

Klinisk molekylærmedisin (1): Diagnostikk av større delesjoner og rearrangementer

Pål Rasmus Njølstad¹, Dagfinn Aarskog

*Seksjon for endokrinologi og metabolisme, Barneklubben, Haukeland sykehus,
5021 Bergen*

Innledning

De siste år har molekylærbiologien stått for en revolusjon innen diagnostikken av genetiske sykdommer (1-3). Tidligere ble en genetisk sykdom diagnostisert ved hjelp av kliniske undersøkelser og etterhvert også med biokjemiske analyser. Begge disse metodene er fortsatt aktuelle og viktige. Kliniske undersøkelser har imidlertid ofte lav spesifisitet, sensitivitet og reproduserbarhet. Biokjemisk diagnostikk kan kreve invasive prosedyrer og være kostbart, og det er begrensninger når det gjelder bærer- og prenatal diagnostikk.

Fortrinn

Molekylærbiologiske metoder kan ofte unngå disse problemene. Nå når hele det humane genomet er kartlagt, vil de fleste genetiske sykdommer etterhvert presist kunne diagnostiseres både hos syke individer og hos bærere av sykdommen. Molekylær diagnostikk har en høy spesifisitet, og dette tillater også screening i befolkningsgrupper. Sensitiviteten er også høy, selv om det er flere dominante sykdommer der man regner med at ca 5% kan ha en genmutasjon uten å få kliniske tegn til sykdom. Teknologisk har det også vært en revolusjon, og det

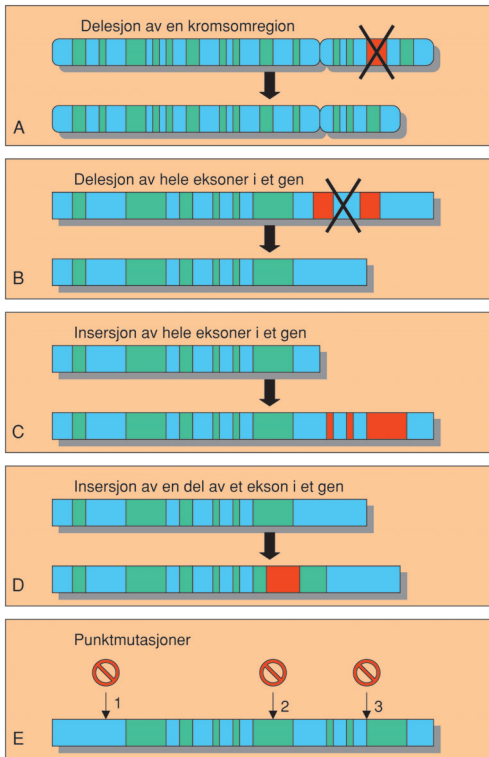
er nå er mulig relativt raskt og billig å gjøre detaljerte undersøkelser av hele gener.

Molekylærbiologisk diagnostikk har den fordel at det bare er nødvendig med en liten mengde DNA som kan ekstraheres fra perifere leukocytter, fibroblaster i kultur eller celler fra hud, hår og slimhinner. Det kan nevnes at HLA-typing kan foretas i materiale fra en børsteprøve av munnslimhinne. Fostervann eller morkakebiopsi tillater prenatal molekylærbiologisk diagnostikk.

Begrensninger

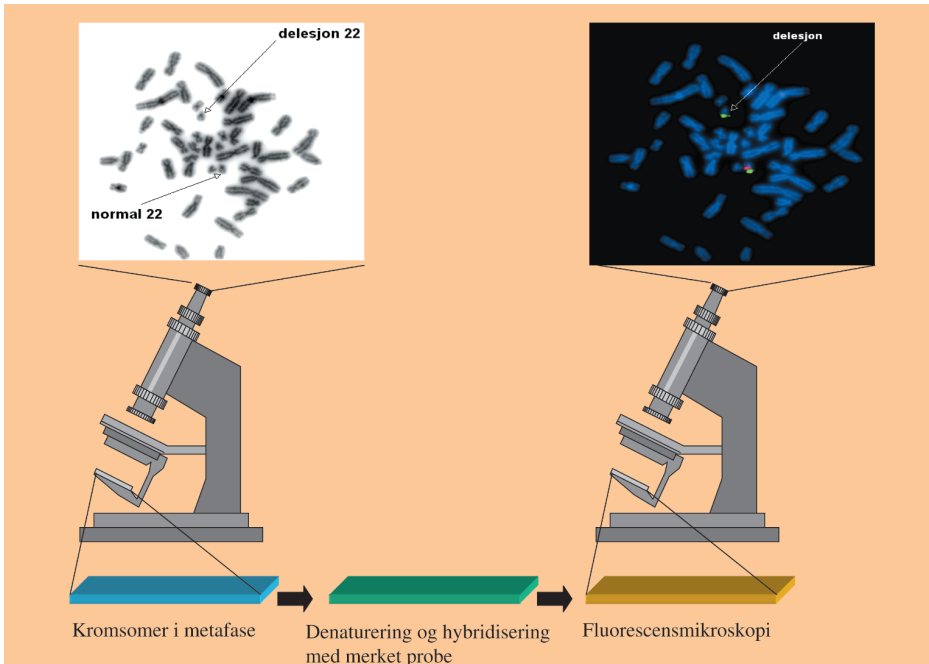
En begrensning i molekylærbiologisk diagnostikk er det store mangfold av genetiske forandringer som ligger til grunn for genetiske sykdommer. Thyreoideahormonresistens kan oppstå på grunn av en forandring i bare en nukleotidbase i DNA, ved Fraxil-X syndrom er 230-1000 basepar endret mens Downs syndrom skyldes at et helt kromosom er kommet i tillegg (4,5). Noen tilstander skyldes et fåtall endringer i DNA. Familiær hyperinsulinisme og hypoglykemi kan skyldes endringer i bare et lite antall nukleotider i glukokinase (6). For dersom det er genmutasjon i andre steder av genet, blir resultatet en helt annen sykdom, nemlig det omvendte – diabetes (7)! Føllings sykdom, derimot, kan skyldes minst 400 ulike mutasjoner i genet for fenylalaninhydroksylase (PAH) (8). For noen sykdommer kan man faktisk se at de fleste familiene har sine "private" mutasjoner. Denne store variabiliteten hindrer foreløpig at man kan benytte ett oppsett for molekylær diagnostikk av alle tilfeller. Bildet kompliseres ytterligere ved at det finnes tilfel-

¹: Korrespondanse til:
Professor Pål Rasmus Njølstad
Barneklubben
Haukeland sykehus
5021 Bergen
Tlf. 55975153
Fax. 55975147
E-post: pal.njolstad@haukeland.no



Figur 1: Ulike typer genetiske forandringer som kan forårsake arvelige endokrine sykdommer.

Dersom en kromosomregion er deletert, vil mange tusen gener kunne være fjernet. Resultatet blir derfor syndromer med affeksjon av multiple organer. Contiguous gene syndromes, mikrodelsjonssyndomer, skyldes også delesjon av en rekke gener, men delesjonene er mindre omfattende og forandringene er ikke synlige ved vanlig karyotyping (A). Delesjoner av hele eksoner (grønne eller røde) kan medføre at avlesningen av genet blir stoppet dersom neste ekson får en annen leseramme. Genproduktet blir avkortet. Dersom samme leseramme opprettholdes, vil avlesningen av neste ekson kunne fortsette. Genproduktet får en mindre grad av reduksjon (B). Duplikasjon av en del av et gen vil kunne resultere i økt størrelse på genproduktet dersom leserammen opprettholdes, eller et kortere genprodukt dersom leserammen forstyrres (C). Inserksjon av DNA fra en annen del av genomet, fører vanligvis til redusert størrelse på genproduktet på grunn av forstyrret leseramme (D). Punktmutasjoner kan være enkeltbaseforandringer eller mindre inserksjoner eller delesjoner i ulike steder av et gen (E). Dersom mutasjonen finnes i promoterregionen (1), vil uttrykkningen av genet forandres. Sitter mutasjonen inne i et ekson (2), kan den korresponderende aminosyren være uendret eller bli endret. Stopp i avlesningen av genet kan også være resultatet. Mutasjon i overgangen mellom intron (blått) og ekson kan føre til endret spleising og dermed endret genprodukt (3).



Figur 2

Figur 2: Fluorescens in situ hybridisering (FISH)

Ved FISH er det nødvendig å vite sekvensen i området for et locus som er av interesse. Ut fra kjente DNA-sekvenser syntetiseres en DNA-probe som merkes med et fluoriserende fargestoff. Kromosomer i metafase fikseres til et mikroskopisk objektglass, og kromosomene denatureres. Merket probe tilsettes, og denne hybridiserer med komplementære sekvenser i kromosomene. Fluoriserende lys medfører at området som proben festes til lyser opp. Tilfellet her viser et kromosompreparat fra en nyfødt gutt med alvorlig hjertefeil og dysmorphe trekk. FISH viser at bare det ene allelet på kromosom 22q11 lyser opp, slik at pasienten har en delesjon av dette området (rødt). Som kontroll for at undersøkelsen er teknisk vellykket, er det også tilsatt en kontrollprobe som lyser opp på begge kromosomene (grønt). FISH-analysen er utført av ingeniør Pål Borge og overlege Gunnar Houge, Senter for medisinsk genetikk og molekylærmedisin, Haukeland Sykehus.

Her der en sykdom kan skyldes mutasjon i ulike gener. Et eksempel på dette er kraniosynostosesyndromet Pfeiffer syndrom. Mutasjoner i både fibroblast vekstfaktorreseptor-1 og fibroblast vekstfaktorreseptor-2 kan forårsake denne tilstanden (9).

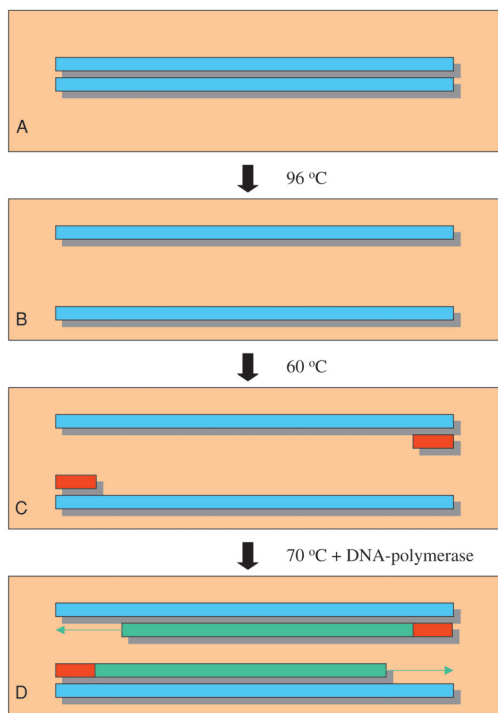
Kromosomale forandringer

Standard kromosomanalyse er i dag mer sensitiv enn tidligere, slik at det er mulig å oppdage relativt sett mindre delesjoner for eksempel ved undersøkelse av kromosomer i metafase. Oppløseligheten er omtrent 5-7 millioner basepar

(Mb). Ved fluorescens in situ hybridisering (FISH)-teknikk, som er tidligere er omtalt i *Pediatrik endokrinologi* (9), øker oppløseligheten til 1-5 Mb (Figur 1). Dermed kan såkalte mikrodelesjonssyndromer påvises (Figur 2). Dette er imidlertid ingen screening, fordi DNA-sekvensen rundt mikrodelesjonen må være kjent slik at det kan lages et DNA-primersett som benyttes til FISH-analysen. Ved rekvisisjon av slike analyser må derfor problemstilling og tentativ diagnose oppgis.

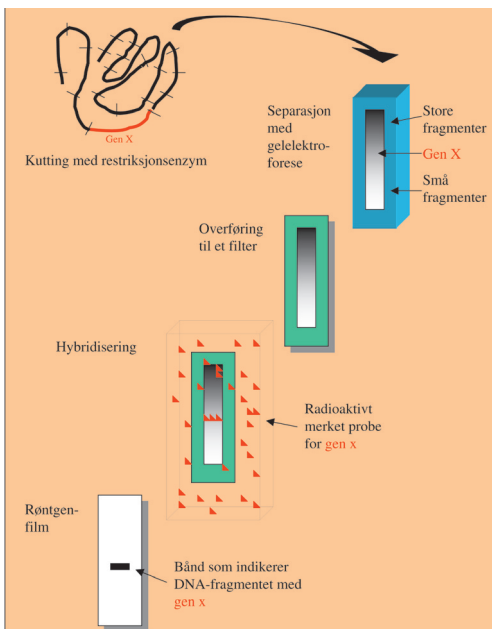
Store delesjoner

Gener som ikke er kjønnsbundet, finnes som to kopier. Selv om et helt gen er deletert, noe som er en stor forandring, kan dette faktisk være vanskelig å detektere siden det normale genet vil kunne maskere bortfall av den andre kopien. Dersom analysen er utført slik at et gen representeres med et bånd på en agarosegel (PCR-analyse, se figur 3), vil det kunne foreligge forskjell i intensitet slik at man kan få



Figur 3: Prinsippet for polymerasekjedereaksjonen (PCR).

Templatet for reaksjonen er dobbeltrådig DNA (A) som smeltes ved 96 °C til enkelttrådig DNA (B). Kunstig syntetiserte oligonukleotider eller primere (røde i figuren) fester seg (hybridiserer) til komplementære sekvenser i templat-DNA ved lavere men likevel stringent temperatur. Denne prosessen kalles annealing (C). Temperaturen heves til optimal temperatur for termostabil taq DNA-polymerase. Denne fyller inn ny DNA komplementær til det originale templat-DNA, noe som benevnes elongering (D). Prosessen gjentas så 30-40 ganger.

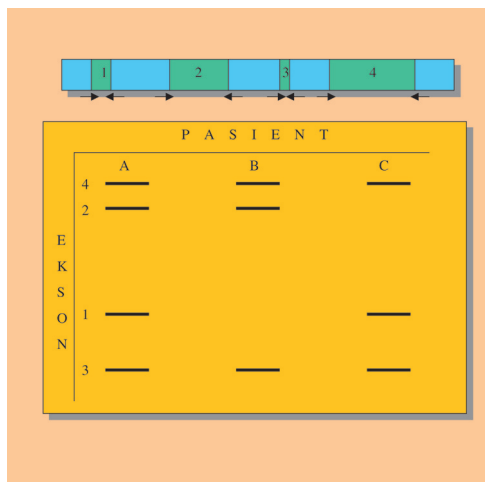


Figur 4: Southern blot.

Teknikken tillater deteksjon av et spesifikt, genomisk DNA-fragment (gen x) i en blanding av millioner av DNA-fragmenter. DNA kuttes med spesielle enzymer (restriksjonsenzymer) og DNA-fragmentene separeres ved hjelp av gelelektroforese (blått). DNA overføres til et filter (grønt), og radioaktivt merket probe (rødt) for det aktuelle genet tilsettes. Proben vil hybridisere til komplementære sekvenser i DNA på filteret (rødt bånd). Dette vil ikke være synlig. Det legges derfor på en røntgenfilm følsom for radioaktive isotoper. Et bånd svarende til DNA-fragmentet som inneholder gen x, vil opptre på filmen som et svart bånd.

mistanke om at det bare er en genkopi tilstede sammenlignet med et normalt mønster som i teorien skal være dobbelt så intenst. Det er likevel ikke alltid lett å tolke og derfor usikkert i diagnostikken. Derfor brukes en metode der DNA kuttes med spesielle enzymer (restriksjonsenzymer). Fragmentene skilles ved elektroforese og bånd visualiseres med radioaktivt sensitiv film (Southern blot, se figur 4). Ved denne metoden kan man bestemme om det foreligger kun en genkopi ved ikke-kjønnsbundne sykdommer.

Ved kjønnsbunden arv er det enklere. Dersom genet er lokalisert for eksempel til X-kromosomet, vil bortfall av et helt gen lett kunne



Figur 5: Multiplex PCR.

Eksemplet viser prinsippet for multiplex PCR hos pasienter med X-bunden arv. Eksone 1, 2, 3 og 4 amplifiseres i samme reaksjon (grønt i figuren). Produktene separeres i henhold til størrelse med gelelektroforese. Hvert ekson representeres med et bånd på gelen. De korteste fragmentene vandrer raskest i gelen og finnes lengst nede i figuren. Dersom et ekson er deletert, vil et bånd mangle. Pasient A har alle eksone, mens pasient B mangler ekson 1 og pasient C mangler ekson 2.

påvises fordi det ikke finnes en annen kopi av genet. Både ved PCR og Southern blot, vil det ikke kunne påvises noe bånd. Tilsvarende gjelder for delesjon av eksone innen et gen. Figur 5 viser hvordan multiplex PCR lett kan påvise delesjoner av eksone i X-koblede gener hos menn. Ved multiplex PCR kjøres mange enkelte PCR-reaksjoner samtidig. Det lages DNA-primersett som hvert korresponderer til de ulike eksone i et gen. Disse kombineres så i en og samme PCR-reaksjon slik at alle eksone amplifiseres samtidig. På denne måten kan man raskere og billigere samtidig analysere alle eksone i ett gen. Slik analyse tar bare et par dager å utføre. Dersom et X-bundet gen undersøkes, vil en delesjon av et helt ekson detekteres ved manglete PCR-produkt for det aktuelle ekson. Omtrent 2/3 av mutasjonene i dystrofin-genet skyldes større delesjoner og kan detekteres ved denne teknikken (10). Dystrofin-genet har 79 eksone, og ved to sett multiplex PCR-oppsett klarer man å detektere ca

95% av de større delesjonene. Dette viser hvor effektivt multipleks PCR er. For de resterende 1/3 av mutasjonene i dystrofingenet, må andre og mer sensitive undersøkelser benyttes (11). Slike teknikker omtales i et senere numre av *Pediatrik endokrinologi*. Multipleks PCR er

også optimalisert til å kunne detektere delesjoner eller insersjoner som er mye mindre, helt ned til enkeltbaser, og benyttes ved diagnostikken av for eksempel brystkreftgener (BRCA1-genet, H Boman, personlig meddelelse).

Referanser

1. Christensen B, Berg K. Molekylærbiologisk diagnostikk av arvelige stoffskiftesykdommer. *Tidsskr Nor Lægeforen* 1998;118:1737-42.
2. Eiken HG, Børresen-Dale AL. Molekylærgenetiske sykdommer: teknologi for å detektere mutasjoner i DNA. *Tidsskr Nor Lægeforen* 1998;118:1730-6.
3. Korf B. Molecular medicine: molecular diagnosis. *N Engl J Med* 1995;332:1218-20.
4. Chatterjee VK. Resistance to thyroid hormone. *Horm Res* 1997;48 Suppl 4:43-6.
5. Warren ST, Nelson DL. Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. *JAMA* 1994;271:536-42.
6. Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, Buchs A, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA, Matschinsky FM, Herold KC. Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med* 1998;338:226-30.
7. Njølstad PR, Søvik O, Cuesta-Muñoz A, Bjørkhaug L, Massa O, Barbetti F, Undlien DE, Shiota C, Magnuson MA, Molven A, Matschinsky FM, Bell GI. Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *N Engl J Med* 2001;344:1588-92.
8. Scriver CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 1999;15:267-72.
9. Aarskog D, Njølstad PR, Bjerknes R. Klinisk dysmorfologi: En oversikt. *Pediatrik Endokrinologi* 2000;14:29-37.
10. van Essen AJ, Kneppers AL, van der Hout AH, Scheffer H, Ginjaar IB, ten Kate LP, van Ommen GJ, Buys CH, Bakker E. The clinical and molecular genetic approach to Duchenne and Becker muscular dystrophy: an updated protocol. *J Med Genet* 1997;34:805-12.
11. Mendell JR, Buzin CH, Feng J, Yan J, Serrano C, Sangani DS, Wall C, Prior TW, Sommer SS. Diagnosis of Duchenne dystrophy by enhanced detection of small mutations. *Neurology* 2001;57:645-50.