SNP-array analyse som nytt verktøy ved syndromutredning

Andrea Milde Øhrn, kull-08

Tromsø, Mai 2013

Veiledere: Valeria Marton, overlege, dr.med., Medisinsk genetisk avdeling, UNN, førsteamanuensis IKM og

Mona Nystad, forsker, cand.scient., Medisinsk genetisk avdeling, UNN.

Det Medisinske Fakultetet

Universitetet i Tromsø

Tekst til bilder på forsiden:

Bildet til venstre viser bioingeniør som påfører genetisk materiale fra pasientprøve på SNP-array brikke/mikromatrisebrikke. Takk til fotograf Marius Fiskum for tillatelse til bruk av bildet. Bildet til høyre er et illustrasjonsfoto hentet fra www.colourbox.com

Forord

Min interesse for genetikk startet da jeg for 8 år siden studerte biologi ved Université Montpellier i Syd-Frankrike. Min veileder der jobbet med genetikk og jeg fikk anledning til å sette meg inn i basale grunnprinsipper ved ulike typer arvegang. Da vi siden hadde undervisning i genetikk ved medisinstudiet Tromsø var nysgjerrigheten min allerede vekket. Min daværende kollokvieleder, cand.scient. Mona Nystad, inviterte til videre utforskning ved avdelingen og ble sammen med dr. Valeria Marton, mine veiledere under 2.-og 5.års oppgaven.

Jeg har helt siden oppholdet under mitt andre studieår, hatt et ønske om å skrive min 5.års oppgave ved Medisinsk genetisk avdeling. Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere for å ha ryddet plass i sine allerede overfylte kalendere for å veilede meg under arbeidet med denne oppgaven. De har inngående kunnskaper på hvert sitt felt innen medisinsk genetikk, Mona Nystad som forsker og Valeria Marton som kliniker, og denne kombinasjonen av kunnskap er gull verdt. Da de i tillegg har lang erfaring som undervisere, har de loset meg gjennom arbeidet på en faglig spennende og pedagogisk god måte.

Jeg vil også gjerne takke alle som jobber ved avdelingen i Tromsø for å ha tatt i mot meg på en åpen og hjelpsom måte – jeg har hele tiden følt meg velkommen, og dere har alle bidratt til at jeg ønsker meg tilbake ved en senere anledning!

Tromsø, mai 2013.

Andrea Milde Øhrn

Resymé

Analysemetoder som kan lese av vårt genom for uregelmessigheter har det siste tiåret utviklet seg i et forrykende tempo. Det er en gjensidig påvirkning mellom laboratorietekniske framskritt, datakraft og biologisk innsikt, og dette driver utviklingen framover. Det gjøres nye funn i genomet som øker behovet for datakraft for å prosessere funnene, samtidig som dette igjen øker behovet for kunnskap om hvilken betydning disse funnene har. Det oppdages hele tiden nye mutasjoner på ulike steder i vårt DNA, og utfordringen er å tolke betydningen av disse i den enkelte pasient. Mikromatrisebaserte analysemetoder, DNA- array analyser, som er utviklet, er et høyoppløsnings analyseverktøy som bidrar med helt andre muligheter og utfordringer enn konvensjonell G-bånds karyotypering eller FISH- analyse. SNP array-analyse, er i dag et svært viktig ledd i den diagnostiske prosessen av barn og familier med syndromer. Nye kopitallsvarianter, homozygositetsområder og SNP'er oppdages daglig på laboratorier som analyserer pasientprøver, og per i dag er den største utfordringen å forvalte den informasjonen som laboratorieanalysene genererer. Jeg har valgt å drøfte den nye teknologien i et klinisk perspektiv da klinikken og laboratoriet er gjensidig avhengige av hverandre. Klinisk genetikk komplementerer de nye molekylærgenetiske analysemetoder der disse genererer svar av usikker betydning.

Denne oppgaven er i all hovedsak en litteraturstudie. Jeg har i tillegg tilbrakt mye tid ved Medisinsk genetisk avdeling, UNN, der jeg har deltatt på tverrfaglige møter med Barneavdelinga, minikurs laget av forsker Mona Nystad, dysmorfologimøter og opplæring holdt av produsent for ny analysemaskin som ankom Tromsø i 2012. Jeg har også vært så heldig å få delta aktivt i overlege Valeria Marton sin klinikkdag i Bodø. Jeg skrev min 2.års oppgave om syndromutredning på laboratoriet og i klinikken, og har de siste årene tilbragt mye tid på avdelingen. Det gjør at jeg mener at dette er en litteraturstudie med en fot plantet i erfaring.

1 Innledning 1
1.1 Syndromutredning – et samarbeid mellom kliniker og forsker. 2

2 Metode 4
2.1 Litteraturstudie 4
2.2 Miniseminar 4
2.3 Avdelingsarbeid 4
2.3.1 Dysmorfologimøter 5
2.3.2 Samarbeidsmøte 5
2.3.3 Klinikkdag 5

3 Teori 6
3.1 Mutasjoner 6
3.2 Kopitallsvariasjon 8
3.3 Homozygositetsområder 9
3.4 Uniparental disomi 10
3.5 Mosaicisme 10
3.6 Den genetiske analyse – utvikling 10

4 Helgenomanalyser 12
4.1 Array CGH 12
4.2 Heleksomsekvensering 13
4.3 SNP- array analyse 14

5 SNP – array, anvendelse og utfordringer 17
5.1 Vurdering av nye kromosomavvik 18
5.1.1 Hvordan skille patogene og benigne funn? 19
5.1.2 Syndromdatabaser 22
5.2 SNP- array, betraktninger i et større perspektiv 22

1 Innledning

Genetikk er et fagfelt der det de siste årene har vært enorme framskritt. Det er en gryende bevissthet blant helsepersonell angående genetisk bakgrunn for mange typer tilstander samtidig med at teknologien har muliggjort diagnostisering av flere og flere pasienter. Denne oppgaven handler om molekylærgenetiske analysemetoder knyttet til sjeldne genetiske tilstander og hvilke muligheter og utfordringer disse fører med seg.

Forskning på våre gener har gått fra å ha hovedfokus på struktur og oppbygging av genomet til å dreie mer i retning av genetisk bakgrunn for sykdom og anvendelse av kunnskap til nytte for pasienten. At det nå er mulig for stadig flere pasienter å få en diagnose ved hjelp av de nye analysemetodene bidrar med tilrettelegging på skole, viktig forebygging og behandling av symptomer og rettigheter til økonomisk støtte. Pasienten vil så tidlig som mulig bli henvist til andre spesialister dersom dette er nødvendig, og det vil i større grad bli mulig å besvare spørsmål om arvegang, prognoser for det aktuelle barnet og risiko ved senere svangerskap. Det blir også lettere for familien å kommunisere sine behov til barnehage, skole og helsevesen. Flere og flere helsesøstre, fastleger, sykehusleger og psykiatere, har tilegnet seg kunnskap rundt arvelige sykdommer med subtile trekk. Særlig gjelder dette barn med atferdsvansker som i tillegg har dysmorfe trekk, og disse barna henvises i dag i større grad til Medisinsk genetisk avdeling for utredning.

I denne oppgaven vil jeg drøfte utvikling av den genetiske analyse, utfordringer underveis og helt fram til i dag. Jeg ønsker å belyse den nyeste analysemetoden, SNP- array, hvordan den har påvirket diagnostisk tankegang i klinikken og hvilken betydning det har for affiserte familier. Dette bygger også opp under noen aspekter ved etiske utfordringer og framtidsutsikter som drøftes til slutt.

1.1 Syndromutredning – et samarbeid mellom kliniker og forsker.

Et syndrom er en sammenstilling av ulike symptomer, kliniske trekk og eventuelle misdannelser med kjent felles etiologi på DNA nivå. Syndromutredning utgjør en stor del av faget medisinsk genetikk, og gangen i en slik utredning viser nødvendigheten av tett samarbeid mellom kliniker og forsker.

Medisinsk genetikk er både et klinisk fag og et laboratoriefag. Dette kommer spesielt godt til syne i arbeidet med å diagnostisere sjeldne genetiske tilstander, for da må kliniker og forsker samarbeide på flere punkter underveis i prosessen. En syndromutredning begynner med at genetiker tar opp anamnese. Det er viktig å danne seg et helhetsinntrykk av pasientens plager, og et kronologisk anamneseopptak helt fra graviditet og fødsel er viktig. Det er fokus på utviklingsmilepæler, sosial funksjon og atferdsvansker, samt lignende historier i familien for å kartlegge eventuelle arvemønster. Klinisk undersøkelse i forhold til syndromutredning er en nøye undersøkelse av hele kroppen. Genetiker vil undersøke pasienten systematisk fra topp til tå og notere seg alt fra proposjoner, dysmorfe ansiktstrekk, muskeltonus og hårkvalitet, og nøkkelen til en diagnose kan ligge i en liten detalj. Pasienten fotograferes, og bildene er viktige verktøy ved søk i ulike databaser, i videre diskusjon med kollegaer og på dysmorfologimøter .

I samarbeid med forsker vil deretter type analyse velges. I syndromutredning uten mistanke om et spesifikt syndrom, men med mistanke om en syndromdiagnose, vil det være aktuelt å starte med SNP-array analyse. En pasient eller familie som skal testes må få grundig genetisk veiledning. Det er viktig med informasjon om hvilke avvik som kan eller ikke kan avdekkes, mulige svar på en analyse og videre om det kan bli aktuelt med flere prøver av pasient eller slektinger. Da en analyse ikke kan avdekke alt, er det viktig at pasient er inneforstått med at en normal test ikke utelukker genetisk sykdom, men det viktigste er kanskje å formidle risiko for resultater av usikker klinisk betydning.

Pasientprøve, som regel en blodprøve, analyseres av bioingeniør på valgt plattform, og resultatene vil i første omgang vurderes av forsker. Dersom det finnes avvik, vil kliniker og forsker diskutere om det er en mulig korrelasjon mellom klinikk og genetisk avvik. Her er det viktig med omfattende erfaring innen databasesøk med mindre det er et allerede velkjent avvik som påvises. Dersom det er påvist et funn av usikker klinisk betydning hos pasienten, er det desto viktigere med diskusjon, gjerne i tverrfaglige forum som dysmorfologimøter. Veiledning av familier der det er usikkerhet rundt et funn er spesielt utfordrende, men de ansvarlige i den aktuelle syndromutredningen må gjøre seg opp en mening om resultatet og formidle dette på en forståelig måte til pasient og familie. En syndromutredning kan være svært tidkrevende, kostbar og utfordrende for kliniker såvel som den rammede familien, og kan gjerne ende opp uten en diagnose. Der analysene ikke avdekker genetisk årsak til en pasients symptomer, er man prisgitt klinikken og må granske pasient og historie i nøyere detalj for å forhåpentligvis finne trekk som kan fungere som bedre søkeord i databaser. Dersom det da framkommer et syndrom som passer med pasientens kliniske bilde, kan det søkes spesifikt etter det aktuelle avviket i pasientens DNA. En nøye beskrivelse av fenotype kan også lede laboratoriet inn på analyser av spesifikke loci (områder på DNA tråden) de på grunn av beskrivelsen får mistanke om. Slik kan en utredning bevege seg fra klinikk til laboratoriet og tilbake til klinikken igjen.

2 Metode

Medisinsk genetikk er både et klinisk fag og et laboratoriefag. Det gjøres framskritt hele tiden, og utviklingen går så fort at lærebøker i klassisk forstand raskt blir utdatert.

Hovedvekten av arbeidet med denne oppgaven er lagt i litteraturstudier, og det mest oppdaterte til en hver tid er publiserte fagartikler. Det kliniske jeg har deltatt i, har gitt meg muligheten til å diskutere faget med eksperter på området og dette har fungert som et supplement til oppdatert litteratur.

2.1 Litteraturstudie

Jeg har siden høsten 2011 lært meg å søke i databaser som PubMed for å få tilgang til relevante artikler. Jeg har brukt mye tid på å søke etter og lese artikler i tilknytning til molekylærgenetiske undersøkelser og sjeldne genetiske tilstander. Utfordringen har vært å finne artikler som godt dekker min problemstilling da temaet er nytt og utfordringene er mange. Jeg har lest meg gjennom bakgrunnsstoff, oversiktsartikler, publisering av nye funn og presentasjoner av pasientkasus, men bare et mindretall er representert i litteraturlisten.

2.2 Miniseminar

Min veileder holdt et miniseminar om SNP- array analyse der hun gjennomgikk hele analysemetoden i detalj. Dette var nødvendig da denne metoden er så ny at det ikke finnes lærebøker i emnet og det finnes få, gode oversiktsartikler. Jeg deltok rett i etterkant også på opplæringsmøte i regi av produsenten for den nye SNP-array maskinen som nå er i drift ved Medisinsk genetisk avdeling, UNN.

2.3 Avdelingsarbeid

Jeg har som supplement til litteraturstudiet og miniseminaret deltatt i flere av avdelingens arenaer i arbeidet med å diagnostisere sjeldne genetiske tilstander, og disse presenteres her.

2.3.1 Dysmorfologimøter

Ved Medisinsk genetisk avdeling arrangeres regelmessige syndromologimøter der forskere og klinikere deltar. Pasienter som er utfordrende å diagnostisere, presenteres med bilde, anamnese, kliniske funn og foreløpige analysesvar. Kliniker beskriver sitt møte med pasient og familie, og bildene vurderes. Det letes etter dysmorfe trekk som kan brukes i databasesøk etter mulige differensialdiagnoser. Forskerne beskriver funn ved analyser og presenterer eventuelt litteratur som kan belyse foreløpige teorier. Klinikere og forskere diskuterer og lager sammen en plan for veien videre. Jeg har deltatt i 3 slike møter som har gitt meg et godt innblikk i hvordan avdelingen jobber med pasienter og familier med sjeldne genetiske tilstander.

2.3.2 Samarbeidsmøte

Jeg deltok på et samarbeidsmøte der leger fra Barneavdelingen, Ungdomspsykiatrisk sengepost (UPS) og Medisinsk genetisk avdeling, samt forskere derfra, deltok. Slike møter er kommet i stand som et forum der leger fra Barneavdelingen og UPS kan legge fram pasienter der de mistenker at symptomer eller adferdsvansker har sitt opphav i et genetisk avvik. Slike møter bidrar også til å øke bevisstheten rundt genetiske tilstander blant andre spesialiteter som sannsynligvis vil møte disse pasientene i sitt daglige virke. For meg var det lærerikt å få innblikk i hvilke vurderinger som blir gjort i forløpet av en eventuell henvisning til Medisinsk genetisk avdeling.

2.3.3 Klinikkdag

Jeg dro til Bodø med min veileder for å delta i oppfølgingen av noen av hennes pasienter som bor i Nordland. Jeg deltok i poliklinisk arbeid med anamnese og klinisk undersøkelse. Vi diskuterte i forkant tidligere kliniske funn og laboratorieanalyser som var gjort på den enkelte og avklarte hvilke forhold som skulle fokuseres på under undersøkelsen den dagen. Det gjorde sterkt inntrykk på meg å møte disse pasientene og foreldrene, og de gjorde det helt klart at behovet for en diagnose er svært viktig.

3 Teori

De nye molekylærgenetiske analysemetodene kan påvise ulike avvik i vårt DNA. Det kan dreie seg om enkle endringer i nukleotidsekvensen, klassiske mutasjoner, eller mindre kjente avvik. I denne oppgaven har jeg valgt å fokusere på 5 typer avvik som kan identifiseres med DNA – array analyse. Begrepene er interessante da de er kilde til ny innsikt og nye utfordringer, og det gjøres stadig funn som gjør at begrepene må omdefineres. Jeg har også inkludert en oversikt over utviklingen av den genetiske analyse.

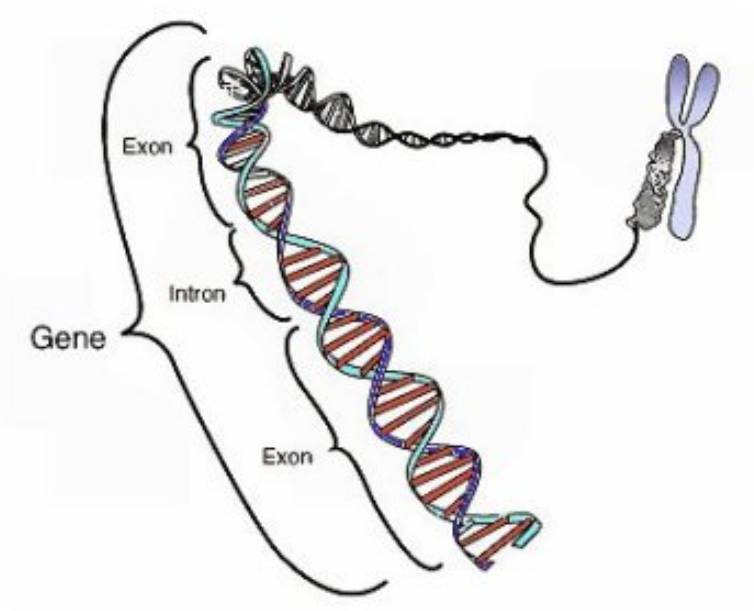
Jeg vil først gi en generell beskrivelse av mutasjoner og deretter en kort presentasjon av begrepene kopitallsvariasjon, homozygositetsområder, uniparental disomi og mosaicisme. Forklaring av begrepet ”Single Nucleotide Polymorphism” (SNPs) kommer under beskrivelsen av SNP- array analyse.

3.1 Mutasjoner

En mutasjon er enhver endring i rekkefølgen av nukleotidsekvensen i arvestoffet. For å forstå bakgrunnen for at slike endringer kan oppstå, vil jeg først gi en kort beskrivelse av hvordan arvestoffet er organisert.

”Deoxyribonucleic acid” (DNA) er bærer av vår genetiske informasjon. Et gen er et segment av det kromosomale DNA som inneholder den nødvendige informasjonen til å danne et funksjonelt produkt. Genene er spredt utover alle kromosomene med varierende tetthet. Et gen er delt opp i en serie av proteinkodende sekvenser, exoner, som er adskilt av såkalte ikke-kodende sekvenser, introner[1] (Figur 1). I hver cellekjerne i alle somatiske celler i kroppen er hele genomet (den komplette genetiske informasjonen) lagret på 46 kromosomer i 23 par. Hvert par av kromosomene – homologe kromosomer – har tilsvarende sett av gener i samme rekkefølge; den ene homologen bærer den genetiske informasjonen fra far, mens den andre fra mor. Slik kan ethvert locus ha identiske eller litt forskjellige utgaver av det samme genet (alleler). Hvert

kromosom bærer sitt distinkte sett av gener som er arrangert lineært langs DNA molekylet.



Figur 1. *Her illustreres et gen, med exoner og introner, og relasjonen til DNAets oppbygging som en dobbelhelix samt relasjonen til kromosomet (Nat Hum Genome Research Institute; Wikimedia Commons).*

Mutasjoner deles på *kromosomnivå* inn i numeriske avvik og strukturelle avvik[2]. Numeriske avvik, såkalt aneuploidi, er overtallige eller undertallige kromosomer, slik som trisomi 13, 18 eller 21. Strukturelle avvik kan være:

- Delesjon – tap av kromosommateriale.
- Duplikasjon - fordobling av et kromosomsegment.
- Translokasjon – utveksling av kromosomale segmenter mellom to ikke-homologe kromosomer. Den kan være balansert, altså uten tap av genetisk materiale eller ubalansert, med tap eller tillegg av genetisk materiale.

På *DNA nivå* deles mutasjonene inn i:

- Substitusjon – endring av et basepar til et annet
- Delesjon – tap av et eller flere basepar

- Insersjon – tilførsel av et ekstra basepar, for eksempel på grunn av en duplikasjon.

Forskjeller i det genetiske materialet mellom ulike individer betegnes som genetisk variasjon. Variasjonen kan foreligge som de beskrevne mutasjoner ovenfor, eller det kan foreligge isodisomi, større homozygositetsområder, repeterte sekvenser eller annen mer kompleks variasjon. En mutasjon eller uregelmessighet i genomet vil noen ganger lede til sykdom, mens det andre ganger kan være tale om normalvariasjon.

3.2 Kopitallsvariasjon

Mennesker er diploide organismer som har to kopier av hvert autosom; et fra far og et fra mor. Det var tidligere antatt at det dermed også var to kopier av hver autosomale *region* på kromosomene. I løpet "the Human Genome Project" ble det beskrevet regioner med en variasjon i antall kopier, altså mer eller mindre enn de forventede to[3]. "Copy Number Variations" (CNV), såkalte kopitallsvariasjoner, defineres som endringer i genomet av størrelsesorden mer enn 1000 basepar/en kilobase, som resulterer i et unormalt antall kopier av et eller flere områder av DNAet. Dette skyldes duplikasjoner eller delesjoner og kan være nedarvet eller nyoppstått i individet. Strukturelle avvik ned i 5 megabaser kan identifiseres i mikroskopet, så dette dreier seg om *sub*mikroskopiske avvik.

En CNV kan være benign eller patogen og CNV-begrepet brukes til å beskrive kopitallsvariasjoner hos fenotypisk normale så vel som syke individer. Begrepet beskriver selve funnet, for mange eller for få kopier av en region, ikke den kliniske betydningen av avviket. Avvik i antall kopier av en region vil kunne endre mengden og/eller funksjonaliteten til et genprodukt, med varierende betydning for affiserte individer. En kopitallsvariant kan for eksempel inneholde hele gener eller påvirke nærliggende gener på grunn av sin posisjon i kromosomet[4]. Patogene CNV er assosiert med sjeldne syndromer og medfødte misdannelser, men også autisme og schizofreni[5]. Det forskes på betydningen av CNV med tanke på risiko

for noen typer kreft, for eksempel bryst- og prostatakreft. Denne oppgaven fokuserer på CNV som er assosiert med sjeldne genetiske tilstander. På grunn av begrenset kunnskap kan det som i dag blir beskrevet som en normal variant, senere vise seg å spille en rolle i sykdom, for eksempel i forhold til sårbarhet for en sykdom eller sen penetrans av en sykdom[3].

3.3 Homozygositetsområder

Homozygositet defineres som to identiske alleler i et bestemt locus på begge kromosomene i et kromosompar. Den hyppigste grunnen til homozygositetsområder er nært slektskap mellom foreldre, fordi da vil barnet motta områder med identiske DNA-sekvenser fra sine foreldre. Cytogenetiske abnormaliteter som uniparental isodisomi kan også være en årsak. Risikoen for autosomale recessive sykdommer vil øke markant, da begge alleler av et gen kan være affisert og dermed skape sykdom[6]. Det er per i dag ingen konsensus om hvordan homozygositetsområder skal klassifiseres. Homozygositetsområder kan ikke defineres som en mutasjon for det er ingen endring selve sekvensen av nukleotider og forskningen på feltet er så langt sparsom. Imidlertid gjøres det i disse tider studier på homozygositetsområder hos friske individer såvel som kasus-kontroll studier. Dette for å finne årsaken til komplekse sykdommer eller arvelige trekk og det jobbes med å kartlegge disse områdene i genomet. Dersom slike områder identifiseres i en pasientprøve vil det letes i det aktuelle området etter kjente gener, og da med tanke på eventuelle sykdomsfremkallende gener. Et lite affisert område vil kunne nærmere defineres med DNA sekvensering, mens et større område vil kreve såkalt eksomsekvensering. Generelt vil et homozygositetsområde vurderes som mulig patogent dersom det overstiger 5 megabaser (Mb), men *"cut-off"* verdien varierer fra laboratorium til laboratorium og vil endres etterhvert som flere studier foreligger. Metoden kan også brukes til avdekke homozygositet for et enkelt gen dersom det foreligger mistanke om monogen recessiv sykdom.

3.4 Uniparental disomi

Dersom et barn arver to kopier av et kromosompar fra en forelder og ingen fra den andre forelderen kalles det uniparental disomi (UPD)[5]. Når barnet arver to homologe kromosomer (dvs slik de ser ut hos den aktuelle forelder, som igjen har arvet et fra far og et fra mor) kalles det heterodisomi. Når barnet mottar to identiske kopier av en enkelt homolog fra sin forelder kalles det isodisomi. Ved UPD vil det aktuelle kromosomparet uttrykke gener fra enten kun mor eller kun far. Dette kan skape sykdom da en normal utvikling som regel krever tilstedeværelse av gener fra begge foreldrene.

3.5 Mosaicisme

Mosaicisme er kromosomavvik som foreligger i et visst antall av kroppens celler, mens de andre cellene har normale kromosomer. Dette skyldes en feilfordeling av kromosomer tidlig i fosterutviklingen og kan affisere alle typer celler i kroppen som blod- hud eller egg/sædceller. Det kan foreligge som aneuploidi, delesjon, duplikasjon eller andre former for strukturelle avvik[5]. Mosaicisme vil kunne påvises med G-bånds analyse, men sensitiviteten er proporsjonal med prosentandelen mosaiske celler. Lavgradig mosaicisme kan være utfordrende å diagnostisere da mange celler må telles, og det gjøres ikke rutinemessig. Ved G-bånds analyse vil cellene først dyrkes og muterte celler deler seg ikke like bra som normale celler, slik at andelen celler med kromosomale avvik vil bli mindre[7]. Til DNA - arrays vil det ekstrahereres DNA fra mange udyrkede celler til analyse og dette muliggjør diagnostikk av mosaicisme dersom det foreligger i mer enn 10% av kroppens celler[8].

3.6 Den genetiske analyse – utvikling

I nesten 50 år har kromosomale abnormaliteter blitt påvist ved klassisk cytogenetisk analyse: lysmikroskopisk undersøkelse av celler i delingsfasen. Til å begynne med ble alle kromosomene farget homogent slik at antall kromosomer kunne telles. Dette førte til oppdagelsen av det kromosomale grunnlaget for syndromer som Down syndrom, Turner syndrom, Klinefelter syndrom og andre

aneuploidier[9]. Deretter ble teknikken med trypsinbehandling og Giemsafarging (G-bånds analyse) utviklet, og med denne metoden farges kromosomene slik at et båndmønster framstår[7]. Det lages et karyogram der kromosomparene sorteres ut fra størrelse og båndmønster og bildet analyseres visuelt i mikroskopet. I tillegg til å oppdage aneuploidier kan strukturelle avvik som delesjoner, duplikasjoner eller translokasjoner ned til 5 Mb avdekkes. Denne analysen er tidkrevende og krever dyrkning av celler. Den kan påvise aneuploidier og store strukturelle avvik, men den har for lav oppløsning til å påvise mindre kromosomavvik.

I løpet av de siste 10-15 årene er det utviklet metoder for å påvise submikroskopiske strukturelle avvik[7]. Flourescense *in situ* - hybridisering (FISH) er en analyse som muliggjør større oppløsning enn den tradisjonelle cytogenetiske analyse. Dette er en målrettet undersøkelse som brukes når det foreligger klinisk mistanke om et kromosomavvik der området - *locus* – er kjent fra før. Det lages en flourescensmerket probe for det locus som skal visualiseres, og denne vil binde seg komplementært til den aktuelle DNA sekvensen hos pasienten. Resultatet kan studeres i flourescensmikroskopet. Metoden ble primært utviklet for å påvise mikrodelesjonssyndromer som DiGeorge og Williams syndrom[5].

Et alternativ til FISH-analyse er mulitpleks ligeringsavhengig probeamplifikasjon (MLPA) analyse[7]. Her kan antall kopier av et gen eller region på kromosomet detekteres, og det er mulig å analysere opp til 45 gener på en gang. FISH analysen utføres på kromosomer fra levende celler, mens MLPA analysen kun krever renset DNA. Ulempen med både FISH- og MLPA-analyse er de kun vil avdekke tap eller tillegg av genetisk materiale i *forhåndsdefinerte* regioner. Det må altså finnes en klinisk mistanke om et kjent kromosomavvik, og så kan det letes spesifikt etter dette locus. FISH - analyse krever både hybridisering og mikroskopisk analyse, noe som er tidkrevende, begrensende med tanke på antall prober og vanskelig å automatisere.

4 Helgenomanalyser

Etter hvert er det utviklet metoder som kan lese av hele genomet, med det mål å finne mulig sykdomsframkallende endringer. DNA – array analyser overgår de tidligere nevnte analysemetodene når det kommer til oppløsning, begrensning til spesifikke loci og tidsbruk. Med utviklingen av DNA- array teknologien har det blitt mulig å undersøke genomet i høy oppløsning, og det kan påvises avvik som er mye mindre enn det konvensjonell G-bånds karyotypering eller FISH - analyse kan påvise. Avhengig av hvilken type DNA array som velges og hvilken oppløsning den har, kan avvik fra noen få basepar til submikroskopiske delesjoner- og duplikasjoner oppdages, men også større avvik opp til flere Megabaser (Mb). Oppløsningen på matrisen kommer an på lengden på oligonukleotidene, antall og hvilken type som velges.

Array - baserte analysemetoder kan anvendes i en rekke sammenhenger for å avdekke sykdom eller risiko for sykdom på gennivå. DNA - array analyser er i bruk for å avdekke risiko for noen typer kreft og i arbeidet med å diagnostisere psykisk utviklingshemming, autismespekterlidelser og medfødte misdannelser. I andre land er disse analysemetodene allerede i bruk i forbindelse med prenatal diagnostikk, nyfødtscreening og det forskes mye på muligheter for individuell tilpasning av medikamentell behandling.

Her vil jeg beskrive de mest aktuelle DNA array – analyser: ”array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)”, heleksomsekvensering og til slutt et mer omfattende kapittel om ”Single Nucleotide Polymorphism array” (SNP array) analyse, da dette helt klart er den mest aktuelle analysemetoden i dag.

4.1 Array CGH

Array komparativ genomanalyse (aCGH) benyttes av mange laboratorier, og brukes i denne sammenheng for å illustrere noen generelle prinsipper bak mikromatrisebasert analyse. Denne analysemetoden har ført til ny kunnskap og

forskning som igjen har ført til utviklingen av SNP - array, som er en bedre analysemetode.

For å identifisere om det foreligger kopitallsvariasjon i pasientens DNA, vil DNA fra blod- eller vevsprøver renses og kuttes opp[7]. Det fragmenterte genomet fra pasienten vil så farges med rød fluorescens, mens et tilsvarende oppkuttet normalt kontroll- DNA vil farges med grønn fluorescens. Denne metoden støtter seg på det biokjemiske prinsippet at nukleotidene binder til sine komplementære – A binder til T og C binder til G i Watson-Crick basepar. De to prøvene blandes og tilføres en glassbrikke (dette er mikromatrisen/array) med korte DNA fragmenter (oligonukleotider) med kjente sekvenser. Prøvene vil binde til de komplementære oligonukleotidene på matrisen, og matrisen undersøkes deretter med laserscanner. Intensiteten av flourescenssignalet fra hvert oligonukleotid registreres: Dersom det er avvikende kopitall vil det være grønne signaler der det er mangler genetisk materiale i forhold til kontroll-DNA, mens det vil være røde signaler der det er for mye av pasientens DNA. Siden både sekvens og hvilket område i genomet oligonukleotidene på matrisen representerer er kjent, kan en finne ut *hvor* det er kopitallsvariasjon og til en viss grad *hvilke gener* som eventuelt ligger i dette området.

4.2 Heleksomsekvensering

Heleksomsekvensering er en metode som er i full utvikling i dag. Som metode fokuserer den på de områdene som er best kjent; eksonene. Først vil DNA kuttes og oppamplifiseres med ”Polymerase chain reaction” (PCR), deretter tilsettes et såkalt eksomkit som vil hybridisere kun med eksonene i prøve DNA[10]. Alle delene som har hybridisert vil merkes og ekstraheres fra prøveblandingen. De hybridiserte bitene vil oppamplifiseres og deretter sekvenseres. Så kan de enkelte eksoner i de gener man er interessert i studeres og man kan vurdere om det finnes endringer her som kan forklare pasientens sykdomsbilde[11]. Det spekuleres i om heleksomsekvensering vil overta for DNA array metoder om en viss tid, men slik situasjonen er i dag, vil pasientprøver uansett først analyseres

med en array metode[5]. Det er teoretisk mulig å gjennomføres heleksomsekvensering på pasientprøver i klinikken, men et stort hinder per dags dato er pris og en utfordring er tolkning av de enorme mengder data heleksomsekvensering genererer.

4.3 SNP- array analyse

Den største kilden til genetisk diverstet i antall nukleotider, er såkalte "single nucleotide polymorphisms (SNPer)"[12]. Dette er punktmutasjoner som oppstår som en naturlig del av evolusjonen, og må foreligge med en allelefrekvens på minst 1% i en gitt befolkning for å bli klassifisert som en SNP. SNPer kan være nøytrale eller endre aminosyrerekkefølgen dersom de ligger i kodende del av genomet. De kan også ha innflytelse på transkripsjonsfaktorer eller andre regulatoriske regioner. Slik kan SNPer være bakgrunn for ulike fenotyper; friske eller syke[12].

På en SNP array plattform finnes både CNV-prober og SNP-prober, slik at man i tillegg til kopitallsdata, vil få informasjon om de to ulike alleler av en SNP[8]. For enkelhets skyld benevnes de ulike alleler A og B, og disse representerer en SNP posisjon på hvert sitt homologe kromosom. Hvert individ arver en kopi fra hver forelder og genotypen til hver SNP vil da enten være AA, AB eller BB. SNP-array analysen ble i utgangspunktet laget for å avdekke SNP'er i genomet[13]. I tiåret som et gått siden da , har SNP-array utviklet seg til en analysemetode som i tillegg kan påvise submikroskopiske kopitallsvariasjoner, homozygositetsområder, lavgradig mosaicisme og uniparental disomi (UPD). SNP- array er ikke egnet til å avdekke balanserte translokasjoner fordi da har regioner simpelthen byttet plass, men det er like mye genetisk materiale til stede. Polyploidier vil heller ikke avdekkes fordi da vil det være et ekstra sett med kromosomer, f,eks 69 i stedet for 46, og intensiteten av lyssignalet som genereres vil være likt over hele matrisen.

Analysen starter med at pasientens DNA ekstraheres fra blod- eller annen celleprøve, deretter tilsettes et restriksjonsenzym som klipper det genomiske DNA på spesifikke sekvenser[8]. Fragmentene ligeres til adaptor, slik materialet kan oppamplifiseres med PCR ved hjelp av bare ett primersett. Alle fragmentene merkes med fluorescens og tilsettes matrisen der de vil hybridisere med sine respektive prober, enten en CNV- eller SNP – probe. Ved aCGH blir pasient- og prøve DNA kohybridisert på matrisen, mens ved SNP- array trenger vi kun pasient DNA. Pasientens DNA vil binde til sine komplementære DNA fragmenter på matrisen som brukes, og deretter sammenlignes resultatet med tidligere analyserte normale kontroller. Avlesingen vil generere et bilde på bakgrunn av lysintensitetssignalene fra matrisen. Dette sendes til en datamaskin med spesialtilpasset programvare som vil behandle disse store mengdene data og lage en hensiktsmessig presentasjon av analysen.

Intensitetsratio på lyssignalene fra matrisen oversettes til en tallfil som representerer hver enkelt probe som har hybridisert; det kan være opp til 2,1 millioner tall i en slik fil[8]. Tallfilen importeres til en datamaskin med en spesialdesignet programvare; ”*Chromosome Analysis Suite”* (ChAS), som igjen oversetter tallfilen til en oversiktlig presentasjon av den genetiske informasjonen funnet ved SNP array – analyse. Dette er en helautomatisk prosess som i alt tar 3 døgn, og alle reagenser som anvendes i analyseprosessen leveres ferdigblandet og kvalitetskontrollert. Dette bidrar til at risikoen for feilkilder og menneskelige feil reduseres til et minimum. Kromosomene presenteres hver for seg og bioingeniør, og deretter forsker, går systematisk gjennom hvert enkelt kromosom; først i lav oppløsning, så i høy oppløsning og deretter for å se etter homozygositetsområder. I ett og samme bilde er det en visuell framstilling av kopitall, SNP’er og de ulike alleler på de homologe kromosomer (Figur 2). Dette muliggjør en svært rask vurdering av hvert enkelt funn i pasientens DNA, og bioingeniør og forsker kan i første omgang ta stilling til om det er sannsynlig at et funn kan være patologisk. Deretter vil forsker i samarbeid med kliniker/lege ta nærmere stilling til om det aktuelle funnet kan forklare pasientens kliniske

presentasjon. I uklare eller vanskelige saker kreves det ofte søk i internasjonal litteratur for å se om lignende funn er gjort tidligere.

*Figur 2: Figuren viser en delesjon på kromosom 16 i bånd 16p11.2, assosiert med autisme. "*Chromosome Analysis Suite" *(ChAS) presenterer kromosomene øverst, og kromosom 16 er uthevet i i blått. Den første linjen i CNV-feltet viser delesjoner merket med røde bjelker, og duplikasjoner merket med blå bjelker. ChAS har også integrert informasjon om normalvarianter fra "*Database of genomic variants" *(DGV), sykdomsgener fra "*Online Mendelian Inheritance in Man" *(OMIM). Raden som er merket "gener", viser alle genene på kromosom 16 som finnes på matrisen Affymetrix CystoscanHD Array. (Fra Medisinsk genetisk avdeling på Barne- og ungdomsklinikken, UNN.)*

5 SNP – array, anvendelse og utfordringer

For å gi et bilde av hvor intens utviklingen av analysemetoder har vært, vil jeg beskrive gangen i analyser ved syndromutredning og hvordan det har endret seg siden jeg besøkte avdelingen første gang. Jeg vil drøfte hvilke vurderinger som gjøres i kjølvannet av informasjonen den nye teknologien genererer og presentere utfordringer og fordeler med de nyeste analysemetoder, inkludert verktøy som databaser og supplerende undersøkelser. Til slutt vil jeg diskutere hvordan det har påvirket utredningsarbeidet for kliniker såvel som affisert familie, etiske utfordringer og framtidsutsikter.

I 2008 besøkte jeg avdelingen for første gang og startet mitt arbeid med 2.års oppgaven om syndromutredning. Da var rekkefølgen i analyser slik at prøver fra pasient med syndromsuspekt klinikk først ble analysert med G-bånds analyse, og videre med målrettede FISH - eller MLPA – analyse dersom klinikken pekte i retning av et kjent syndrom. Array – baserte metoder var bare så vidt nevnt, og det var ikke mulighet for dette i Tromsø. Det var kun hos de mest utfordrende pasientene med svært sterk mistanke om genetisk sykdom, men uten funn ved nevnte analyser, at man sendte prøvene til analyse i Oslo eller Bergen. I Oslo fantes det muligheter for CGH og etterhvert aCGH, men sjansen for negativt svar var stor. Bergen fikk etterhvert mulighet for SNP – array analyse, og noen av de samme prøvene som kom tilbake negativt svar etter CGH i Oslo, ble sendt til Bergen for analyse der det i noen tilfeller ble gjort funn av årsaksforklarende mutasjoner. Høsten 2012 ankom den nyeste type SNP – array maskin UNN, Tromsø, og etter en implementeringsperiode, er den nå i full bruk i avdelingen.

Flere studier de 3 siste årene har vist at det er formålstjenelig med SNP-array som førstehåndsanalyse ved syndrommistanke, og det er i dag etablert som standard rutine[14]. Kjente eller potensielt patogene funn ved SNP - array, vil deretter bekreftes med en uavhengig analysemetode (FISH eller MLPA) fra en adskilt prøve. G-bånds analyse bør reserveres til pasienter med tydelig klinikk som peker i retning av en aneuploidi, ved habituell abort eller dersom familien

har en kjent historie med kromosomal translokasjon[15]. I tillegg er det viktig å bruke G-bånds analyse som et supplement til SNP-array analyser for å lokalisere kromosomal plassering av avvik, og det brukes også i utredninger ved mistanke om mosaicisme.

5.1 Vurdering av nye kromosomavvik

I 2004 ble det publisert rapporter om at aCGH kunne detektere kopitallsvarianter som årsak til psykomotorisk utviklingshemming og medfødte misdannelser[5]. Det ble snart vist at aCGH fant patogene kopitallsvarianter som kunne forklare de fenotypiske trekk i 5-15% av pasienter med psykomotorisk utviklingshemming som hadde en normal G-bånds analyse, særlig dersom pasienten i tillegg presenterte seg med medfødte misdannelser eller dysmorfe trekk[16]. SNP-array analyse bidrar med mulighet til høyere oppløsning og flere muligheter enn aCGH og kan også påvise de fleste kromosomavvik som avdekkes med G-bånds analyse.

Nye delesjons- og duplikasjonssyndromer og andre typer sjeldne genetiske avvik beskrives kontinuerlig over hele verden. For å kunne si så sikkert som mulig at et kromosomavvik er årsak til de fenotypiske trekk observert i klinikken, må det som oftest allerede være beskrevet lignende fenotype og kromosomavvik hos andre pasienter. Først etter nøye undersøkelse fra klinikere og forskere kan nye genetiske syndromer etterhvert defineres. Listen av nye mikrodelesjons- og duplikasjonssyndromer vokser stadig og vil fortsette med i raskt tempo etter som SNP array-analysen blir vanligere i klinikker.

Resultater fra SNP- array analyse som beskriver nye kromosomavvik har ført til tilfeller av såkalt ”revers dysmorfologi”[9]. Det vil si at nye syndromer er beskrevet etter at man har funnet at pasienter har samme genetiske avvik og først da oppdaget alle dysmorfe trekk disse deler. Tradisjonelt er syndromer beskrevet ut i fra at flere pasienter deler de samme fenotypiske trekk, og *deretter* er det vist at de har samme eller lignende kromosomavvik. Her er den nye teknologien brukt til

å gå motsatt vei; kromosomavviket er den utslagsgivende linken for å etablere en genotype-fenotype korrelasjon.

5.1.1 Hvordan skille patogene og benigne funn?

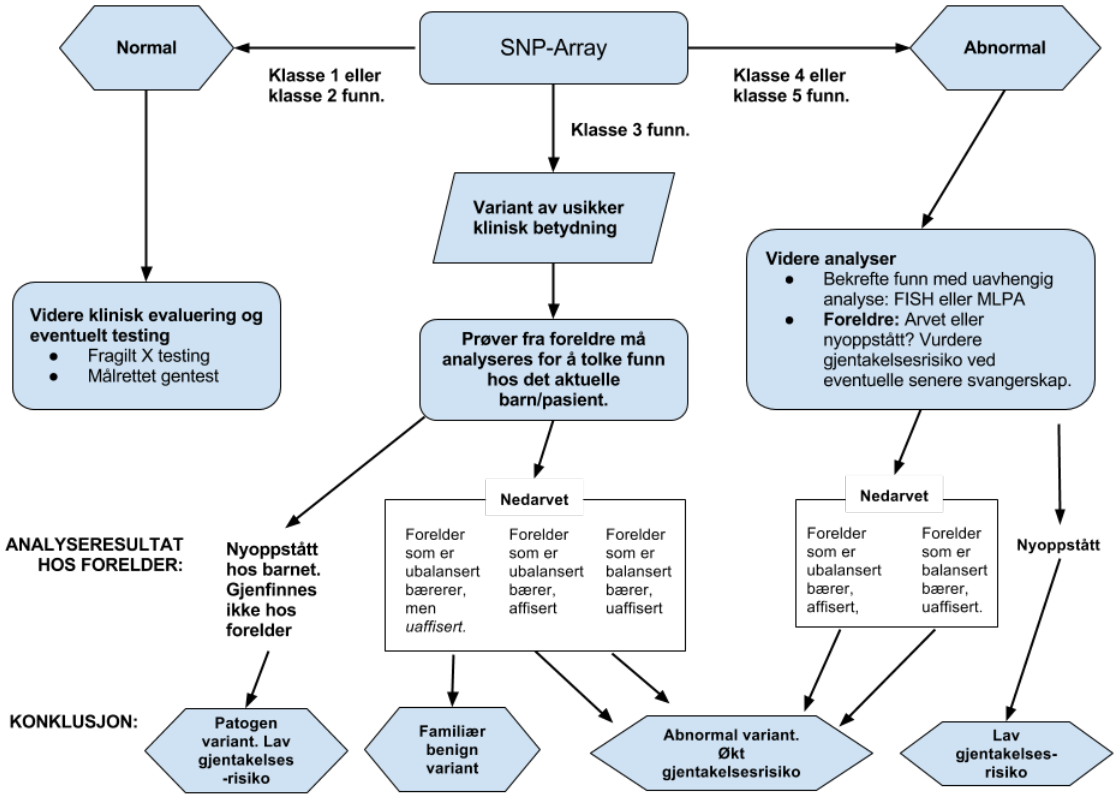
Den største utfordringen med SNP array er å forstå betydningen av funn, fordi avvik av usikker betydning vil være tilstede i hele genomet. Det er en del tommelfingerregler som er gjeldende når en skal vurdere om et avvik er patogent eller ikke. La oss si at det er funnet et avvik hos et barn med psykomotorisk utviklingshemming, der G-bånds analysen var normal. Først vil foreldrene genom analyseres for å se om avviket kan gjenfinnes der; er det tilstede også hos fenotypisk normale foreldre, kan det tyde på at det aktuelle funnet er benignt. Det er mer sannsynlig at en mutasjon som er oppstått *de novo* hos et barn med psykomotorisk utviklingshemming og som ikke gjenfinnes hos friske foreldre er patogen, enn en mutasjon som nedarves uforandret fra en frisk forelder[9] (Figur 3). Deretter kan det undersøkes om mutasjonen befinner seg i et område med kjente gener, eller kanskje den omfatter deler av et område i genomet der det allerede er beskrevet et syndrom. Med andre ord letes det etter genotype-fenotype korrelasjon; det må vurderes om mutasjonen som er påvist er lokalisert til et område med gener som koder for et fenotypisk trekk vi kan finne igjen hos pasienten.

Det finnes unntak fra denne type tilnærming til analysereslutat. Det kan være at en nyoppstått mutasjon er benign, og på samme måte kan det være at en nedarvet mutasjon fra frisk forelder er årsaken til barnets utviklingsavvik. For eksempel kan en mutasjon hos forelder bare gi så milde trekk at det oversees ved klinisk undersøkelse (ulik ekspresjon hos barn og foreldre) eller kromosomavviket har ikke gitt fenotypiske utslag i det hele tatt (ikke penetrant)[5]. Det er tilfeller med X- bundne gener som er overført fra mor til sønn, gonadal mosaicisme hos foreldre eller imprinting. Det kan også være en mutasjon i den samme regionen på det andre kromosomet hos barnet men ikke forelder, eller barnet kan i tillegg ha en mutasjon i et modifiseringsgen som er knyttet til det

aktuelle avviket[14]. Årsakene til at en mutasjon kan gi utviklingssavvik hos barnet men ikke forelder er altså mange i teorien, men det forblir i den enkelte sak stort sett ukjent, eller ikke utforsket fordi det antas at funnet er uten betydning.

Det å finne kromosomavvik av uklar betydning er en stor utfordring både for forsker ved tolkning av svar, og for kliniker i møte med pasienten. "The International Standard for Cytogenomic Arrays Consortium (ISCA Consortium)" er en raskt voksende organisasjon for klinisk genetikere og forskere som jobber for bedre kvalitet i arbeidet med DNA array analyser, og en ivaretakelse av pasientene som møter denne nye teknologien[17]. De har utarbeidet en rapport med veiledende kriterier for å lette arbeidet med tolkningen av funn ved SNP-array analyse. Kriteriene er utformet med fokus på analysesvar fra barn med uoppklart utviklingshemming, autisme og andre utviklingsavvik. I Norge er disse kriteriene lagt til grunn for nasjonale retningslinjer, og det er laget 5 klasser for inndeling av funn.

- Klasse 1: Sikker nøytral variant, ingen klinisk betydning (godt dokumentert).
- Klasse 2: Sannsynlig nøytral variant eller liten klinisk betydning (mangelfull dokumentasjon).
- Klasse 3: Variant av usikker klinisk betydning.
- Klasse 4: Sannsynlig patogen variant (magelfull dokumentasjon).
- Klasse 5: Sikker patogen variant (svært godt dokumentert, ingen tvil om konklusjon).
- Klasse 0: Klinisk relevant, men ikke relatert til fenotypen.



Figur 3. *Figuren viser algoritmen for forløpet i utredning av pasienter med mental retardasjon, dysmorfe trekk og/eller atferdsvansker. Denne algoritmen forutsetter at pasienten ikke har et kjent syndrom, eller at eventuelle tester for et mistenkt syndrom har vært negative. (Figuren er omarbeidet fra[15].)*

Type og oppløsning av matrisen spiller i stor grad inn på hvilke resultater som genereres. Det finnes syndromspesifikke matriser som består av områder som er kjent for å være involvert i sykdom. Andre er helgenommatriser med større eller mindre oppløsning. Jo høyere oppløsningen er, jo bedre mulighet for å avdekke små endringer, men jo større sjanse for falske positiver. Patogene avvik har en tendens til å være store, mens benigne små, og med høyere oppløsning vil andelen benigne funn øke[9]. Tiden og innsatsen som må brukes på å tolke resultatene vil øke med oppløsningen, og det kreves økt kunnskap for å forvalte informasjonen som følger med. Det må være balanse mellom god mulighet for å avdekke patogene avvik og mengde utfordringer som møtes i tolkningsarbeidet.

5.1.2 Syndromdatabaser

Et viktig, men uventet funn i tidlige DNA array analyser var at de fleste CNV er benigne varianter som ikke kan sees i sammenheng med sykdom[9]. Dette gjelder også de aller fleste SNP'er og homozygositetsområder. Disse avvikene finnes spredt utover hele genomet til fenotypisk normale individer, og alle mennesker har kopitallsvariasjoner og SNP'er i genomet. Dette understreker viktigheten av å samle informasjon om funn i felles databaser; det gjøres i stor skala der data fra både friske og syke samles og er søkbart for forskere og klinikere over hele verden. Eksempler er *"Database of Genomic Variants og* DECIPHER *("DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources")* m.fl der det kan undersøkes om et funn er beskrevet i den friske populasjonen eller om funnet er en variant som er rapportert hos pasienter med lignende klinikk[18-20]. Det finnes også mer klinisk rettede databaser med omfattende fotobibliotek og mer detaljerte kliniske beskrivelser, som for eksempel "*London dysmorphology database"* eller *"Orphanet"* [21-22]*.* Kliniker må ved undersøkelse av pasienten velge ut dysmorfe trekk eller andre særegenheter som kan egne seg for søk i databasene, og det krever erfaring for å sile ut viktige trekk og vite hvordan de best brukes som søkeord i databaser. Disse databasene forenkler det diagnostiske arbeidet veldig fordi databasene jobber for å samle informasjon fra undersøkelse i klinikken og funn fra laboratorieanalyser på et sted. Dette forbedrer tolkning av resultater og muliggjør en mer effektiv karakterisering av nye syndromer og diagnostisering av nye tilfeller av allerede beskrevne syndromer. En slik katalogisering er også helt avgjørende i det videre arbeidet med å kartlegge kompleksiteten av variasjon i genomet, og etiologisk basis for uavklarte genetiske sykdommer.

5.2 SNP- array, betraktninger i et større perspektiv

Vi står midt i en periode der svært mye spennende innen fagområdet genetikk er i ferd med å skje. I år er det 10 år siden det første utkastet til det fullsekvenserte humane genom ble publisert, noe som i seg selv var revolusjonerende. Det gav oss informasjon om oppskriften og i kjølvannet ble det utviklet ny teknologi, men

det gav ikke forståelse for hvordan oppskriften faktisk virker eller hvordan ulike avvik kan påvirke det enkelte individ. I kjølvannet av "The human genome project" ble det klart at det humane genom inneholdt langt mer interindividuell variasjon enn tidligere antatt, i form av CNV, SNP'er og homozygositetsområder. Arbeidet med å kartlegge og forstå hvordan disse avvikene kan føre til sykdom hos mennesket har pågått siden, og pågår enda for fullt i dag.

Mikromatrisebaserte analyseverktøy gir oss muligheten til å lese av hele genomet for uregelmessigheter med varierende oppløsning, og er i dag en av de mest avanserte metodene i bruk i klinikken for å diagnostisere sjeldne genetiske syndromer. I dag er ikke pris lenger den store utfordringen, slik det var for noen år tilbake. Den klart største utfordringen er å tolke den store mengden informasjon som genereres, og anvende resultater på den enkelte pasienten i klinikken. Dette i kombinasjon med at det er snakk om tilstander som er nettopp svært sjeldne, gjør det til en utfordrende prosess å tolke informasjonen. Høy oppløsning er nødvendig for å detektere små variasjoner i genomet, men dette fører også til at tolkningsarbeidet blir omfattende og vanskelig. Det er gjort en rekke studier på grupper av pasienter der tidligere analyser ikke har ført til diagnose; alle disse pasientprøvene har blitt analysert på nytt med høyere oppløsning og det avdekkes genomisk ubalanse som med stor sannsynlighet er årsaksforklarende hos en signifikant andel pasienter[16]. Denne konklusjonen trekkes som regel på bakgrunn av at avviket korresponderer med kjente regioner eller innholder gener som kan settes i sammenheng med pasientens klinikk. Det største arbeidet før man kommet så langt er å filtrere en enorm mengde informasjon, der det fra en enkelt pasientprøve kan være svært mange avvik som må vurderes. Programvare som brukes i dag inneholder integrert informasjon fra flere databaser som beskrevet ovenfor, noe som har revolusjonert arbeidet med å finne en diagnose/ekskludere benigne varianter. I teorien er det mulig både teknologisk og økonomisk å helgenom- eller heleksomsekvensere pasientprøver i syndromutredninger, men informasjonsmengden vil være fullstendig overveldende, og i praksis umulig å tolke i sin helhet per i dag.

Arbeidet med å katalogisere avvik i det humane genom har de siste årene vært omfattende, og bidrag kommer fra laboratorier rundt om i hele verden. Rask utbredelse av SNP – array analyser i klinikker har de siste årene ført til beskrivelsen av utallige variasjoner i genomet som ligger til grunn for en rekke sykdommer, sjeldne og mer vanlige. Dette bidrar til en utvikling som kan beskrives som eksponentiell; jo flere som bidrar til databasene, jo flere ulike varianter av allerede beskrevne områder i genomet vil påvises og bidra til å belyse avvik fra flere hold. For eksempel kan man tenke seg en kjent fenotype med en beskrevet *delesjon* av et gen, der det hos en pasient avdekkes en *duplikasjon* av det samme området og klinisk undersøkelse avdekker lignende, men kanskje mildere fenotypiske trekk hos pasienten[23]. Slik er analysene og rapportering av funn til databaser med på å øke forståelse av genomets funksjon i tillegg til å øke sannsynlighet for at neste pasient med samme avvik får en diagnose.

SNP- array teknologi har også påvirket diagnostisk tankegang i klinikken. En kliniker har i dag et mye større repertoar av syndromer å spille på i møte med en ny pasient eller familie, og muligheten for tidligere ubeskrevne syndromer vurderes i større grad. Klinikere beskriver at en følge av dette er at de har blitt bedre til å formidle muligheter og begrensninger med den nye teknologien, og at denne kommunikasjonen fører til at arbeidet blir nærmere familien som får delta i diskusjon rundt videre valg i utredningen. Den hurtige utviklingen gjør at pasienter uten diagnose, bes om å komme tilbake i løpet av noen år for nærmere vurdering av klinikk, samt nye analyser med forbedret teknologi. Dette har blant annet ført til at flere pasienter har fått en diagnose.

En spesifikk genetisk diagnose kan muliggjøre riktig medisinsk behandling og tilrettelegging samt presis veiledning av familier med tanke på gjentakelsesrisiko. Gjentakelsesrisiko dersom det er en nyoppstått CNV hos det aktuelle barnet, er ved neste svangerskap svært lav. I en del andre tilfeller, som ved ubalanserte

translokasjoner, recessive lidelser eller andre endringer i genomet som gjenfinnes hos foreldre, er gjentakelsesrisiko forhøyet. SNP- array er i ferd med å bli en viktig del av prenatal diagnostikk i store deler av den vestlige verden, og det vil i nær framtid også bli aktuelt i Norge. I situasjoner der det kan tenkes at SNP-array kan brukes i prenatal diagnostikk i dag, vil det dreie seg om familier som allerede har fått et sykt barn med et påvist avvik, og det må være helt sikkert at det påviste avviket er den bakenforliggende årsak til sykdommen (klasse 5: Sikker patogen variant).

I arbeidet med å søke etter mulige årsaksforklarende mutasjoner i genomet, hender det at avvik som ikke står i relasjon til aktuell klinikk avdekkes, klassifisert som klasse 0 (klinisk relevant, men ikke relatert til fenotypen). I slike tilfeller kan etiske problemstillinger oppstå. En av disse er dersom det avdekkes betydelig risiko for sykdom som først vil manifestere seg i voksen alder (Huntingtons chorea, arvelig kreft). Dersom det finnes tilgjengelig forebyggende- eller behandlingsmessige tiltak for en slik sykdom, er det naturlig å informere familien om funnet[24]. I motsatt fall står man ovenfor et betydelig etisk dilemma, og det er viktig å diskutere med kollegaer nasjonalt, og i noen tilfeller internasjonalt. Kunnskap og utdannelse er viktig for riktig forvaltning, men man må spørre seg hvem som skal stå som eier av den genetiske informasjonen. Et annet eksempel er dersom SNP-array analyse påviser avvik som med stor sannsynlighet peker i retning av incest, som igjen kan medføre rettslig forfølgelse dersom det rapporteres. Her er det igjen viktig å drøfte problemstillingen grundig med kolleger og eventuelt konferere med andre faginstanser. Slike etiske problemstillinger, som disse to eksemplene illustrerer, er tross alt sjeldne. Den daglige store utfordringen er å knytte SNP-array funn til klinisk presentasjon av pasienten.

Når vi skal se på framtidsutsikter for bruk av molekylærgenetiske analyser, er det viktig å være klar over de ultimate utfordringer som eksisterer i dag. Blant disse er å kartlegge hvordan gener samspiller for å produsere en fenotype, hvordan

avvik kan medføre sykdom, og deretter anvende kunnskapen til fordel for pasienten[25]. I dag er det mengde informasjon som er den store flaskehalsen innen genetikk, men med samarbeid på tvers av landegrenser og spesialiteter vil det i løpet av kort tid bli lettere å tolke det som i dag karakteriseres som funn av usikker klinisk betydning. Greene et al etterspør i sin artikkel fra 2011, databaser som i større grad gir omfattende og lett søkbar informasjon om fenotype direkte lenket til beskrivelse av avvik på gennivå. Allerede i dag er slik programvare utviklet, med mulighet for å dele kliniske opplysninger og SNP-array funn med andre klinikker i Norge og Europa, og dette vil taes i bruk i tiden som kommer. Flere pasienter får en diagnose i dag enn for noen år tilbake, men fremdeles står nesten halvparten av barn med dysmorfe trekk og mental retardasjon uten diagnose etter endt utredning, så behovet for videre utvikling er sterkt tilstede[26].

Uavhengig av utfordringer og store mengder analyseresultat av usikker klinisk betydning, er SNP- array analyse et førsteklasses verktøy for å identifisere kromosomavvik. SNP- array analyse har økt mulighetene til å diagnostisere genetiske tilstander, og bidrar med å ytterligere avsløre genomets kompleksitet. SNP- array analyse har allerede blitt et verktøy genetikeren ikke klarer seg foruten.

Litteraturliste

1. Nussbaum R, McInnes R, Willard H. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, 6.utgave. USA, Saunders Elsevier, 2004, side 17-31.
2. Nørby S, Nielsen P. *Medicinsk Genetik,* 2.utgave. København, Fadl's Forlag, 2012, side 85-91.
3. Choy K, Setlur S, Lee C, Lau T. The impact of human copy number variation on a new era of genetic testing. *BJOG*, 2010, DOI: 10.1111/j.1471-0528.2009.02470.x.
4. Feuk L, Marshall C, Wintle R, Sherer S. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Human Molecular Genetics*, 2006, 15(1): R57-R66.
5. Schaaf C, Wiszniewska J, Beaudet A. Copy Number and SNP Arrays in Clinical Diagnostics*. The Annual Review of Genomics and Human Genetics,* 2011, 12:25–51.
6. Ku C, Naidoo N, Teo S, Pawitan Y. Regions of homozygosity and their impact on complex diseases and traits*. Hum Genet*, 2011, 129:1–15.
7. Rødningen O, Prescott T, Hovland R et al. Påvisning av kromosomavvik ved hjelp av DNA matriser. *Tidsskr Nor Legeforen*, 2010, 130(9):944-7.
8. Nystad M. Helgenomisk diagnostikk av pasienter med utviklingsforstyrrelser ved bruk av DNA-matriser (SNP array), seminar holdt 14.06.12.
9. Friedman J. High-resolution array genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn,* 2009, 29:20–28.
10. Tucker T, Marra M, Friedman J. Massively Parallel Sequencing: The next big thing in genetic medicine. *Am J Hum Genet*, 2009, 85:142-154.
11. Video tutorial on conducting whole-exome sequencing research http://www.genome.gov/27545880 (10.12.12).
12. Nowak D, Hofmann W-K, Koeffler H. Genome-Wide Mapping of Copy Number Variations Using SNP Arrays. *Transfus Med Hemother,* 2009, 36:246–251 .
13. LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(13):4181–4193.
14. Gijsbers A, Lew J, Bosch C *et al.* A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *European Journal of Human Genetics*, 2009, 17:1394-1402.
15. Miller D, Adam M, Aradhya S *et al.* Consensus Statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet,* 2010, 86:749–764.
16. Bernardini L, Alesi V, Loddo S *et al.* High-resolution SNP arrays in mental retardation diagnostics: how much do we gain? *European Journal of Human Genetics*, 2010, 18:178–185.
17. https://www.iscaconsortium.org(15.11.12).
18. http://projects.tcag.ca/variation/(03.05.13).
19. http://decipher.sanger.ac.uk/about(12.05.13).
20. Van den Veyver I, Beaudet A. Comparative genomic hybridization and prenatal diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2010, 18:185-191.
21. http://www.lmdatabases.com/index.html(05.01.13).
22. http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php(15.11.12).

23. Makryathanasis P, Moix I, Gimelli S *et al*. De novo duplication of *MECP2* in a girl with mental retardation and no obvious dysmorphic features. *Clin Genet,* 2010, 78:175-180.
24. Wolf S, Crock B, Van Ness B *et al.* Managing findings and research results in genomic research involving biobanks and archived data sets. *Genet Med,* 2012, 14(4):361-384.
25. Greene E, Guyer M & National Human Genome Research Institute. Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature,* 2011, 470:204-213.
26. Johannesen L. Dekker hele spekteret av genetisk sykdom. *Tidsskr Nor Lægeforen*, 2004, 124(3):404.