomi 13, 18 og 21 og triploidi og aneuploidi for kjønnskromosomene utgjør bortimot 80 % av de klinisk signifikante kromosomavvikene diagnostisert i den prenatale tiden (16, 22). For øvrig finnes kromosomabnormaliteter hos ca 0,5 % av nyfødte, 5 % av dødfødte og 50 % av spontanaborterte i 1. trimester. Ved undersøkelser vises det kromosomavvik hos fosteret i 60 % av spontanaborter under 8 uker og 25 % av spontantaborter mellom uke 8 og 12 (22).

2.3 Sentrale cytogenetiske analyser

Denne delen av oppgaven tar for seg G-bånds analyse, Fluorescens *in situ* hybridisering-analyse, "Comparative Genomic hybridisering" og "Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction".

2.3.1 G-bånd analyse

Den mest brukte cytogenetiske metoden i klinikken er G-bånd analyse. Ved denne analysen er en avhengig av at cellene er levende, de må dyrkes og stoppes i metafasen i cellyklusen. Cellene hypotoneres, høstes og kromosompreparatet lages. Først behandles kromosomer med trypsin og deretter *Giemsa*-farge (evt. *Leichmann*-farge) og det vil da være mulig å se lyse og mørke bånd. Hvert kromosom har sin karakteristiske båndstruktur og slik kan man skille de forskjellige kromosomene fra hverandre. Denne metoden brukes som screeningsmetode. Dersom antall kromosomer er feil eller det finnes strukturelle avvik, vil dette oppdages. Ikke alle forandringene vil oppdages dersom de er for små. Hovedsakelig oppdages kun forandringer større enn 5-15 millioner basepar (Mb) (12). Det er vanskelig å se avvik dersom båndmønstrene er diffuse. Til slutt gjøres karyotypering og resultatet fremstilles i et karyogram.

2.3.2 Fluorescens *in situ* hybridiserings analyse

Fluorescens *in situ* hybridiserings (FISH) analyse er en teknikk hvor en benytter DNA prober som merkes med fluoresens og binder (hybridiserer) til et bestemt målområde (5, 12). Prober er deler av DNA (eller RNA) og er komplementære til et bestemt område av et gen, deler av et gen, deler av kromosomer eller hele kromosomer. Det finnes flere forskjellige ulike prober alt ettersom hvilket mål analysen har. Dette er prober som hybridiserer til hele kromosomet, farger kun spesifikke locus, sentromer, subtelomer eller telomer. Analysen gjøres i et fluorescensmikroskop.

Det benyttes ved denne teknikken hovedsakelig kromosomer fra celler som er i metafase eller i interfase av cellyklus. Lymfocytter brukes ofte siden de er en lett tilgjengelig kilde til pasientmateriale. Translokasjoner, duplikasjoner og delesjoner kan påvises med denne teknikken. FISH-analyse benyttes også gjerne som et supplement til G-bånd analyse for å bekrefte funn. Mikrodelesjoner er delesjoner som er mindre enn 2 millioner basepar og er ikke synlige ved G-bånd analyse. FISH-analyse på metafase kromosomer brukes hyppig ved påvisning av mikrodelesjoner, som for eksempel SMS, dette er bildet på forsiden av oppgaven en illustrasjon av. Bildet viser en FISH-analyse vi utførte selv for å se om pasienten hadde delesjon i SMS regionen på kromosom 17.

Interfase-FISH: Som nevnt er det aller mest vanlig å benytte kromosomer i metafase av cellesyklus. Kromosomene kan da enkelt skilles fra hverandre. Det er også mulig å gjøre denne testen på celler i interfase. Kromosomene til disse cellene ligger inne i kjernen og er mer dekkondensert i form av kromatin. Testen kalles interfase-FISH eller "kjerne-FISH" og er en hurtigtest. Det benyttes udyrka celler og gjøres spesielt på fosterceller for deteksjon av de mest vanlige aneuploidiene (kromosom 13, 18 og 21). Proben som benyttes går gjerne på centromeren på det spesifikke kromosomet, og det gir lite informasjon utover om kromosomet er tilstede eller ikke (13). For kromosom 13 og 21 benyttes det locus spesifikke prober, mens for kromosom 18 (og X og Y) tas det i bruk prober som går på centromeren.

"Multicolour" FISH-analyse (M-FISH) og Spectral karyotyping (SKY): Spectral karyotyping er en screeningmetode basert på FISH teknikk (12). Det er 24 forskjellige prober med ulike farger slik at alle kromosomene får forskjellige farger. Strukturelle rearrangementer sees lett. Multifarget FISH er omtrent det samme som SKY, men istedet benyttes 5 prober med ulike farger som i kombinasjon gir 24 farger. Deteksjonen av fargesammensetningen registreres med ulike fluorescensmikroskop innen SKY- og M-FISH analyse. Forandringer innad i det samme kromosomet kan ikke sees hverken ved SKY eller M-FISH. Translokasjoner med materiale over 3 Mb detekteres.

2.3.3 "Comparative genomic hybridization"

Comparative genomic hybridization (CGH) er en teknikk hvor det gjøres en sammenlignende hybridisering av genomet (13). Dyrkning av celler er ikke nødvendig og det blir gjort screening av hele genomet. Kromosomer i metafase fra en frisk person benyttes som referanse. Metoden måler forskjeller i mengde mellom to forskjellige DNA prøver basert på FISH teknikken og kromosomal ubalanse kan detekteres. Den ene prøven merkes med grønn fluoresens (pasientprøven) og den andre med rød (en normal kontroll). De to merkede DNA-prøvene blandes sammen og i tillegg tilsettes DNA som blokkerer de repeterende områdene, slik at probene kun fester seg til gener på kromosomene. Deretter ser sammenlignes forholdet mellom rød og grønn fluoresens. Ved delesjon hos pasienten vil vi få et overskudd av kontroll DNA (rød) på det aktuelle kromosomet, ved duplikasjon er det overskudd av prøve-DNA (grønn) på det aktuelle kromosomet. Et spesialutviklet dataprogram benyttes for å analysere resultatet. Små delesjoner og duplikasjoner kan sees (15), men balanserte translokasjoner,

Robertsonske translokasjoner, og inversjoner kan ikke oppdages. I figur 2, side 36, vil prinsippet av CGH illustreres.

Ved vanlig CGH analyse kan oppdages avvik inntil 5 Mb. Det har blitt utviklet ulike CGH-varianter som kan brukes for analyse av hele kromosomer, deler av kromosomer, spesifikke regioner og hele genomet (15). Ved ”High resolution” CGH analyse (HR-CGH) kan ubalanse ned til 3 Mb oppdages.

For å ytterligere øke oppløsningen ble matrise-CGH (”array-CGH”) utviklet i 2003. DNA-mikroplater med flere tusen DNA-fragmenter benyttes og disse representerer punkter plassert rundt i hele genomet (12). Prinsippet er det samme som for CGH, men hybridiseringen av pasientprøve og kontroll gjøres til DNA fragmenter istedenfor hybridisering til kromosomer. Dette gir økt sensitivitet. Ved meget høy oppløsning kan avvik ned til 100 kb oppdages (13).

2.3.4 “Quantitative fluorescence polymerase chain reaction”

“Quantitative fluorescence polymerase chain reaction” (QF-PCR) er en molekylærgenetisk metode hvor DNA fra celler isoleres. Det kan benyttes alle typer celler (blod, cytotrofoblaster, hud, muskel). Ulike gener fra kromosom 13, 18, 21, X og Y er valgt ut og kan detekteres ved bruk av PCR av ”short tandem repeat” (STR) - markører. Disse STR- markørene er kromosomspesifikke, repeterte DNA sekvenser, som er stabile og polymorfe. Deteksjonen gjøres via elektroforese for deretter å analyseres i et spesialutviklet dataprogram. Mengden PCR-produkt kvantiteres og eventuelle aneuploidier av 13, 18, 21, X og Y kan detekteres. Svaret kommer som en graf med topper, og arealet under toppene beregnes og kontrolleres opp i mot kontrollen. Det er ikke mulighet til å finne ut om det er translokasjoner eller insersjoner. Metoden krever ikke like stort prøvemateriale (kun 1 ml fostervann (13)) som ved FISH. Det tar 1-2 dager å få svar på de vanlige aneuploidiene og metoden er lettere og i tillegg billigere å gjennomføre enn FISH-analysen, siden flere kromosomer undersøkes samtidig.

I normale heterozygote blir det to topper som representerer to ulike alleler for et lokus dersom prøven er fra en heterozygot (en stor topp dersom homozygot). DNA fra de med trisomi, vil gi enten to topper, hvorav den ene toppen er dobbelt så stor som den andre (diallelisk trisomi), eller tre topper (triallelisk trisomi). Topp eller areal kan begge bli brukt for å regne ut ratio for allelene. Er pasienten homozygot for en markør, er bare en topp synlig fordi allelet da har

samme repeatnummer og samme størrelse. Kvantifisering vil ikke være mulig, og toppen regnes ikke som informativ. For å komme frem til riktig kopinummer av et kromosom må det være minst to informative markører per kromosom. Ratio mellom arealene på 0.8-1.4 ansees som normalt, mens ratio >1.8 eller <0.65 ansees som trisomer (5, 15). Dette illustreres nærmere i figur 3, side 37.

2.4 Klinisk genetikk

Klinisk genetikk er en omfattende del av den genetiske utredningen. Vi vil i denne oppgaven ikke fokusere på hvordan en klinisk undersøkelse utføres, men i stedet gi en kort innføring i hvordan arvelige og genetiske tilstander utredes.

Klinisk genetikk er en bred virksomhet og omhandler i de fleste tilfeller sjeldne sykdommer. Medfødte misdannelser, psykisk utviklingshemming, syndromer, arvelige muskelsykdommer og arvelige kreftformer er de sykdomstilfellene det er vanlig å gjøre en genetisk utredning på.

Den kliniske utredningen løper parallelt med den laboratoriemessige utredningen og er en viktig del som styrer valg av laboratorieanalyser. Den kliniske utredningen kan omfatte en familie eller bare enkeltpasienter. Den kliniske undersøkelsen er sentral i den totale genetiske utredningen og går først og fremst ut på en visuell undersøkelse av pasienten. De ulike delene av kroppen beskrives grundig. Ansiktstrekk, øyestilling, hårfestet, utseende på fingre og avstand mellom tær er eksempler på hva som beskrives. For å unngå subjektive oppfatninger er det viktig med presise målinger og konkret beskrivelse av de kliniske funn (6). Derfor tas det også pasientbilder. Bilder er alltid en del av pasientjournalen og er et viktig hjelpemiddel for bruk etter at pasienten har forlatt avdelingen. Det er også viktig å få en god anamnese hvor tidligere sykdommer, sosial funksjon, aktuell sykehistorie og familiehistorie er sentrale.

Faget genetikk og genetiske sykdommer handler mye om arv. Det er viktig å tegne familiekart samt å ha kunnskap om arveganger. Vi vil derfor gi en kort beskrivelse av de ulike arvegangene.

2.4.1 Arvegang

Mange sykdommer viser klare tendenser til opphopning i ulike slekter. Det kan komme av genetiske faktorer, miljømessige faktorer eller en kombinasjon av disse. Der det foreligger en mistanke om genetiske faktorer, er det viktig å kartlegge gjentakelsesrisiko, risiko for sykdom hos slektninger og hvordan sykdommen går i arv med tanke på familieplanlegging. Arvelige sykdommer kan nedarves via klassisk mendelsk arvegang, og atypisk mendelsk arvegang.

En endring i et gen kan være dominant eller recessivt. I en dominant genmutasjon (genfeil) er det nok med at et av to homologe gener er påvirket (mutert) for at det skal gi utslag i sykdom. Ved recessiv genmutasjon må begge homologe genene være påvirket for at det skal gi utslag i sykdom. I klassiske mendelsk arvegang inngår autosomal recessiv arv, autosomal dominant arv, kjønnsbundet recessiv arv og kjønnsbundet dominant arv.

Autosomal recessiv arv kjennetegnes ved at det rammer menn og kvinner like ofte, men sykdommen forekommer som oftest ikke i alle generasjoner. Det kan være flere bærere i familien som ikke er syke i motsetning ved autosomal dominant arv hvor kjønnsforskjellen er liten, men den rammer oftest hver generasjon. Ved autosomal recessiv sykdom der begge foreldre er friske bærere av sykdomsanlegg har hvert av deres barn 25 % risiko for å bli syk. Ved dominant arvegang har hvert barn av en syk person 50 % risiko for å arve sykdomsmutasjonen. Kvinner og menn affiseres like ofte, men det er ikke alltid sykdommen utvikles selv om den er dominant. Dette har med penetrans av sykdommen å gjøre. Penetrans er genene sin evne til å trenge gjennom med sine egenskaper. Oppgaven beskriver ikke penetrans nærmere, men nevner det for å illustrere at arvegang kan virke enkel i teorien mens i klinikken sees det ofte et mer komplekst bilde.

Kjønnsbundet arv er i all hovedsak X-bundet arv, men det finnes noen sykdommer assosiert med Y-kromosomet. Siden menn kun har ett X kromosom er menn mer sårbar for X-bundet arvelige sykdommer, mens kvinner er ofte bærere uten å vise sykdomstegn. Dersom en kvinne er bærer av en X-bundet recessiv sykdom, har hver av hennes sønner 50 % risiko for å arve sykdomsmutasjonen og bli syk. Hver av hennes døtre har 50 % risiko for å være bærer av sykdommen. For at en datter skal bli syk, må både far og mor ha det syke genet hvilket er svært sjelden. Som nevnt ovenfor finnes også X- bundet dominant arvegang. Ved X-bundet dominant arvegang vil kvinner også bli affisert mens menn er ofte sterkere affisert og slike

sykdommer hos menn er i mange tilfeller uforenelig med liv. Disse typer nedarving kalles klassisk mendelsk arvegang.

Sykdommer som nedarves via atypisk mendelsk arvegang har den klassiske mendelske arvegangen i bunn, men avviker noe. Eksempler på atypisk mendelsk arv er mitokondriell arv, dynamiske mutasjoner, imprinting og somatiske mutasjoner (kreft). Vi anser nærmere beskrivelse av disse typer arvegang ikke relevant for oppgavens tema.

2.4.2 Syndromologi

Når en sykdom opptrer med flere ulike symptomer og kliniske funn, brukes betegnelsen syndrom (1). Det vil også være minst en misdannelse assosiert med symptomene. Symptomer, misdannelse og kliniske forandringer har alle samme årsak, for eksempel på grunn av en kromosomforandring. Ikke alle funn og symptomer beskriver et syndrom like godt. Gjennom sammenlikning av publiserte pasientkasuistikker kommer klinikere frem til noen få hovedsymptomer og funn som må være til stede for at en sykdom kan beskrives som et syndrom. I tillegg vil det også være en rekke andre sykdomstrekk som oppstår i varierende grad. Siden genetiske syndromer er sjeldne og i tillegg består av mange kliniske varianter, gjør dette diagnostiseringen i mange tilfeller vanskelig. Ikke alle syndromer er assosiert med mental retardasjon. I mange tilfeller kommer en klinisk genetiker i kontakt med et syndrom som vedkommende ikke tidligere har hatt direkte erfaring med. Desto viktigere vil det være å gi en visuell objektiv beskrivelse under klinisk utredning, og bilder er, som nevnt, en sentral del av utredningen.

Vi vil i vår oppgave senere presentere to eksempler på pasienter med syndromer. Den ene har et funn forenelig med et kjent syndrom, mens den andre pasienten har en kromosomforandring som ikke tidligere er beskrevet med navn. Våre to pasientkasuistikker illustrerer at hos enkelte syndrompasienter er det lettere å komme på sporet av en diagnose, mens andre ikke blir oppdaget før de kommer i kontakt med en genetiker med flere års erfaring på dette feltet. Da den ene av pasientkasusene har en kromosomendring som er assosiert med Smith-Magenis syndrom vil vi gi en kort beskrivelse av dette syndromet som en avslutning av teoridelen.

2.4.3 Smith-Magenis Syndrom

Smith-Magenis syndrom (SMS) er en genetisk multisystem-sykdom. Den karakteriseres av medfødte misdannelser, dysmorfe ansiktstrekk og mental retardasjon (3, 19, 21). Dette syndromet rammer ca en per 15 000- 25 000 fødte barn, gutter og jenter rammes like ofte (18). En person med denne sykdommen har enten en delesjon av 17p11.2, eller en mutasjon i *RAII* (retinoic acid induced 1) genet (3, 25). Haploinsuffisiens i *RAII* er trolig det som gir de fleste karakteristika hos SMS pasienter. De fleste SMS pasienter fikk tidligere diagnosen ved klinisk undersøkele, bruk av G-bånds analyse av kromosomer eller ved bruk av FISH analyse som et supplement. Det har også blitt gitt diagnosen ved bruk av FISH analysene alene (25). 90 % av de med SMS har 17p11.2 delesjon, mens 10 % har mutasjon i *RAII* genet (3, 4). Den største andelen av de med delesjon har delesjon i en felles region av 17p11.2. (20, 27) Denne regionen strekker seg over 3,5Mb, mens de andre med SMS diagnosen har enten en mindre delesjon enn 3,5Mb, større enn 3,5Mb eller overlappende delesjon.

Mutasjon i *RAII* genet vil føre til et ufunksjonelt protein som vil gi haploinsuffisiens. *RAII* har trolig en rolle i forhold til transkripsjon, men genets funksjon er ikke enda helt klarlagt. Erfaring og studier viser at pasienter med mutasjon i kun *RAII* har mange av de samme symptomene som SMS pasienter med delesjon av hele 17p11.2.

Smith-Magenis syndrom kjennetegnes med nedsatt kognitiv funksjon, utviklingsforsinkelser, unormal oppførsel og dysmorft skjelett og ansikt (18). De fleste er mild til moderat mentalt retarderte. Motoriske ferdigheter er ofte forsinket, spesielt i første leveår. Oral sensorimotorisk dysfunksjon er vanlig (18). De dysmorfe ansiktstrekkene vil komme klarere frem jo eldre barnet blir og kjennetegnes ved bredt og firkantet ansikt, dypt plasserte øyne med korte mellomrom, hypoplasi i midten av ansiktet og prognatisme (underkjeven foran overkjeven). Det er også vanlig med forsinkelse i utvikling, spesiell oppførsel og søvnvansker. Ofte finnes det misdannelser i øre, hals og svelg og dette gir utslag i otolaryngiske problemer, kronisk otitis media, velopharyngeal insuffisiens, hes stemme, spise- og pusteproblemer og forsinket psykomotorisk utvikling. I tillegg har mange (50-75%) dårlig hørsel, lav høyde og skoliose (18). Infantil hypotoni er ikke et uvanlig funn. Adferden er stereotypisk, men kommer lettest til kjenne når barnet blir litt eldre (over 18 mnd). Den består i å klemme seg selv, selvskading som å dunke hodet, bite seg selv, samt stikke fremmedlegemer inn i kroppsåpninger (polyembolokoilamania) og trekke ut negler (onychotillomania). En stereotypisk måte i atferden er at de putter 4 fingre inn i munnen så de blir våt, for så å bla de

i en bok. En annen er at de holder underarmene vannrett foran seg og presser hardt mot brystet i noen sekunder og dette gjentar seg flere ganger (7). Det er blitt funnet en invertert circadian rytme ved melatonin utskillelsen hos SMS-pasienter. Dette gjør at veldig mange plages med søvnforstyrrelser.

Det er beskrevet enkelte forskjeller mellom kjønn. Myopi, spise/apetitt problemer er mere hyppig hos jenter enn hos gutter. Et spesielt funn er at pasienter med en genmutasjon i *RAII* har en høyere funksjonalitet enn de med delesjon av hele genet. Det er mindre svikt i kognitiv funksjon i denne pasientgruppen noe som kan ha sammenheng med at det ikke mangler noe DNA materiale utover mutasjonen slik det gjør hos de med delesjon der en større del av arvestoffet er borte.

Pasienter med Smith-Magenis syndrom har økt risiko for å ha misdannelser i indre organer som hjerte, nyre og kjønnsorganer og CNS (3, 27). Hyperkolesterolemi og lavt stoffskifte er rapportert og bør være med i utredningen.

Diagnostisering av Smith-Magenis Syndrom (SMS) starter alltid med en klinisk undersøkelse som gir mistanke om sykdommen. Den endelige diagnosen fås ved å påvise delesjon av 17p11.2 ved klinisk mistanke. G-bånd analyse ved høy oppløsning (det vil si 550 bånd eller høyere) og FISH analyse har vært de klassiske måtene å påvise SMS (4). Det er i tillegg flere nyere metoder som kan brukes. Analysene er “multiplex ligation-dependent probe amplification” (MLPA), “real-time quantitative” PCR (qPCR) og “comparative genomic hybridization” (CGH) (4). MLPA og QF-PCR er mye mer kostnadseffektive metoder og i tillegg har de evnen til å fange opp mindre delesjoner som FISH analyse og G-bånding vanligvis ikke klarer. Det er i tillegg mulig å undersøke større områder i hver test. FISH prober som brukes for å diagnostisere SMS, bør inkludere *RAII* genet (27). Oppdages ingen delesjon ved bruk av de nevnte metodene, kan det gjøres en aCGH analyse for å undersøke om *RAII* genet er affisert. Foreldrene bør også undersøkes cytogenetisk for å finne ut om mutasjonen er *de novo* eller arvet fra foreldrene. Alle SMS pasienter med en 17p11.2 delesjon har en delesjon av *RAII*. *RAII* er ansvarlig for mesteparten av SMS tilfellene, mens andre gener i 17p11.2 regionen er ansvarlig for mangfoldet og variasjonene i fenotypen (4). For eksempel er hypotoni og kort vekst er knyttet til delesjon av 17p11.2 og ikke bare mutasjon i *RAII* genet, i tillegg er pasienter med kun *RAII* genmutasjon mindre motoriske forsinket og

har en bedre funksjon. Fenotyper der pasienten har små delesjoner er mer lik de pasientene med kun genmutasjon i *RAII*.

Når vi nå beveger oss over til metodedelen av oppgaven, er det viktig å påpeke at i dette faget ikke alltid lar seg gjøre å skille mellom metode og teori. Derfor vil enkelte deler av teori og metode i denne oppgaven flyte noe over i hverandre.

Kapittel 3. Metode

Denne delen av oppgaven gir en beskrivelse av de ulike metodene som vi har brukt for å erverve kunnskap om cytogenetikkens bidrag til utredning av uavklarte genetiske sykdommer.

3.1 Litteraturstudie

Innenfor genetikk finnes det store mengder litteratur som omhandler klinikk, cytogenetiske metoder og syndromer og artiklene overlapper hverandre. I vårt arbeid har det vært viktig å tilegne seg ferdigheter til å lese vitenskapelig litteratur. Vi har lest mye litteratur, men litteraturlisten gjenspeiler kun det som direkte har vært brukt i oppgaven. Det har vært en utfordring å sile ut det viktigste til vårt bruk. I tillegg har vi også vært nødt til å lære oss å lese flere artikler over kortere tid.

3.2 Håndtering av ulike databaser

For å søke frem de vitenskapelige artiklene er det brukt ulike vitenskapelige, genetiske databaser. Vi har blitt kjent med og lært å lete i flere ulike genetiske databaser, men de mest brukte er PubMed (33) , Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (31) , Gene Tests Disease Searsch (29), Possum (32), London Medical Databases herunder The Winter-Baraitser Dysmorphology Database (30). PubMed omhandler alle medisinske fagfelt, mens de resterende har oppsamlet litteratur om genetikk. I referanselisten finnes nettadressene til de ulike databasene.

3.3 Arbeidsmetoder ved genetisk avdeling

Spesielt i begynnelsen, men også underveis, har vi måttet lære oss hvordan Medisinsk Genetisk avdeling fungerer og er organisert. Dette har vært helt nødvendig for å få overblikk i gangen av genetisk utredning, og hvordan de ulike faglige gruppene samarbeider for å få en diagnose på en pasient som utredes. Medisinsk Genetisk avdeling på UNN er bygget opp annerledes enn mange andre avdelinger ved sykehuset. Poliklinisk pasientvirksomhet løper parallelt med laboratoriarbeidet som består av cytogenetikk og molekylærgenetikk. Det foregår et kontinuerlig samspill mellom leger, forskere og bioingeniører på avdelingen. Alle deltar aktivt i sin del av utredningen som samordnes enten via møter eller diskusjoner initiert av hver enkelt. Vi har samarbeidet med og observert samspillet mellom de tre ulike faggruppene på avdelingen.

3.4 Minikurs i cytogenetikk

Den praktiske delen under dette oppgavearbeidet startet ved at vi først leste litteratur om cytogenetiske metoder. Deretter holdt forsker Mona Nystad et endags seminar om analysemetoder og arbeidet ved et genetisk laboratorium. Det ble gitt forelesning, omvisning rundt på avdelingen både på den cytogenetiske- og molekylærgenetiske seksjon, samt gjort demonstrasjoner av ulike laboratorierutiner. Endags-seminaret og demonstrasjon på laboratoriet gjorde at vi fikk en grei og oversiktlig innføring i cytogenetikken samtidig som vi fikk kunnskap som lett kunne bygges på når vi senere leste artikler om emnet. Minikurset var i tillegg en forberedelse til det en ukes lange laboratoriearbeidet vi selv skulle utføre senere på avdelingen.

3.5 Selvutført laboratoriearbeid

Vi tilbragte en uke ved det cytogenetiske laboratoriet der vi fulgte tett bioingeniørene og forskerne i sitt arbeid samt utførte bestemte analyser selv. Det vedlegges protokoll for utførelse av FISH- og QF-PCR metodene, de analysene vi har utført selv. Array CGH gjøres ikke i Tromsø, men sendes til Ullevål Universitetssykehus. Svaret sendes tilbake til Tromsø, der den tolkes av forskere, leger og bioingeniører i felleskap

- 1) Vi fulgte rutinene ved dyrking av lymfocytter og fostervannsceller, hvor disse lagres og håndtering av preparatene for å unngå kontaminering. Vi så hvordan preparater etter G-båndsfarging benyttes og hvordan kromosomene så blir satt opp i et karyogram. Behandling og analyseresultat ved MLPA fikk vi også litt innblikk i. Avdelingen utførte også prenatal diagnostikk, så rutinene ved analysering av fostervannsprøver ved bruk av QF-PCR og interfase FISH for eventuelt å påvise trisomi har vi også deltatt på.
- 2) Som nevnt er hovedtyngden i oppgaven rundt den cytogenetiske utredningen av syndromene, og en viktig metode var derfor å få praktisk innføring i noen av analysene som brukes mest, samt var en viktig bidragsyter til resultatet av de to kasusene som blir presentert senere. Vi tok for oss de praktiske oppgavene til FISH-, QF-PCR- og array CGH. Vi vil derfor gi en kort beskrivelse av hva vi gjorde ved disse analysene. En fullstendig protokoll på FISH og QF-PCR er tilgjengelig ved forespørsel Medisinsk genetisk avdeling ved UNN.

3.5.1 Fluorescens *in situ* hybridization

En av våre pasientkasus var en pasient med Smith-Magenis syndrom (SMS). Denne diagnosen kan bli bekreftet ved bruk av FISH, og det var derfor oppklarende å få kjennskap til denne metoden. Cellene som ble benyttet i FISH var dyrkede lymfocytter. Cellene ble behandlet slik at membranen ble sprengt bort, da kunne probene binde seg til kromosomene. Kromosomene ble merket med en kontrollprobe (*Vysis-LSI RARA*) og en regionspesifikk probe for SMS (*Vysis LSI SMS region*). Lokalisasjonen på kontrollproben er spesifikk for kromosom 17 og festet seg til den lange armen, 17q12-21. Proben som bandt SMS regionen var lokalisert til den korte armen, 17p11.2, og til et område på bortimot 140kb homolog med SMS regionen. Kontrollproben hadde en *SpectrumOrange* fluorophore, den andre hadde *SpectrumGreen* fluorophore. Den fluoresensmerkede DNAsekvensen bandt seg til DNA på kromosomet under hybridiseringen og overskytende fluoriserende prober ble vasket bort slik at det lett kunne sees om proben er bundet til målsted ved analyse i mikroskop. Preparatet som skulle analyseres under mikroskop ble laget på mørkelaboratoriet. Resultatet vi fikk vises i bildet på forsiden av oppgaven og denne FISH analysen vi utførte viser at pasienten ikke hadde SMS.

3.5.2 “Quantitative fluorescence polymerase chain reaction”

“Quantitative fluorescence polymerase chain reaction” (QF-PCR) var den andre analysen vi utførte. Det var i forbindelse med prenatal diagnostikk og vi undersøkte om pasienten hadde trisomi. Denne analysen gjøres som et samarbeid mellom kromosom seksjonen og DNA seksjonen ved Medisinsk genetisk avd.

Analyseringen av pasientprøven er gjort ved QF-PCR med settene *SI/S2*, det inneholder fire markører for hvert kromosom (13, 18, 21, X og Y). Vi analyserte med Applied Biosystems *ABI PRISM*[®] genetisk analyse instrument. Resultatet av analysen finnes i figur 3, side 37.

3.5.3 “Array- Comparative genomic hybridization”

“Array comparative genomic hybridization” (aCGH eller matrise- CGH) gjøres ikke i Tromsø. Prøven sendes til et annet laboratorium, men resultatet sendes tilbake til avdelingen i Tromsø, og må derfor tolkes der. Metoden er basert på FISH teknikken. Tolkningen gjøres ved å se på forholdet mellom rød og grønn fluoresens. Ved delesjon vil vi få et overskudd av kontroll DNA (rød) på det aktuelle kromosomet, ved duplikasjon vil man få overskudd av

prøve-DNA (grønn) på det aktuelle kromosomet. En nærmere beskrivelse av utførelsen kan leses under teoridelen på side 13. Illustrasjon av aCGH finnes på side 36, figur 2.

3.6 Pasientkasuistikker

Gjennomgang av to journaler og ervervet kunnskap fra bøker og vitenskapelige artikler satte oss inn i rutine ved genetisk utredning. Dette utgjør kun en liten del av oppgaven og vi går ikke nærmere inn på temaet enn at vi har nok informasjon om den kliniske utredningen til at de to kasusene blir forståelig. Vi har ikke satt oss detaljert inn i utredning av dysmorfologi, men har skaffet oss en oversikt over fremgangsmåtene ved utredningen. Alle pasientene som er brukt i denne oppgaven er anonymisert.

3.7 Metodenes styrker og svakheter

De ulike arbeidsmetodene i denne oppgaven hadde både fordeler og ulemper. En styrke var at vi har igjennom ukene lært å arbeide selvstendig, i tillegg til at vi har lært å håndtere ulike metoder hvorav praktisk arbeid har vært en stor del. Det var stor forskjell på å være tilskuer og å gjøre arbeidet selv. Arbeidet vi gjorde i forkant av laboratoriearbeidet var viktig. Det å sette seg inn i metodene og lære seg nomenklatur på forhånd var en fordel slik at når vi kom på laboratoriet var vi ikke helt ukjent. Her er ”minikurset” vi hadde også en styrke. Kort og presis informasjon i forkant gjorde alt mer forståelig. Den omfattende litteraturen vi måtte gå igjennom har presset oss til å lære å velge ut viktige fakta og sammenlikne ulike artikler med hverandre for å få et mer nøytralt perspektiv på stoffet de omhandler. Det hadde vært ønskelig å utføre en aCGH analyse som hadde styrket hele oppgaven, men var vanskelig å gjennomføre siden denne analysen ikke gjøres i Tromsø. Vi har heller ikke fått være tilstede ved den kliniske utredningen, eller møtt pasientene som våre kasuser omhandler. Selv om vi har sett pasientbilder er det mange aspekter ved pasienter med syndromer som ikke kommer frem på et bilde, slik som væremåte. Det hadde også vært ønskelig å hatt noe mer tid slik at stoffet kunne modnes mer, spesielt den delen hvor cytogenetikk og klinikk overlappes. Selve utformingen av oppgaven er også en modningsprosess, og dette kunne vi tenke oss å ha hatt mer tid til å jobbe med. Underveis oppdaget vi at den faglige formulering og oppbygning av en forskningsoppgave er tidkrevende. Ved større oppgaver vil det være bedre tid til å jobbe med nettopp dette.

Kapittel 4. Klinisk genetik og cytogenetik drar vekslers på hverandre

Vi har valgt å presentere de kliniske og cytogenetiske funnene sammen for hver pasientkasus. Vi valgte to nokså ulike pasientkasus som på hver sin måte illustrerer hvordan den kliniske og cytogenetiske utredningen utfyller hverandre og hvordan de nyeste cytogenetiske metodene bidrar til diagnostikk av uklare genetiske syndromer.

4.1 Pasientkasuistikk 1

4.1.1 Sykehistorie

Gutt som er født i 1992. Mor har hatt to tidligere spontanaborter. Fødselen var ukomplisert, fødselsvekt var 3930 gram og fødselslengde 50 cm. I nyfødt perioden ble han innlagt på sykehus pga krampeanfallet uten at unormalitet ble avdekket. En måned gammel ble han innlagt med luftveisinfeksjon, og litt senere ble han operert for retensio testis bilateralt. Han hadde en del ernæringsproblemer det første året og har i ettertid hatt en del svelgproblemer. Han hadde også enkelte episoder med pustestopp.

Ett år gammel, ble det påvist hjernesubstans tap frontotemporalt, som ble satt i sammenheng med tidligere hypoksisk ischemisk skade. Han har hatt mye øreplager fra småbarnsalderen, operert inn ny trommehinne på høyre side, og bytte av trommehinne på venstre side var vurdert. Hatt tett oppfølging hos øyelege og er lappe-behandlet. Han bruker briller (15 år gammel dioptri +6 på det dårligste øyet), og har utviklet en viss amblyopi. Han har hatt mange hull i tennene og har vært mye hos tannlegen. På skolen har det vært lagt opp et eget opplegg siden barneskolen, etter hvert ble han plassert i spesialklasse. Foreldrene fikk innvilget avlastning 2004 samt hjelpestønad sats 2. Fra han var født har foreldrene slitt med at han våknet om natta, men det ble bedre etter at han startet med melatonin. I tillegg til søvnproblemer kunne han i perioder få utbrudd av sinne uten tilsynelatende forståelig forklaring. Han river/biter av neglene og biter noen ganger seg selv. Han kan rugge med kroppen og være urolig med bena og når han blir opprørt gnir han hendene sammen foran ansiktet. Ingen relevante sykdomstilfeller i familien utenom at den ene broren (med samme foreldre) har lese og skrivevansker. Han har en bror som er frisk og foreldrene er ikke beslektet.

4.1.2 Kliniske funn:

12 år gammel fant de at høyde var normal (152 cm 50-75p) og noe lav vekt(37 kg 10-25p). Han ble vurdert til å være umoden for alder, men blid og tililtsfull. Han var velproposjonert i kroppen, hadde dysmorfe ansiktstrekk med litt bred neserot, krøllete ørebrusker og stor og bred munn, ikke lik foreldre eller bror. Pupillerefleksene var normale, ingen fiksert skjeling. Hjerne og lunger ble vurdert til normale. Motorikken ble ansett for litt klumsete og at han gikk stivt og tungt. Begge anklene var stive og kunne tøyes litt forbi 0- stilling. Stram i muskulaturen på baksiden av begge leggene. Høyre arm og fot var dominant. Ryggen var rett. Refleksene (patellar og achilles) var lik på begge sider, men litt sterke, og plantarrefleksen ble ansett for å kanskje være invertert, men det var vanskelig å vurdere. Ytterste fingerledd på andre og tredje finger på venstre hånd var skjev (mest sannynlig fordi han hadde sugd mye på dem). Klarte ikke kneppe knapper selv. Det er tatt en rekke tester for å måle evne nivå og mental alder. Disse viste at han både på verbale og nonverbale tester scoret under normalen for hans alder. Ble vurdert til å ha mental alder som en 5-6 åring (moderat psykisk utviklinghemming).

Undersøkt igjen i 2007 da ble det funnet høyde på 176 cm, hodeomkrets 57 cm (50-75p).

Undersøkelsen viste at han hadde lang avstand mellom øynene og disse satt også relativt dypt, det var ingen forandringer på iris. Han hadde dyp neserygg og bred nesetipp. Tannstillingen var uregelmessig og det var stor avstand mellom tennene. Han hadde fortsatt tendens til prognatisme. Noe spesiell form på ørene der øreflippen var løftet opp. Neglene var bitt så langt ned som mulig, clinodactyli på begge lillefingrene og tredje venstre finger devierte radially (startet i grunnleddet). Håret var lyst og øynene blå. Ingen skoliose eller kyfose.

4.1.3 Sammenlikning av artikler og pasientens sykehistorie.

Sykehistorien: I sykehistorien til pasienten finnes det informasjon om at han har hatt svelgvansker, ernæringsproblemer, hyppige luftveisinfeksjoner, ørebetennelse og øreplager. Sammenliknet med artikler om Smith-Magenis syndrom er dette kliniske symptomer som er rapportert hos pasienter med dette kromosomavviket. Det er i tillegg nevnt at hos SMS-pasienter finnes det hyppige misdannelser i hals/svelg regionen og også i mellomørene. Dette kan ha sammenheng med de hyppige otittene og luftveisinfeksjonene som pasienten har hatt. Han har også hatt episoder med pustestopp som kanskje kan koples opp i mot eventuelle

misdannelser i svelg og hals. Dyp og hes stemme er noe som Smith-Magenis pasienter ofte har. Ernæringsproblemer og svelgvansker som har plaget pasienten, kan også ha sammenheng med misdannelser. Pasienten har spesielt vært plaget med søvnvansker, selvskading, riving og biting av negler. Mental retardasjon har vært en del av det kliniske bildet siden barneårene. Dette er også noe som blir hyppig nevnt i artikler om Smith-Magenis syndrom. Han hadde også utbrudd av sinne, var urolig og gnidde henderdene sammen, hvilket er en del av den stereotypiske oppførsel hos disse pasienter.

Klinikk: Ved klinisk undersøkelse ble det funnet at han hadde dysmorfe trekk i ansikt som prognatisme, tannfeilstilling og dypt plasserte øyne. Det er ansiktstrekk som er beskrevet i artiklene om Smith-Magenis. Det er også funn av hypertoni og hyperrefleksi hos Smith-magenis pasienter, hvillket også ble funnet hos vår pasient. Han hadde også nedsatt mental funksjon, som er et velkjent fenomen hos de med Smith-Magenis syndrom.

4.1.4 Cytogenetiske funn

Laboratoreutredning av pasienten startet i 2004. Det ble utført fem ulike analyser for utredning av syndrom; vanlig karyotypering, PCR for screening med tanke på fragilt X syndrom, HR-CGH, MLPA og FISH. To ble tatt i 2004. De siste to førte til en diagnose og ble utført i 2007.

- 1) I 2004 ble det først tatt en vanlig blodprøve. Rekvirerende instans ga opplysninger om lærevansker samt et syndromsuspekt utseende. Det ble gjort en G-båndsanalyse. Resultatet viste 46,XY (en normal mannlig karyotype). Det ble også gjort en molekylærgenetisk undersøkelse på grunn av mistanke om fragilt X syndrom (FRAXA). Det ble undersøkt ved PCR analyse av CGG triplettstørrelse i *FMRI*-genet (genet er mutert ved fragilt X-syndrom) og viste et normalt allel. Det ble ikke påvist noen cytogenetisk eller molekylærgenetisk årsak til pasientens kliniske tilstand, men genetisk avdeling oppfordret behandlende lege til å eventuelt gi bedre kliniske opplysninger for videre utredning. Det ble i tillegg gjort en kromosomanalyse med HR-CGH metoden. Undersøkelsen viste balansert karyotype, det vil si normale funn.
- 2) I 2007 ble det gjort nye cytogenetiske undersøkelser. Det ble gjort en DNA analyse av EDTA-blod. Prøven ble undersøkt med metoden MLPA. Det ble brukt tre ulike kit (*MR1 MLPA P064* (tester for: syndromene: 1p-delesjon, Williams, Smith-Magenis, Miller-Dieker, DiGeorge, Prader-Willi, Alagille, Saethre-Chotzen og Sotos)), *MR2 MLPA P096*

(tester for syndromene: Wolf-Hirschorn, Cri-du-Chat, Langer-Gideon, WAGR, Rubinstein-Taybi, Down og Kabuki), *Human Telomer MLPA P036B* (en del syndromer har subtelomerendringer på kromosomene). Kun MR1 MLPA kitet ga positivt svar. Resultatet av dette ble at man fant delesjon av 4 gener (*DKFZp586M1120*, *LLGL1*, *PRPSAP2* og *MFAP4*). Disse regionene er assosiert med Smith-Magenis syndrom i området 17p11.2.

- 3) Etter bruk av MLPA metoden, ble det gjort en mer spesifikk kromosomanalyse, via FISH metoden. Det ble brukt en Smith-Magenis probe som dekker *RAI1* genet. Resultatet av testen støttet mistanken, og påviste en delesjon av et allel i den Smith-Magenies kritiske regionen på kromosom 17p11.2. Dette visualiseres på figur 4, side 39.

Allerede i klinikken fikk man mistanke om et syndrom, analysene bekreftet dette. Denne rekkefølgen i en genetisk utredning er vanlig, en klinisk mistanke fører til videre utredning og klinisk kartlegging mens endelige verifisering skjer ved at cytogenetisk analyse bekrefter diagnosen.

4.2 Pasientkasuistikk 2

Denne pasientkasuistikken illustrerer den kliniske genetikkens ulike fasetter. En mistenkt arvelig sykdom kan vise seg og være noe annet enn den opprinnelige mistanken. Dette viser hvor viktig samarbeidet mellom den kliniske og cytogenetiske utredning er.

Ei mor skrev en e-post til Medisinsk Genetisk avdeling og ønsket å henvise seg selv og sin datter for å undersøke om de kunne ha en arvelig sykdom kalt Ehlers-Danlos syndrom (EDS). Denne diagnosen fikk hun selv mistanke om da hun tilfeldigvis leste om dette syndromet i et ukeblad. Vi vil presentere mor og datters sykehistorie her hver for seg.

4.2.1 Mors sykehistorie, kliniske funn og cytogenetiske funn.

Kvinne født i 1961. Etter egen henvisning kom hun til Medisinsk Genetisk avdeling for utredning av Ehlers-Danlos syndrom (EDS). EDS er først og fremst en klinisk diagnose og skyldes arv. Symptomene på EDS er økt bevegelse (hypermobilitet) i ledd, hyperelastisitet i huden, vevssjørhet, blødningstendens og plutselig død ved at blodårer rupturerer (9).

Sykehistorie: Hun hadde siden tenårene vært plaget med leddsmerter. Fikk tidlig strekkmerker. Hun hadde lett for å få blåmerker og hadde slarkede ledd. Har hatt en dødfødsel med tvillinger, hadde et barn med liknende plager. Både moren hennes og mormor har hatt tendens til økt bevegelighet i leddene. En tante og en onkel har hatt hjerneblødning.

Klinisk undersøkelse: Hun hadde ingen dysmorfe trekk i ansikt. Huden var myk og deigaktig, men uten klar overstrekbarhet. Hun hadde misfarginger på lår og knær, og uttalte striae på bryst, mage og hofter. På beighton scala for hypermobilitet scoret hun 8 poeng av 9.

4.2.2 Datters sykehistorie, kliniske funn og cytogenetiske funn.

Ei jente født i 1992. På grunn av sen psykomotorisk utvikling og somatiske plager hadde hun hatt oppfølging hos fysioterapeut og hatt et opphold på et helsesportssenter. I 2006 ble hun henvist til pediatrik poliklinikk på grunn av psykosomatiske plager. Mor hadde mistanke om at datteren har Ehlers-Danlos syndrom, siden hun og datteren hadde mange av de samme symptomene. Etter at overlege ved Medisinsk Genetisk avdeling hadde gått igjennom henvisningen fra mor, ble de kalt inn til time for genetisk utredning. Ved ankomst la klinikerens straks merke til at mor og datter hadde ulikt utseende. I løpet av den første konsultasjonen ble mistanken om EDS dreid over til mistanke om et kromosom syndrom.

Sykehistorie: hun ble født uten komplikasjoner med normal fødselsvekt, ingen andre søsken. Hadde de første leveårene noe sen psykopmotorisk utvikling. Som 1 ½ år fikk hun påvist betennelse i tarmslimhinne pga melkeallergi. De første årene hadde hun problemer med ernæring og var undervektig. Etter 8 års alderen begynte hun å legge på seg, for så å bli overvektig i tenårene. På skolen har hun hatt problemer i form av dårlig konsentrasjon og har hengt etter i kroppsøvingstimene. Har vært til utredning med tanke på ADHD, men ikke fått diagnosen. Hun har vært noe tilbaketrukket og har hatt få fritidsaktiviteter. Flere av melketennene har blitt operert ut, og de nye tennene vokser uregelmessig. Hun hadde urininkontinens, og var plaget med treg mage.

Hovedplagene var leddsmerter. De var mest uttalt i de store leddene som rygg og hofter, ankler og håndledd.

Klinisk undersøkelse: Hun ble vurdert til å være en kortvokst overvektig jente. Høy panne, samt bred nesetipp. Filtrum var kort, hun hadde små ører, nakken var noe kort og bred. Hun hadde feil tannstilling. Hyperpigmentert område i nakke og hals. Hun hadde uttalte striae på bryst, mage og lår. Huden var ellers stram, ikke overstrekkelig, ingen misfarging. På Beighton skala for leddhypermobilitet fikk hun 3 av 9 poeng, hvilket betydde at hun ikke hadde hypemobile ledd. Hun hadde økt avstand mellom 1. og 2. tå, små og brede føtter.

Cytogenetiske funn: I første omgang ble det utført en vanlig karyotypering med tanke på om dette dreide seg om Turner syndrom. G-båndanalysen viste normal kvinnelig karyotype: 46,XX. Undersøkelse med tanke på Fragilt X-syndrom (*FRAXA*) viste også normale funn. Det ble etter klinisk mistanke gjort en laboratorieutredning for ulike syndromer: MLPA med 4 ulike kit; *Huma Telomer MLPA P070*, *MR1 MLPA P064*, *MR2 MLPA P069*, *Human Telomer MLPA P063B*. Alle disse testene ga negativt resultat. Det ble gjennomført Matrise- CGH. Denne analysen utføres på Ullevål Universitetssykehus. Her ble det funnet en 1Mb stor delesjon på kromosom 16p11.2

For å utelukke at dette ikke var en nedarvet normalvariant, men en *de novo* variant, måtte foreldrene også undersøkes. Det ble gjort matrise-CGH av mor og far. Undersøkelsen viser ingen tegn til kromosomforandringer tilsvarende datteren. Dette bekrefter at forandringene hos pasienten er nyoppstått og vurderes som forklaring på hennes tilstand. Delesjon i området 16p11.2 har kun noen få tidligere pasientbeskrivelser (28). Området dekker 29,5 Mb – 30,1 Mb, og endringer i dette området er assosiert med autisme, men utover dette er det ikke kartlagt hvilke gener som eventuelt er involvert i denne kromosomforandringen.

Kapittel 5. Oppsummering og diskusjon

Medisinsk genetikkk omhandler arvelige og genetiske sykdommer. Sykdommene er ikke alltid lett å oppdage og krever ofte samarbeid mellom mange ulike instanser, både innad på en genetisk avdeling og utenfor. Innad på genetisk avdeling er samarbeidet mellom klinikken og den cytogenetiske og molekylærgenetiske delene av laboratoriet viktig. De molekylærgenetiske- og cytogenetiske analysemetodene er forskjellige, men samtidig tett knyttet sammen. Spesielt de nyere metodene glir over i hverandre. For 15-20 år siden ble det gitt diagnose kun basert på klinikk og enkle cytogenetiske metoder. I nyere tid har det blitt utviklet nye og mer avanserte analyser som bekrefter eller avkrefter med større sikkerhet og resultatene foreligger hurtigere. Men selv i dag hender det at diagnosen settes kun på klinisk mistanke. Til tross for en rivende utvikling klarer ikke analysemetodene å fange opp alle avvik. I pasientkasuistikk 1 kunne vi se at genetisk syndrom var en klinisk mistenkt diagnose allerede før den laboratoriemessige utredning begynte, mens cytogenetiske analyser ble benyttet som bekreftelse. Slike bekreftelser gjør genetikeren tryggere i sin diagnostisering.

De genetiske fagkunnskapene har økt i omfang, og detaljerte kromosomendringer har blitt avdekket i takt med de nye analysene. Dette har også ført med seg økte muligheter for å utvikle tester som kan screene på de mest kjente genetiske syndromene. Dette har kortet ned på tiden det tar å diagnostisere pasientene med ukjente genetiske sykdommer. For de pasientene som har et mistenkt genetisk syndrom, men har en kromosomendring som det ikke finnes tester for, må diagnosen basere seg på kun klinisk undersøkelse. I slike tilfeller tar det ofte lengre tid før diagnosen kan stilles og pasienter kalles tilbake til genetisk avdeling flere ganger som ledd i utredningen.

Datter i pasientkasuistikk 2 illustrerer en situasjon som med stor sannsynlighet ville vært uavklart for 10-15 år siden. Denne pasienten har et kromosomavvik som med de gamle cytogenetiske metodene ikke var mulig å oppdage. Det finnes kun noen få tidligere beskrevet tilfeller av den type endring i arvestoffet som datter i pasientkasuistikk 2 hadde. Ved et tilfelle hvor kromosomforandring er svært sjelden, ville det ikke tidligere vært mulig å gi en diagnose ut fra klinikken. Symptomene og funnene som ble avdekket ved en klinisk utredning ville ikke vært spesifikke nok til å kunne gi en diagnose, men i stedet ville det kun gi en mistanke om et mulig avvik i arvestoffet. Nye cytogenetiske analyser har gjort det mulig å teste for hittil ubeskrevne kromosomendringer.

Vi vil nedenfor drøfte mer inngående de ulike sidene ved de cytogenetiske analysene som ble brukt i de to pasientkasuistikkene.

Som vi har vært inne på i oppgaven er det flere ulike analyser å bruke i utredning av mulige genetiske sykdommer. Et genetisk syndrom kan blant annet gi utslag i medfødte misdannelser og mental retardasjon. Indikasjonen for å utføre en cytogenetisk analyse bør ikke gjøres som screening, men ut i fra en klinisk mistanke. Ved bruk av G-bånd analyse på pasienter med mental retardasjon finner en kromosomavvik hos 3-5 % av disse pasientene, ytterligere 3-6 % pasienter med kromosomavvik oppdages ved bruk av FISH analyse (17). Dette er blant annet avhengig av størrelsen på kromosomforandringen. FISH-analyse er spesielt nyttig for å identifisere mistenkte kromosomabnormaliteter, siden pasientprøven kan analyseres med en høy spesifisitet. En gjennomgang av ulike studier for interfase-FISH viste at spesifisiteten ligger opp under 100 % og sensitiviteten også er svært høy (varierte fra 83,3 – 100 %) (16). FISH metoden har derimot noen begrensninger. Det er en dyr analyse (1000 kr per probe). Det er også tid-krevende siden det kun kan analyseres en og en spesifikk region på et kromosom. Identifikasjon av avviket er også avhengig av hvilken DNA probe som brukes. Små rearrangementer kan mistes ved bruk av store prober og det er også mulig å miste avvik som er utenfor det området FISH proben dekker. En annen begrensning er de få kromosomloci som kan brukes til screening i en enkelt reaksjon (5). Utvikling av telomer-region spesifikke prober til FISH analysen har ført til funn av delesjoner og andre ubalanserte rearrangementer hos pasienter med mental retardasjon og tilsynelatende normal karyotype. Det er derfor viktig å vite hvor det et avvik mest sannsynligvis befinner seg ved bruk av FISH analysen. Analysen er ikke en screeningmetode, men en undersøkelse som gjøres å screene mot spesifikke kromosomavvik.

Tidligere har G-bånds analyse og FISH analyse vært de metodene som utelukkende har blitt brukt til analyse av kromosomer. Utvikling av ny teknologi og forskning har ført til utvikling av nye metoder som både tar mindre tid og kan teste på flere kromosomavvik samtidig.

I kasus nr. 2 ble det benyttet matrise CGH (aCGH) for å komme frem til den endelige diagnosen. aCGH har en mye større sensitivitet enn karyotypering og kalles ofte derfor for ”molekylær-karyotypering”. Analysen kan også oppdage flere kromosomavvik enn FISH

analysen på en mer kostnadseffektiv måte. aCGH oppdager også bedre små kromosomale duplikasjoner og delesjoner enn FISH-analysen (17). Dersom rutine karyotyping ikke finner avvik, kan matrise-CGH derimot fange opp subtelomere i tillegg til andre loci og kan gi en diagnose til 4-17 % av pasienter med mental retardasjon.

I en enkel matrise kan tusenvis av loci undersøkes. Med matrise CGH finnes det muligheter til å oppdage DNA avvik som aneuploidi, delesjoner og duplikasjoner med en oppløsning høyere enn vanlig karyotyping og konvensjonell CGH. Metoden kan ikke benyttes for å teste polyploidier. Falsk negativt resultat kan skyldes tekniske problemer på grunn av dårlig hybridisering eller utilfredsstillende dekning av proben. Avvik som oppdages av matriseCGH bør bekreftes av en annen metode som FISH, QF-PCR eller real-time qPCR. Tolkingsproblemer kan også skyldes tilstedeværelse av CNV ("copy-number change variation") med uklar klinisk signifikans (5).

aCGH er en effektiv metode å identifisere nye mikrodelesjons syndrome på. Bekreftelse av kromosomavvik har blitt forbedret ved bruk av aCGH og teknologien kan brukes til screening av hele genomet i store pasientgrupper (17). Matrise CGH har et vidt spekter. Analysen er effektiv ved en høy oppløsning og er en sensitiv og rask undersøkelsesmetode (15). Ved å benytte aCGH til å screene hele genomet kan det føre til resultater som kan være vanskelig å tolke. Ved å ta for seg hele genomet er det å forvente at kromosomavvik i ulike regioner oppdages f.eks ved polymorfisme. Disse avvikene har ikke alltid klinisk betydning og kan skape problemer når resultatene skal tolkes (15). Det har blitt utviklet mange typer matriser og probene blir brukt til å undersøke loci med kjent klinisk betydning. Dette reduserer sannsynligheten for å oppdage CNV av ukjent signifikans, men det vil også redusere sjansen for å oppdage nye avvik. Ved å bruke matriser som screener hele genomet vil muligheten for å oppdage tidligere ubeskrevne forandringer være tilstede (17).

Medisinsk genetisk avdeling ved UNN benytter interfase-FISH som prenatal screeningstest for å undersøke for aneuploidi på kromosom 13, 18 og 21. I tillegg benyttes QF-PCR parallelt som et prøveprosjekt. På sikt har genetisk laboratorium i Tromsø kun tenkt å benytte QF-PCR til dette formålet. QF-PCR har vist seg å gi gode resultat selv ved små mengder av prøvemateriale (16). Vanligvis brukes minimum 3-4 STR (short tandem repeats) for hvert kromosom som blir testet, dette for å luke ut resultat som ikke har relevans. Først og fremst benyttes QF-PCR for rask og simpel diagnostikk av aneuploidi som trisomi 13, 18 og 21,

samt kjønnskromosom avvik (5). Sammenliknet med interfase FISH analysen gir QF-PCR metoden omtrent like presist resultat. Sensitiviteten ved bruk av metoden opp mot de vanlige aneuploidiene er høy (gjennomsnittlig 99,2 % (16)). Singel nucleotide polymorfisme (SNP) lokalisert i sekvensen som en primer dekker kan føre til at man får en "null-allel" som igjen vil gjøre at man tolker resultatet av QF-PCR som en monosomi (5).

En fordel med QF-PCR metoden i forhold til FISH analysen er mulighet for å oppdage maternell kontaminering ved prenatal diagnostikk. Resultatet viser et karakteristisk mønster hvor det er et ekstra allel eller en distribusjon som varierer betydelig fra det som er normalt. Ved bruk av QF-PCR kan autosomal mosaicisme oppdages dersom trisomi er presentert i mer enn 10 % i celler dyrket *in vitro* (3). QF-PCR metoden detekterer ikke strukturelle kromosomavvik, som translokasjoner, duplikasjoner, insersjoner og inversjoner, men disse kromosomabnormalitetene er relativt sjelden og ofte assosiert med alvorlige fenotyper. Den kliniske presentasjonen hos disse pasientene burde gi et signal til klinikere og det genetiske laboratoriet om å gjøre andre undersøkelser som supplement til en eventuell QF-PCR (16). QF-PCR er en mye billigere metode (300 NOK pr prøve) sammenliknet med FISH analysen (1000 NOK pr probe).

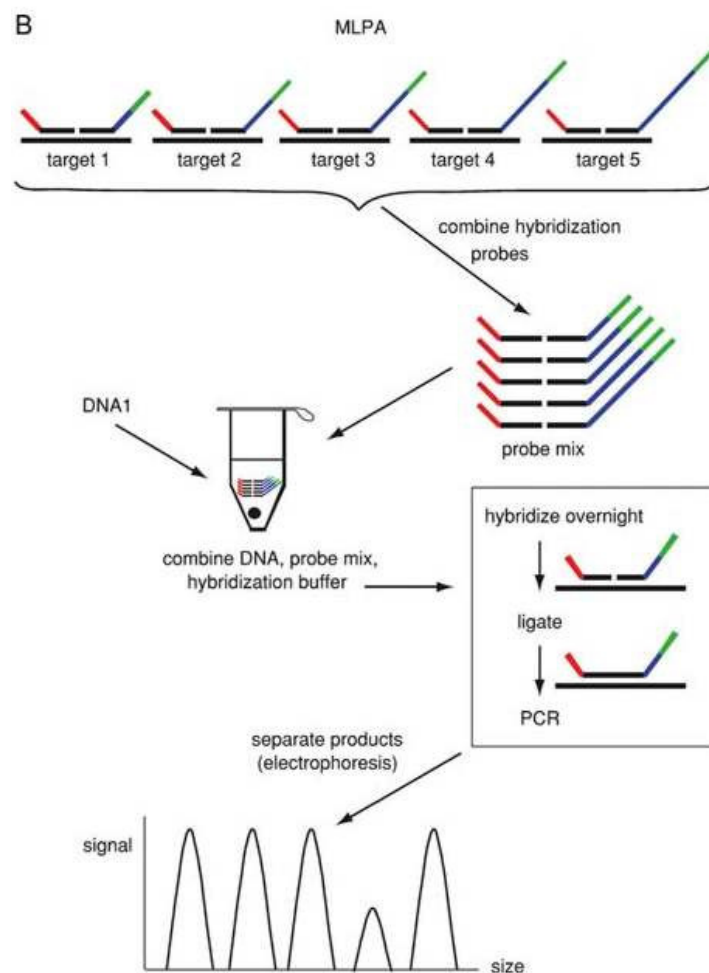
Oppgaven handler ikke i hovedsak om de molekylærgenetiske analysene, men siden molekylærgenetikk og cytogenetikken er tett knyttet sammen vil vi kort diskutere den nye molekylærgenetiske metoden MLPA. I pasientkasuistikk 1 var denne analysen utslagsgivende for å gi en endelig diagnose. MLPA vil, slik som QF-PCR, ikke oppdage strukturelle kromosom avvik. I tillegg vil ikke maternell kontaminering og triploidi bli oppdaget (16). Sammenliknet med andre metoder er dette en enkel test med høy sensitivitet. Det er en billig metode (100 kr pr stk) og opptil 45 ulike DNA regioner kan testes i en reaksjon. Resultatet er klart i løpet av 2-3 dager. MLPA bør verifiseres med en annen teknikk som FISH analyse, QF-PCR eller real-time qPCR (5). For øvrig kan det nevnes at MLPA kan oppdage genmutasjon av enkeltbaser i probebindingsstedet, da proben ikke fester seg. Dette kan mistolkes som en større delesjon. Slike funn bør bekreftes med sekvensering.

Utvikling av de nye metodene, aCGH analyse, QF-PCR og MLPA metode, har redusert kostnadene og tiden det tar å diagnostisere kromosomavvik i forhold til vanlig karyotypering. Fra å bruke opptil 14 dager å finne ut om det foreligger de vanligste kromosomavvikene (trisomi 12, 18 og 21), tar det nå 24-48 timer før resultatet foreligger.

Problemstillingen vår var hvordan utrede barn med uavklarte genetiske sykdommer kan utredes ved hjelp av de nyeste og moderne cytogenetiske metodene. Dette svarer vi på ved å forklare de nyeste cytogenetiske metodene, som QF-PCR, matrise-CGH, FISH-analyse og den molekylærgenetiske metoden MLPA. Gjennom våre to pasientkasuistikker ser vi at disse metodene er benyttet med stort hell for å avklare og bekrefte ukjente kromosomavvik. Formålet med oppgaven var at vi skulle lære oss om cytogenetikken og lære å skrive en større forskningsoppgave der utfordringene var mange, som å finne aktuelle databaser, sile ut relevant litteratur og lære laboratorieferdigheter. Arbeidet med oppgaven var en modningsprosess der vi ser at vi har lært mye, men vi kan også se for oss at vi har ervervet en del kunnskap vi ikke vil legge merke til at vi har lært før vi benytter den i arbeidet som lege i fremtiden.

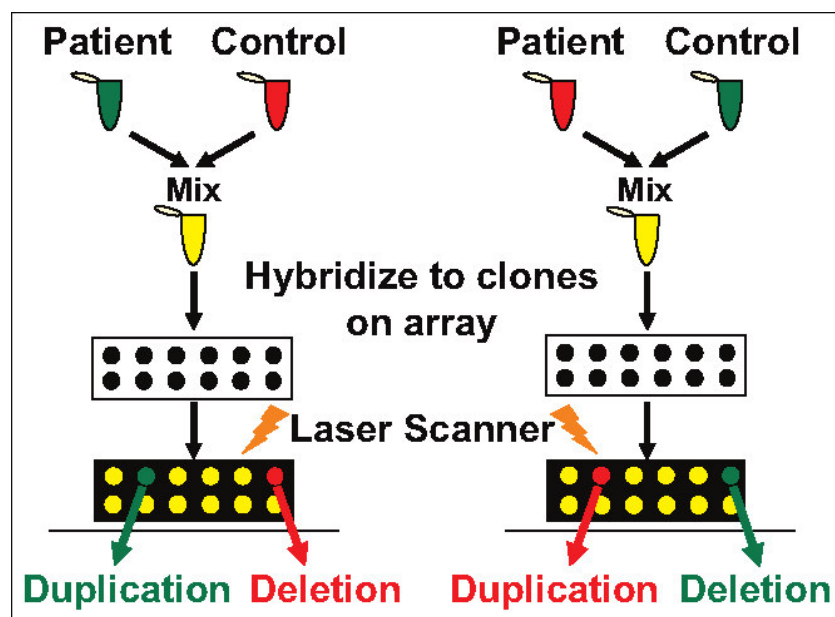
Figurer

Figur 1. “Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification” (MLPA)



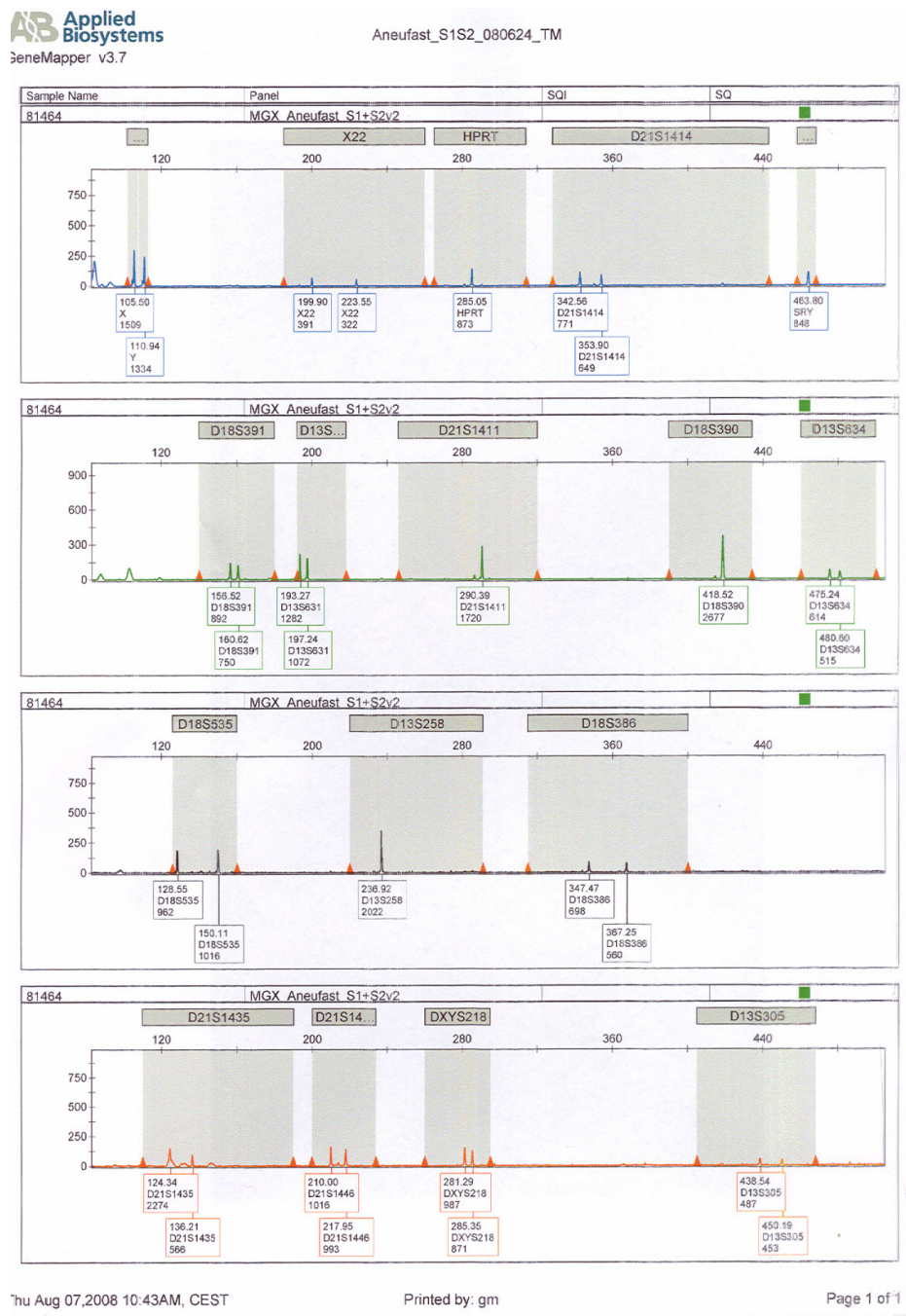
Ved MLPA-analysen isoleres DNA fra pasientens blødpøver og spesifikke MLPA- prober tilsettes slik at de hybridiseres til målsekvenser i genomet til pasienten. Hver MLPA probe består av to oligonukleotid hemiprober, og disse kobles sammen av en ligase. Produktet etter ligering amplifiseres ved bruk av PCR. Ved bruk av kapillær elektroforese blir PCR produktene av ulik størrelse (130-480 kb) separert og resultatet av antall allelkopier sammenliknes med en normal-kontroll. Dersom det finnes mutasjoner i en pasientprøve, vil beregninger gi ratio 0,5 eller 1,5 ved henholdsvis deleksjon og duplikasjon. (2)

Figur 2. "Array comparative genomic hybridization"



Matrise CGH benyttes for å screene hele genomet for eventuelle mutasjoner i arvestoffet. Pasientprøven merkes med grønn fluoresens og kontrollprøven med rød. De to merkede DNA-prøvene blandes sammen hybridiseringen av pasientprøve og kontroll gjøres til DNA fragmenter som er festet til en DNA-mikroplater. På mikroplaten finnes flere tusen DNA-fragmenter som representerer hele genomet. Resultatet av analysen kommer frem ved å sammenligne forholdet mellom rød og grønn fluoresens. Ved delesjon hos pasienten vil det være et overskudd av kontroll DNA (rød) på det aktuelle området på mikroplaten, ved duplikasjon er det overskudd av prøve-DNA (grønn). (26)

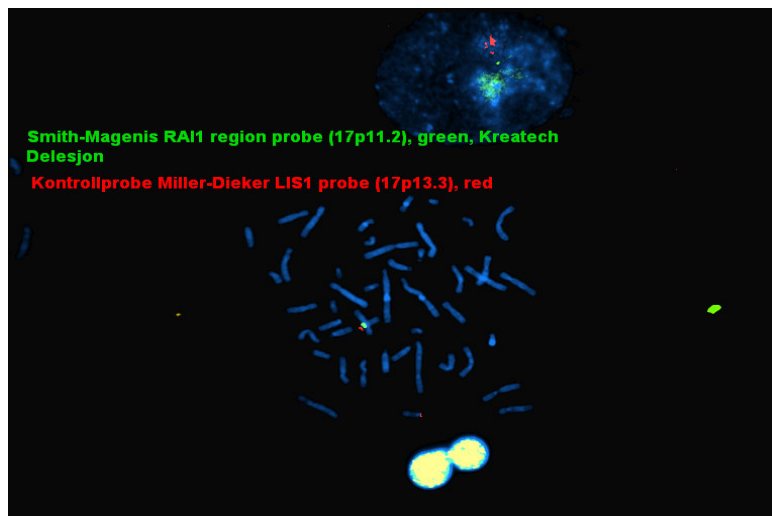
Figur 3. “Quantitative fluorescence polymerase chain reaction”



Analyseringen av pasientprøven er gjort ved QF-PCR med settene S1/S2, det inneholder fire markører for hvert kromosom (13,18,21,X og Y). Vi analyserte med Applied Biosystems ABI PRISM[®] genetisk analyse instrument. I begynnelsen av bildet ser vi at både X og Y er tilstede og ratio er normal (1,1), de pseudoautosomale markørene X22 og DXYS218 er begge tilstede og ratioen på begge er innenfor normalområdet (henholdsvis 1,2 og 1,1), i tillegg ser vi at SRY er tilstede og det bekrefter at det er en XY-karyotype. Det er fire markører for 13:

D13S631 (ratio 1,2), *D13S634* (ratio 1,2). *D13S258* (ikke informativ), *D13S305* (ratio: 1,1). Fire markører for kromosom 18: *D18S391* (ratio: 1,2), *D18S390* (ikke informativ), *D18S535* (ratio 0,9), *D18S386* (ratio1,2). Og fire markører for kromosom 21: *D21S1414* (ratio: 1,2), *D21S1411* (ikke informativ), *D21S1435* (ratio: 4, denne må vi ser bort fra for det er kjent støy på den), *D21S1446* (ratio:1). Alle kromosomene har 2 eller flere informative markører som viser normale kopinummer. Det vil si at resultatet er en normal gutt. (11)

Figur 4. Fluorescens *in situ* hybridisering analyse



Dette er resultatet fra FISH-analyse av pasientkasuistikk 1. Kromosomene er farget med *DAPI II* og merket med markører for SMS-region (rød) og kromosom 17 spesifikk markør (grønn). Prøven er tatt av pasienten i pasientkasuistikk 1 med Smith-Magenis Syndrom og det kan vi se ved at kun det ene av kromosom 17 har et rødt SMS-signal. Det betyr at det finnes en delesjon eller genmutasjon i SMS regionen på det ene kromosom 17. (11)

Referanseliste

1. Cassidy & Allanson. Management of genetics syndromes, *Wiley*, 2005, 2. Edition
2. Den Dunnen and White, MLPA and MAPH: Sensitive Detection of Deletions and Duplications, *Current protocols in Human Genetics*, Part 7.14.3, Supplement 51, 2006
3. Edelman *et al.* Gender, genotype, and phenotype differences in Smith-Magenis syndrome: a meta-analysis of 105 cases, *Clinical genetics*, 2007, **71**: 540-550
4. Elsea, S.H. & Girirajan, S., Smith-Magenis syndrome, *European Journal of Human Genetics*, 2008; **16**: 412-421
5. Gouas L. *et al.* Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities, *Pathologie Biologie*, 2008, doi:10.1016/j.patbio.2008.03.010
6. Hall, Judith G., Froster-Iskenius, Ursula G., Allanson, Judith E., Handbook of Normal Physical Measurements, *Oxford University Press*, Oxford, 1995
7. <http://www.frambu.no/modules/diagnoser/diagnose.asp?iDiagnoseId=193> (23.06.08)
8. <http://www.helse-bergen.no/avd/medgen/teknikker/sb/teksouthern.htm> (10.07.08)
9. <http://www.pasienthandboka.no/default.asp?mode=document&documentid=22227> (10.07.08)
10. Marton, V. Medisinsk genetikk, forelesning for medisinstudenter i Tromsø høst 2006 (MK-03)
11. Medisinsk genetisk avdeling, UNN
12. Ness & Houge, Diagnostikk av medfødte kryptiske kromosomavvik, *Tidsskriftet for Den Norske Lægeforening*, 2003; **123**: 2418-21
13. Nystad, Mona. Kromosomseksjonen på Medisinsk genetisk avdeling, UNN forelesning 18.06.08
14. Ogilvie, C.M. *et al.* Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy using quantitative fluorescence-PCR (QF-PCR), *Journal of Histochemistry & cytochemistry*, 2005, **53**(3): 285-288
15. Shaffer, L.G. *et al.* A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays, *Human Reproduction Update*, 2001, **10**(3): 221-226
16. Shaffer, L.G. *et al.* Molecular Cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis, *American Journal of Medical Genetics*, 2007, Part C (seminars in Medical Genetics) **145C**: 87-98

17. Slavotinek, A. M., Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays, *Human Genetics*, 2008, **124**(1): 1-17
18. Smith, Ann C.M. *et al.* Smith-Magenis Syndrome, Gene Reviews, Gene tests, *University of Washington*, Seattle, Gene Reviews in Gene Clinics, <http://www.genetests.org/> (07.08.2007)
19. Smith-Magenis syndrome, London Medical Databases, The Winter-Baraitser Dysmorphology Database, 2008
20. Smith-Magenis syndrome, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), 2008
21. Smith-Magenis syndrome, Possum database, 2008
22. South, S.T *et al.* Genomic Medicine in Prenatal Diagnosis, *Clinical obstetrics and gynecology*, 2008, **51**(1): 62-73
23. Thompson & Thompson, Genetics in medicine, *Elsevier*, 2001, 6. Utgave
24. Tommerup & Frøland, Medicinsk gentik, *Munksgaard*, 1993, 3. Utgave
25. Truong, H.T *et al.* Diagnosing Smith-Magenis Syndrome and duplication 17p11.2 Syndrome by RAI1 Gene Copy Number Variation using Quantitative Real-Time PCR, *Genetic testing*, 2008, **12**(1): 67-73
26. Van den Veyver, IB. and Beaudet, AL, Comparative genomic hybridization and prenatal diagnosis, 2006, *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, **18**: 185-191
27. Vlangos, C.N. *et al.* Diagnostic FISH Probes for del(17)(p11.2p11.2) associated with Smith-Magenis Syndrome should contain the RAI1 Gene, *American Journal of Medical Genetics*, 2008, **132A**: 278-282
28. Weiss LA, *et al.* Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism, *New England Journal of Medicine*, 2008 Feb 14, **358**(7): 737-9
29. Gene Reviews in Gene Clinics, <http://www.genetests.org/>
30. London Medical Databases, The Winter-Baraitser Dysmorphology Database
31. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>, 2008
32. Possum database, <http://www.possum.net.au/> , 2008
33. PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> , 2008