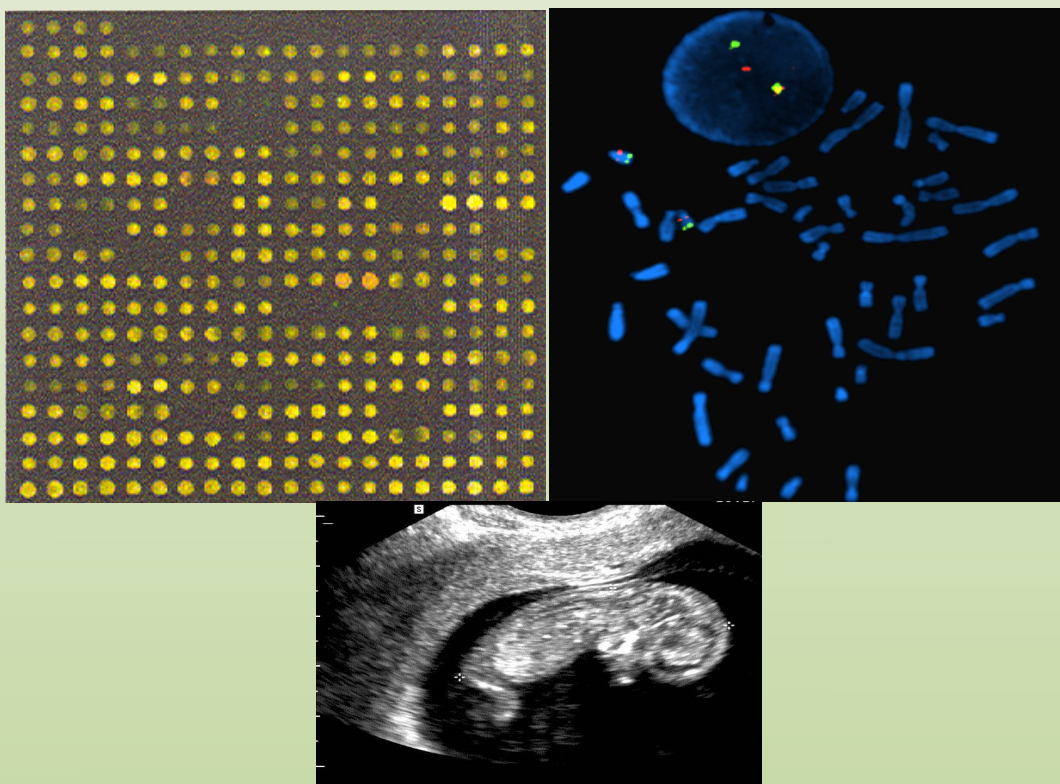


Molekylær karyotypering ved prenatal diagnostikk

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

Tonje Kræmer



TROMSØ

SEPTEMBER 2010

Veiledere:

Valeria Marton, overlege, dr. med

Mona Nystad, forsker, cand. scient

Medisinsk Genetisk avdeling, UNN/UiTø



Det Medisinske Fakultet

Tekst til figurene på forsiden.

Venstre side: Matrisebilde etter array komparativ genomisk hybridisering (aCGH) analyse på en pasient. Gule prikker representerer normale gener hos pasienten, grønne prikker duplikasjoner av gener og røde prikker delesjoner av gener. Se for øvrig beskrivelse av metoden s. i oppgaven. (Bildet er laget av Mona Nystad ved Meidsinsk genetisk avdeling på UNN.)

Høyre side: Fluorescens *in situ* hybridisering (FISH)-analyse av pasient med mistanke om DiGeorge syndrom. Kromosomer i metafase av celledyklusen er farget med blå farge og probe mot *N25*-genet i bånd 22q11.2 er merket med rød fluorescens. I tillegg er en kontrollprobe mot *ARSA*-loket i bånd 22q13 merket inn med grønn fluorescens. Tilstedeværelse av to røde signaler på begge kromosom 22 viser at pasienten ikke har DiGeorge syndrom. På bildet er påvises også en interfasekjerne med to røde signaler som bekrefter funnet gjort på kromosomene. (Bildet er laget av Tonje Feldt Kræmer under praksisperioden på Medisinsk genetisk avdeling på UNN.)

Under: Ultralydbilde av foster.

Innholdsfortegnelse

Kapittel 1 Innledning	2
Kapittel 2 Teori	4
2.1 Innledning	4
2.2 Faget medisinsk genetikk	4
2.3 Arvestoffet	5
2.3.1 DNA.....	5
2.3.1.1 DNA-forandringer.....	7
2.3.2 Kromosomer.....	7
2.3.2.1 Kromosomforandringer	8
2.4 Arveangene	10
2.5 Undersøkelser av arvestoffet	13
2.5.1 Kromosomundersøkelser	13
2.5.2 DNA-undersøkelser	15
Kapittel 3 Metode	18
3.1 Litteraturstudie	18
3.2 Minikurs i cytogenetikk	18
3.3 Opplæring i tolkning av aCGH-svar	19
3.4 Selvutført laboratoriearbeid	20
3.5 Fordeler og ulemper med metodene	20
Kapittel 4 Prenatal diagnostikk (PND)	22
4.1 Innledning	22
4.2 Indikasjoner for tilbud om prenatal diagnostikk	23
4.3 Metoder ved prenatal diagnostikk	24
4.3.1 Non-invasive metoder.....	24
4.3.2 Invasive metoder.....	25
4.4 Prenatal diagnostikk og lovgivning	27
Kapittel 5 Array komparativ genomhybridisering	28
5.1 Innledning	28
5.2 aCGH - metoden	28
5.3 Praktisk laboratoriemessig utføring	29
5.4 Databaser ved tolkning av funn	30
5.4.1 Kopinummervariasjoner og deres betydning ved genetiske avvik	30
5.4.2 Klinisk eksempel	32
Kapittel 6 Diskusjon	34
Referanser	39
Vedlegg 1	43
Vedlegg 2	52
Vedlegg 3	53

Forord

Jeg ønsker å takke mine to gode veiledere overlege Valeria Marton og forsker Mona Nystad ved Medisinsk genetisk avdeling på UNN for deres investering i tid og energi for å hjelpe meg. Jeg har lært utrolig mye av dere, tusen takk for godt samarbeid og for deres tålmodighet og velvilje.

Tonje

Sammendrag

Denne oppgavens hovedfokus er bruk av matrisebasert komparativ genomhybridisering (arrayCGH) og utfordringene med denne i fosterdiagnostikk. Metodene jeg har brukt er litteratur, databasesøk, samt at jeg har utført praktiske analyser på laboratoriet og sett på pasientcaser.

I oppgaven har jeg blant annet beskrevet de konvensjonelle cytogenetiske metodene for å vise hvordan aCGH er forskjellig fra disse, og for å vise hva den kan tilføre i genetisk sammenheng. Genetikk kan være komplisert, og det hører med en kort innføring i faget, i arvestoffets oppbygning og funksjon, samt forklaringer på til dels vanskelige begreper på området. Prenatal diagnostikk er viet større plass, slik at det fremgår klart hva dette er, og hvordan undersøkelsene utføres. Prenatal diagnostikk og aCGH knyttes sammen idet jeg drøfter ulike aspekter som per i dag er utfordrende med fosterdiagnostikk utført på denne måten, samt at jeg ser på aCGH i et framtidsperspektiv.

Stikkord: Array comparative genome hybridization (aCGH), molekylær karyotypering, FISH, prenatal diagnostikk

Kapittel 1 Innledning

Da jeg var i praksis ved UNN på 5.året, hadde jeg en gravid pasient hvor det ved ultralyd ble gjort funn som kunne indikere at noe var galt med fosteret. Den medisinske situasjonen vekket min nysgjerrighet, og jeg ble opptatt av hva som skulle skje videre. Jeg ville gi henne et sikkert svar på om fosteret var sykt eller ikke. Pasienten ble henvist til fosterdiagnostikk, men til min frustrasjon fikk vi ingen sikrere svar. Det eneste vi kunne gjøre var å vente til barnet ble født, for hun ønsket ikke å avbryte svangerskapet uten å vite mer om barnets tilstand.

Dette var utgangspunktet for ideen til å skrive en oppgave om emnet prenatal diagnostikk. Som lege vil jeg også møte på dette temaet i min fremtidige praksis. Under forberedelsene i emnet prenatal diagnostikk fikk jeg kjennskap til en ny genetisk undersøkelsesmetode som kunne bli et lovende verktøy i diagnostikken av genetiske tilstander og sykdommer før barnets fødsel. Den nye genetiske undersøkelsesmetoden kalles for array komparativ genomisk hybridisering (aCGH).

I denne oppgaven ønsker jeg å belyse og drøfte ulike aspekter ved aCGH-analysen og dens fremtidige potensialet i prenatal diagnostikk. For å underbygge rekkevidden av hva aCGH kan brukes til og hvordan den skiller seg fra de andre undersøkelsesteknikkene, er det nødvendig å ha bakgrunnskunnskap om hvordan andre genetiske undersøkelser fungerer. Derfor handler denne oppgaven også om medisinsk genetikk og genetiske undersøkelser.

Kapittel 2 Teori

2.1 Innledning

I dette kapittelet vil jeg presentere medisinsk genetikk som et eget fagfelt innen medisin. Jeg vil gi den teoretiske bakgrunnen for de undersøkelser som er vokst fram på basis av den kunnskapen vi har om arvestoffets oppbygning og funksjon.

2.2 Faget medisinsk genetikk

Genetikk er læren om arvelighetsforhold. Den humane genetikk fikk sitt grunnlag ved gjenoppdagelsen av Mendels lover i 1900. Human genetikk omfatter den medisinske genetikk, hvor studier av arvelige sykdommer og genetiske sykdommer får viktig praktisk anvendelse i en stor pasientgruppe som kjennetegnes av at tilstandene er sjeldne og er ofte av alvorlig karakter. Genetiske sykdommer er sykdommer med bakenforliggende årsaker i arvestoffet, men ikke alle genetiske sykdommer er arvelige.

Faget medisinsk genetikk er bygd opp av en klinisk og en laboratorieanalytisk del. Den kliniske delen inkluderer kjennskap til pasientens sosiale funksjon, tidligere sykdommer, sykdommer i familien, pasientens aktuelle plager og en klinisk undersøkelse av pasienten. I noen tilfeller er ikke pasienten selv tilgjengelig for klinisk undersøkelse på den måten vi er vant til i medisinen. Dette gjelder foster i mors liv, der vi kun kan få indirekte informasjon om fostret gjennom for eksempel ultralyd undersøkelse og fostervannsprøve. Den laboratorieanalytiske delen inkluderer kjennskap til arvestoffet i form av DNA og kromosomer.

2.3 Arvestoffet

Arvestoffet vårt utgjør grunnlaget for våre egenskaper. Arvestoffet foreligger i form av DNA og kromosomer. For å forstå hvordan arvestoffet og endringer i det kan gi opphav til sykdom, er det viktig å vite hva arvestoffet er, hvordan det er bygd opp, hvordan endringer skjer, og hvordan disse endringene kan føres videre fra en generasjon til den neste.

2.3.1 DNA

Den genetiske informasjonen ligger lagret i DNA i cellekjernen, og noe DNA finnes også i mitokondrier. Den genetiske informasjonen som er lagret der, er helt nødvendig for at en celle skal kunne fungere og utføre oppgavene sine. DNA inneholder oppskriften på alle funksjoner en celle har.

DNA er forkortelse for deoksyribonukleinsyre (1). Hver enkelt byggestein eller nukleotide består av et suktermolekyl (deoksyribose), en fosfatgruppe og fire nitrogenholdige baser; adenin (A), tymin (T), guanin (G), og cytosin (C). To lange tråder med nukleotider bindes sammen, slik at de danner en spiral. De holdes sammen av hydrogenbindinger, og disse bindingene kan bare oppstå mellom bestemte baser. Derfor er det slik at G alltid er bundet til C, og T alltid er bundet til A. Denne baseparingen er opphavet til at trådene blir antiparallele, og det er også den som gjør det mulig for DNA-molekylet å kopiere seg selv. Denne egenskapen ved DNA utnyttes også *in vitro*. Den gjør det mulig å bruke metoder hvor en i laboratoriet kan kopiere eller merke bestemte DNA-sekvenser, slik at de kan analyseres med tanke på om det foreligger genetiske avvik.

Den genetiske informasjonen i DNA er bestemt av rekkefølgen av nitrogenbasene i DNA-tråden. En del av DNA som bestemmer hvilket protein som skal dannes kalles et gen. I genomet finnes ca. 25.000 gener (2). For at et protein skal dannes, må informasjonen fra genene først oversettes til aminosyrer i en prosess som kalles translasjon. Dannelsen av protein fra aminosyrer skjer på ribosomene, som betyr at

informasjon fra DNA må fraktes ut av kjerna. DNA er altfor store molekyler til at det kan passere kjernemembranen, derfor trengs mindre molekyler kalt ribonukleinsyrer (RNA). RNA er sammensatt av nukleotider i en tråd. Nukleotidene i RNA består av sukkeret ribose og de nitrogenholdige basene uracil (U), guanin (G), adenin (A) og cytosin (C). RNA har viktige funksjoner når det gjelder å oversette gener til hhv. aminosyrer og proteiner. Først må DNA kopieres til RNA; en prosess som kalles transkripsjon og som skjer vha. ulike enzymer. Det finnes flere typer RNA. De mest sentrale er "messenger-RNA" (mRNA) som inneholder informasjon om hvilket protein som skal lages. Transport RNA (tRNA) frakter aminosyrer fra cytosol til ribosomene og ribosomalt-RNA (rRNA) inngår i ribosomene hvor proteinsyntesen foregår.

Tre nitrogenbaser etter hverandre (en triplett) koder for én bestemt aminosyre, og kalles et kodon. Ett enkelt gen inneholder de kodon som er nødvendige for å danne et helt protein. Siden 4 baser settes sammen tre og tre, finnes det 64 ulike kodon (4^3). Disse koder for 20 ulike aminosyrer, slik at hver aminosyre har flere kodon. I tillegg finnes egne stoppkodon som markerer slutten på proteinsekvensen. Antallet kodon i de ulike genene varierer fra mindre enn ti til mer enn tusen, avhengig av størrelsen på proteinet som genet skal framstille. Et gen er altså en del av DNA som inneholder den informasjonen som trengs for å danne et bestemt protein. Siden DNA-sekvensene avleses og oversettes tre og tre, og hver triplett har sin egen betydning, kan utskifting eller tap/tillegg av bare én base være alvorlig og føre til at målproteinene ikke fungerer slik det skal.

I genomet vårt har vi områder som kalles exon og områder som kalles intron. Exon er kodende regioner, altså sekvenser av DNA som kan oversettes til proteiner. Intron er områder som fjernes etter at de er blitt transkribert slik at exon på hver sin side av et intron spleises sammen. Bare 2% av genomet vårt koder for proteiner, resten er tilsynelatende uten funksjon (3).

2.3.1.1 DNA-forandringer

Enhver forandring i DNA kalles mutasjoner (1). Mutasjoner kan skje spontant eller på bakgrunn av ytre påvirkninger, som for eksempel stråling. Mutasjoner i arvestoffet kan føre til sykdom, men ikke alle mutasjoner er sykdomsfremkallende. Eksempler på mutasjoner kan være endringer i enkeltnukleotider, eller større mutasjoner, hvor et antall baser legges til eller tapes. Selv små mutasjoner kan få alvorlige følger. Ved missense-mutasjoner vil en nukleotid erstattes av en annen, og resultatet kan bli at tripletten nukleotiden er en del av, koder for en annen aminosyre. Da er det ikke sikkert at målproteinet vil fungere. Dersom nukleotiden erstattes av en som koder for samme aminosyre, utgjør substitusjonen ingen forskjell. En nonsense-mutasjon er en substitusjon av nukleotider som fører til prematurt stoppkodon, slik at proteinet blir mindre enn det skal være, fordi alle basene etter stoppkodonet tapes. Frameshift-mutasjoner er mutasjoner hvor én base tapes, slik at hele leserammen forskyves i de etterfølgende kodon.

Insertjoner betyr tillegg av baser, og delesjoner betyr at baser tapes. På DNA-nivå omfatter mutasjonene enkeltnukleotider eller mutasjoner mindre enn ca. 5 millioner basepar (Mb), og de er ikke store nok til å kunne oppdages i et lysmikroskop.

2.3.2 Kromosomer

Hos mennesket er kjerne-DNAet pakket inn i 46 kromosomer, 23 arvet fra far og 23 arvet fra mor (1). Kromosomer er DNA i sin mest tettpakkede form. I cellekjernen ligger DNA kveilet opp med histoner som er basiske proteiner som beskytter DNAet og gjør at det tar så liten plass som mulig. Histonene er igjen surret sammen i nukleosomer, små knuter som danner grunnenheten i kromosomet. Den tette pakkingen gjør at hvert kromosom kan inneholde flere centimeter DNA, og i cellekjernen ligger ca. 2 meter DNA totalt. Eksakt hvordan DNAet er pakket, varierer med celledelingsfasene, og det er hardest pakket under mitose. I metafase av celledelingen trekkes kromosomene ut mot polene i cellekjernen, slik at de kan skilles fra hverandre og gå til hver sin celle. Når en skal analysere kromosomene i mikroskop, stoppes

celledelingen i metafase ved hjelp av kjemikalier, slik at kromosomene foreligger i den formen de er mest synlige.

Endene på kromosomene kalles telomerer, og midtpartiet hvor kromosomparene festes sammen, kalles centromer. Hvert kromosom har en kort og en lang arm. Den korte armen kalles p og den lange kalles q.

Kromosomene som ikke er kjønnskromosomer, altså alle utenom X og Y, kalles autosomale kromosomer. Somatiske celler er diploide, dvs. at hver celle har to av hvert kromosom, mens kjønnscellene er haploide og bare har ett eksemplar av hvert kromosom. Kvinnens eggceller består av 22 autosomer og ett X-kromosom. Mannen utvikler derimot sædceller av to typer, hvor den ene typen har 22 autosomer og ett X-kromosom, mens den andre har 22 autosomer og ett Y-kromosom.

2.3.2.1 Kromosomforandringer

Vi skiller mellom DNA- og kromosomforandringer ved at kromosomforandringer er større enn 5 Mb og kan analyseres i mikroskop. På kromosomnivå kaller vi ofte mutasjoner for kromosomfeil. Kromosomfeil kan i likhet med DNA-mutasjoner gi sykdom, og de er ofte årsaken til ulike syndromer (4). Et syndrom kan beskrives som et sett av symptomer eller funn som forekommer sammen, og som har en felles underliggende årsak.

Kromosomforandringer skjer på to måter; enten ved at strukturen på kromosomet forandres, eller ved at kromosomer tilkommer eller tapes – såkalt numeriske avvik. Strukturen på kromosomene kan endres dersom det oppstår brudd i kromosomene. For eksempel kan det skje delesjoner – at områder tapes, duplikasjoner – at et område fordobles, insersjoner – at noe legges til, og inversjoner – at et område blir snudd 180 grader. Det forekommer også ulike former for translokasjoner, som betyr bytte av segmenter mellom to ikke-homologe kromosomer. Translokasjoner trenger ikke å ha noe å si for sykdomsutvikling, så lenge segmentet finnes på et annet kromosom. Disse kalles balanserte translokasjoner. Problemer kan derimot oppstå dersom avkommet

arver kromosomet som mangler segmentet, og ikke får kromosomet hvor segmentet er lokalisert, såkalte ubalanserte translokasjoner. Ubalanserte translokasjoner resulterer typisk i misdannelser i flere organsystemer, avvikende utseende og mental retardasjon (5).

Numeriske avvik vil si at det har skjedd endringer i antallet kromosomer. I slike tilfeller foreligger aneuploidi, som betyr unormalt antall kromosomer. Et eksempel på aneuploidi er monosomi hvor individet mangler et kromosom. Dette ser vi for eksempel ved Turner syndrom (45,X), Et annet eksempel er trisomi, hvor individet har et kromosom for mye, som ved Downs syndrom (47,XY,+21). Det kan også foreligge polyploidi, som vil si unormalt antall kromosomsett, for eksempel 69,XXX. Numeriske avvik skjer oftest pga. "non-disjunction" under meiose. Ved "non-disjunction" går to homologe kromosomer til den samme dattercellen istedenfor at de separeres og går til hver sin dattercelle, og resultatet blir monosomi eller trisomi hos fosteret.

Dersom mutasjoner skjer under fosterutviklingen slik at det oppstår to eller flere ulike cellelinjer, kalles det **mosaicisme**. Mosaikktilstander er blandingstilstander av normale celler og celler med nymutasjoner. Mutasjonene kan foreligge både som strukturelle og numeriske mutasjoner. For eksempel kan en andel av cellene ha tre kopier av kromosom 21, mens resten av cellene er normale. Mosaicisme gir ikke alltid fenotypiske utslag, da det kommer an på hvilket avvik det er tale om, hvilke celler som er rammet og hvor stor andel av cellene det gjelder. Jo tidligere i celleutviklingen det skjer, jo flere celler vil inneha feilen.

2.4 Arvegangene

Arvegangene beskriver hvordan en sykdomsmutasjon kan føres videre fra foreldre til barn. I denne oppgaven er ikke arvegangene så sentrale, men de hører med i enhver innføring i genetik og kan derfor ikke utelates. For at vi skal kunne forstå arvegangene best mulig er det viktig å forklare enkelte begreper i genetik som allel, locus og homo-/heterozygiositet.

Homologe kromosomer inneholder gener som koder for de samme egenskapene på samme locus (sted), og disse kromosomene er organisert i par (1). Et allel er en av flere alternative former av et gen. Alle kromosomer som ikke er kjønnskromosomer har to alleler, ett fra mor og ett fra far. Heterozygot betyr at et individ har arvet to ulike alleler på to homologe kromosomer. Homozygot er det motsatte av heterozygot, og betyr at to alleler på to homologe kromosomer er like. Mange homozygote alleler kan indikere at foreldrene er nært beslektet.

Gener er enten dominante eller recessive. De dominante genene blir uttrykt, når de er tilstede på et allel, og dominerer derfor over de recessive, som viker. Recessive gener må være tilstede på begge allelene for å bli uttrykt. Genotype er slik som genene er satt sammen på DNA nivå, mens fenotype er hvordan genotypen uttrykkes. Eksempler på dette kan være syk eller frisk, eller brune eller blå øyne.

Klassisk Mendelsk arv omfatter autosomal og kjønnsbundet arv. Ved **autosomal dominant arvegang** er arveanlegget lokalisert på et av de 22 autosomale kromosomene. Ethvert barn av en syk person har 50% risiko for å arve sykdommen, og sykdommen kan nedarves gjennom hver generasjon. Kvinner og menn rammes like ofte. Autosomal dominante sykdommer kan nedarves fra mann til mann, og dette er en viktig observasjon for å skille autosomal dominant arv fra X bundet recessiv arv. Eksempler på autosomalt dominante sykdommer er Neurofibromatose, Huntington chorea, Marfan syndrom og Colonpolypose. Over 2600 sykdommer er kjent, og nymutasjoner forekommer ofte.

Som ved autosomt dominant arv, er arveanlegget også ved **autosomal recessiv arvegang** lokalisert på et av de 22 autosomale kromosomene. Friske foreldre der begge er bærere av mutasjon for samme sykdom kan få ett eller flere syke barn. Hvert av deres barn har 25% risiko for å arve sykdommen, og hvert friske søsken til et sykt barn har 66% risiko for å være anleggssbærer. Risikoen for å få syke barn øker dersom foreldrene er beslektet. Menn og kvinner er like ofte affisert. Eksempler på autosomt recessive sykdommer er cystisk fibrose, spinal muskelatrofi, Føllings sykdom og hemokromatose. I alt finnes mer enn 2000 sykdommer, og de fleste er medfødte stoffskiftesykdommer.

Kjønnsbundet arvegang kan være recessiv eller dominant, og arveanlegget er lokalisert på X-kromosomet. Dominant kjønnsbundet arv ses sjelden fordi den ofte ikke er forenelig med liv. X bundet recessiv arv rammer hovedsakelig menn og sykdommen overføres fra friske mødre. Alle døtre av en mann med sykdom blir arveanleggssbærere. Alle hans døtres sønner har 50% risiko for å arve sykdommen. X-bundet recessiv arv overføres ikke direkte fra far til sønn, fordi far gir sitt Y-kromosom til sine sønner, mens de får X-kromosomet fra mor. Sykdommen kan imidlertid overføres via flere kvinnelige bærere, og nymutasjoner kan oppstå.

Enkelte genetiske sykdomsgrupper har en atypisk arvegang i den forstand at de har et av de typiske Mendelske arvegangene i bunnen, men har likevel en noe annerledes arvegang. For eksempel **dynamiske mutasjoner** er mutasjoner som endrer sin størrelse når de nedarves (6). Som oftest ekspanderer de. Ekspansjonen innebærer at repeterte områder i DNA øker i størrelse. Prosessen beskrives i klinikken som antisipasjon, som betyr at en sykdom som nedarves i flere suksessive generasjoner, vil gi tidligere debut, og/eller være klinisk mer alvorlig fra en generasjon til neste. Eksempler er Dystrophia Myotonica og Fragilt X syndrom.

Et annet eksempel på atypisk arvegang er genomisk **imprinting** (1). Normal utvikling krever tilstedeværelse av både maternelt og paternelt genetisk materiale. Genomisk **imprinting** innebærer differensiel ekspresjon av maternelt og paternelt genetisk

materiale svarende til et kromosom/gen. Et gen som er gjenstand for imprinting blir inaktivert (avslått) og derfor ikke uttrykt når det passerer gametogenesisen hos et individ av ett kjønn, mens det gjennom gametogenesisen i det motsatte kjønn bevarer evnen til ekspresjon. Eksempler på slike sykdommer er Prader-Willi syndrom, som skjer ved inaktivering av et paternelt gen, mens Angelman syndrom kommer til uttrykk når det samme maternelle genet er avslått. Imprinting spiller sannsynligvis en rolle i flere prosesser knyttet til arvestoffet som vi per i dag ikke kjenner til.

Et tredje eksempel på atypisk arvegang er **mitokondriell arv**. Mitokondrielle sykdommer kan skyldes mutasjoner i kjerne-DNA (autosomt eller recessivt nedarvet) eller mutasjoner i mitokondrielt DNA (mtDNA). Et barn arver mtDNA kun fra mor, fordi sædcellens mitokondrier befinner seg i sædcellens hale, som faller bort ved befruktning slik at bare sædcellens cellekjerne slipper inn i eggcellen. Dette innebærer at en mann med sykdomsfremkallende mutasjoner i sitt mtDNA ikke kan føre dette videre til sine barn, mens mor fører mtDNA videre til alle sine barn. Mitokondrielle sykdommer rammer ofte flere organsystemer og gir neurologiske og/eller myopatiske symptomer. Eksempler på mitokondrielle sykdommer er Mitokondriell encephalomyopati med laktat acidose og ”stroke-like” episoder (MELAS), Myoklon epilepsi med ragged-red fibre (MERFF) og Neurologisk svakhet med ataxi og retinitis pigmentosa (NARP).

2.5 Undersøkelser av arvestoffet

Arvestoffet kan undersøkes på flere måter; direkte ved at en analyserer DNA eller kromosomer, og indirekte på protein-nivå. Her vil jeg konsentrere meg om de direkte undersøkelsene på DNA og kromosomnivå. Matrisebasert komparativ genomhybridisering er en av de nyeste metodene og den metoden som denne oppgaven handler om. Derfor har jeg for helhetens skyld valgt å ta den praktiske utførelsen av aCGH med i kapittelet som omhandler den, kapittel 5.

2.5.1 Kromosomundersøkelser

Den sveitsiske biologen Karl Wilhelm von Nägeli observerte kromosomer i mikroskop for første gang i 1842, mens Thomas B. Morgan i 1933 oppdaget at kromosomene er bærere av genene våre. I begynnelsen observerte man kromosomene som ensfargede strukturer, og de kunne skilles fra hverandre på basis av lengden og centromerens plassering. Kromosomundersøkelse var den første laboratoriediagnostikken i klinisk genetikk, og er i dag til uvurderlig hjelp i diagnostikken av kromosomsykdommer. Kromosomavvik er en underliggende årsak til medfødte misdannelser, dysmorfe trekk, mental retardasjon, autisme, infertilitet og en rekke genetiske syndromer.

Karyotype er et individs kromosomsammensetning (1,3). Normale jenter har 46 kromosomer og to kjønnskromosomer (46,XX), mens normale gutter har 46 kromosomer og kjønnskromosomene X og Y (46,XY). Kromosomavvik kan være kompliserte, sjeldne og det kan foreligge flere samtidig. Derfor er det nødvendig med et internasjonalt system for navnsetting, som gjør det enkelt å beskrive hvor feilen er lokalisert siden det ikke finnes generiske navn på alle mulige avvik. Alle kjente avvik er systematisert i International System for Human Cytogenetic Nomenclature (7).

Karyotypering kalles også G-båndsanalyse og er en manuell undersøkelse av kromosomene. Den innebærer isolering, farging og visuell analyse av kromosomene. Ved karyotypering kan en oppdage både strukturelle og numeriske avvik av

kromosomene, men avvikene må være over en viss størrelse (5 Mb) for at de skal være synlige i mikroskopet. For å kunne utføre kromosomanalyser trenger en levende celler. Kromosomer vises best i mikroskop når de foreligger i metafasen av celledelingen. Derfor må celler fra prøvemateriale først dyrkes i vekstmedium for at en skal få stort nok antall, en prosess som tar fra 3 til 10 dager avhengig av hvilket vev cellene kommer fra. Når en har mange nok celler, fikseres kromosomene i metafase for så å farges med Giemsa-farge. Så er de klare til å undersøkes i mikroskopet. Fargen gjør at en kan skille kromosomene fra hverandre på bakgrunn av størrelse, centromerens posisjon og fargestyrken på båndmønsteret. Kromosomene settes parvis opp i et karyogram for sammenlikning og god oversikt.

Ved karyotypering kan mosaikktilstander overses, fordi celler som har genfeil vokser dårligere enn friske celler i cellekultur. Ved lavgradig mosaicisme er det viktig å telle mange celler for å oppdage avviket.

Fluorescens *in situ* hybridisering (FISH) analyse er en metode som kan påvise utveksling av materiale mellom kromosomene. Det vil si at den kan avdekke translokasjoner og insersjoner, og den kan også avsløre forandringer innenfor samme kromosom som duplikasjoner, delesjoner, og inversjoner. Det tar to til tre uker å få svar på en FISH-analyse, selv om selve analysen er utført i løpet av et par dager. Cellene må foreligge i metafase, på samme måte som ved karyotypering. Det kan bare testes på et utvalg av områder samtidig.

Metoden går ut på at en bit av DNA (eller RNA) merkes med fluorescens. Den merkede biten kalles probe og vil basepare med en komplementær tråd. Proben fungerer dermed som en målsøkende rakett. Det fremstilles forskjellige prober som vil feste seg på ulike områder av kromosomet, og man velger probe etter hvilket område man ønsker å se på. For at proben skal finne mål-DNAet må dette først gjøres enkelttrådet, slik at proben kan basepare med den aktuelle DNA-sekvensen. Denne vil bli farget dersom den har komplementær sekvens til proben. I fluorescensmikroskopet vil en dermed kunne se om områdene som probene festes til, er normale hos

pasienten. Normalt skal en se to fargesignaler fra to kromosomer i mikroskopet, som betyr at begge områdene finnes på begge kromosomene. Ved delesjoner av et område på et kromosom, vil man bare se ett fargesignal fordi proben ikke kan feste seg på kromosomet som mangler sekvensen. Ved trisomi vil en se tre fargesignaler, som betyr at det foreligger et ekstra kromosom.

En kan benytte interfasekjerner hvor DNA er i utstrakt form som kromatin, dersom man ikke har mulighet til å dyrke celler eller til hurtigtesting. Fordelen er nettopp at en unngår den tidkrevende prosessen med å dyrke frem celler for å stoppe dem i metafase.

2.5.2 DNA-undersøkelser

DNA-undersøkelser kom til senere enn kromosomundersøkelsene. På 1950-tallet oppdaget Watson og Crick DNAs struktur og det sentrale dogme, det vil si forholdet mellom DNA, RNA og proteiner, og at DNA kopierer seg selv ved hjelp av replikasjon. Med dette var grunnlaget for molekylær-biologien lagt, og det ble mulig å undersøke arvestoffet på et nytt nivå.

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en teknikk som har vært i bruk siden 1983 (1). PCR kan ses på som en biologisk kopimaskin, hvor en liten bit av DNA-tråden kan kopieres til et stort antall i løpet av kort tid. I denne metoden gjøres DNA-syntese *in vitro* med DNA fra pasienten (templat) som utgangspunkt. Primere definerer start og stoppsted for kopieringen. I tillegg trengs nukleotider, buffer og enzym for å få en vellykket kopiering. I en varmeblokk med ulike temperaturer vil enzymet katalysere nydannelse av det valgte DNA-fragmentet. PCR brukes til å finne lengdeforskjeller på DNA, og er også utgangspunkt for sekvensering. Det trengs bare en liten mengde DNA for å kunne utføre PCR.

Kvantitativ Fluorescens PCR (QF-PCR) er en metode som brukes til hurtigdiagnostisering av trisomi 13, 18 og 21, og kan også påvise

kjønnskromosomaneuploidi (8). Disse avvikene er de vanligste, og utgjør 80% av de klinisk signifikante kromosomalnomaliene. Det gjøres en PCR amplifisering av mikrosatelittalleler, som merkes med fluorescens, og påfølgende elektroforese. Mikrosatelittalleler kalles "short tandem repeats" på engelsk, og forkortes STR. Dette er repeterte elementer som finnes i genomet. De består av områder på ca 20-50 basepar, for eksempel repetisjoner av (GT)ⁿ. Størrelsen og intensiteten av fluorescensen på produktene analyseres for å bestemme om prøven er mono-, di- eller tri-allelisk for disse områdene, som vil korrelere med antallet kromosomer. Antall STR per kromosom i QF-PCR-testen er vanligvis 3 til 6. En har resultatet i løpet av et par timer.

Fordelene med denne metoden er at den går raskere enn interfase-FISH, og den er billigere (9). Ulempen er at lavgradig mosaicisme ikke alltid oppdages med QF-PCR, og en vil dermed kunne få falske negative svar. Den kan heller ikke avdekke alle strukturelle avvik, og oppdager ikke endringer i kromosomsett.

Sekvensering innebærer en kartlegging av basenes rekkefølge i DNA (1). Den mest brukte teknikken er Sanger-teknikken som Fred Sanger utviklet sammen med Walter Gilbert. I 1980 fikk de Nobelprisen for sitt arbeid, som sier noe om teknikkens nytte og viktighet. Ved hjelp av sekvensering kan enhver DNA-sekvens bestemmes.

DNA-tråden som skal sekvenseres, kalles templat og kopieres først opp vha. PCR. Deretter har en templatet i et reagensrør og benytter oligonukleotider som primer, dvs. som merke for hvor enzymet DNA polymerase skal starte med å sette inn nukleotider og slik lage en DNA-tråd som er komplementær til templatet. I blandingen i reagensrøret finnes også nukleotider og endrede nukleotider merket med fluorescens. De endrede nukleotidene er dideoxyribonukleosidtrifosfat (ddNTP) mens de ordinære er deoxyribonukleosidtrifosfat (dNTP). Andelen ddNTP er mindre enn andelen dNTP. Når en ddNTP settes inn i sekvensen, kan ikke tråden fortsette å vokse lenger. Slik får en mange DNA-tråder med ulik lengde, og sekvensen kan leses av ved hjelp av gel elektroforese. Et bånd i gelen leses av for hver lengde som korresponderer med

henholdsvis A, C, G og T. Slik ser man til slutt hvordan hele sekvensen er bygd opp. I dag gjøres sekvensering maskinelt.

Sekvensering er nyttig for å lese av aminosyresekvensen i et gen. Det kan blant annet benyttes i kartlegging av nyoppdagede gener, og det kan påvise mutasjoner ved genetiske sykdommer. Før sekvenserte man ett og ett gen, eller ett og ett exon. Nå er helgenomsekvensering teknisk mulig, men det er kostbart.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) er en metode som først ble beskrevet i 2002 (3). MLPA påviser antall kopier av et gen eller et kromosom, delesjoner og insersjoner. Prinsippet likner PCR, men med MLPA kan flere områder kopieres opp samtidig.

I motsetning til ved PCR, er det ved MLPA ikke templatet som kopieres opp og kvantifiseres, men probene som tilsettes prøvene. (9) En er avhengig av at målsekvensen er tilstede i prøven for at probene skal kunne kopieres ved PCR. Hver MLPA-probe består av to oligonukleotider som er merket med fluorescens. Disse hybridiseres til målsekvensen, det vil si at de enkelttrådede oligonukleotidene baseparer med en komplementær enkelttrådet målsekvens. De to oligonukleotidene i hver probe hybridiseres til tilstøtende områder på målsekvensen. Når de er hybridisert, limes de sammen ved hjelp av en ligase, og så kan sekvensen kopieres med PCR. Deretter gjøres en elektroforese og bestemmelse av størrelse på fragmenter. Ved identifisering av størrelsen på fragmenter vil man identifisere ulike gener eller deler av gener. I tillegg kvantifiseres mengden av hvert allel. Avhengig av antall kopier av hvert allel får en ut en ratio; 1 hvis det finnes to kopier av hvert allel, 1,5 hvis allelet er duplisert, og 0,5 hvis et allel mangler. Resultat foreligger etter 2-3 dager.

Kapittel 3 Metode

I dette kapittelet vil jeg beskrive hvilke metoder jeg har brukt i denne oppgaven, og belyse deres styrke og svakheter.

3.1 Litteraturstudie

Både i forberedelsesdelen og underveis i arbeidet med oppgaven har jeg lest faglitteratur, herunder artikler og bøker om emnet, både i generell genetik og mer spesifikt om aCGH og fosterdiagnostikk. Jeg har lært å lete frem artikler om emnet, og sile ut hvilke som er mer relevante enn andre. Jeg har også lært å søke i ulike litteraturlitdata-baser.

Fordelen med denne metoden er at det finnes en stor mengde litteratur å ta for seg og hente inspirasjon fra. Samtidig er dette meget utfordrende, og det er en tidkrevende prosess. Dette fordi en må tilegne seg nødvendig bakgrunnskunnskap for å være i stand til å vurdere og velge ut relevant litteratur. En annen utfordring er at jeg i denne oppgaven skriver mye om praktiske undersøkelser, som kan være vanskelige å forstå ut fra et rent teoretisk perspektiv som et litteraturstudie medfører.

3.2 Minikurs i cytogenetikk

Jeg gjennomgikk et tredagers kurs hvor jeg fikk én-til-én-undervisning av min veileder Mona Nystad. På denne måten fikk jeg en innføring i cytogenetikk og en bedre oversikt over hvordan arbeidet med genetisk materiale foregår i praksis. I tillegg til praktisk undervisning på laboratoriet holdt hun også forelesning der hun gjennomgikk hvilke undersøkelser som gjøres på genetisk avdeling, og prinsippene bak dem. Denne praktiske undervisningen har vært svært nyttig i arbeidet med oppgaven, all den tid jeg fikk en dypere innsikt i de ulike analysemetodenes praktiske side.

3.3 Opplæring i tolkning av aCGH-svar

Jeg fikk forklart hvordan selve aCGH-analysen utføres teknisk. Imidlertid er selve tolkningsarbeidet det sentrale i array-analysen, Derfor har jeg fått opplæring i tolkning av aCGH svar. Denne prosessen er tidkrevende. Jeg gjennomgikk flere pasientcaser, slik at jeg har sett hvordan genetisk utredning foregår i praksis, og lært hvordan databasesøkene blir gjort. Jeg søkte på funn som var blitt gjort ved aCGH slik som genetikerne gjør når de mottar prøvesvar. Jeg har på denne måten fått kjennskap til databasene Ensembl, OMIM, PubMed og UNIQUE (se nettadresser lenger ned i teksten). Ved å søke på posisjonene av deleterte områder i pasientens DNA fant jeg hvilke gener de deleterte områdene inneholdt, hvilke oppgaver de aktuelle genene hadde og hvordan en delesjon ville påvirke pasientens kliniske bilde. I databasene er det også samlet bilder av personer med samme delesjon, slik at en kan sammenlikne det med egen pasient. Det finnes i tillegg informasjon som er tilpasset pasienten selv og/eller pårørende, som er nyttig for pasientens forståelse av sitt syndrom eller sin sykdom.

Gjennom dette arbeidet fikk jeg anledning til å erverve en bedre forståelse for helheten i arbeidet med array-funn. På bakgrunn av casene har jeg kunnet underbygge hvordan man kan skille mellom benigne og patogene kopinummervariasjoner, og slik utfylle avsnittene som omhandler dette med gode eksempler. Jeg har også fått mer kunnskap og en mer helhetlig forståelse av genetiske undersøkelser som sådan.

Databaser brukt ved vurderinger av aCGH/SNParray funn:

- Ensembl - <http://www.ensembl.org>
- Omim - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
- PubMed - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- UNIQUE - <http://rarechromo.org/html/home.asp>

3.4 Selvutført laboratoriearbeid

Jeg har selv utført en del laboratoriearbeid. Dette inkluderte oppsett av en FISH-analyse av prøve fra en pasient med mistanke om DiGeorge-syndrom (Vedlegg 1). Først ble jeg vist hvordan trinnene i analysen skulle utføres, deretter gjentok jeg prosedyren selv med en egen prøve. Resultatet av analysen ses på FISH-bildet på oppgavens forside, som viser at pasienten hadde alle områdene proben søkte etter, og dermed ikke hadde DiGeorge syndrom. På bildet er det to signaler både på kromosomer i kjernen og på frie kromosomer. Vi kunne imidlertid ikke si noe om resten av områdene på kromosomene ettersom det kun var området forbundet med DiGeorge vi testet. Dette var da heller ikke formålet med analysen. Det illustrerte imidlertid noen av vanskelighetene en møter i arbeidet med å undersøke genetisk materiale.

3.5 Fordeler og ulemper med metodene

Metodene jeg har brukt var alle nødvendige og de har alle sine klare fordeler, som jeg tidels har vært inne på. Med den tiden jeg hadde til rådighet er jeg fornøyd med prioriteringen av metoder, for de har utfyllt hverandre på en god måte. Likevel er det noen ulemper. Jeg skulle gjerne hatt mer tid til å se på flere pasientcaser og se mer klinikk, være med på dysmorfologimøter, veiledning av pasienter, og kanskje til og med være med ved prenatale undersøkelser. Disse tingene ville gitt meg et mer nyansert bilde og et mer helhetlig innblikk i oppgavens tema. Siden jeg skrev oppgaven alene, ble tiden for knapp til at dette lot seg gjøre.

Den største fordelen med metodene jeg har brukt, er at jeg fikk sett sammenhengene mellom teori og praksis. Ved å se på pasientcaser har jeg fulgt gangen i diagnostikken fra første undersøkelse til pasienten var ferdig utredet. Slik fikk jeg også se samspillet mellom klinikken og laboratoriet. En annen fordel er at jeg hadde to veiledere med forskjellig bakgrunn. Den ene er kliniker og jobber som overlege, og den andre er genetiker og forsker på laboratoriet.

Kapittel 4 Prenatal diagnostikk (PND)

4.1 Innledning

I 1966 oppdaget Steele og Breg at et fosters karyotype kunne bestemmes ved hjelp av analyse av celler hentet fra fostervannet (1). Det var allerede kjent at risikoen for Downs syndrom øker med mors alder. Steele og Bregs funn la grunnlaget for utviklingen av prenatal diagnostikk som medisinsk verktøy, hvor gravide kunne undersøkes ved hjelp av fostervannsprøve med den hensikt å avdekke foster med Downs syndrom. Rekkevidden av hva prenatal diagnostikk kan fange opp av avvik hos foster har økt betraktelig siden den gang.

Formålet ved prenatal diagnostikk er å utelukke eller påvise kromosomavvik eller en bestemt forandring på gen-nivå. Tidligere var det ofte slik at par som hadde alvorlige arvelige sykdommer i familien, avsto fra å få barn. I dag har par i den situasjonen en mulighet de ikke hadde før. Ved hjelp av prenatal diagnostikk kan genetiske avvik oppdages, og den gravide kvinnen kan selv velge om hun vil avslutte svangerskapet eller ta imot barnet.

Prenatal diagnostikk er viktig i tilfeller hvor det påvises sykdom hos fosteret som kan behandles. Dette gjelder foreløpig et lite antall sykdommer, men det blir stadig flere. For eksempel kan blæreobstuksjon, som vil føre til oligohydramnion og dermed dårlig utvikling av lungene, behandles *in utero*. Fosterdiagnostikk er også viktig ved påvisning av sykdommer som krever behandling rett etter fødsel, slik at helsepersonell er godt forberedt på fødsel av et mulig kritisk sykt barn. Samtidig gir prenatal diagnostikk familien tid til å forberede seg mentalt på å få et barn med genetisk avvik.

I dette kapitlet vil jeg gi en oversikt over ulike aspekter av PND, inkludert indikasjoner og ulike PND-metoder. I tillegg vil jeg si noe om genetisk veiledning og lovgivning.

4.2 Indikasjoner for tilbud om prenatal diagnostikk

- I tilfeller der ultralydundersøkelse har vist tegn til kromosomavvik hos fosteret.
- Foreldre som tidligere har fått barn med: Kromosomavvik, neuralrørsdefekt, stoffskiftesykdom, alvorlig X-bundet recessiv sykdom, eller hvor det er høy risiko for at kvinnen er bærer av et slikt arveanlegg
- Foreldre som tidligere har fått barn med alvorlig autosomal dominant eller recessiv sykdom hvor fosterdiagnostikk er mulig.
- I tilfeller hvor en av foreldrene er bærer av kromosomabnormitet, og dermed har høyere risiko for å få barn med alvorlig utviklingsforstyrrelse.
- Kvinner som behandles med anti epileptika (eks. Valproat eller Karbamasepin) og dermed har høyere risiko for å få barn med neuralrørsdefekt.
- Habituelle aborter
- Kvinnens alder. Risiko for trisomiene øker med alder.
- Livssituasjon, etter helhetsvurdering.

Det er i første omgang allmennlegen som vurderer om det er indikasjon for å sende en gravid kvinne videre til prenatal diagnostikk. Dersom legen er usikker, kontaktes fødselslege eller genetiker. Pasienten skal på forhånd informeres nøye om undersøkelsesmetodens muligheter og begrensninger, risikoen undersøkelsen medfører for mor og foster, og risikoen for å få et sykt barn. Informasjonen skal gjøre pasienten selv i stand til å ta valg på et best mulig grunnlag både kunnskapsmessig og etisk.

4.3 Metoder ved prenatal diagnostikk

Det finnes ulike metoder for å undersøke et foster, og hvilken en velger avhenger av indikasjonen. Vi skiller mellom non-invasive og invasive metoder (10).

4.3.1 Non-invasive metoder

De non-invasive metodene er dobbel- og trippeltest, ultralydundersøkelser og undersøkelser av føtale celler i mors blod.

De non-invasive metodene er indirekte knyttet til genetikk fordi det ikke gjøres noen direkte undersøkelser av kromosomer eller DNA som sådan, bare av markører som kan indikere at noe er i veien med arvestoffet. I tilfeller hvor en finner slike, kan en gå videre med invasive tester for sikrere å kunne si noe om diagnose.

Dobbeltest er en test der en måler to hormoner. HCG og PAPP-A måles i morens serum i svangerskapsuke 8+0 til 13+6, og resultatene sammenholdes med ultralydundersøkelse (11). Sammen med nakkefoldsmåling, mors alder og svangerskapslengde, kan denne testen gi en beregnet risiko for om barnet har trisomi 21, trisomi 18 eller trisomi 13 (12). Hvis risikoen er høyere enn en gitt størrelse, dvs. at testen er positiv, vil foreldrene få tilbud om ytterligere fosterdiagnostikk. Siden det er en blodprøve fra mor er prøven uten risiko for mor og barn.

Trippeltest er en måling av tre hormoner; nivået av AFP, HCG og østriol i mors blod (11). Den kan utføres i svangerskapsuke 15-17. Svangerskapslengden fastslås samtidig ved ultralyd (12). Trippeltesten gir, kombinert med mors alder og svangerskapslengde, et risikoestimat for trisomi 18 og 21, samt neuralrørsdefekt og bukveggsdefekter.

Testen har en deteksjonsrate på 75% når det gjelder trisomi 21, den påviser 80-90% av misdannelser i form av ryggmargsbrokk og bukveggsdefekter, og tilnærmet 100% av de med anencephali oppdages. Hvis testen er positiv tilbys foreldrene ytterligere fosterdiagnostikk. I motsetning til dobbelttesten kan trippeltest også benyttes ved tvillingsvangerskap.

Ultral lyd er en ikke-invasiv metode som kan avdekke avvik hos foster. Metoden brukes både som et verktøy i fosterdiagnostikk og som screeningsverktøy i svangerskapsomsorgen, og loven skiller mellom disse to (13).

Ved ultral yd-undersøkelse kan det oppdages ulike markører, for eksempel slike som kan foreligge hos foster med Downs syndrom. Det kan dreie seg om fortykket nakkefold, kort lårbein eller overarm, ekkorik struktur i hjertet, ekkorik tarm, choroid plexus cyster, eller manglende nesebein. Dersom en finner noen av disse markørene, tilbys paret genetisk veiledning slik at de blir i bedre stand til å avgjøre om de ønsker å gå videre med fosterdiagnostikk. Andre tilfeller hvor ultral yd brukes i fosterdiagnostikk, er der hvor mor har opplevd smerter eller blødninger, eller der livmorens størrelse ikke er i samsvar med antatt varighet av svangerskapet.

Føtale celler i mors blod er en metode som fortsatt er under utvikling og som ikke brukes rutinemessig. Dette er imidlertid en lovende metode fordi den ikke er invasiv og uten risiko for mor og barn, men den er teknisk vanskelig å utføre.

4.3.2 Invasive metoder

Invasive PND-metoder er amniocentese, morkakebiopsi, navlestrengsprøve, samt preimplantasjons genetisk diagnostikk (PGD). Ved hjelp av disse metodene kan vi analysere DNA og kromosomer direkte (8).

Fostervannsprøve eller amnioscentese er en metode som har vært i bruk siden slutten av 60-tallet. 15-20 ml fostervann hentes ut vha nåleaspirasjon under ultralydveiledning transabdominalt eller transcervicalt. Fostercellene dyrkes og det kan gjøres molekylær- og cytogenetiske analyser. En kan også måle nivåer av AFP og acetylcholinesterase i fostervannet som markører for om det foreligger neuralrørsdefekt. Det er i tillegg mulig å måle metabolitter i fostervannet dersom en mistenker metabolsk sykdom.

Amnioscentese kan gjøres mellom 15. og 24. svangerskapsuke, da det etter uke 15 er nok fosterceller i fostervannet til at de kan dyrkes og undersøkes. Teknisk er det også vanskelig for legen å utføre prøven før uke 15 fordi forholdet mellom foster og fritt fostervann er mindre og det dermed er større fare for å stikke i fosteret eller i morkaken. Frem til uke 24. er også celleveksten størst hvilket gjør det lett å få tak i celler fra fostervannet. Svar på prøven foreligger i løpet av to til tre uker. Abortrisiko ved en slik prøve er 0,5- 1 %. Feilkilder ved amniocentese er for eksempel mosaicisme og risiko for maternell celletilblanding. Noen ganger er funnene uklare slik at en ikke får et entydig resultat.

Chorion villus sampling (CVS) er en biopsi/vevsprøve fra morkaken (chorion villi) som tas mellom svangerskapsuke 10 og 14 (1). Prøven tas transabdominalt eller transcervicalt vha et kateter. Indikasjoner for CVS er de samme som for amnioscentese. Cellene kan analyseres direkte og etter dyrkning. Det kan gjøres molekylær- og cytogenetiske analyser. Fordelen med CVS framfor amnioscentese er at CVS kan gjøres på et tidligere tidspunkt i svangerskapet, og dermed foreligger også resultat av analysen tidligere. Ulemper i forhold til fostervannsprøve er at en går glipp av en del markører en kan finne i fostervannet, men ikke i chorion villus, for eksempel AFP, acetylcholinesterase og metabolitter. Maternell celletilblanding opptrer med en høyere frekvens enn ved fostervannsprøve, her med 1-2%. En feilkilde ved CVS er at en kan få ut celler som ikke representerer fosteret, men morkaken i seg selv. Mosaicisme kan gjøre det vanskelig å tolke resultatene også ved denne undersøkelsen.

Navlestrengsprøve er en blodprøvetaking fra navlestrengen til fostret. Dette utføres med en tynn nål gjennom kvinnenes bukvegg under ultralydveiledning.

Preimplantasjons genetisk diagnostikk (PGD) er en undersøkelse av det befruktede egget før det settes inn i livmoren (14). Metoden gjør det mulig å velge ut embryo uten et bestemt kromosomavvik eller sykdomsmutasjon som foreligger i familien. Dette embryoet planteres i kvinnens livmor.

4.4 Prenatal diagnostikk og lovgivning

Genetiske undersøkelser og forskning er underlagt lovgivning som strengt tatt regulerer alt som kan gjøres på laboratoriet, hvem som kan utføre analyser, hvilke undersøkelser som kan gjøres, hvem som har tilgang til journaldata, og hva resultatene fra undersøkelsene kan brukes til (15).

Etiske aspekter ved prenatal diagnostikk er viktig fordi resultatet av undersøkelsene kan bli et spørsmål om liv eller død. Det er blant annet derfor konkret lovgivning er så viktig. I prenatal diagnostikk spiller også Lov om svangerskapsavbrudd en sentral rolle, fordi den setter grenser for når et svangerskap kan avbrytes (16). Selvbestemt abort er lovlig inntil utgangen av 12. svangerskapsuke. Aborter etter dette tidspunktet må det søkes til abortnemden om, og kan foretas inntil uke 18, men det må da foreligge særlig tungtveiende grunner til å innvilge svangerskapsavbrudd.

Kapittel 5 Array komparativ genomhybridisering

5.1 Innledning

I innledningen i første kapittel nevnte jeg min nysgjerrighet for betydningen av uklare funn på undersøkelser som gjøres prenatalt. I den sammenheng har array komparativ genomhybridisering (aCGH) vist seg å være en meget lovende metode, og kan være nettopp det hjelpemiddelet vi trenger der andre metoder kommer til kort. På den andre siden er metoden fortsatt så ny at det foreløpig også foreligger mange utfordringer.

I dette kapittelet vil jeg se på mulighetene vi i dag har for å tolke resultatet av aCGH-undersøkelser på bakgrunn av databaser og kjente rapporterte funn. Først vil jeg imidlertid forklare hvordan undersøkelsen foregår i praksis.

5.2 aCGH - metoden

Matrisebasert komparativ genomhybridisering har vært i klinisk bruk siden 2005 (17). Det er en høyresolusjonsteknikk, som betyr at den kan avdekke små delesjoner og duplikasjoner i hele genomet med stor nøyaktighet, helt ned på enkeltgen-nivå. Metoden kalles også molekylær karyotypering. aCGH er en kostbar undersøkelse, men ingen annen laboratoriemetode har like høy funnprosent når det gjelder å påvise årsaken til psykomotorisk utviklingshemming.

Metoden kan blant annet brukes til å screene genomet målrettet for de vanligste typene avvik, for eksempel trisomi 13, 18, og 21 samt kjønnskromosomanomalier, slik som vi i dag bruker for eksempel FISH og QF-PCR. En fordel med aCGH er at det går raskt, fordi en ikke trenger å dyrke celler for å få tak i kromosomer i metafase (18). Det betyr at aCGH-analyse kan være et alternativ i tilfeller hvor en ikke får oppvekst av vevsceller i cellekultur, eller der det er et for lite antall celler i deling.

Mikrodelesjoner -og duplikasjoner er mutasjoner mindre enn 3 Mb som ikke er synlig i mikroskop (17). Samlet sett er disse mutasjonene langt hyppigere årsak til utviklingshemning enn for eksempel trisomi 21. De kalles også kopitallsvarianter og forkortes CNV etter det engelske ”copy number variations”. Array CGH kan oppdage disse, og brukes på indikasjoner som for eksempel utviklingsforstyrrelse og syndromutredning. aCGH er ideell i tilfeller hvor en ikke kommer i mål med andre metoder, dvs. i de tilfeller der det mest sannsynlig foreligger sjeldne submikroskopiske varianter av kromosomfeil.

Studier har vist at aCGH avslører patogene avvik i arvestoffet i 19 % av tilfellene med pasienter som har mental retardasjon og utviklingsavvik (19). Denne prosenten er omtrent dobbelt så høy som den ved cytogenetiske undersøkelser. Derfor er aCGH nyttig i diagnostikken, for eksempel i situasjoner hvor det kliniske bildet av en pasient peker i retning av at pasienten har et syndrom, men hvor man ikke har klart å påvise dette med konvensjonelle cytogenetiske metoder. aCGH er en svært omfattende genom-screeningmetode som er rask, og som er mindre ressurskrevende. For øvrig har metoden også noen ulemper, som jeg vil se nærmere på i kapittel 6.

5.3 Praktisk laboratoriemessig utføring

Praktisk gjøres undersøkelsen ved å blande en DNA-prøve fra en pasient merket med rød fluorescens og en frisk DNA-kontroll merket med grønn fluorescens. Blandingen helles på en glassbrikke, som er selve arrayet eller matrisen, der korte syntetiske DNA-molekyler kalt oligonukleotider er lokalisert tett i tett i bestemte posisjoner. Oligonukleotidene har kjent sekvens. Under hybridiseringen vil DNA-bitene fra kontrollen og pasienten binde seg til oligonukleotider som har komplementær sekvens. Når DNAet er bundet, undersøkes glassbrikken med laserscanner, og signalstyrken på fluorescensen avleses vha. dataverktøy. Resultatet en får vil vise om det foreligger avvik i pasientens DNA i forhold til kontrollens. Gule posisjoner betyr at det er likt forhold mellom DNA i de to prøvene, røde posisjoner betyr at det er for mye pasient-DNA tilstede og at det har skjedd duplikasjoner, og grønne betyr at det foreligger mer kontroll-DNA enn pasient-DNA i prøven og at områder i pasientens DNA er deletert (se bildet på forsiden av oppgaven). Undersøkelsen er i seg selv

enkel å utføre, men det er utfordrende å tolke resultatene av den. Funn gjort ved aCGH verifiseres alltid ved hjelp av en annen metode, som oftest FISH-analyse.

aCGH er en ny teknikk for screening av genomisk ubalanse. Siden den er ny har den gitt muligheten til å oppdage avvik som ikke kunne oppdages tidligere. Dermed fremkommer funn som vi ikke alltid med sikkerhet kan si at har betydning for pasientens tilstand. Det er viktig at klinikere rapporterer funn til databaser slik at informasjon samles på ett sted. Slik kan man gjenkjenne noe som er rapportert tidligere og bli sikrere på at den aktuelle endringen en har funnet er en reell sykdomsfremkallende forandring. Imidlertid oppdages også forandringer som ikke er rapportert tidligere. I slike tilfeller er det viktig å se på hvilke gener som inngår i forandringen, hvilke proteiner de koder for, og proteinets funksjon.

5.4 Databaser ved tolkning av funn

Siden aCGH kan gi et så detaljert bilde av gensammensetningen, betyr det at den også viser varianter av gener som ikke er sett tidligere eller som er svært sjeldne (20). Databaser er her viktige verktøy. Ulike databaser hvor korrelasjoner mellom genotype og fenotype registreres er til stor hjelp i utredningen av pasienter som har submikroskopisk kromosomal ubalanse. Nye funn registreres i databasen, og på denne måten blir flere sammenhenger oppdaget. Eksempler på slike databaser er DECIPHER (DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources) og ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations).

5.4.1 Kopinummervariasjoner og deres betydning ved genetiske avvik

De fleste CNVer er ikke sykdomsfremkallende, og hver av oss har mellom 24 og 824 CNVer i genomet vårt (20). Ved mistanke om kromosomavvik for eksempel ved mental retardasjon kan det likevel være CNVer som er årsaken. Ofte benyttes nedarvingsmønster og genotype/fenotype-korrelasjonen til å avgjøre om en CNV er

benign eller patogen. En CNV som er oppstått *de novo* hos et barn med mental retardasjon som har friske foreldre med normale funn ved aCGH, har større sannsynlighet for å være patogen enn en nedarvet CNV. Det finnes imidlertid unntak, og noen *de novo* forandringer er sannsynligvis benigne, mens noen CNVer nedarvet fra friske foreldre, vil kunne være årsaken til mental retardasjon eller andre utviklingsavvik hos barnet.

For å få et best mulig svar på dette er det viktig å studere funksjonen til proteinene som de involverte genene koder for. Vedlegg 2 illustrerer en delesjon i bånd 15q26.3. I kolonnen til venstre er det ført opp en liste med gener som inngår i delesjonsområdet. I kolonnen til høyre er det ført opp funksjonene til proteinene som de ulike genene koder for. Slike tabeller benyttes når aCGH-funnene skal sammenholdes med pasientens kliniske funn.

Noen gener har den egenskaper at de gir en bestemt fenotype når de er inaktiverte eller når det er for mange av dem. Dersom en CNV er en delesjon og inkluderer et slikt gen, vil individet få en fenotype tilsvarende den som oppstår når genet er avslått. I slike tilfeller er det nærliggende å slå fast at CNVen er av patogen type (21). Likeledes er det sannsynlig at en CNV er patogen hvis den finnes i et område som fra før er forbundet med syndromatologi. Store CNVer (> 1Mb) har større sannsynlighet for å være patogene enn små (< 0,1 Mb), og klinisk erfaring tilsier at delesjoner er mer patogene enn duplikasjoner. Nyere forskning viser at også duplikasjoner kan ha betydning, men at de ofte gir mildere klinikk.

Jo høyere oppløsning, eller dekningsgrad, en benytter, jo flere små CNVer vil oppdages. Siden de fleste CNVer er ufarlige, vil andelen CNVer som er patogene være liten i forhold til andelen som vil være benigne. Dermed vil det ta lengre tid og kreve mer ressurser å avgjøre hvilke avvik som er av betydning. Det vil også være vanskelig å si om kombinasjoner av CNVer til sammen vil gi patogene utslag. Det er et tilbakevendende spørsmål hvilken oppløsning man bør velge for å finne patogene CNVer og samtidig være i stand til å tolke resultatet på en tilfredsstillende måte.

Enkelte CNVer finnes oftere hos individer med utviklingsavvik enn hos normale individer (17). Et eksempel er delesjoner i kromosombånd 15q13.3, hvor enkelte som har det rammes av utviklingsavvik, mens andre er helt friske. Slike CNVer er assosiert med økt risiko for utviklingsavvik, og kalles sårbarhetsvarianter. De utgjør tolkningsmessige og veiledningsmessige utfordringer fordi en ikke kan være sikker på at det er varianten som er årsaken til avviket. Kanskje er det bare en medvirkende årsak sammen med flere andre faktorer.

5.4.2 Klinisk eksempel

Denne pasientkasuistikken illustrerer hvordan klinikk og funn av genetiske avvik ved undersøkelser alltid må ses i sammenheng. Pasienten var en gutt som hadde medfødte misdannelser, forsinket psykomotorisk utvikling, dysmorfe ansiktstrekk, og mild mental retardasjon uten kjent diagnose. Han hadde også en sjelden hjertelidelse, såkalt WPW-syndrom. Klinisk mistenkte man først DiGeorge eller VCF-syndrom, men analyser av guttens arvestoff utelukket disse diagnosene. Utredningen pågikk gjennom flere år, med blant annet ulike FISH- og MLPA-undersøkelser.

Etter at aCGH analyse ble tilgjengelig, ble det påvist 20p.12.3 delesjon hos denne pasienten (22). Den påviste delesjonen innebar at han manglet genet ”bone morphogenic protein 2”, *BMP2* (Vedlegg 3). Når dette genet er borte, får pasientene ofte skoliose og andre muskel- skjelettplager. Seks liknende tilfeller ble funnet rapportert ved databasesøk, og alle hadde samme delesjon. Alle pasientene hadde forandringer i skjelettet, dysmorfe trekk, mild mental retardasjon og fem hadde også WPW-syndrom. Med dette eksempelet ønsker jeg også å vise at noen kliniske funn vekt mer enn andre i diagnostikken. Mental retardasjon og skjelettforandringer er forandringer som er nokså hyppige ved en del syndromer, men med en så sjelden tilstand som WPW i tillegg var sannsynligheten stor for at den array-påviste delesjonen var riktig.

Kapittel 6 Diskusjon

I denne oppgaven har jeg sett på ulike undersøkelsesmetoder i medisinsk genetikk, og særskilt aCGH som en ny og lovende teknikk i prenatal diagnostikk. Da jeg begynte å jobbe med det, så jeg behovet for å gi en større plass til array-diagnostikk i seg selv. Først vil jeg derfor drøfte ulike utfordringer ved metoden. Deretter vil jeg se på anvendelse av aCGH i prenatal diagnostikk. Jeg vil avslutte oppgaven med å drøfte molekylær karyotypering i et fremtidsperspektiv.

I kapittel 5 skrev jeg at aCGH er ideell i tilfeller hvor en ikke kommer i mål med andre metoder. Imidlertid finnes begrensninger også ved denne metoden (17). Mosaikktilstander kan bare avsløres med aCGH dersom avviket foreligger i mer enn 30% av cellene, men de kan i noen situasjoner avsløres med aCGH der andre metoder ville oversett dem (23). Balanserte translokasjoner oppdages heller ikke da det ikke har tilkommet arvestoff eller gått noe tapt. For øvrig kan metoden bringe på det rene om translokasjoner som ser balanserte ut, virkelig er det, eller om det har gått tapt genetisk materiale i bruddspaltene. Det er endringer i mengde som kan oppdages med aCGH. Triploidi vil imidlertid ikke detekteres fordi det ikke finnes et tilsvarende tredje kromosomsett i prøven som det overflødig kromosomsett kan reagere med.

Diagnostisering av genetiske avvik som innbefatter mental retardasjon og medfødte misdannelser er utfordrende fordi det finnes mange ulike årsaker til det. Det har blitt foreslått at aCGH og liknende matriser bør innføres som standard første undersøkelse av kromosomer og DNA, fordi de oppdager dobbelt så mange avvik hos pasienter med mental retardasjon og medfødte misdannelser som tradisjonell karyotypering. Per i dag er det karyotypering som vanligvis gjøres først. Dessuten gjøres ofte aCGH uansett når en ikke finner noe vha. FISH- eller MLPA-analyser. Ressursmessig kan det da lønne seg å i stedet gjøre én analyse som vil avdekke de fleste avvik (24).

Et annet aspekt ved aCGH som bør drøftes, er tidsaspektet. I løpet av få dager kan en gjennomlese hele genomet. Imidlertid er det viktig å presisere at array-funn alltid må

verifiseres, for eksempel med FISH-analyse. Da er man tilbake til utgangspunktet der en analyse vil ta to til tre uker på grunn av celledyrking. Dette er, som jeg har vært inne på tidligere, uheldig for diagnostikken på fosterstadiet, hvor tid er en knapp ressurs i forhold til lovgivning og etikk. Ofte må det dessuten utføres flere undersøkelser med FISH-analyse, for til forskjell fra aCGH kan FISH-analyse bare brukes på noen få områder om gangen da det er begrenset hvor mange fargesignaler man kan skille fra hverandre i fluorescensmikroskopet. Det som i utgangspunktet var ment å være en enkel undersøkelse utført i ett trinn, har da ført til en serie andre undersøkelser som er tid- og ressurskrevende.

Slik jeg nevnte ovenfor, kan aCGH screene hele genomet i én analyse, noe som til sammenlikning vil kreve 244 000 FISH-analyser. Selv om aCGH i seg selv er en dyr undersøkelse, er den i mange sammenhenger mer kostnadseffektiv.

I prenatal diagnostikk er det viktig å vite om en CNV vil gi sykdom eller ikke. I kapittel 5 har jeg tatt opp utfordringene vi møter i tolkningen av aCGH-funn, men utfordringen med aCGH-funn prenatalt er mye større enn det jeg har drøftet hittil, som har dreid seg om funn av medfødte kromosomavvik. I fosterlivet vet vi ikke noe om faktorer som mental utvikling og milde dysmorfe trekk. Vi har likevel situasjoner prenatalt der aCGH kan gi et trygt svar, for eksempel der de samme avvikene påvises hos søsken. Dersom en søster eller bror har en bestemt fenotype, kan en forvente at fosteret vil få den samme fenotypen når de samme avvikene foreligger genotypisk ved undersøkelse.

Kromosomavvik og andre genetiske avvik kan gi karakteristiske funn på ultralyd. Dersom man hos et foster oppdager én eller flere sjeldne malformasjoner som man forbinder med en bestemt tilstand, kan man lete etter andre markører for tilstanden og sammenholde resultatene med genotypen og andre tilfeller som er registrert i databasene. Jo flere sammenhenger man finner, jo sikrere blir man på at dette faktisk dreier seg om en sykdom eller et syndrom.

En utfordring med genetiske undersøkelser, og da særlig genetiske undersøkelser av foster i mors liv, er at det kan oppdages såkalte presymptomatiske diagnoser. En presymptomatisk diagnose er en diagnose som stilles før sykdommen selv bryter ut på bakgrunn av funn av genetiske avvik. Pasienten er altså frisk på diagnosetidspunktet (25). Fordi aCGH kan undersøke hele genomet, er muligheten for å avdekke andre diagnoser enn den man i utgangspunktet så etter absolutt tilstede.

Mange genetiske sykdommer viser stor variasjon i det kliniske bildet, særlig de som gir seg utslag først i voksen alder. Det betyr at man hos et foster kan oppdage DNA-forandringer med uklar klinisk betydning. Dermed kan et ufødt barn få en presymptomatisk diagnose som avdekker at barnet på et senere tidspunkt vil bli sykt, men uvisst i hvilken grad. Dette gjelder sykdommer som for eksempel Charcot Marie Tooth (CMT), hvor pasienten får symptomer i tenårene eller i voksen alder, men ikke syk fra fødselen av. Dette setter foreldre i en vanskelig situasjon, hvor de blir nødt til å forholde seg til mange usikkerhetsmomenter. De blir også nødt til å vurdere om den presymptomatiske diagnosen er så alvorlig at de ikke ønsker å fortsette svangerskapet. Det er også mulighet for at foreldre får informasjon som de senere ser at de egentlig ikke ønsket – for eksempel i tilfeller der den presymptomatiske diagnosen kommer ut med veldig milde symptomer. Da har de kanskje bekymret seg unødvendig i mange år.

Det kan hende at en genetisk undersøkelse avdekker alvorlige mutasjoner som fosteret kan ha arvet fra en av foreldrene, uten at de er klar over at de har den. Dette gjelder for eksempel mutasjoner som er assosiert med brystkreft og kreft i eggstokkene – mutasjoner i *BRCA 1* og *BRCA 2*. Denne typen mutasjoner kan være arvelige. Dersom en slik mutasjon oppdages, vil det være aktuelt å teste foreldre og eventuelle søsken for å se om de har den samme mutasjonen. I slike situasjoner er det ikke bare fosteret som får en mulig presymptomatisk diagnose, men kanskje også foreldre og søsken. I motsetning til eksempelet med CMT, kan det være en fordel å vite om det dersom det foreligger mutasjoner i *BRCA*-genene. Pasienten kan følges opp poliklinisk, og en eventuell kreftutvikling vil oppdages tidlig. Det vil bidra til at en

kan starte behandling på et tidlig stadium, noe som er positivt for prognosen. En annen mulighet er å fjerne bryster og eggstokker for å hindre at det kan oppstå kreftsvulster i dem. Det finnes ikke noen tilsvarende behandling for CMT. Like fullt kan en slik diagnose gi opphav til mange bekymringer for de som rammes av den.

Det finnes måter å løse disse problemene på. En kan lage målrettede aCGH-analyser (designerchips) som "overser" områder hvor analyseresultatene kan bli vanskelige å tolke (20). Det gjøres ganske enkelt ved å konstruere arrayet på den måten. Såkalte "designerchips" med bare utvalgte kjente syndrom-gener utelater andre områder fullstendig slik at man ikke trenger å ta stilling til dem. En annen måte å gjøre det på er å overse problematiske områder i fortolkningen. Problemet med det siste er at familier som er rammet av en sykdom og som senere får vite at tilstanden på et tidlig tidspunkt kunne ha blitt oppdaget, kan føle seg ført bak lyset. Disse problemstillingene reiser juridiske så vel som medisinsk-etiske spørsmål.

Veien videre

Utviklingen av aCGH og liknende matriser er så vidt begynt, og fremtidsvisjonene er store og mange. Single nucleotide polymorphism array (SNP-array) er en matrise som likner aCGH og som kan avdekke CNVer, men som i tillegg kan detektere tap av heterozygositet og uniparental disomi av kromosommateriale (24). Uniparental disomi betyr at begge kromosomene i et par er arvet fra samme forelder. I likhet med aCGH detekterer den ikke balanserte kromosomavvik eller lavgradig mosaicisme. SNP-arrayene har bedre dekning av subtelomeriske områder og høyere oppløsning enn aCGH. Derfor ble det i 2009 bestemt at SNP –array var det som skulle benyttes ved helgenomsanalyser (3). I fremtiden vil det derfor være mulig å oppdage avvik som er enda mindre i størrelse, og som vil gi enda større tolkningsmessige utfordringer enn dem vi har med aCGH per i dag. På sikt vil likevel de tolkningsmessige problemene bli færre, fordi vi vil få en større oversikt over sammenhenger mellom klinikk og funn ved genetiske undersøkelser.

Mange kommende mødre ønsker så langt det lar seg gjøre å forsikre seg om at ingenting er galt med barnet de venter. For disse er genetisk veiledning veldig viktig, slik at de forstår at mental retardasjon og andre medfødte misdannelser i de fleste tilfeller ikke lar seg diagnostisere verken med aCGH eller andre metoder. Et normalt svar ved aCGH-analyse er heller ikke nødvendigvis ensbetydende med at fosteret er friskt. Dilemmaet med aCGH, som ved andre metoder i fosterdiagnostikk, er at når avvik med uklar betydning oppdages, er risikoen for å avslutte et svangerskap der fosteret likevel er friskt, tilstede. Velger man å ikke utføre aCGH, kan man gå glipp av verdifull informasjon om fosterets tilstand. Det er uansett viktig å vite hva man ser etter og hva man ønsker å oppnå med en eventuell analyse. Selv ikke den beste teknikk kan garantere et friskt barn.

Etter å ha arbeidet med temaet jeg tar opp i denne oppgaven, har jeg forstått at det å tilby sikker diagnostikk av foster er en større utfordring enn jeg hadde sett for meg. Jeg tviler ikke på at jeg også i fremtiden kommer til å føle på frustrasjonen over å ikke kunne gi gravide pasienter et trygt svar, slik jeg opplevde i 5.årspraksisen min. Jeg har imidlertid utvidet min faglige horisont mye i skriveprosessen. Fra visjonen om en metode som kan gi oss alle svar, har jeg fått et større og mer realistisk perspektiv på muligheter og begrensninger ved fosterdiagnostikk og genetiske undersøkelser generelt. Jeg har på bakgrunn av kunnskapen jeg har ervervet, blitt i stand til å vurdere prenatal diagnostikk- ikke bare i et pasientperspektiv, men også fra en mer faglig og samfunnsrettet vinkel. Jeg mener at som lege er det viktig å være bevisst på de komplekse sidene av temaet prenatal diagnostikk og aCGH. En slik bevisstgjøring vil hjelpe meg til å møte mine pasienter på en bedre måte, nettopp fordi jeg kan se saken fra flere vinkler, og kan formidle dette til pasienten.

Referanser

1. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson and Thompson. Genetics in Medicine*. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 2004.
2. HUMAN Genome Organisation (HUGO) Available from: <http://www.hugo-international.org>
3. Nystad M. Minikurs i cytogenetikk. Februar og august 2010.
4. The Rare Chromosome Disorder Support Group (UNIQUE). Available from: <http://rarechromo.org/html/home.asp>
5. Ekerhovd E.: Preimplantatorisk genetisk diagnostikk, *Tidsskr Nor Lægeforen* 2007; 127(19):2521-3
6. Richards RI. Dynamic mutations: A decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. *Hum Mol Genet* 2001;10(20):2187-2194.
7. *ICSN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009)*, Shaffer LG, Slovak ML, Campell LJ (eds); Basel: S. Karger; 2009.
8. South ST, Chen Z and Brothman AR. Genomic Medicine in Prenatal Diagnosis. *Clin Obstet Gynecol* 2008;51(1):62-73.
9. Shaffer LG and Bui T-H. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet Part C (Semin Med Genet)* 2007; 145C:87-98.
10. Fetal Medicine. Available from: www.fetalmedicine.com

11. Nicolaidis KH. First-trimester screening for chromosomal abnormalities. *Semin Perinatol* 2005; 29:190-194.
12. Nicolaidis KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obst and Gyn* 2004;191:45-67.
13. Sosial- og helsedirektoratet. *Veiledende retningslinjer for bruk av ultralyd i svangerskapet*, IS-23/2004.
14. Braude P, Pickering S, Flinter F and Ogilvie CM. Preimplantation genetic diagnosis. *Nat Rev Genet.* 2002;3(12):941-53.
15. Lov 12.05.2003 nr. 100 om humanmedisinsk bruk av bioteknologi m.m. (Bioteknologiloven)
16. Lov 13.06.1975 nr. 50 om svangerskapsavbrudd. (Abortloven)
17. Rødningen O, Prescott TE, Hovland R, Eiklid K og Houge G. Påvisning av kromosomavvik ved hjelp av DNA-matriser. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2010;9(130):944-7.
18. Pergament E. Controversies and challenges of array comparative genomic hybridization in prenatal genetic diagnosis. *Genet Med* 2007;9(9):596-9.

19. Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, Ruivenkamp C, Sikkema-Raddatz B, Smeets D and Poot M. Array analysis and karyotyping: Workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet.* 2009;52(4):161-9.
20. Friedman JM. High-resolution array genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2009;29:20-28
21. Lee C, Iafrate AJ and Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet Suppl* 2007;39:S48-54.
22. Lalani SR , Thakuria JV , Cox GF , Wang X , Bi W, Bray MS, Shaw C , Cheung SW , Chinault AC, Boggs BA, Ou Z , Brundage EK, Lupski JR, Gentile J, Waisbren S, Pursley A, Ma L, Khajavi M, Zapata G, Friedman R, Kim JJ, Towbin JA, Stankiewicz P, Schnittger S, Hansmann I, Ai T, Sood S, Wehrens XH, Martin JF, Belmont JW and Potocki L . 20p12.3 microdeletion predisposes to Wolff-Parkinson-White syndrome with variable neurocognitive deficits. *J Med Genet* 2009;46(3):168-75.
23. Shinawi M and Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today* 2008;13(17/18):760-70.
24. Gijsbers ACJ, Lew JYK, Bosch CAJ, Schuurs-Hoeijmakers JHM, van Haeringen A, den Hollander NS, Kant SG, Bijlsma EK, Breuning MH, Egbert Bakker E and Ruivenkamp CAL. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: Test arrays first. *Eur J Hum Genet* 2009;17(11): 1394-1402

25. Darilek S, Ward P, Pursley A, Plunkett K, Furman P, Magoulas P, Patel A, Cheung SW and Eng C. Pre- and postnatal genetic testing by array-comparative genomic hybridization: Genetic counseling perspectives. *Genet Med* 2008;10(1):13-18.

VEDLEGG 1

Fluorescens *in situ* hybridisering (FISH)

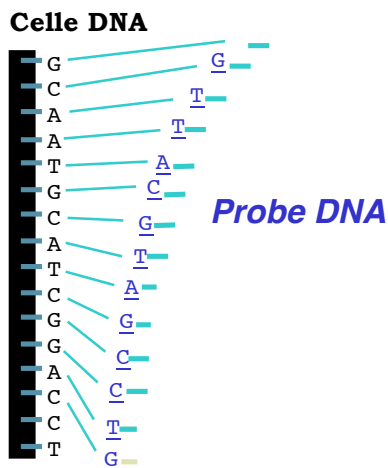
HENSIKT:

Lære prinsippet ved Fluorescens *in situ* hybridisering (FISH) analyse. Få en forståelse av hva hybridisering er og hva prober kan benyttes til. Stille en diagnose ved FISH analyse hos en pasient med mistanke om DiGeorge mikrolelesjonsyndrom.

INTRODUKSJON:

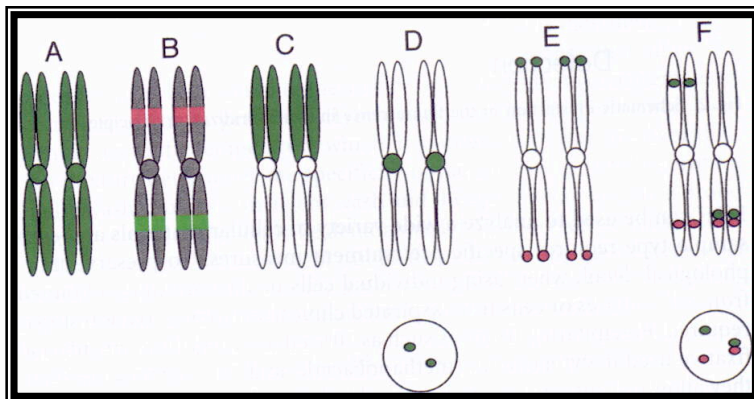
På kromosomlaboratoriet benyttes **Fluorescens *in situ* hybridisering (FISH)** analyse ofte som et supplement til G-bånd analysene/ karyotyperingen. FISH analyser benyttes til visualisering av genetiske forandringer i celler. Det kan være delesjoner, duplikasjoner, translokasjoner og for å kartlegge spesifikke bruddpunkter. Ulike FISH teknikker er tilgjengelig hvor de fleste er basert på tilgang til levende celler.

En benytter **prober** i analysen. Det er fragmenter av nukleinsyren RNA eller DNA, som er merket (med fluorescens) og benyttes som en "målsøkende rakett". En utnytter her prinsippet med komplementær baseparing, hvor proben festes til komplementær sekvens. Om sekvensen ikke finnes på kromosomene (delesjon) vil en ikke få signaler i denne regionen.



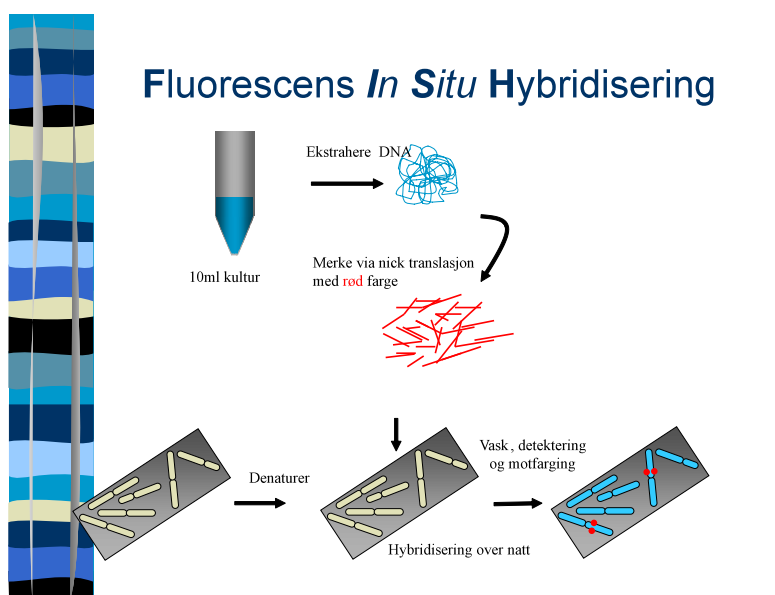
Figur 1: Prinsippet med komplementær baseparing mellom probe og målsekvens på celle DNA.

I mange tilfeller skal et funn bekreftes med FISH-teknikken og en må da velge passende prober i forhold til den problemstillingen som en har på hver pasient. Proben kan f.eks inneholde et bestemt lokus, en hel arm eller hele kromosomet.



Figur 2: Ulike probetyper som dekker hele kromosomet (A) kalles paintprober eller "whole chromosome paint" (WCP) prober. Regionspesifikke/båndspesifikke prober festes til deler av kromosomet (B), mens armspesifikke prober dekker en hel p- eller q-arm (C). Sentromerprober kalles CEP ("centromere probes") (D) (legg merke til figuren under kromosomet som viser at disse probene også kan detekteres i kjerner). Subtelomerspesifikke prober er vist i figur E, mens lokusspesifikke (LSI ("Locus Specific Identifier")) prober er illustrert i figur F, både på metafasekromosomer og på kjerner. Referanse: Rautenstrauss og Liehr (2002).

Teknikken går i hovedsak ut på at en lager eller kjøper en kommersiell probe som er merket med fluorescens. Denne tilsettes til preparatet som kan være av kromosomer og kjerner. I prinsippet kan en benytte hva som helst som inneholder nukleinsyrer til denne teknikken. Proben fester seg til målsekvensen ved **hybridisering in situ** ("på stedet") og kan detekteres i FISH mikroskopet.



Figur 3: Prinsippet ved FISH analysen hvor en merker inn proben med fluorescens, denaturerer kromosomene i preparatet og tilsetter denaturert probe; slik at den kan hybridisere til målsekvensen på kromosomene. Etter hybridiseringen vaskes overflødig

probe bort og kromosomene motfarges med DAPI. Fluorescens signalene fra proben detekteres i Fluorescens mikroskop.

Referanse: Mona Nystad.

MIKRODELESJONER OG MIKRODUPLIKASJONER:

En **mikrodelesjon** er en delesjon som vanligvis er på mindre enn 3 Mb. Denne typen mutasjoner er for små til at de er synlige ved vanlig karyotypering. En må derfor gjøre FISH- eller **MLPA** (Multiplex Ligation Probe dependent Amplification) analyse for å detektere slike forandringer.

Mikrodelesjoner er synlige på preparater av metafasekromosomer og på interfasekjerner. I disse tilfellene vil en da se at det mangler et signal på kromosomet hvor en har delesjonen (se figur side 4).

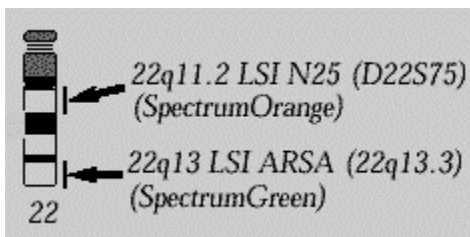
Mikroduplicasjoner hvor en har to kopier av den aktuelle regionen vil ikke kunne være synlige på metafasekromosomer, da oppløsningen ikke er høy nok. En må derfor analysere interfase-kjerner eller benytte MLPA-teknikken til dette.

En vil forvente å finne mikrodelesjoner og mikroduplicasjoner med de ulike probene. Når det gjelder DiGeorge syndrom har en funnet flere pasienter med delesjoner, duplicasjoner og en pasient med triplikasjon i region 22q11.2 (se Ensenauer *et al.*, 2003).

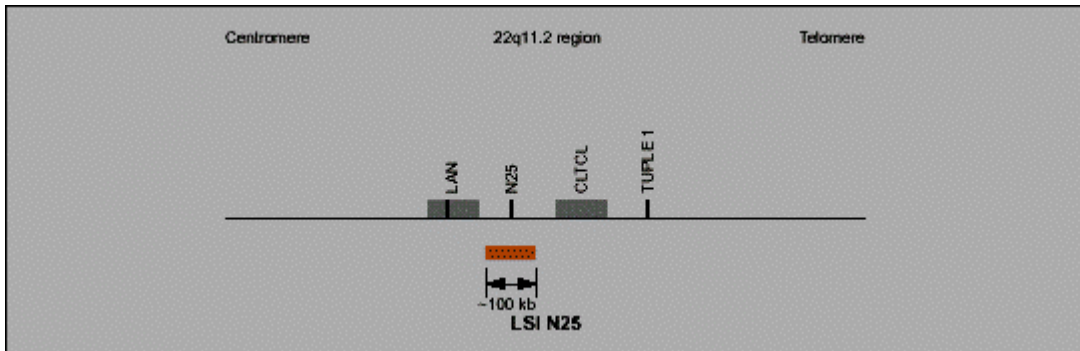
Di George/VCFS syndrom

Di George N25 kromosom region probe er en direktemerket probe for påvisning av D22S75 locus på kromosom 22 (gir rødt signal). Delesjon i dette locus kan bl.a. gi Di George syndrom eller velocardiofacial syndrom (VCFS), som påvises ved manglende signal på det ene kromosom 22. Symptomer ved Di George syndrom kan variere meget individer imellom, men vanligst er hjertefeil og tilbakevendende infeksjoner.

Di George N25 kromosom regionprobe er en probemix med probe til deteksjon av D22S75 locus, samt en grønn LSI ARSA kontrollprobe (22q13.3). D22S75 locus er lokalisert i Di George/VCFS - kritisk region.



Ideogram av kromosom 22 med lokalisering av hvor LSI N25 probe og kontrollprober hybridiserer.



Probekart for lokalisering av *N25*.



LSI DiGeorge *N25* regionprobe hybridisert til metafasekromosomer. Fravær av rødt signal på det ene kromosom 22 (bildet til høyre) indikerer delesjon i *N25* locus i bånd 22q11.2.

I) FORBEHANDLING AV PREPARATER
II) FORBEHANDLING AV PROBEN
III) DENATURERING OG HYBRIDISERING
IV) VASKEPROSEDYRE
V) MOTFARGING

REAGENSER:

Medier	Plassering/Temperatur
LSI Di George N25 (D22S75) region probe med kontroll probe (22q13)	- 20°C
LSI/WCP hybridiseringsbuffer	- 20°C
Milliquevann	Romtemperatur
2 X SSC	Romtemperatur
70%, 80% og absolutt alkohol	Romtemperatur
2xSSC/0,1%NP-40 vaskeløsning	Romtemperatur
0,4xSSC/0,3% NP-40 vaskeløsning	Romtemperatur
DAPI II Counterstain	- 20°C
Sykkellim (brukes som monteringsmedium)	Romtemperatur

MATERIALE:

- Objektglass: Glass- eller plast
- Dekkglass: 18x18 mm, 22x22 mm, 24x50mm, 24x60mm, 18x50 mm (kun for plastslides).
- Pipetter: Volum: 1 µl – 30 µl
- Pipettespisser
- 1 ml sprøyte
- Pinsett
- Coplin kar (evt. Hellendahl-kar dersom en har mange slides)
- PH-papir
- HYBrite
- Fluorescensmikroskop
- Erlenmeyerkolbe 1000 ml
- Flasker a 1000 ml
- Nitrilhansker

METODER:

I) FORBEHANDLING AV PREPARATER

Forbehandling og dehydrering modner preparatene og gjør dem mindre sensitiv for "overdenaturering".

1. La preparatet ligge i 1 time ved 55-60°C i varmeskap.
2. Forvarm 2xSSC (pH=7), i et Coplin-kar til 37°C. Bruk vannbad. Sett så preparatet i karet i 30 minutter.
3. Dehydrer preparatene i 70%, 80% og deretter i absolutt alkohol. 2 minutter i hver på risting.

II) FORBEHANDLING AV PROBEN

1. Tin probe og LSI/WCP hybridiseringsbuffer i 3-5 minutter ved romtemperatur.
2. Sentrifuger ned innholdet i begge flaskene og bland:
2 µl sterilt vann
7 µl hybridiseringsbuffer og
1 µl probe
i ett mikrosentrifugerør.
3. Sentrifuger røret i 2-3 sekunder, mix og sentrifuger igjen.

III) DENATURERING OG HYBRIDISERING

1. Pipetter probeløsning på objektglasset/preparatet og legg passende dekkglass på preparatet.
2. Forsegle med monteringslim langs kantene på dekkglasset.
3. Slå på HYBrite, velg program som passer med følgende:
Denaturering: 76°C i 5 min.
Hybridisering: 37°C i 20 timer

Mikrodelesjonsprober skal hybridiseres til **dagen etter**. Sett straks på vannbad morgenen etter, i henhold til **IV Vaskeprosedyre**, punkt **1**.

IV) VASKEPROSEDYRE (PUNKT 1. ER GJORT AV MONA)

NB! Vask ett og ett preparat, slik at du har best mulig kontroll på temperaturen ettersom den kan falle ett par grader dersom flere preparater settes i vaskeløsningen.

1. Hell 0.4 x SSC/0.3 % NP-40 i ett Joplinkar, og forvarm i varmebad til 76 +/- 1°C. Det tar ca. 1 time
2. Hell 2 x SSC/0.1% NP-40 i ett Joplinkar. Brukes ved romtemperatur.
3. Fjern dekkglasset fra preparatet som skal vaskes med pinsett, og sett det straks oppi karet med den forvarmede 0.4 x SSC/0.3 % NP-40 – løsningen. Ryst preparatet i 1-3 sek. Ta ut preparatet etter **2** minutter.
4. Dypp preparatet i 2 x SSC/0.1% NP-40 – løsningen. Ryst i 1-3 sek. Ta ut preparatet etter **1** minutt.
5. Lufttørk preparatene i mørke.

V) MOTFARGING

1. Tilsett 10 µl counterstain (motfarge) til målområdet, og legg på 22x22 mm dekkglass. Vi bruker som regel DAPI II som motfarging.
2. Forsegle dekkglasset med en TYNN stripe sykkellim. Inkuberes i 15-30 min i romtemperatur eller i kjøleskap før en analyserer preparatet.

Oppbevaring av preparater

Preparatene oppbevares i mørke beholdere i kjøleskap i ca 14 dager etter utsvaring.

Analysering

For å analysere preparatene brukes fluorescensmikroskop med passende filterkombinasjon.

Alle mikrodelesjonsprobene er merket inn med grønn og rød fluorescens. Bruk derfor filteroppsett med DAPI, FITC og TRITC. Vi analyserer minimum 10 metafaser. Sjekk også noen interfaser for å se at det er samsvar med antall signal.

Følg egen prosedyre for **FISH-analysering på Cyto Vision.**

LAGING AV LØSNINGER:

Reagens	Leverandør	Bestillingsnummer	Plassering/Temperatur
100% Ethanol	Sentrallager, UiTø		
Milliquevann			
20 X SSC	Lages på mediekjøkkenet		RT
NP-40		Vysis/32-804818	- 20°C; Fryser på
HCl (for evt. regulering av pH)			RT
NaOH (for evt. regulering av pH)			RT

20xSSC

Vi kjøper ferdig 20xSSC på mediekjøkkenet.
Oppbevares ved romtemperatur. Holdbarhet: 1 år, evt. til det sees utfelling i flasken.

2xSSC

100 ml 20xSSC tilsettes milliquevann ad 1000 ml. PH = 7.
Justør med HCl eller NaOH etter behov.
Oppbevares ved romtemperatur. Holdbarhet: 3 mnd.

70% alkohol

700 ml absolutt alkohol tilsettes milliquevann til 1000 ml.

80% alkohol

800 ml absolutt alkohol tilsettes milliquevann til 1000 ml.

2xSSC/0,1%NP-40 vaskeløsning

100 ml 20xSSC (pH 5.3) og 850 ml milliquevann blandes.
Tilsett 1 ml NP-40. Bland løsningen godt med magnetrører.
Tilsett milliquevann til sluttvolum på 1000 ml.
Justør pH til 7.0 med NaOH eller HCl. Lagres ved romtemperatur i opptil 6 måneder, kastes tidligere hvis det blir utfelling i flasken.

0,4xSSC/0,3% NP-40 vaskeløsning

20 ml 20xSSC (pH 5.3) og 950 ml milliquevann blandes. Tilsett 3 ml NP-40. Bland løsningen godt med magnetrører inntil NP-40 er helt løst opp. Tilsett milliquevann til sluttvolumet på 1000 ml.
Justør pH til 7-7.5 med NaOH eller HCl. Lagres ved romtemperatur i opptil 6 måneder, kastes tidligere hvis det blir utfelling i flasken.

REFERANSER:

Barch, Knutsen and Spurbeck (Eds)(1997): *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Lippincott Raven, New York.

Dracopoli *et al.* (2003): *Current Protocols in Human Genetics*. John Wiley and sons, Inc., New York, USA.

Ensenauer *et al.* (2003): *Am J Hum Genet* **73**: 1027-1040

Rautenstrauss and Liehr (Eds.)(2002) *FISH Techonology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

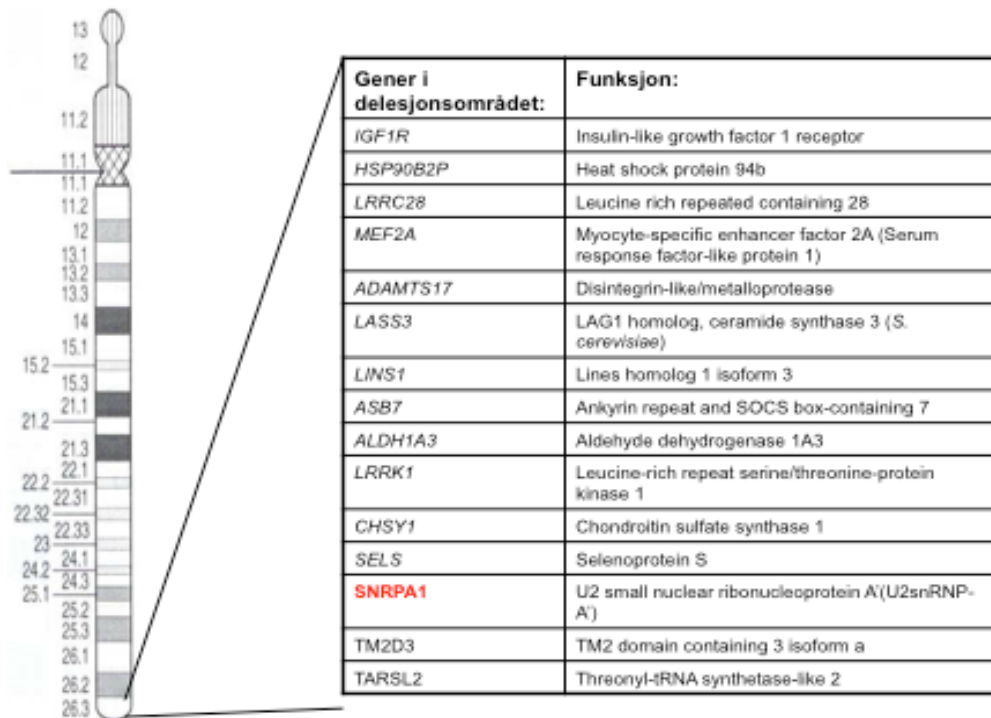
Rooney (ed) (2001): *Human Cytogenetics: constitutional analysis. A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, England.

Yobb *et al.* (2005) *Am J Hum Genet* **76**: 865-876

Leverandører/referanser til bilder og ideogrammer under mikrodelesjonskapitlet:

- Vysis: <http://www.vysis.com>

Vedlegg 2



Kromosom 15

Vedlegg 3

20p12.3 – 970 kb delesjon

