

Diagnostikk av medfødte kryptiske kromosomavvik

Sammendrag

Bakgrunn. Kryptiske kromosomfeil, dvs. kromosomavvik som ikke oppdages ved rutinemessig kromosomundersøkelse, er sannsynligvis den viktigste årsaken til medfødte utviklingsavvik der mental retardasjon er en del av det kliniske bildet.

Materiale og metode. Vi gir en presentasjon av molekylærgenetiske metoder som baseres på fluorescens in situ-hybridisering (FISH) og DNA-markører. Særlig vekt blir lagt på komparativ genomisk hybridisering (CGH), en DNA-basert screeningmetode for påvisning av genomisk ubalanse.

Resultater. Ved CGH kan tap (delesjon) eller fordobling (duplikasjon) av kromosomområder av en størrelse ned til 3–4 millioner basepar (Mb) påvises. Ved hjelp av CGH-metoden har vi funnet kromosomavvik hos 10 % av mentalt retarderte barn med dysmorfe trekk der rutinemessig kromosomundersøkelse tidligere har gitt normale funn.

Fortolkning. Selv om CGH-undersøkelsens sensitivitet fortsatt er for lav til at delesjonen ved de fleste kjente mikrodelesjonssyndromer blir detektert, er det diagnostiske utbyttet nesten på nivå med rutinemessig karyotypering.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

Gro Oddveig Ness
gro.ness@helse-bergen.no

Gunnar Houge
Senter for medisinsk genetik og molekylærmedisin
Haukeland Universitetssykehus
5021 Bergen

Mental retardasjon (IQ < 70) forekommer hos 0,6–0,7% av befolkningen (1, 2). Kromosomavvik er den vanligste kjente årsak til mental retardasjon, og ved rutinemessig kromosomanalyse gjøres det funn hos omtrent 12 % av disse personene (3). På tross av sterkt forbedret cytogenetisk, molekylærgenetisk og klinisk diagnostikk finner man hos over halvparten av mentalt retarderte barn fortsatt ikke årsaken til utviklingsavviket (4–6). Det er som regel god grunn til å anta at ukjente og ofte tilfeldig oppståtte gen- eller kromosomfeil likevel ligger til grunn for tilstanden. Mange av disse barna har en kombinasjon av mental retardasjon, dysmorfe trekk og misdannelser i ulike organer som passer dårlig inn i et kjent syndrombilde. Kryptiske kromosomfeil (mikrodelesjoner eller mikroduplikasjoner) kan være en mulig årsak til utviklingsavviket hos disse barna.

Standard kromosomanalyse

Den eneste screeningmetoden for genetisk sykdom som hittil har vært tilgjengelig, er tradisjonell karyotypering, hvor man utfører en systematisk analyse av kromosomene når de foreligger i metafase av cellyklus (fig 1a). Kun forandringer som er større enn 5–15 millioner basepar (Mb), vil rutinemessig bli oppdaget, og en rekke kromosomfeil blir derfor oversett. Sensitiviteten er også avhengig av båndstrukturen – avvik ses lettere i områder med distinkte, tetsittende bånd enn i områder med diffust eller manglende båndmønster.

Fluorescens in situ-hybridisering (FISH)

Dersom de kliniske observasjoner gir mistanke om et kjent syndrom som skyldes en kryptisk kromosomfeil, for eksempel mikrodelesjonssyndromer som del22q11/Di-Georges syndrom, Williams syndrom, Smith-Magenis syndrom, Miller-Diekers syndrom o.a., kan dette undersøkes ved hjelp av fluorescens in situ-hybridisering (FISH) (fig 2). Det er imidlertid viktig å presisere at FISH ikke er en screeningmetode, men en undersøkelse som gjøres når kliniske symptomer

og funn indikerer en delesjon (sjeldnere duplikasjon) av et bestemt kromosomområde.

Spesialundersøkelse for subtelomeriske avvik

Området innenfor telomeren (navnet på sekvensen som er lokalisert på enden av hver kromosomarm) kalles det subtelomeriske område (fig 1b). Noen subtelomeriske delesjoner gir kjente syndromer (for eksempel 4p-/Wolf-Hirschhorns syndrom, 5p-/cri du chat-syndrom, 18p- og 18q-syndrom). Delesjoner eller duplikasjoner av subtelomeriske kromosomområder er funnet hos opptil 10 % av barn med moderat til alvorlig mental retardasjon og dysmorfe trekk (7, 8). Screening for subtelomeriske avvik kan gjøres ved å anvende et subtelomerisk sett av FISH-prober (9) eller ved matrise-CGH (10). Det er større sannsynlighet for å finne subtelomeriske avvik hos et barn med mental retardasjon og dysmorfe trekk dersom barnet har annen- eller tredjegradslektninger med liknende fenotype. Dersom man påviser et subtelomerisk avvik, vil en av foreldrene i halvparten av tilfellene ha en kryptisk balansert translokasjon mellom to kromosomer. Denne translokasjonen kan også finnes i familien for øvrig, og en familieundersøkelse (først og fremst foreldre) bør derfor utføres dersom et barn har en subtelomerisk ubalanse.

Multifarge-FISH

Som alternativ til vanlig kromosomanalyse er det utviklet screeningmetoder basert på FISH. Den ene metoden kalles SKY (spek-

Fakta

- Kryptiske kromosomavvik er vanskelige eller umulige å oppdage ved rutinemessig kromosomanalyse
- Slike avvik er en viktig, kanskje den viktigste, årsak til medfødte utviklingsavvik med mental retardasjon
- Komparativ genomisk hybridisering er den eneste generelle screeningmetode for påvisning av genomisk ubalanse som følge av kryptiske kromosomavvik
- Med CGH-metoden kan vi i dag påvise et kryptisk kromosomavvik hos 10 % av mentalt retarderte og dysmorfe barn med tilsynelatende normal karyotype

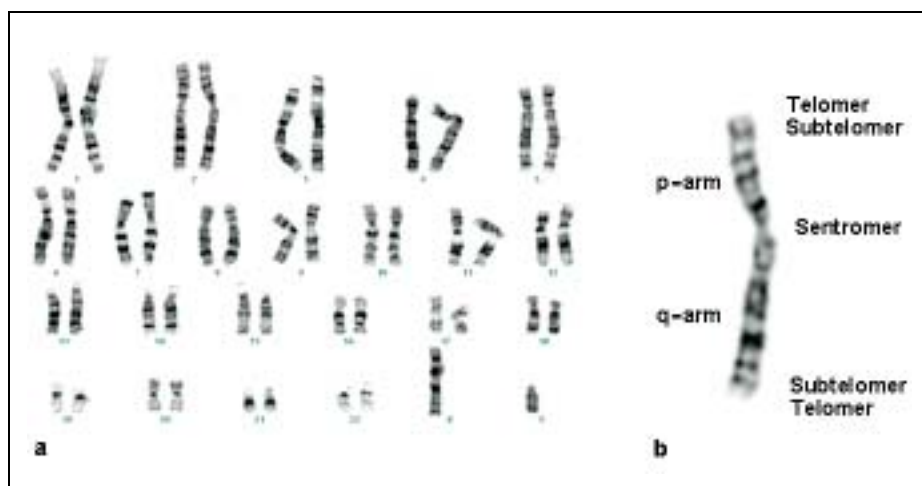
tral karyotyping) (11), den andre M-FISH (multifarge-FISH) (12). Prinsippet for begge metoder er at hvert kromosom får sin unike farge ved at kromosompreparatet hybridiseres med en blanding av ulikt fluorescerende DNA-prober for hvert kromosom. Kromosomenes fargesammensetning kan enten registreres ved bruk av filtre (M-FISH) (fig 3) eller spektral kamera (SKY). Det siste er kostbart spesialutstyr som de færreste rutinelaboratorier har tilgjengelig. Sensitiviteten er bedre enn ved vanlig kromosomanalyse dersom det foreligger utveksling av materiale mellom kromosomer (translokasjoner og insersjoner), men metoden vil som regel ikke avsløre forandringer innen samme kromosom (duplikasjoner, delesjoner og inverasjoner). Metodene er særlig nyttige når det foreligger komplekse forandringer der flere kromosomer er involvert (13), og også ganske små interkromosomale forandringer kan oppdages (14). Både M-FISH og SKY er anvendt for å finne subtelomeriske kromosomavvik (13), men metodene er her lite egnet fordi sensitiviteten er for lav (15). Selv med forbedrede probesett er oppløsningen så grov at translokert materiale av en størrelse under ca. 3 Mb ikke vil kunne forventes å bli oppdaget.

DNA-markører til undersøkelse av kromosomal ubalanse

Gjennom hele genomet finnes det områder med enkle repetisjoner av baser (ofte kalt STR eller «simple tandem repeats»). Antallet repetisjoner i et bestemt område kan variere fra individ til individ og fra kromosom til kromosom – områdene er såkalt polymorfe ved at de viser naturlig lengdevariasjon i en befolkning. En genetisk markør er et slikt naturlig forekommende polymorft område med kjent kromosomlokalisering. Ved å undersøke lengden av en bestemt markør kan man skille mellom kromosomet som er arvet fra far og kromosomet som er arvet fra mor. Dersom et barn har et område på kromosomet som er deletert, vil man oppdage dette ved å sammenlikne lengden på markører i det bestemte området hos barnet med lengdene på de samme markørene hos mor og far (16). DNA-markører som er lokalisert til enden på kromosomarmene, har vært benyttet til å lete etter subtelomeriske avvik hos mentalt retarderte personer. Det ble rapportert funn hos 10 % (17).

Komparativ genomisk hybridisering (CGH)

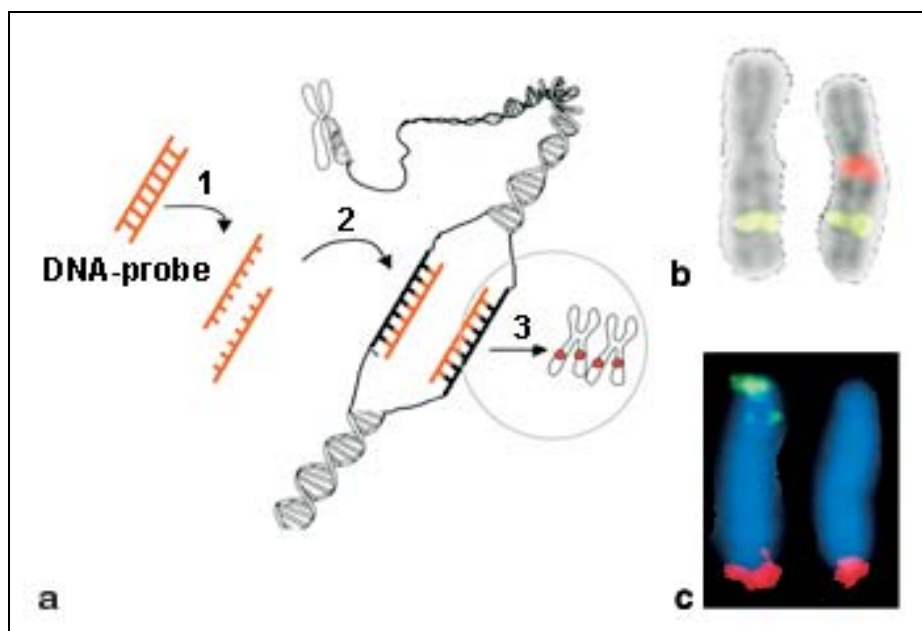
Selv om subtelomeriske delesjoner og duplikasjoner synes å være en vesentlig årsak til mental retardasjon, kan det tenkes at små delesjoner og duplikasjoner i andre deler av kromosomene forekommer enda hyppigere. Kun et fåtall av disse vil falle inn under kjente mikrodelesjonssyndromer (se www.medgen.no for mer informasjon). Ved en CGH-analyse kan hele genomet undersøkes for slike ubalanser (fig 4). Metoden er basert på



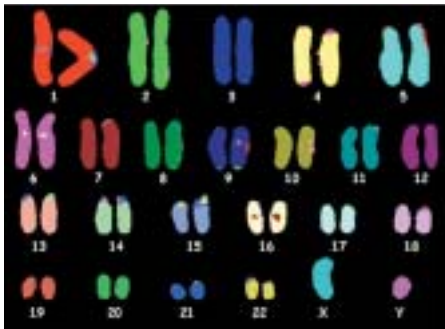
Figur 1 a) Karyogram av en normal mann. Bildet viser alle kromosomene etter at de er behandlet med fargestoffet giemsa (G-banding). Kromosomene fremtrer med unike båndmønstre som kan identifiseres og analyseres. Båndene nummereres etter bestemte konvensjoner, og kromosomene deles på denne måten inn i regioner, domener og subdomener. Alle kromosomanalyser er utført ved kromosomlaboratoriet, Senter for medisinsk genetik og molekylærmedisin, Haukeland Universitetssykehus. b) Angivelse av bestemte områder på kromosomet. De fleste kromosomer har to armer, den korteste kalles p og den lengste q. Sentromeren er mellom disse. I kromosomendene finner man telomerene, og innenfor disse de subtelomeriske områdene

FISH-teknikken, og ble første gang beskrevet i 1992 (18). Utgangspunktet for analysen er renset DNA fra blod eller vev. Nettopp av denne grunn er CGH først og fremst blitt anvendt for å lete etter kromosomal ubalanse i solide svulster, vev som det til dels har vært vanskelig eller umulig å karyotypere (19).

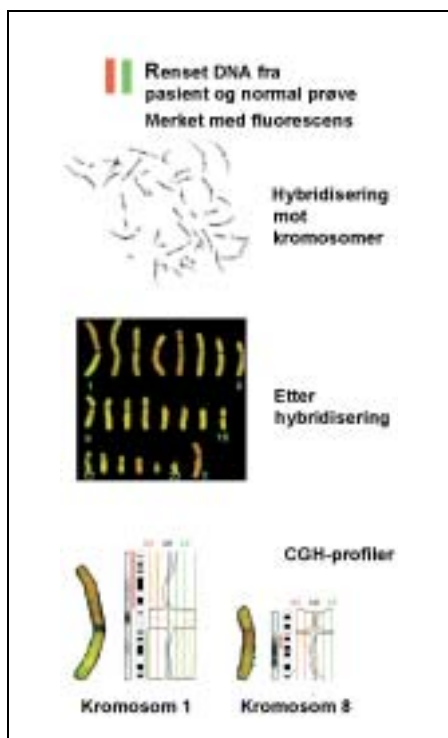
For analyse av medfødte kromosomavvik er CGH benyttet for nærmere karakterisering av avvik som allerede er oppdaget ved rutinemessig kromosomanalyse (20, 21). I tillegg er teknikken benyttet som en screeningmetode for subtelomeriske avvik. Man antar at CGH-analysen er sensitiv nok å opp-



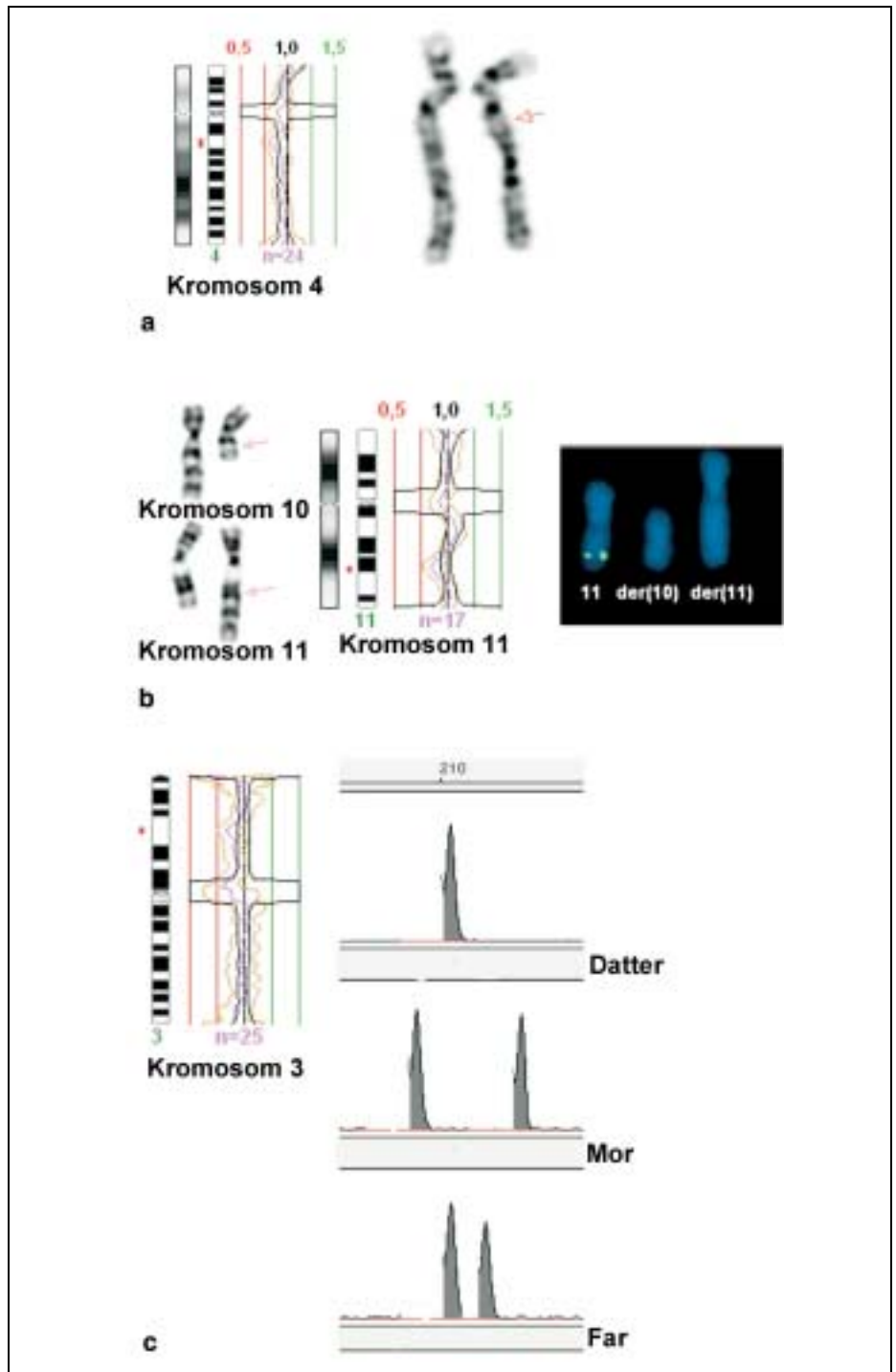
Figur 2 a) Skjematiske illustrasjon av prinsippet for FISH. En dobbeltrådet DNA-probe er merket med et fluorescerende stoff. Den merkede proben og kromosomene på objektglasset gjøres enkelttrådede, 1. Proben tilsettes preparatet i en bufferløsning. Proben kan binde seg (hybridisere) til den komplementære DNA-tråden på kromosomet, 2. Ved hjelp av et fluorescensmikroskop kan man observere proben, 3. b) Lokalisering av området som er deletert ved Williams syndrom. Den grønne proben er kontrollprobe for kromosom 7, mens den røde proben er spesifikk for et område på 7q som mangler (er deletert) på ett av kromosomene ved Williams syndrom. c) Undersøkelse av de subtelomere områdene på kromosom 8. Den røde proben er lokalisert til det subtelomeriske området på q-armen, mens den grønne proben er lokalisert til det subtelomeriske området på p-armen. Bildet viser at det sistnevnte er deletert på ett av kromosomene. Kromosomene ser blå ut fordi det benyttes et bakgrunnsfargestoff (DAPI)



Figur 3 Ved M-FISH får hvert kromosom en unik farge. Bildet viser normale kromosomer (med tillatelse fra Randi Hovland, Senter for medisinsk genetik og molekylærmedisin, Haukeland Universitetssykehus)



Figur 4 Skjematisert illustrasjon av prinsippet for komparativ genomisk hybridisering (CGH). Metoden viser tap eller ervervelse av kromosomområder i en prøve sammenliknet med en normal kontrollprøve. DNA renses fra prøvematerialet og pasientens DNA merkes med grønn fluorescens. DNA fra en normal prøve merkes med rød fluorescens. Disse blandes sammen og brukes som probemix på et kromosompreparat. Probene vil binde seg (hybridisere) til sitt tilhørende område på kromosomene. Det benyttes et fluorescensmikroskop med videokamera tilkoblet en PC med analyseprogram for å ta bilder av metafasene. Forholdet mellom rød og grønn fluorescens registreres for hvert kromosom og gir utgangspunktet for en CGH-profil. Områder på kromosomene som er mer grønne enn røde, indikerer at det er ekstra mengde av dette DNA-området i pasientens DNA. Prøven som her er analysert er en tumorprøve. Her vises profilen av kromosom 1 og kromosom 8. De røde vertikale strekene angir hvilke områder som er deletert i prøven, mens de grønne vertikale linjene angir at det er for mye DNA i prøven svarende til disse kromosomområdene



Figur 5 CGH-analyse av barn med mental retardasjon og dysmorpfe trekk. a) En deleksjon på den lange armen av kromosom 4 er angitt som en vertikal rød strek på venstre side av CGH-profilen. Ved reanalyse av båndmønstret på et kromosompreparat av høy kvalitet var det mulig å oppdage den tidligere oversette deleksjonen, angitt med pil på kromosomet til høyre. b) En nyoppstått tilsyrelatende balansert translokasjon mellom kromosom 10 og kromosom 11 ble analysert med CGH. Bruddstedene er angitt med røde piler på de translokerte kromosomene. Det ble funnet at kromosom 11 hadde en deleksjon på den lange armen, antakelig i bruddstedet (rød vertikal strek til venstre for CGH-profilen). Deleksjonen ble verifisert med en FISH-probe svarende til domenet for bruddstedet. Proben er merket med grønn fluorescens og har bundet seg til det normale kromosom 11, men ikke til noen av de to kromosomene involvert i translokasjonen, der(ivatkromosom)(10) og der(11). Dette viser at det er en deleksjon i bruddstedet. c) En deleksjon ble funnet på den korte armen av kromosom 3. Det var ikke mulig å oppdage deleksjonene ved reanalyse av kromosompreparatet. Det ble derfor utført en analyse der genetiske markører hos barn og foreldrene ble sammenliknet. Det ble valgt markører lokalisert til det området der CGH-profilen angav en deleksjon. Markøranalysen ble utført ved hjelp av PCR etterfulgt av kapillær elektroforese. Kurvene viser de forskjellige lengdene for en av markørene hos barn og foreldre. Både mor og far har to topper fordi markøren har ulik lengde på deres to kromosom 3 (foreldrene er heterozygote). Barnet har derimot bare én topp, tilsvarende en av toppene hos far, mens det ikke er noen topp som er sammenfallende med dem som representerer mor (barnet er hemizygot). Dette viser at barnet har en deleksjon i dette området

dage de fleste subtelomeriske ubalanser (22).

Ved å anvende analyseprogrammet høy-resolusjons-CGH (HR-CGH), kan genomiske ubalanser ned til 3 Mb oppdages. Dette innebærer at sensitiviteten er 2–3 ganger høyere ved tradisjonell CGH (23). Vi har benyttet HR-CGH til diagnostikk av pasienter med mental retardasjon og dysmorfe trekk som tidligere har hatt tilsynelatende balansert kromosommønster ved vanlig kromosomanalyse (fig 5). Hittil er 116 slike barn blitt undersøkt. Hos 12 av disse har vi påvist en genomisk ubalanse. Kun i tre av tilfellene var de subtelomeriske områdene involverte. Hos ni andre forelå delesjoner eller duplikasjoner av andre deler av kromosomene. Resultatet av de 50 første undersøkte pasientene er publisert (24), og samsvarer med andre rapporterte funn (25). HR-CGH kan også benyttes til å oppdage små delesjoner ved bruddstedene ved nyoppståtte translokasjoner (fig 5b) (24, 25). Dessverre er vi fortsatt avhengig av at en kromosomal ubalanse er større enn 3–4 Mb for at den skal oppdages ved HR-CGH. Ved mange kjente syndromer (for eksempel Williams syndrom, del22q11-syndrom) er delesjonene under denne deteksjonsgrensen.

Screening for kromosomal ubalanse ved matrise-CGH

Screening av hele genomet for kromosomale ubalanser har nå en sensitivitet på maksimalt 3 Mb. En ytterligere bedring av sensitiviteten vil først være mulig når matrise-CGH-teknikken er ferdig utviklet. Her benyttes DNA-mikroplater med flere tusen DNA-fragmenter som representerer tilnærmet hele genomet (26, 27). Hybridiseringen av prøvene utføres på en slik DNA-matrise i stedet for på et kromosompreparat (27–29). Slike teknikker kan tenkes å kunne påvise ubalanser av størrelser ned til noen hundre kilobasepar (Kb), dvs. at sensitiviteten vil være omtrent ti ganger høyere enn det man kan oppnå med HR-CGH per i dag. For å komme ned i en oppløsning på 1 Mb, trengs minst 3 000 ulike DNA-fragmenter i matrisen. For å dekke hele genomet må matrisen inneholde minst 35 000 fragmenter av en størrelse på 150–200 Kb. Arbeidet med å plukke ut fragmenter og å verifisere posisjonene til disse er svært tidkrevende. I tillegg kommer de tekniske utfordringene som selve matriseteknologien innebærer. Det er blitt fremstilt spesial-CGH-matriser med DNA-fragmenter svarende til begrensede deler av genomet, for eksempel de subtelomeriske områdene (10). Helgenomiske matriser finnes, men av tekniske og kostnadsmessige år-

saker er disse kun blitt anvendt i liten utstrekning. For høy sensitivitet kan paradoksalt nok bli det største problemet i fremtiden. Mye tyder på at det humane genomet er temmelig ustabil. Før man får samlet nok erfaring, vil tolkingen av resultatene være vanskelig fordi man ikke kjenner hvilke områder som har naturlig forekommende polymorfisme for delesjoner, duplikasjoner og amplifikasjoner (30).

Konklusjon

Kryptiske og vanligvis tilfeldig oppståtte kromosomavvik er en meget hyppig forekommende årsak til medfødte utviklingsforstyrrelser med mental retardasjon. Genomisk ubalanse forårsaket av slike avvik kan detekteres med komparativ genomisk hybridisering dersom delesjonen eller duplikasjonen er over 3–4 Mb. Den store fordelene med CGH er at alle deler av kromosomene blir undersøkt og at man kun trenger DNA fra pasienten til slik analyse. Når man i fremtiden kan anvende mer sensitiv matrise-CGH for å lete etter slike avvik, forventes det at vår evne til å finne årsaken til medfødte utviklingsavvik forbundet med mental retardasjon vil bli betydelig forbedret.

Litteratur

- Roeleveld N, Zielhuis GA, Gabreels F. The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev Med Child Neurol* 1997; 39: 125–32.
- Strømme P. Epidemiological, genetic and neurological aspects of mental retardation. A Norwegian population-based study of children born between 1980 and 1985. Doktoravhandling. Oslo: Universitetet i Oslo, 2000.
- Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a consensus conference. *Am J Med Genet* 1997; 72: 468–77.
- Flint J, Wilkie AO. The genetics of mental retardation. *Br Med Bull* 1996; 52: 453–64.
- Ørstavik KH. Psykisk utviklingshemning. *Tidsskr Nor Lægeforen* 1997; 117: 1438.
- Strømme P. Syndromer – riktig diagnose gir bedre oppfølging. *Tidsskr Nor Lægeforen* 1998; 118: 1539.
- Knight SJ, Flint J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 2000; 37: 401–9.
- Vries BBA, White SM, Knight SJL, Regan R, Homfray T, Young ID et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 2001; 38: 145–50.
- Brown J, Saracoglu K, Uhrig S, Speicher MR, Eils R, Kearney L. Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). *Nat Med* 2001; 7: 497–501.
- Veltman JA, Schoenmakers EFP, Eussen BH, Janssen I, Merckx G, van Cleef B et al. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1269–76.
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273: 494–7.
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996; 12: 368–75.
- Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Damer-Haas C, Apacik C et al. Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 448–62.
- Bezrookove V, Hansson K, van der Burg M, van der Smagt JJ, Hillhorst-Hofstee Y, Wiegant J et al. Individuals with abnormal phenotype and normal G-banding karyotype: improvement and limitations in the diagnosis by the use of 24-colour FISH. *Hum Genet* 2000; 106: 392–8.
- Lee C, Gisselsson D, Jin C, Nordgren A, Ferguson DO, Blennow E et al. Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1043–7.
- Rosenberg MJ, Vaske D, Killoran CE, Ning Y, Wargowski D, Hudgins L et al. Detection of chromosomal aberrations by a whole-genome microsatellite screen. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 419–27.
- Rio M, Molinari F, Heuertz S, Ozilou C, Gosset P, Raoul O et al. Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. *J Med Genet* 2002; 39: 266–70.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10: 231–43.
- Gray JW, Collins C. Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis* 2000; 21: 443–52.
- Breen CJ, Barton L, Carey A, Dunlop A, Glancy M, Hall K et al. Applications of comparative genomic hybridisation in constitutional chromosome studies. *J Med Genet* 1999; 36: 511–7.
- Rigola MA, Carrera M, Ribas I, De La Iglesia C, Mendez B, Egozcue J et al. Identification of two de novo partial trisomies by comparative genomic hybridization. *Clin Genet* 2001; 59: 106–10.
- Joly G, Lapierre J-M, Ozilou C, Gosset P, Aurias A, de Blois M-C et al. Comparative genomic hybridisation in mentally retarded patients with dysmorphic features and a normal karyotype. *Clin Genet* 2001; 60: 212–9.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundsteen C. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 1998; 31: 163–73.
- Ness GO, Lybæk H, Houge G. Usefulness of high-resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 2002; 113: 125–36.
- Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 2001; 38: 740–4.
- Antonarakis SE. BACKing up the promises. *Nat Genet* 2001; 27: 230–2.
- Snijders AM, Nowak N, Segreaves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J et al. Assembly of microarrays for genomewide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001; 29: 263–4.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20: 399–407.
- Pinkel D, Segreaves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20: 207–11.
- Stankiewicz P, Lupski JR. Molecular-evolutionary mechanisms for genomic disorders. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 312–9.