

## Klinisk molekylærmedisin (4): Indirekte diagnostikk ved koblingsanalyser

Pål Rasmus Njølstad<sup>1,2,3</sup>, Jørn V. Sagen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Seksjon for pediatri, Institutt for klinisk medisin og molekylærmedisin, Universitetet i Bergen;

<sup>2</sup>Seksjon for endokrinologi og metabolisme, Barneklivnikken, Haukeland Universitetssykehus, 5021 Bergen

### Innledning

Tidligere i temaserien har vi omtalt diagnostikk av patogene mutasjoner der en forutsetning har vært at denne kan undersøkes direkte (1,2,3). Hva med familier som har en arvelig sykdom men der mutasjonen ikke er kjent? Dersom genet er klonet eller lokalisert ved genetisk kartlegging, kan genetisk diagnostikk i begrenset omfang gjøres med koblingsanalyser. Et viktig verktøy i disse analysene er genetiske markører (4,5).

### Genetiske markører: DNA-repetisjoner

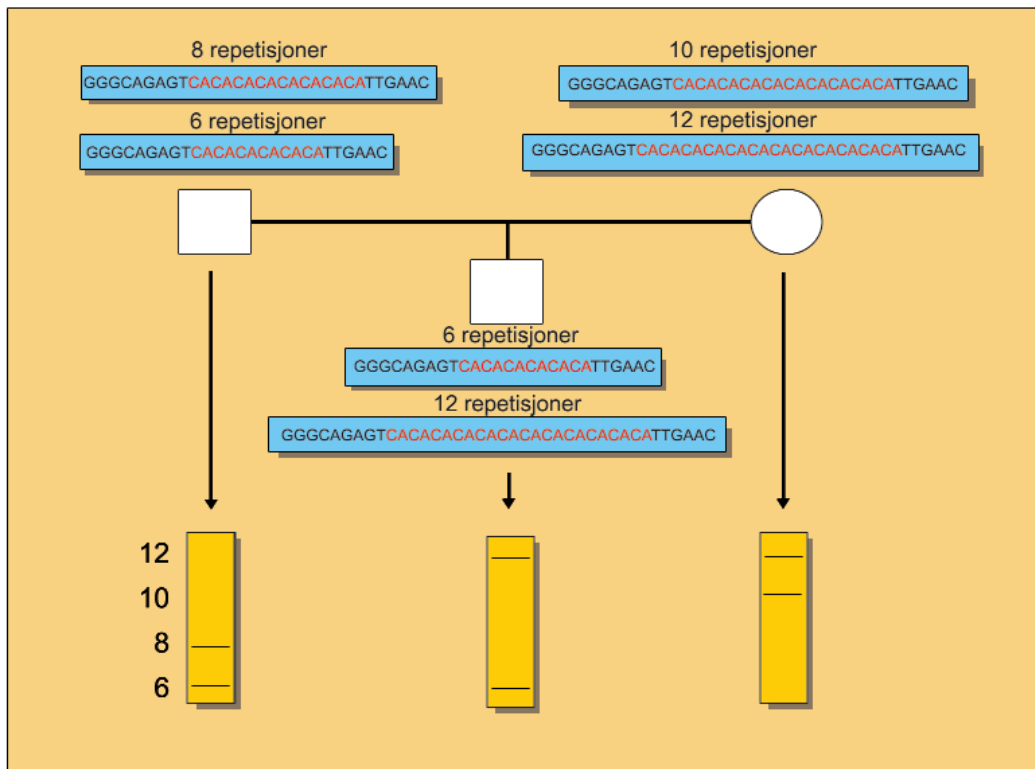
Det humane genomet inneholder en rekke nukleotidsekvenser som er repetert fra noen få til mange tusen ganger. Disse repeterte DNA-sekvensene varierer i størrelse og kompleksitet fra noen få basepar til hele gener. En spesiell

gruppe repeterte sekvenser er de som forekommer i serier, eller i tandem. Disse består av to til fem basepar som reiteres fra noen få til omtrent 50 ganger. Den vanligste benevnes "simple tandem repeats" (STR) og består av to basepar, A og C, på den ene DNA-tråden (og følgelig T og G på den andre). Dette repeterte elementet forekommer trolig 50-100.000 steder i genomet. Siden de autosome kromosomene forekommer som par, finnes det to sett av de repeterte elementene. Ofte varierer antallet kopier (som gir ulik lengde) av det repeterte elementet på de to kromosomene slik at det kan oppstå heterozygositet for antallet kopier (Figur 1).

Dinukleotid-repetisjoner er en rik kilde til genetisk variasjon i det humane genomet, og de kan lett påvises ved hjelp av PCR. Disse repetisjonene, eller markørene, brukes til å konstruere genetiske kart der genesens posisjon kan bestemmes. Slike kart finnes hos flere store organisasjoner, som for eksempel Genethon laboratories, National Center for Biological Information og Marshfield Laboratories, og er offentlig tilgjengelig (6-9). Kartene kan være til hjelp for genetikere og forskere til for eksempel å lokalisere og isolere sykdomsgener.

De genetiske markørkartene kan også brukes til diagnostikk (10). Dersom to markører nesten alltid nedarves sammen, sies de å være tett koblet.

<sup>3</sup>: Korrespondanse til:  
Professor Pål Rasmus Njølstad  
Barneklivnikken  
Haukeland Universitetssykehus  
5021 Bergen  
Tlf. 55975153  
Fax. 55975147  
E-post: pal.njolstad@helse-bergen.no



**Figur 1**

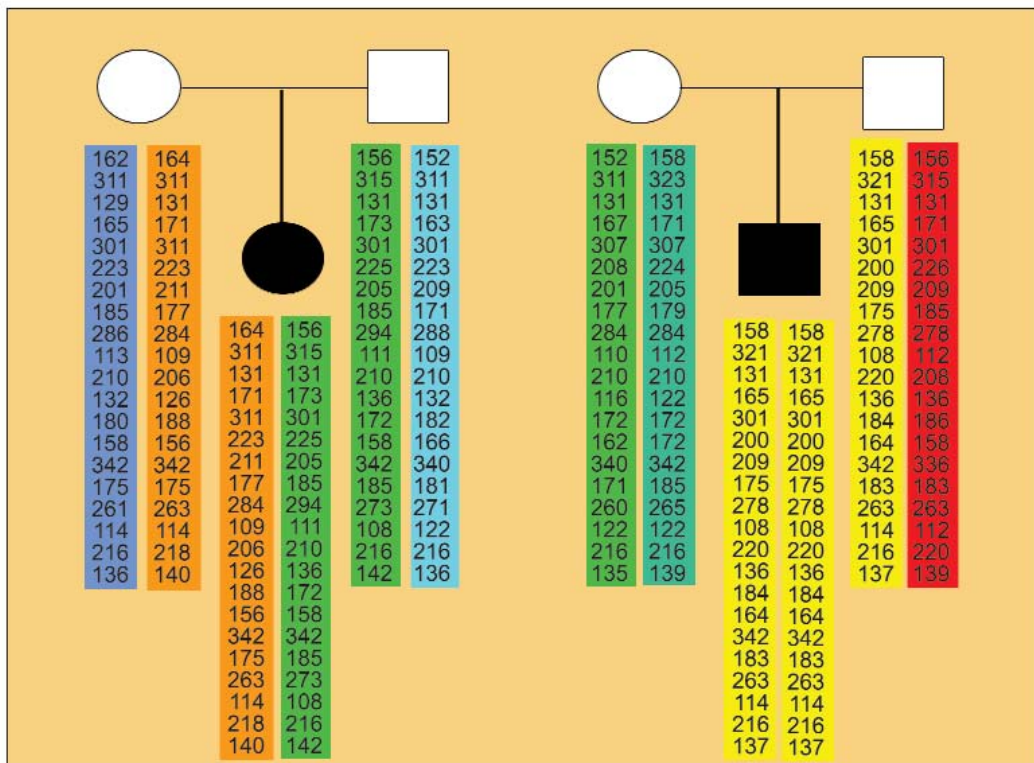
Prinsippet for bruk av dinukleotid-repetisjoner som markører i koblingsanalyser. Vi har to av hvert kromosom slik at gener, alleler og markører vil forekomme i to kopier. Normalt arves den ene kopien fra mor og den andre kopien fra far. Figuren viser en dinukleotid, CA, som i dette tilfellet repeteres fra seks til 12 ganger på kromosom-parene. Alle er heterozygote for markøren. Far sine to kopier av kromosomområdet har henholdsvis seks og åtte CA-repetisjoner, mens mor har 10 og 12. Barnet har arvet området med seks repetisjoner fra far og 12 repetisjoner fra mor. Ved hjelp av PCR og elektroforese, kan de fire ulike størrelsene visualiseres som bånd. Slik kan det avleses hvor mange repetisjoner barn, far og mor har og man ser at nedarvingen er Mendelsk.

Dette prinsippet benyttes ved diagnostikk ved hjelp av koblingsanalyser. Markører som er tett koblet eller er i nærheten av et aktuelt kandidatgen, types ved hjelp av PCR, og det etableres et kart over familien (Figur 2 og 3).

Dersom en (eller flere) markør(er) viser samme mønster hos de syke, men ikke de friske, er det ko-segregering mellom markør (genotype) og sykdom (fenotype). Dette betyr at det er tett kobling mellom markør og sykdom kan benyttes til diagnostikk (Figur 3).

## Problemer ved koblingsanalyser

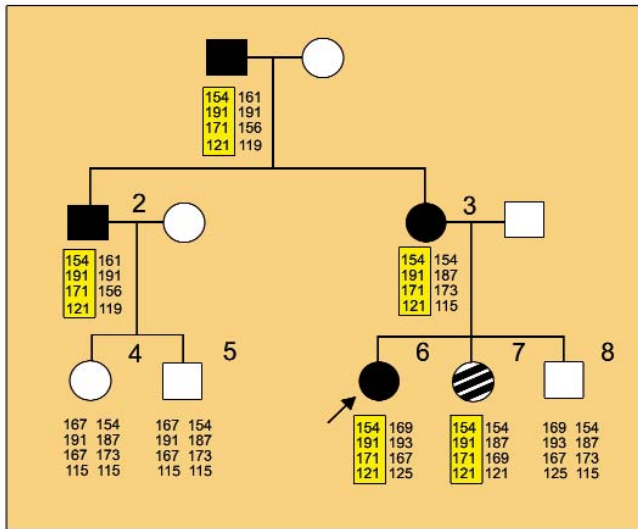
Koblingsanalyser kan bare benyttes dersom det er tilgjengelig familiemedlemmer fra minst to generasjoner. Studiene krever oftest inngående analyser av familien for å finne markører som er informative (foreldre må være heterozygote). Det er ikke mulig å bruke familier med bare ett affisert medlem eller der slektninger er utilgjengelige for eksempel ved at de ikke vil la seg teste.



**Figur 2**

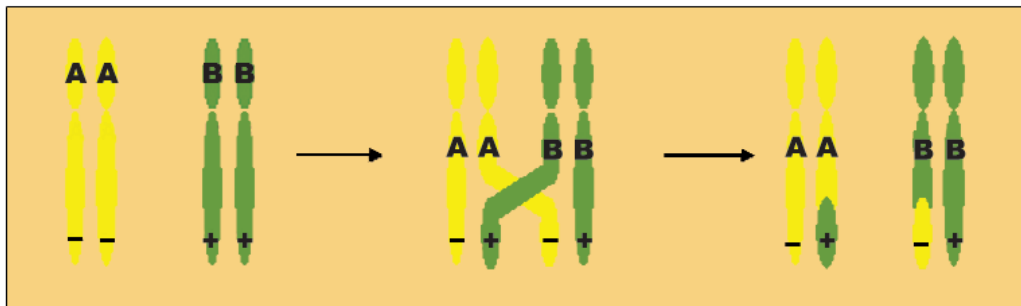
Bruk av markøranalyse ved nyfødt diabetes. Begge barna (sorte symboler) hadde neonatal diabetes. Foreldrene er illustrert med hvite symboler og har ikke diabetes. Barnet til venstre i panelet utviklet permanent diabetes med insulinbehov, mens barnet til høyre hadde transient diabetes. Det er brukt 20 markører som fordeler seg over hele kromosom 6. Markørene er sortert og det er etablert haplotyper som passer med Mendelsk arv. Det er ikke tegn til overkryssing. Vi ser at barnet med permanent diabetes er heterozygot og har arvet en kopi av kromosom 6 fra mor (orange) og en fra far (grønn). Barnet med transient diabetes, derimot, er homozygot og har arvet begge kopiene av kromosom 6 fra far. Dette kalles uniparental disomi for kromosom 6 og er assosiert med transient neonatal diabetes. Overlege Hæreid, St. Olavs Hospital, Trondheim takkes for henvisning av pasient med transient neonatal diabetes.

To forhold kan gi problemer med tolkingen i koblingsanalyser. Det første er genetisk rekombinasjon eller overkryssing (Figur 4). Dette er utveksling av genmateriale mellom de to kromosomparene under meiosen. Overkryssing skjer oftere på visse områder i genomet. Dersom hypotesen av overkryssing mellom markør og sykdomsgen er kjent, kan dette inkluderes i koblingsanalysene for estimering av risiko. Det andre problemet er genetisk heterogenitet som betyr at mer enn ett genlokus kan være årsak til samme sykdom i ulike familier.



**Figur 3**

Koblingsanalyser brukt i en familie med autosomal dominant arvelig diabetes. Haplotype er bestemt ved hjelp av hepatocyt nukleær faktor (HNF)-1alfa eller MODY3-genet. Hos pasientene med sorte eller skraverte symboler (sort betyr diabetes, skravert er nedsatt glukosetoleranse) ser man at alle de syke har samme haplotype (gul) mens de friske har ikke denne haplotypen. Dette betyr at sykdomslokus og genområdet, som er bestemt av haplotypen, er tett koblet. Det er ko-segregering mellom genotype (haplotype) og fenotype (diabetes). Uten å kjenne mutasjonen i genet, kan man således ved hjelp av koblingsanalyse med dinukleotid -markører finne de som er eller vil bli syke i denne familien. DNA-sekvensering bekreftet seinere at familien hadde en mutasjon i MODY3-genet (11).



**Figur 4**

Overkryssing (rekombinasjon) av genmateriale mellom to kromosomer. Fenomenet forekommer under meiosen (kjønnselledingen). Overkryssning skjer oftere på helt bestemte steder i arvematerialet. Vi ser at sykdomsgenet + flyttes fra en genstreng (grønn) som inneholder markøren B til genstrengen (gul) med markøren A. Dette kan gi problemer med diagnose på basis av koblingsanalyse. Presis genetisk testing kan likevel beregnes dersom hyppigheten av overkryssning mellom markør og sykdomsgen er kjent.

## Referanser

1. Njølstad PR, Aarskog D. Klinisk molekylærmedisin (1): Diagnostikk av større delesjoner og rearrangementer. *Pediatriisk Endokrinologi* 2001;15:61-5.
2. Njølstad PR. Klinisk molekylærmedisin (2): Molekylær diagnostikk av mindre mutasjoner. *Pediatriisk Endokrinologi* 2002;16 :23-6.
3. Ræder H, Ræder M, Njølstad PR. Klinisk molekylærmedisin (3): DNA-sekvensering. *Pediatriisk Endokrinologi* 2002;16 :51-6.
4. Korf B. Molecular diagnosis (2). *N Engl J Med* 1995;332:1499-1502.
5. Sutherland GR, Richards RI. DNA repeats: A treasury of human variation. *N Engl J Med* 1994;331: 191-3.
6. <http://www.marshfieldclinic.org>
7. <http://www.genethon.org>
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
9. <http://www-ls.lanl.gov/HGhotlist.html>
10. Burke W. Genetic testing. *N Engl J Med* 2002;347:1867-75.
11. Bjørkhaug L, Sagen JV, Thorsby P, Søvik O, Molven A, Njølstad PR Hepatocyte nuclear factor-1 alpha - gene mutations and diabetes in Norway. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:920-31.