

Anvendelse af molekylærbiologiske metoder ved invasiv prænatal genetisk diagnostik

STATUSARTIKEL

Claes Lundsteen & lic.scient. Marianne Schwartz

Prænatale genetiske undersøgelser har været foretaget i mere end 30 år. I starten blev der fortrinsvis foretaget kromosomundersøgelser af celler fra fostervandsprøver og senere fra moderkageprøver samt biokemiske undersøgelser for visse medfødte stofskiftesygdomme og føtale misdannelser. I takt med at molekylærbiologiske teknikker blev udviklet og taget i anvendelse i den klinisk genetiske diagnostik i begyndelsen af 1990'erne, blev de også bragt i anvendelse i den prænatale genetiske diagnostik for at opnå en hurtigere og mere nøjagtig diagnostik og for at kunne udvide antallet af genetiske sygdomme, der kan undersøges for.

I Danmark foretages der ca. 7.000 invasive prænatale undersøgelser om året (1). Rutinemæssigt foretages der kromosomundersøgelse med båndfarvningsteknik på dyrkede celler, og svartiden er 1-2 uger for moderkageprøver og 2-3 uger for fostervandsprøver. Ud over risikoen for utilsigtet abort på grund af det invasive indgreb indebærer fosterkromosomundersøgelserne to væsentlige problemer. Det ene er fund af mere eller mindre komplicerede abnormiteter, hvis kliniske betydning er uvis. Det andet er den lange svartid, som i mange tilfælde er et stort problem for den gravide.

Med båndfarvningsteknikken kan de enkelte kromosomer identificeres, så numeriske kromosomabnormiteter, f.eks. Downs syndrom, kan diagnosticeres med stor sikkerhed. Grovere strukturelle abnormiteter, f.eks. større translokationer, kan også identificeres. Mindre strukturelle abnormiteter og tilstedeværelse af markerkromosomer (små strukturelt abnorme kromosomer af ukendt oprindelse) skaber imidlertid ofte diagnostiske problemer, som kun kan overkommes ved anvendelse af findiagnostik med molekylærbiologiske metoder, som har været benyttet i stigende omfang siden begyndelsen af 1990'erne (2).

I de senere år har man med fluorescens in situ-hybridisering (FISH)-teknik kunnet screene for de hyppigst forekommende numeriske kromosomafvigelse, der involverer kromosomerne 13, 18, 21, X og Y. Herved er den lange svartid på fostervandsprøver og moderkageprøver blevet reduceret til et par døgn. Metoden, som er et supplement til den konventionelle kromosomundersøgelse, er dog kostbar og benyttes kun i de tilfælde, hvor der er behov for et hurtigt svar (3).

Efterhånden som flere og flere sygdomsgener bliver identificeret, er det blevet muligt at foretage prænatal genetisk diagnostik for stadig flere monogene sygdomme. Der blev i 2000 foretaget 133 prænatale undersøgelser for 48 forskellige monogent nedarvede sygdomme. I midten (slutningen) af 1980'erne og i begyndelsen af 1990'erne var sekvensen kun kendt for ganske få gener, og de prænatale undersøgelser byggede på DNA-markør-undersøgelser, dvs.

indirekte undersøgelse af et sygdomsgens nedarvning i en familie.

Molekylærbiologiske undersøgelser for kromosomsygdomme

Findiagnostik af kromosomabnormiteter

I dag råder man over en række molekylærbiologiske metoder, som isoleret eller kombineret kan anvendes til at identificere selv meget små og komplicerede strukturelle kromosomabnormiteter. Metoderne er baseret på FISH, hvor en fluorokrommærket probe med en given DNA-sekvens hybridiseres til en komplementær DNA-sekvens på et kromosompræparat. Herved kan den pågældende DNA-sekvens identificeres på præparatet (2). I **Tabel 1** gives en oversigt over de hyppigst benyttede FISH-metoder og deres væsentligste anvendelsesområder. Locusspecifikke prober kan benyttes til påvisning af kendte mikrodeletionssyndromer, f.eks. Prader-Willis og DiGeorges syndromer. Prober, som farver et enkelt kromosom (såkaldte maleprober), er velegnet til at påvise translokationer og markerkromosomer. Centromerprober benyttes til at identificere markerkromosomer. Subtelomerprober anvendes til påvisning af små subtelomere deletioner og translokationer. Ved *multicolour*-FISH, hvor proben består af alle 24 kromosomtyper hver med sin farve, kan man identificere ekstra kromosommateriale af ukendt oprindelse, f.eks. markerkromosomer. Komparativ genomisk hybridisering (CGH) er velegnet til identifikation af markerkromosomer og submikroskopiske deletioner og duplikationer, der ikke kan ses ved almindelig kromosomundersøgelse (4). Med de anførte metoder kan de fleste strukturelle abnormiteter identificeres prænatalt med stor sikkerhed. **Fig. 1** viser konkrete eksempler herpå. Detaljer er beskrevet i figurteksten. I **Fig. 1A** benyttes en locusspecifik probe til at bekræftes diagnosen DiGeorges syndrom hos et

Tabel 1. Molekylærbiologiske metoder og deres anvendelse til findiagnostik af strukturelle kromosomabnormiteter:

| Teknik | Prober (fluorescensmærkede) | Anvendes til identifikation af |
|--|-----------------------------|---|
| Fluorescens in situ-hybridisering (FISH) | locusspecifikke | mikrodeletions-syndromer |
| | hele kromosomer | translokationer |
| | centromerer subtelomerer | markerkromosomer små subtelomere deletioner og translokationer |
| <i>Multicolour</i> -FISH | hele kromosomer | ekstra kromosommateriale markerkromosomer |
| Komparativ genomisk hybridisering | genomisk DNA | små deletioner og duplikationer markerkromosomer |

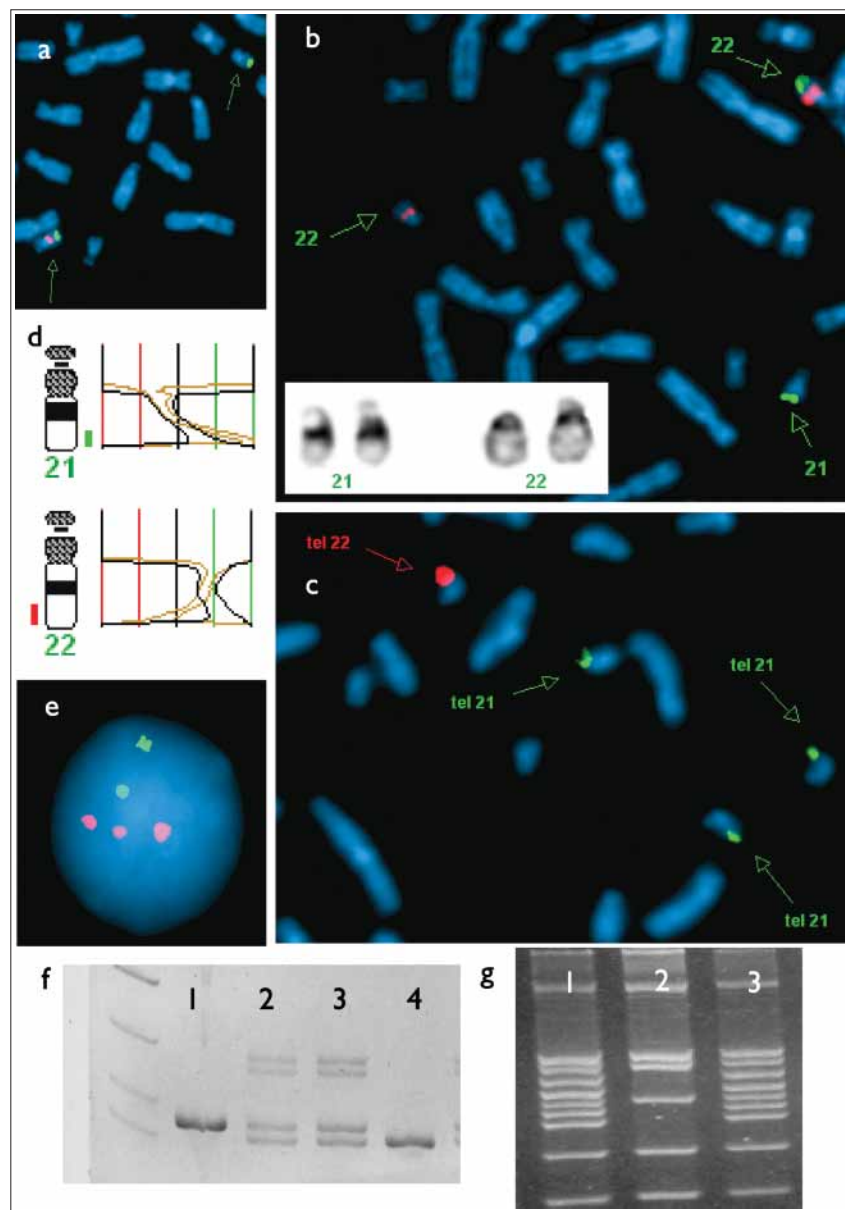


Fig. 1. Eksempler på anvendelse af molekylærbiologiske metoder i prænatal diagnostik. A viser en FISH-undersøgelse for DiGeorges syndrom, hvor det ene kromosom 22 viser et normalt rødt signal svarende til DiGeorge-regionen og et grønt kontrolsignal, der hybridiserer til den terminale ende af den lange arm af kromosom 22. Det andet kromosom 22 mangler det røde signal, hvilket betyder, at fosteret har DiGeorges syndrom. B er en FISH-undersøgelse, hvor DiGeorge-proben påviser en $t(21q;22q)$ hos en rask translokationsbærer. Der er to normale signaler på den ene 22'r; mens kontrolsignalet på den anden 22'r er translokeret til den lange arm af den ene 21'r. Translokationen kan ikke ses på de G-båndfarvede kromosomer 21 og 22 nederst i billedet. C er en FISH-undersøgelse, hvor subtelomerprober for kromosom 21 og 22 viser en ubalanceret $t(21q;22q)$, idet der er tre grønne signaler for kromosom 21 og et rødt signal for kromosom 22. Dette bekræftes i D, som er en CGH-undersøgelse, hvor den grønne lodrette streg markerer en ekstra kopi af den nederste ende af kromosom 21, og den røde streg markerer en manglende kopi af den nederste ende af kromosom 22. E er en interfase FISH-undersøgelse, hvor to grønne signaler markerer to kromosomer nr. 13, mens tre røde signaler markerer tre kromosomer nr. 21, hvilket betyder trisomi 21, Downs syndrom. F viser PCR-analyse for den hyppigste cystisk fibrose-mutation F508del, der skyldes en deletion af tre basepar i exon 10 af CFTR-genet. Række 1 viser et normalt PCR-produkt på 87 basepar; række 2 og 3 er resultater fra personer, der er anlægsgæberere for mutationen, med to PCR-produkter på hhv. 87 og 84 basepar (der ses endvidere to ekstra bånd, der kaldes heteroduplekser). Række 4 er PCR-produktet fra en patient, der er homozygot for F508del, svarende til 84 basepar. G viser en multiplex-PCR-analyse for deletioner i genet for Duchennes muskeldystrofi. Analysen vil påvise de hyppigste deletioner i DMD-genet. Der undersøges for tilstedeværelsen af ni områder i genet. Række 1-3 viser resultatet af analyser af tre forskellige personer. Række 1 og 3 har normalt mønster med ni forventede PCR-produkter. Række 2 viser kun fem af de forventede ni produkter, hvilket er en større deletion af DMD-genet, der bekræfter diagnosen Duchennes muskeldystrofi.

foster, hvor UL-scanning har givet formodning herom. I Fig. 1B viser man ved en FISH-undersøgelse, at en gravid kvinde er bærer af en balanceret $t(21q;22q)$, som ikke kan ses ved almindelig kromosomundersøgelse. Hendes første barn har

en ganske lille ubalanceret $t(21q;22q)$, som i forvejen er påvist ved en CGH-undersøgelse (ikke vist). Fig. 1C viser FISH-undersøgelse af en moderkageprøve fra den gravide translokationsbærer. Der er anvendt subtelomerprober for

kromosom 21 og 22, som viser, at fosteret har en ubalanceret t(21q;22q). Dette bekræftes ved CGH-undersøgelse i Fig. 1D.

Hurtig diagnostik af numeriske kromosomabnormiteter

Fig. 1E viser hurtig diagnostik af trisomi 21, Downs syndrom, i udyrkede interfaseceller ved hjælp af locus-specifikke prober. For nylig er en billigere PCR-baseret teknik blevet introduceret som alternativ til FISH-teknikken. Den er baseret på højpolymorfe DNA-markører. De fleste mennesker har to forskellige alleler for disse markører. Har et menneske f.eks. to kromosomer nr. 21, vil kvantitativ fluorescens PCR (QF-PCR) vise to alleler med samme intensitet, repræsenteret ved et kromatogram med to toppe med samme højde. Er der tre kromosomer nr. 21, finder man tre alleler (toppe) af ens højde eller to toppe, hvor den ene er dobbelt så stor som den anden, hvis to af de tre kromosomer 21 er identiske for den pågældende markør. Teknikken er taget i rutinemæssig anvendelse flere steder i udlandet og er under indkøring herhjemme (5). Det forventes, at metoden for en mindre merpris vil kunne tilbydes som supplement til den konventionelle kromosomundersøgelse for at opnå et hurtigt svar på de hyppigst forekommende kromosomabnormiteter.

Molekylærbiologiske undersøgelser for monogene sygdomme

I de seneste år er generne for en lang række arvelige sygdomme klonet og karakteriseret. Dette medfører, at det teoretisk er muligt at identificere den sygdomsfremkaldende mutation i en given familie. I de tilfælde, hvor en bestemt sygdom skyldes få, hyppige mutationer (cystisk fibrose) eller samme type mutation (dystrophia myotonica), er prænatal diagnostik også næsten altid praktisk mulig, se eksempler i Fig. 1F og Fig. 1G. For en lang række sygdomme gælder det imidlertid, at hver patient har sin egen private mutation i et givent gen. I disse tilfælde er det ikke altid praktisk muligt at identificere denne mutation, hvis genet er meget stort. Prænatal diagnostik kan i nogle af disse tilfælde udføres ved indirekte DNA-markør-analyse. Prænatal diagnostik af monogene sygdomme kræver altid, at familien er udredt i forvejen, dvs. at den kliniske diagnose og sygdoms-genet/mutationen er entydigt bekræftet. Prænatal diagnostik af disse sygdomme udføres næsten altid ved hjælp af CVS, og svar foreligger normalt i løbet af 1-3 dage. Risikoen for, at fostret er afficeret, er normalt mellem 25% og 50%, hvilket gør, at tidlig diagnose er meget vigtig.

Perspektiver: praktiske og videnskabelige

I løbet af de seneste år er metoderne til noninvasiv screening for føtalt Downs syndrom blevet forbedret væsentligt. Med den nuværende praksis, hvor invasiv diagnostik tilbydes til gravide, der er over 35 år, er detektionsraten for Downs syndrom kun 40%, hvorimod screening med en kombination af UL-markører og biokemiske markører ifølge beregninger giver en detektionsrate på over 90%. Man forventer derfor, at alderskriteriet snart bliver erstattet af noninvasive screeningsmetoder. Det betyder, at størstedelen af de

screeningspositive gravide vil have en betydelig risiko for at vente et barn med Downs syndrom. Dette vil medføre krav om hurtig diagnostik, som vil kunne imødekommes ved anvendelse af QF-PCR som supplement til alle invasive prøver. For alle invasive prøver kan svartiden for de hyppigste kromosomfejl derfor snart forventes at blive reduceret fra 1-3 uger til 1-2 dage. Dette vil være et betydeligt fremskridt for den prænatale diagnostik. Ved indførelse af screening for Downs syndrom forventes et fald i antallet af invasive prøver, fordi falsk positiv-raten vil falde til en tredjedel eller måske en fjerdedel. Dette er også et fremskridt, idet antallet af utilsigtede aborter, som skyldes den invasive prøve, derved vil falde. Hos et begrænset antal patienter vil der dog ved invasiv diagnostik fortsat påvises komplicerede strukturelle abnormiteter, som kun kan afklares ved molekylærbiologisk metodik. For disse patienter vil en sådan afklaring være af overordentlig stor betydning.

Sekvensen af menneskets genom er nu kendt, og udviklingen af f.eks. DNA-chips vil gøre det praktisk muligt at undersøge for så at sige alle sygdomsgener. I øjeblikket anvendes DNA-chips til påvisning af kendte mutationer, men metoden er under stadig udvikling. Selv om det bliver praktisk muligt at sekventere hele en persons genom, vil den store normalvariation, der findes i menneskets genom, imidlertid gøre det vanskeligt at skelne mellem normale varianter og sygdomsfremkaldende mutationer. Da en lang række genetiske sygdomme har samme kliniske fænotype, men skyldes mutation i forskellige gener, er et nært samarbejde mellem klinikere og molekylærgenetikere meget vigtigt. Genetisk rådgivning til og udredning af familier, hvor genetiske sygdomme forekommer, bør altid tilbydes før invasiv prænatal diagnostik igangsættes.

Summary

Claes Lundsteen & Marianne Schwartz: Use of molecular biological methods in invasive prenatal genetic diagnosis.

Ugeskr Læger 2003;165:780-3.

In the past, prenatal cytogenetic analysis was limited by answering times of one to three weeks and lack of exact diagnosis of some structural abnormalities. The number of prenatal analyses of monogenic diseases was small due to lack of knowledge of the gene and the mutation in question. The introduction of molecular biological techniques allows prenatal diagnosis of the most frequent trisomies within one to two days and exact diagnosis of almost all structural abnormalities. The Human Genome Project now allows prenatal diagnosis for most monogenic diseases, and the rapid improvement of the DNA-chip technology will increase the number of prenatal diagnoses even further.

Reprints: *Claes Lundsteen*, Klinisk Genetisk Afdeling 4052, H:S Rigshospitalet, DK-2100 København Ø. E-mail. lundsteen@rh.dk

Antaget den 16. januar 2003.

H:S Rigshospitalet, Juliane Marie Centret, Klinisk Genetisk Afdeling.

Litteratur

1. Lundsteen C, Vejerslev L. Prenatal diagnosis in Denmark. *Eur J Hum Genet* 1997; 5(suppl 1):14-21.
2. Jensen PKA. Kromosomafvigelser hos mennesket. København: CEC Gads Forlag, 1998.
3. Bryndorf T, Lundsteen C, Lamb A et al. Rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies by interphase fluorescence in situ hybridization: a one year clinical experience with high-risk and urgent fetal and post-natal samples. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79:8-14.
4. Kirchhoff M, Rose H, Gerdes T et al. Påvisning af submikroskopiske kromosomfejl med komparativ genomisk hybridisering. *Ugeskr Læger* 2001;163:5652-7.
5. Levett LJ, Liddle S, Meredith R. A large-scale evaluation of amnio-PCR for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;17:115-8.

»Polymerase chain reaction«-teknikkens anvendelsesmuligheder

STATUSARTIKEL

Lic.scient. Niels Rüdiger

Siden slutningen af 1980'erne er udviklingen i molekylær-biologiske teknikker til undersøgelser af DNA og RNA nærmest eksploderet. Dette skyldes alt overvejende *Karry Mullis* idé i 1983 om anvendelse af DNA-polymeraser til gentagne udbygninger af det dobbeltstrengede DNA-molekyle (*polymerase chain reaction* [PCR]). Ideen anvendt i praksis beskrev *Mullis et al* bl.a. i en artikel i *Nature* i 1986 (1), og den indbragte ham i 1993 nobelprisen i kemi.

Tiden herefter har været hektisk. PCR-teknikken har således haft umådelig stor betydning for kortlægningen af det humane genom. Kloningsarbejder, som før kunne tage fra uger til måneder, kan nu afsluttes på få dage. Teknikken viste på ganske kort tid, at mange års arbejde med at opnå kendskab til DNA, RNA, gener, genstrukturer og genregulering nu stod over for potentielle anvendelsesmuligheder også uden for universiteterne. Det var klart, at denne teknik, hvis den var pålidelig, ville revolutionere hele vort molekylære informationsniveau. Klinikere fik i højere grad mulighed for at relatere variationer i genotypen til fænotypen. Netop enkeltheden i teknikken og den deraf følgende minimale omkostning ved at udføre den, er vel nok en af de alt-overvejende grunde til den eksplosive anvendelse, som PCR-teknikken fik helt fra starten.

Grundlaget for en optimal klinisk udnyttelse er imidlertid et indgående kendskab til arvmassen hos mennesker. Flere gigantiske projekter har været iværksat for at kortlægge menneskets genom, som nu også foreligger. Fordi man i denne kortlægning har beskrevet genernes sekvens base for base, er det muligt forholdsvist enkelt at udvælge et område af arvmassen, som ønskes opformeret og analyseret. Opformeringen sker ved anvendelse af to syntetisk fremstillede, små DNA-stykker (*primere*), der flankerer det genområde, som ønskes analyseret. Ved hjælp af en termostabil polymerase kan kopieringen resultere i en fordobling af genområdet mellem primerne for hver gang reaktionen gennemgår en cyklus, der består af 2-3 forskellige temperaturniveauer. Selv om PCR-teknikken forekommer at være

enkel at udføre, er den praktiske anvendelse ofte forbundet med store håndterings-/kontamineringsproblemer. Konsekvensen heraf er, at sensitive, klinisk relevante PCR-analyser kun bør udføres i specialindrettede laboratorier, hvor kontamineringsrisici kan minimeres. Hvis laboratoriet indrettes korrekt fra starten, åbner der sig en verden af muligheder baseret på PCR-teknikken, hvoraf jeg her vil nævne enkelte simple og andre mere avancerede metoder.

PCR-baserede teknikker til påvisning af genvariationer

En af de mest anvendte PCR-baserede genetiske undersøgelser tager udgangspunkt i polymorfe områder i og omkring generne. En genetisk variation siges at være en polymorfi, hvis den i normalbefolkningen forekommer med en hyppighed, der er større end 1%. En type polymorfi kunne eksempelvis være faktor V (Leiden)-mutationen (med en hyppighed på ca. 6,5% i den danske befolkning) (2) eller *variable number of tandem repeat* (VNTR)-sekvenser. Sidstnævnte er korte DNA-sekvenser, der hos forskellige individer ofte forekommer i varierende antal. Sådanne sekvenser kan forekomme såvel i som tæt ved kodende DNA-områder. VNTR-sekvenser anvendes hyppigt til at følge nedarvningsmønstre. Dette sker, ved at PCR opformerer et område, som dækker over en region med VNTR-sekvenser. Forskelle i antallet af VNTR vil resultere i varierende længde af de PCR-opformede DNA-fragmenter. Samme situation gør sig gældende for mutationer, hvor der er sket en deletion (mangler DNA) eller insertion (ekstra DNA), der ligeledes vil medføre DNA-fragmenter, som størrelsesmæssigt adskiller sig fra normale genområder. Størrelsesforskelle i DNA-fragmenter kan erkendes visuelt ved en simpel gelelektroforetisk adskillelse.

Påvisning af kendte punktmutationer/variationer

Mange sygdomsforbundne genmutationer kendes i dag, og for de fleste er det forholdsvist enkelt at opsætte en specifik PCR-baseret analyse for at teste en mutations tilstedeværelse i en given prøve. Design af genspecifikke primere til opformeringen af et DNA-fragment kan f.eks. udformes således, at normalfragmentet i det opformede PCR (DNA)-