

Array-CGH på OUH

Efter 1 år er der undersøgt 236 patienter og fundet 114 med kromosomafvigelser

Pr. 1. november 2010 hjemtog Klinisk Genetisk Afdeling på OUH en ny analyse til at undersøge børn, som er psykisk-, motorisk-, eller mentalt forsinkede.

Denne analyse hedder array-Comparativ Genomisk Hybridisering, i daglig tale array-CGH. Med denne analyse screenes genomet for variationer i antallet af kopier, og det betyder, at der undersøges for ubalancerede kromosomafvigelser, hvor der enten er deleteret eller duplikeret genetisk materiale.

Efter 1 år er der blevet undersøgt 236 patienter, hvor der er fundet 114 patienter med kromosomafvigelser, som er fundet egnet til yderligere udredning.

Kandidater til en array-CGH-analyse

Lige nu analyseres primært børn, som er psykisk-, motorisk-, eller mentalt forsinkede og eventuelt også har adfærdsforstyrrelser, såsom autisme, eller har misdannelser/dysmorfe træk. Nogle børn med epilepsi analyseres også.

Patienten ses af en børnelæge, som vurderer, om nogle af de sygdomme/vanskeligheder, patienterne har, er kendte og kan kobles til en sygdom eller et syndrom som fx Prader-Willi/Angelmann-syndrom. I disse tilfælde undersøges patienten primært for det.

Hvis sygdommene/vanskelighederne ikke falder ind under i forvejen kendte syndromer/sygdomme, kan man foretage en array-CGH-analyse, hvor man undersøger hele genomet for kopianal-variationer.

Mange af de genetiske ændringer, der findes ved en array-CGH-analyse, er sjældent/aldrig set før og gør det vanskeligt at vurdere, om resultatet af analysen er årsag til patientens sygdom/vanskeligheder. Det beskrives senere i artiklen, hvordan man forsøger at sammenholde resultatet med patientens sygdom/vanskeligheder.



Flemming Holm Bergholdt //
Bioanalytiker
Klinisk Genetisk Afdeling
Odense Universitetshospital

Baggrund

Før array-CGH-analysen fandtes, blev disse patienter undersøgt med en kromosomanalyse evt. suppleret med en FISH-analyse. I familier, hvor der var/er ophobning af mental retardering, havde man en stærk mistanke om, at det kunne skyldes genetiske faktorer. Derfor sendte man prøverne til Rigshospitalet, hvor man anvendte en "udvidet" kromosomundersøgelse kaldet CGH – forløberen til array-CGH.

Sidenhen fik Rigshospitalet array-CGH analysen, og det blev hurtigt den foretrukne analyse.

Detektionsgrænsen for deletioner/amplifikationer på kromosomanalyse er ca. 5 Mb – i bedste fald 3 Mb og i værste fald 10 Mb. Detektionsgrænsen er afhængig af, hvor på kromosomet ændringen sidder, og hvordan ændringen sidder i forhold til båndtegninger. Det betyder, at man kan overse større ændringer, fordi disse kan sidde et sted, hvor de ikke er tydelige. Og derved er der nogle patienter, som aldrig har fået en diagnose baseret på denne teknik.

Fordelene ved kromosomanalysen er, at man kan se balancerede og ubalancerede translokationer, inversioner og polyploidier (se "parlørr"), hvis disse ændringer er store nok.

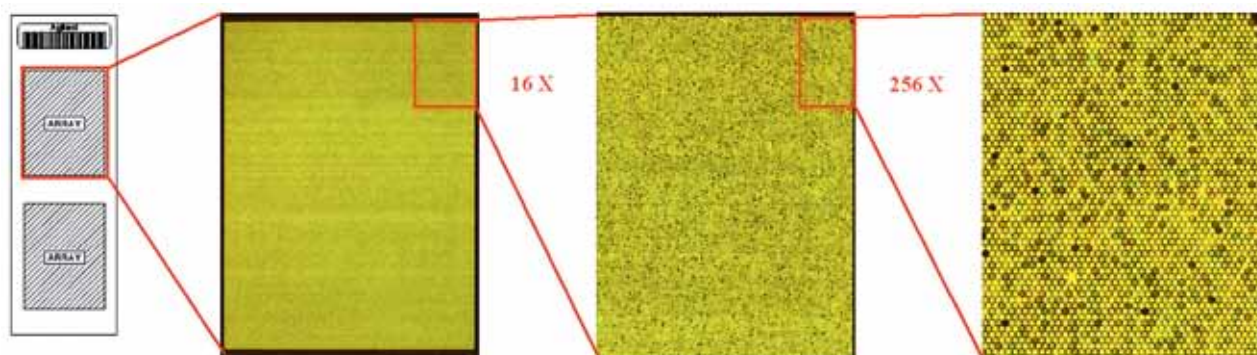
Detektionsgrænsen ved array-CGH er ret lav. Den er afhængig af typen af array, og hvilke grænser for rapportering der anvendes. I vores patienter gennem det første år har vi set ændringer på 25 kb, som inden for array-CGH-verdenen er meget små ændringer.

Fordelen ved array-CGH er evnen til samtidigt at undersøge for aneuploidier, deletioner, duplikationer, ubalancerede kromosomafvigelser og meget høj opløselighed.

Ulemper ved denne teknik er, at den ikke er velegnet til at detektere mosaikker, balancerede strukturelle kromosomafvigelser eller polyploidier. Dette er, fordi metoden primært kan anvendes til at bestemme antallet af kopier, hvor det normale er 2 kopier for hvert kromosom.

Udførelse af array-CGH

Til analysen anvendes arvemateriale (DNA) fra to personer: patienten og en reference. I al sin enkelhed går teknikken ud på at indmærke hvert genom med hvert sit fluorescerende farvestof. Herefter skal de indmærkede genomer "konkurrere" om at hybridisere til små stykker DNA. Disse små stykker DNA er 60 baser lange og kaldes prober. Proberne er hæftet til et objektglas, placeret i 2 arrays. I hvert array sidder der 400.000 prober. På hvert objektglas kan vi køre to patienter. De



400.000 prober dækker hele genomet med en gennemsnitlig afstand mellem proberne på ca. 7.000 basepar. Se fig. 1.

DNA oprenses, for de fleste patienter, fra en blodprøve. Derudover skal man anvende reference-DNA. Reference-DNA'et er kommercielt tilgængeligt DNA, som indeholder DNA fra 6 forskellige personer. Disse personer er donorer og fænotypisk normale. Man kan købe reference-DNA med DNA fra enten kvinder eller mænd.

Reference-DNA'et er nødvendigt, da der foretages en komparativ analyse, hvor patienten sammenlignes med "normalt" DNA.

DNA fra både patient og reference klippes i små stykker med 2 enzymer, som skærer bestemte steder på genomet. Efter enzymkløvning er DNA'et klippet i stykker på 200-500 basepar.

DNA'et fra patienten bliver derefter mærket med et fluorescerende farvestof, Cy5. DNA fra referencen bliver mærket med et andet farvestof, Cy3. Disse farvestoffer er koblet til et molekyle, dUTP (2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate), som kan indbygges i DNA. Indmærkning med disse farvestoffer foregår ved, at man foretager en lille opformering af DNA'et, og derved indbygges farvestoffet i DNA'et.

Det mærkede DNA fra både patient og reference blandes, herefter denatureres DNA'et og pipetteres på et array. Når DNA denatureres, går det fra at være dobbeltstrenget til enkeltstrenget. Enkeltstrenget DNA vil altid forsøge at binde sig til sin komplementærsekvens for at danne det stabile dobbeltstrengede DNA-molekyle. Dette kaldes for annealing og er den egenskab, man udnytter på arrayet. DNA-fragmenterne vil forsøge at anneale til de bundne prober på arrayet. Temperaturen sikrer, at de stykker, der annealer, passer fuldstændigt med hinanden. Hvis temperaturen er for lav, kan DNA-strengene anneale uspecifikt, uden at affiniteten er særlig høj, derfor hybridiseres ved 65 °C.

Efter 40 timers hybridisering bliver arrayene vasket. Her vasker man det materiale af, som ikke er bundet til proberne på arrayet. Herefter scannes slidene, og signalet overføres til en computer. Data kobles til producentens informationer om probernes placering i genomet og deres placering på sliden.

I computeren beregnes ratioen af intensiteten af fluorescenssignalet mellem prøverne (patient og reference).

Denne ratio beregnes for samtlige 400.000 prober, som findes på arrayet. Se fig. 2 for oversigt over proceduren.

FIGUR 1 viser, hvor tæt proberne sidder. Det er først ved 256 x zoom, at man kan skelne de enkelte probe-spots.

Svar/resultat

Tolkningen af resultaterne er vanskelig. Vi har alle kopiantalvariationer i vores genom, og de fleste af de ændringer, vi observerer hos patienter, er normale varianter.

Ved tolkning af resultaterne undersøger man, om der er forskel mellem patient og reference.

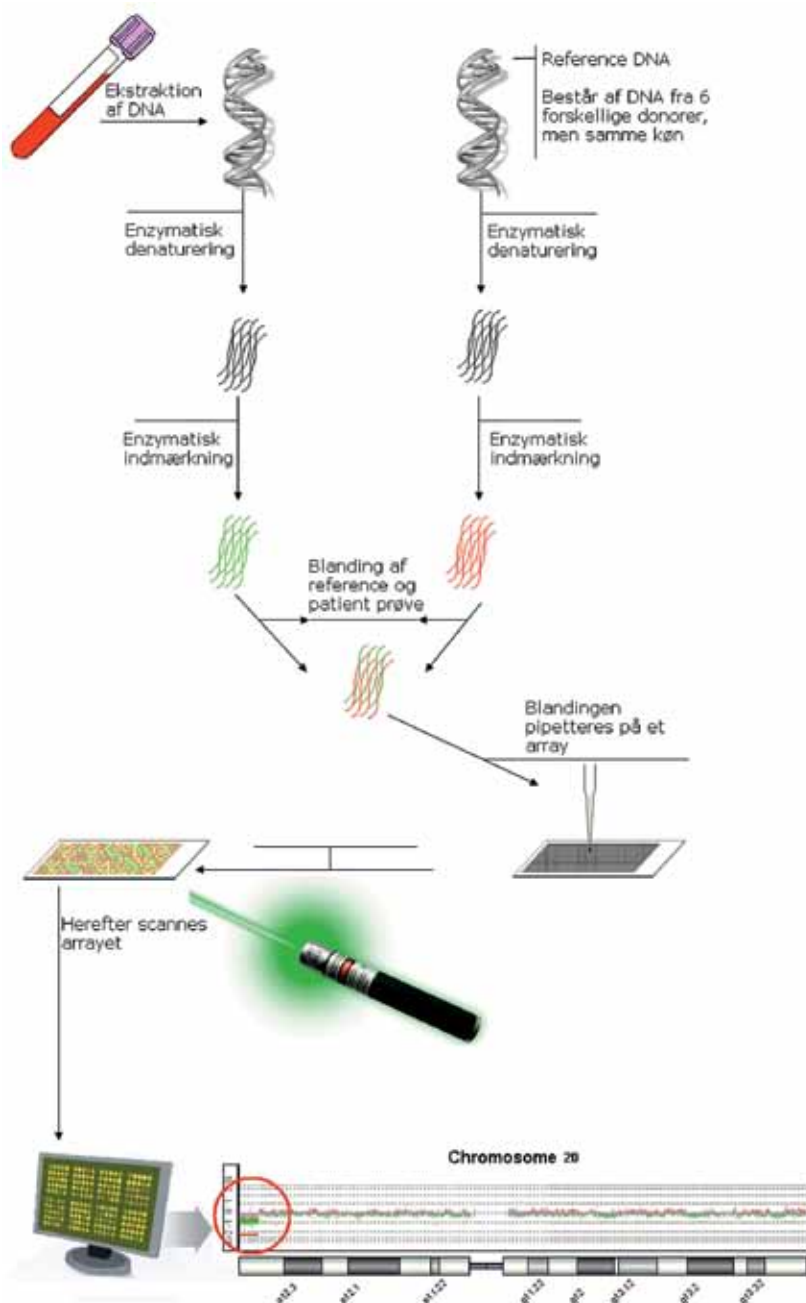
Det vil sige, at enten har patienten for meget eller for lidt materiale i forhold til referencen.

De ændringer/områder med kopiantalvariationer, som findes ved array-CGH-analysen, bliver vurderet. Størrelsen på ændringen vurderes, da den potentielt i sig selv kan være betydende for, om et område er sygdomsfremkaldende eller ej. Det vurderes, om ændringerne ligger i områder, der i forvejen er hypervariable, da dette vil sænke sandsynligheden for, at ændringerne er sygdomsfremkaldende og i stedet blot er normale variationer i befolkningen. Der noteres også, om der er gener til stede i ændringen eller i umiddelbar nærhed, da dette højner sandsynligheden for, at ændringerne er sygdomsfremkaldende.

Når resultaterne er analyseret, og der er fundet ændringer, der kandidater som årsag til patientens sygdom/vanskeligheder, vil man undersøge, om der findes fortilfælde, som kan give en forklaring. Dette gøres ved at søge i litteraturen efter casestudies, artikler o.a. Der søges også i en international database (Decipher), hvor der er samlet et kæmpe materiale af resultater fra array-CGH-analyser på patienter med lignende sygdomme verden over.

I databasen står ofte beskrevet patientens symptomer/karakteristika, og om ændringen er nedarvet eller nyopstået. Ydermere anvendes data fra litteraturen, hvor det forsøges at finde artikler, der kan beskrive betydningen af de ændringer, der ses.

Da det er et ret tidskrævende arbejde, kan der gå helt op til 6 uger, før der kommer et svar på en array-CGH-analyse.



FIGUR 2 Resultatet af scanningen overføres til en pc. Her beregnes data og kobles til producentens informationer om probernes placering i genomet og deres placering på arrayet. På pc'en bliver der genereret et billede af hele genomet, kromosom for kromosom. Herefter kan man tjekke kromosomerne for ændringer. Ændringerne kan bestå af duplikationer eller deletioner, i det ovenstående tilfælde en deletion.

Verificering

Når man har fundet nogle ændringer, der kan være årsag til patientens sygdom/vanskeligheder, skal disse verificeres. Man skal også bestemme, om det er en nyopstået ændring, eller om den er nedarvet fra en af forældrene. Og det gøres ved at analysere forældrene med.

På OUH anvendes en analyse, der hedder MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) til verificering. MLPA er en ligerings PCR-metode, der anvendes til at undersøge kopi-varianter i genomisk DNA eller RNA. Der designes en probe, som er rettet specifikt mod det område, som enten er fundet deleteret eller duplikeret ved array-CGH, eller der anvendes et af de MLPA-kits, der er kommercielt tilgængelige i forvejen, hvor muligt.

Samtidig undersøges forældrene. Dette gøres for at undersøge, om ændringen er nedarvet, eller om den er nyopstået.

Hvis ændringen er nyopstået og altså ikke nedarvet fra forældrene, kan det konkluderes, at det med stor sandsynlighed er den ændring, der er skyld i patientens sygdom/vanskeligheder.

Hvis det viser sig, at ændringen er nedarvet fra en af forældrene, bliver det mere komplekst at tolke svaret.

- Hvis forælderen har samme sygdom/vanskeligheder som patienten, så er det overvejende sandsynligt, at det er ændringen, der er årsagen til det. Men det kan godt være en normal variant, så sygdommen skyldes noget helt andet.

- Hvis forælderen ikke har samme sygdom/vanskeligheder som patienten, så er der flere muligheder:

- Det kan være, at ændringen er en ukendt/sjælden normal variant og ikke har nogen betydning for patientens sygdom/vanskeligheder.

- Det kan være, at ændringen er årsagen, men at der kan/skal være flere faktorer, der skal spille ind, før ændringen er sygdomsfremkaldende, og som er til stede i/ved patienten og ikke i/ved patientens forældre.

Da man også analyserer forældrene for at fastslå arvegangen, så forlænges den endelige svartid væsentligt, da man afventer blodprøver på forældrene. Der kan gå op til 1 års tid, før de kommer.

”DIAGNOSE”

I de tilfælde, hvor det vurderes, at den genetiske ændring er årsagen, giver det patienterne og især patienternes familie en afklaring/diagnose. En sikker diagnose kan gøre det nemmere for familien at tackle problemet og kan også være med til at gøre det lettere at få den støtte og hjælp til barnet, som det har brug for. I sjældne tilfælde har det også betydning for behandlingen.

Når man kender til en eller flere sygdomsfremkaldende ændringer i en familie eller hos et barn, så er det muligt at tilbyde prænatal diagnostik til dem, der har et ønske om flere børn. Her undersøger man fostret (fostervand/moderkage) for de ændringer, man har fundet.

I de tilfælde, hvor patienten frifindes ved en array-CGH-analyse, betyder det ikke nødvendigvis, at patientens sygdom ikke skyldes genetik. Patienten kan stadig have en genetisk ændring, som ikke kan påvises med array-CGH, dette kunne være en sekvensvariation (mutation) i et gen.

Status array-CGH, OUH (første år)

- 236 patienter analyseret.
- 114 patienter (48,3 %) udvalgt til verificering.
- Størrelse af ændringer rangerer fra 25 kb til 34 Mb. Ud over det har vi fundet et tilfælde af trisomi 8 i mosaisk form og et enkelt tilfælde af mosaik for isokromosom 18p.

Verificerede ændringer

I det første år har vi undersøgt 90 ændringer i 76 familier (patient og forældre) med MLPA eller FISH – 20 var nyopstået og 60 var nedarvet, og nogle af disse var faktisk nedarvet fra forældre, der har lignende vanskeligheder.

For resten – 10 stk. – er arvegangen ikke blevet fastslået på grund af manglende prøver fra forældre eller af anden årsag.

Af de verificerede ændringer var 55 (61 %) deletioner, og 33 (37 %) var duplikationer, og 1 var en triplikation, og 1 enkelt quadroplikation.

Det er svært at vurdere, om der er kommet flere eller færre prøver end forventet. Metoden er afløseren for kromosomanalysen, så det vil være forventeligt, at der kommer flere prøver til. Ud over det bliver der fundet flere anvendelsesmuligheder for teknikken, så på sigt vil der komme flere til.

Vi kan i hvert fald sige, at der er mange verificeringer, og det afspejler den begrænsede viden, der findes om, hvorvidt nogle ændringer er normale varianter eller patologene. □

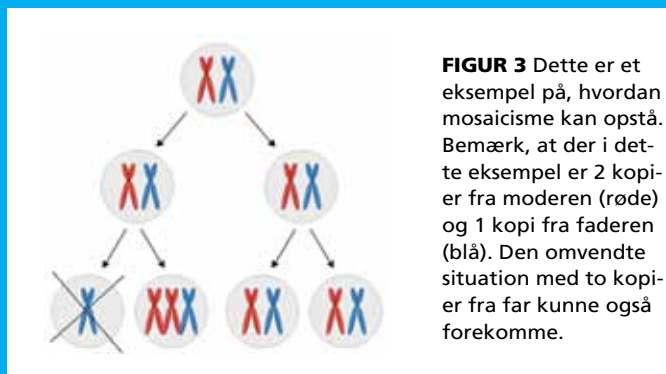
FAKTA/PARLØR

Mb: Megabaser = 1.000.000 basepar.

Kb: Kilobaser = 1.000 basepar.

Mosaik: To eller flere populationer af celler med forskellige genotyper i en person.

Mosaicisme kan skyldes en fejl under fosterudviklingen, som kun forplanter sig til en delmængde af cellerne. Denne fejl kan fx resultere i, at man får en cellelinje med 3 kopier af et kromosom og et anden cellelinje med kun 1 kopi af samme kromosom. Det normale er 2 kopier, og de vil selvfølgelig også være til stede. Se fig. 3. Cellelinjen med 1 kopi vil sandsynligvis gå tabt. Alt efter forholdet mellem normale og unormale celler (mosaikgraden) vil patienten være mere eller mindre vanskeligt stillet. Man kan også have mosaicisme for en meget lille del af et kromosom, og det kan betyde, at man fejler noget, men ikke nødvendigvis.



FIGUR 3 Dette er et eksempel på, hvordan mosaicisme kan opstå. Bemærk, at der i dette eksempel er 2 kopier fra moderen (røde) og 1 kopi fra faderen (blå). Den omvendte situation med to kopier fra far kunne også forekomme.

Polyploid: Polyploidier er celler og organismer, der indeholder mere end to parrede (homologe) sæt kromosomer. Det kan fx være triploid med 69 kromosomer i stedet for de normalt 46.

Polyploide personer findes ikke, da det normalt vil være uforeneligt med liv, men kan findes i mosaisk form.

Aneuploidi: Personer, som har et kromosom, eller kromosomsegment, som findes i færre eller flere antal end normalt. Fx har personer med Downs syndrom 3 eksemplarer af kromosom 21.

Fænotype: Fænotypen er karakteristika eller træk ved et menneske: såsom udseende, udvikling, biokemiske eller fysiologiske egenskaber, sygdom, adfærd og produkter af adfærd.

Genotype: Genbesætningen i en organisme eller i et menneske. Arveanlægget.

Balancerede/ubalancerede strukturelle kromosomafvigelser: Strukturel kromosomafvigelse: ændring i kromosomets struktur (i modsætning til antalsfejl). Balanceret: der er ikke tabt kromosommateriale.

Ubalanceret: der er for meget eller for lidt kromosommateriale.

De ubalancerede kromosomafvigelser vil næsten altid føre til sygdom, mens bærere af en balanceret kromosomafvigelse sædvanligvis vil være raske. De ubalancerede kromosomafvigelsers størrelse har selvfølgelig en betydning for, hvor syg en person er. Raske personer bliver sjældent undersøgt.