

## Principles of Clinical Cytogenetics

**Cytogenese** handler om studiet af kromosomer, deres struktur og arvelighed. Det er vigtigt for at kunne diagnosticere kromosomdefekter og syndromer.

For at kunne analysere kromosomer kræves der at celler kan vokse og dele hurtigt i medium. Man analyserer tit leukocytter, fordi de indeholder kernen. Man udtager blodet og tilsætter heparin for at forhindre koagulation. Man udtager leukocytter og placerer dem i medium, in vitro-dyrkning. Når der er mange af dem og er kondenserede, tilsætter man mitosehæmmer, så man fanger dem i metafase og forhindrer mitotisk spindler og behandler dem med hypotonisk væske for at isolere kromosomerne. Bagefter fikseres de og analyseres.

### Man laver kromosomanalyser, hvis

- Der er problemer med normal udvikling, vækst, dysplasi eller malformation.
- Fosterdød eller tidligt fødte døde (10 %)
- Ved ufrugtbarhed eller hyppige aborter (3-6 %)
- Hvis der er tendens arvelighed ved syndromer
- Ved kræftsygdomme
- Hvis kvinden er over 30-35 år

Man bruger hvide blodlegemer, amniocytter, chorion villi biopsier, hudbiopsier, abortvæv og kræftceller.

Knoglemarv er svær at analysere pga. dårlige opløst kromosomer.

Der er 3 metoder til at skelne mellem kromosomerne. Man farver med Giemsa banding (G banding), som er den mest almindelig at bruge i laboratoriet. Det gør det muligt at identificere hvert enkelt kromosompar. Udover G banding kan der bruges Q banding. Den lys Q bånd vil korrespondere med den mørke G bånd. Den farvning benyttes ved heteromorphisme. Begge farver binder sig til A-T rige DNA-regioner der ligger over 60 % og er de mørke bånd. Ved R banding vil binde sig til C-G rige DNA-regioner pga. varmebehandling af kromosomer. Den giver mønster der er lettere at analysere og er den standard metode i nogle laboratorier i Europa. C banding involverer farvning af centromer og regioner indeholdende heterokromatin, især regioner 1q, 9q, 16q og Yq.

Kromosomerne kan ofte klassificeres ved deres position af centromer. Metacentrisk er, når centromer er mere eller mindre placeret i midten af kromosomet (1,3,16). Submetacentrisk er når centromerens placering medfører en kort og lang arm (resten). Acrocentrisk er når centromer er placeret nær en ende af armen. Man taler også om en telocentrisk hvor centromer er placeret ved den ene ende og har kun en arm. Den humane acrocentriske kromosomer (13,14,15,21,22) har små kromatin kendt som satelliter hæftet på deres korte arm og indeholder kopier af genkodende ribosomal RNA.

**Der er to typer heterokromatin:**

- 1) konstitutivt heterokromatin, DNA som ikke indeholder gener, bevarer den kompakte struktur og findes ved telomere og centromer
- 2) Fakultativt heterokromatin, menes at indeholde gener der er inaktive, kompakt DNA.

**Eukromatinet** indeholder de aktive gener, findes spredt i kromosomerne, mindre kompakt pakket og tillader at ekspressionsproteinerne kan komme til.

**Prometafase banding** er kommet af G-banding eller R-banding i tidligt fase af metafase. Prometafase kromosomerne, der er noget længere, afslører ca. 550 til 850 de subband eller mere i haploid sæt, hvor metafaser afslører kun ca. 450 (se figur 9-3)

**Fragile sites** er de steder, hvor der ved påvirkning på kromosomet har tendens til at gå i stykker. Den hyppigste arvelige årsag til mentalt handicap er fragilt X-syndrom. Sygdommen skyldes mutationer i et enkelt gen, men rangerer ofte som en kromosomsygdom, idet den kan opdages ved en kromosomanalyse.

Mutationerne optræder i et enkelt gen (FMR1), der er beliggende yderst på X-kromosomets lange arm.

Mutationerne kan bevirke at det yderste stykke af X-kromosomet knækkes af genet. Det er aktiv i alle væv, men især i celler i hjernen og testiklerne. I det normale FMR1 gen findes tripletten CGG gentaget 6-56 gange. Sygdommen forekommer, hvis tripletten er gentaget over 230 gange.

Nyere molekylær teknik som **fluorescens in situ-hydridering (FISH)** benytter specifikke molekylær-cytogenetiske metoder vha. DNA-prober til at identificere deletioner og små forandringer i det genetiske materiale. Denne teknik har øget mulighederne for at opdage gen- og kromosom anomalier. Proberne hydriderer til metafase-kromosomer eller til interfase nuclei. Da der i løbet af celledelings-stadierne sker en gradvis kondensering af kromatinet, har man også kunnet udvikle teknikker til at undersøge kromosomerne på profase-stadiet, hvor de fremtræder betydeligt længere og med flere detaljer end metafase-kromosomer. Defekter af kromosomerne kan enten være numeriske eller strukturelle og involverer ofte en eller flere kønskromosomer. 46 kaldes for euploid. Udover diploid er der også rapporteret triploid eller tetraploid. Babyer bliver født, men de lever ikke længere.

**Aneuploid** betyder at antallet af kromosomer ikke er euploid, det anvendes ofte når der er et ekstra kromosom (trisomi) eller når et kromosom mangler (monosomi). Abnormiteter i antallet af kromosomer kan opstå under den mitotiske eller den meiotiske deling. I meiosen bliver de to medlemmer af et kromosompar normalt delt ved den første meiotiske deling, så hver dattercelle modtager et medlem af hvert par. Det kan ske at denne separation ikke gennemføres (non-disjunction) og begge medlemmer af et par bevæger sig til denne samme celle. Ved en non-disjunction vil den ene celle modtage 24 kromosomer og den anden kun 22 kromosomer. Når en gamet med 23 kromosomer fusionerer ved fertilisationen med en gamet med 22 eller 24 kromosomer, bliver resultatet et individ med enten 47 kromosomer (trisomi) eller 45 kromosomer (monosomi). Non-disjunction hvad enten den foregår under den første eller den anden meiotiske deling af kimcellerne, kan inddrage autosomer eller kønskromosomer.

Konsekvenser for non-disjunctions i meiose I og meiose II er forskellige. I meiose I vil kromosomerne indeholde både paternal og maternal par, hvorimod i meiose II vil der indeholde en ekstra kromosom af begge kopier af enten maternal eller paternal kromosom.

Hvis der sker rekombinationen nær centromere eller telomere, er der stor sandsynlighed for non-disjunction. Tilfældig non-disjunction kan opstå under mitosen i en embryonal celle under de allertidligste delinger. Dette vil medføre at individet bliver en mosaik hvor nogle celler har abnormt kromosomantal og andre et normalt. Et individ som er mosaik pga. fusion af to zygoter, betegnes en kimære.

Det kan ske at kromosomer går i stykker og dele af et kromosom knyttes til et andet. Sådant en translokation kan være balanceret, dvs. alt kromosommateriale er til stede men der er sket en omorganisering, og individet er normalt eller det kan ske ubalanceret hvor dele af et kromosom går tabt eller der er overskud, og fænotypen således ændres og medfører alvorlige kliniske tilstande. En tilsyneladende balanceret afvigelse, f.eks. translokation, kan dog i nogle tilfælde give alvorlig sygdom, hvis bruddet på kromosomet har ødelagt et gens funktion. For eksempel ubalancerede translokationer mellem de lange arme på kromosom 14 og 21 – en af årsagerne til Downs syndrom. Translokationer er hyppige mellem acrocentriske kromosomerne 13, 14, 15, 21, 22 fordi de optræder i en klynge under meiosen.

**Duplikation** af et kromosom kan sammenlignes med trisomi. Deletionen kan sammenlignes med monosomi. En vigtig klasse af ubalanceret rearrangement involverer submikroskopisk forandringer med telomerer af mange kromosomer hos en patient med idiopatisk mental retardation.

I praksis er det af flere grunde nyttigt at skelne mellem mutationer der vedrører et enkelt bp, såkaldte punktmutationer og andre mutationer. Dette pga. såvel mutationernes opståen og hyppighed som deres fænotypiske konsekvenser. Punktmutationer er:

- 1) Substitution er ændring af et bp til et af de 3 andre. Man skelner mellem transition (udskiftning af purin til purin, pyrimidin med pyrimidin) og transversion (udskiftning af purin med pyrimidin og omvendt).
- 2) Deletionen betyder tab af kromosomets segment. En bærer vil være monosomik for genetisk information på den korresponderende segment af den normale homolog (haploinsufficiency). Denne deletion kan give cri du chat syndrom på kromosom nr. 5.
- 3) Insertions er en nonreciprok type af translokation, hvor en segment fjernes fra en kromosom indsættes i et andet kromosom. Når en person har en abnorm kromosom, findes det i alle vedkommendes celler. Men hvis der er 2 eller flere forskellige kromosomer (flere cellelinjer), kaldes situation for mosaicism (påvises ofte i hudbiopsier). Årsagen til denne lidelse er en non-disjunction i en tidligt postzygotisk mitotisk deling. Det er normal fund i cytogenetisk studiet i chorionisk villi.

Duplikation er mindre harmful end deletionen men kan føre til noget fænotypisk abnormalitet. Det er tilføjelse af et eller flere bp.

Ekstra små og store uidentificerede kromosomer kaldet marker, er set i mosaik tilstand. De er meget svært at karakterisere. Der er nogle subklasser, hvor nogle marker mangler enten identificerbar centromerisk DNA eller telomerisk DNA (ring). De kan medføre mental retardering men kan ses også familiært uden fænotypisk betydning.

**Isokromosomer** er når den ene arm mangler og den anden er duplikeret i spejlvendt. Derfor har en person med 46 kromosomer en enkelt kopi af den ene arm (monosomi), og 3 kopier af den anden arm (trisomi). Der er dokumenteret 2 mekanismer:

- 1) Forkert deling gennem centromer i meiose I
- 2) Forveksling af den ene arm og dets homolog ved den proximale kant af armen. Isokromosomet findes på den lange arm af X-kromosom hos nogle individer med Turner syndrom. Det er også set ved solid tumor og hæmatologisk malignitet.

**Ringkromosom** opstår ved at der sker brud i telomer-regionerne og sammensmeltning af de to ender. Der sker tab af kromosommateriale og ringkromosomer medfører næsten altid kliniske symptomer. Der kan være tydelig ringe, men der findes også helt små, så det er vanskeligt at afgøre om de er ringe.

**Dicentrisk** er en sjældent form for abnorm kromosom, hvor 2 kromosomsegmenter fra forskellige kromosomer, hver med centromer, smelter deres ender og mister deres acentrisk fragmenter. De ville være stabile, hvis en af centromer inaktiveres, eller de koordinerer deres aktivitet.

Balanceret rearrangement giver ikke fænotypisk effekt, fordi alt materiale er til stede, bare pakket anderledes.

**Iversion** er intrakromosomalt rearrangement hvor et kromosomsegment er vendt 180 grader. Der findes 2 slags:

- 1) **Paracentrisk**, der ikke inkluderer centromer og forekommer kun i den ene arm, kun i p- eller q-arm. Når inversion er paracentrisk, er ubalanceret rekombinant kromosomer typiske acentrisk eller dicentrisk og ikke medfører til levedygtige afkom.
- 2) **Pericentrisk**, der inkluderer centromer, og forekommer i hver arm. Det medfører ikke abnorme fænotype, men pericentrisk inversion kan føre til produktion af ubalanceret gameter med duplikation og utilstrækkelige af segmenter. Den almindelige inversion er set i kromosom 9  $inv(9)(p11q12)$ .

**Translokationer** involverer forveksling af kromosomernes segmenter, sædvanligvis mellem nonhomologe kromosomer. Der er 2 typer:

- 1) Reciprokke translokation er forveksling af segmenter mellem to non-kromosomerne men giver ikke fænotypisk effekt, men kan give risiko for misdannede afkom. Det forårsager mental retardation. Når kromosomerne af balanceret reciprokke translokation danner par ved meiose, en quadrivalent er formet. Ved anafase vil kromosomerne blive adskilt på 3 forskellige måder: 1) alternate (balanceret) 2) adjacent-1 3) adjacent-2 (ubalanceret)

- 2) Robertsonian translokation involverer 2 acrocentrisk kromosomer der smelter sammen nær centromer region med tab af korte arme. (13q14q) og (14q21q) er meget relative normal. Bærer af Robertsonian translokation har 45 kromosomer idet der kun er et frit kromosom nr. 21, og der er store risiko for at producere et barn med translokation Downs Syndrom.

3 store numeriske lidelser er non-mosaic trisomier: trisomi 21, trisomi 18 og trisomi 13 og 4 typer af kønskromosomal aneuploidy: Turner syndrom (45,X), Klinefelter syndrom (47, XXY), 47, XYY og 47, XXX. I nogle tilfælde udvikler trofoblasten sig dog og danner placentrale membraner selvom der ikke eller næsten ikke er noget embryonalt væv. Denne tilstand kaldes mola hydtidosa. Mola secernerer meget store koncentrationer af hCG og kan udvikle sig til en benign eller malign tumor. Genetisk analyse af mola hydtidosa indikerer at selvom mandlige og kvindelige pronuklei er genetisk ækvivalente er de funktionelt forskellige. Molacellerne er diploide, men hele deres genom er paternelt. De fleste mola opstår derfor ved fertilisering af en oocyt der mangler nucleus, efterfulgt af en duplikation af de mandlige kromosomer for at genoprette det diploide antal. Det viser også at de paternelle gener regulerer det meste af udviklingen af trofoblasten eftersom dette væv kan differentiere til en mola i fravær af en kvindelig pronucleus.

For eksempel vil en deletion på kromosom 15 fra faderen produceres **Prader-Willis syndrom**, hvorimod nedarvning af den samme defekt fra moderen resulterer i **Angelmans syndrom**. Dette fænomen er afhængigt af hvilken af forældrene det er nedarvet fra, kaldes genomisk prægning, der involverer både autosomer og kønskromosomer. Prægningen resulterer i inaktivering af genet hos afkommet.

En mutation er en ændring i DNA-sekvensen som ikke skyldes rekombination. Og en grundlæggende biologisk proces som DNA-replikation ikke er fejlfri. Øvrige substitutionsmutationer vil typisk skyldes indbygning af et nukleotid med en ikke-komplementær base, under syntesen af den ny DNA-streng i forbindelse med replikation og reparation. Den involverede DNA-polymerase besidder en såkaldt korrekturlæsningsfunktion (proofreading), en 3'-5' exonukleaseaktivitet der kan fjerne et fejlkoporeret nukleotid, men denne funktion er ikke 100 % effektiv.