

Van Microscoop naar Microarray

Na vele tientallen jaren gebruik te hebben gemaakt van de lichtmicroscoop voor het karyotyperen van patiënten, zal door de sectie Cytogenetica van de afdeling Antropogenetica, UMC St Radboud, per 1 januari 2009 het chromosomenonderzoek vervangen gaan worden door een moleculaire analyse (array onderzoek). Deze vervanging geldt vooralsnog alleen voor de postnatale genoomanalyse van patiënten met een verstandelijke of lichamelijke ontwikkelingsstoornis en/of congenitale afwijkingen, inclusief de zogenaamde microdeletiesyndromen.

Waarom stoppen met chromosomenonderzoek?

De huidige gang van zaken

Al sinds vele jaren is regulier chromosomenonderzoek bij patiënten met multipole congenitale afwijkingen (MCA) en/of een ontwikkelingsachterstand (mentale retardatie (MR)) een belangrijk onderdeel van het diagnostisch traject. Een groot voordeel van deze techniek is dat in één oogopslag het complete genoom in beeld wordt gebracht en geanalyseerd kan worden. Een niet onbelangrijk nadeel echter is de relatief lage resolutie. Om een verandering in een chromosoom door een lichtmicroscoop te kunnen herkennen, moet deze tenminste tussen de 6 en 10 miljoen basenparen groot zijn.

Met het huidige chromosomenonderzoek wordt bij ongeveer 5% van de patiënten met MCA/MR een afwijking gedetecteerd. Naast het standaard chromosomenonderzoek wordt bij een aantal patiënten tevens gericht FISH onderzoek gedaan voor het opsporen van specifieke microdeleties (b.v. een deletie in 22q11.2 bij verdenking DiGeorge/VCF syndroom, of een deletie in 7q11.23 bij Williams syndroom). Met dit onderzoek wordt in 3 tot 5% van deze patiënten een oorzakelijke submicroscopische deletie ontdekt. Indien na deze onderzoeken nog geen diagnose gesteld kan worden, is het mogelijk ook nog specifiek onderzoek te verrichten naar kleine (submicroscopische) imbalansen aan de uiteinden van de chromosomen, het zogenaamde subtelomerenonderzoek met behulp van MLPA. Hierbij wordt in circa 5% van de gevallen een deletie en/of duplicatie aangetoond. Dit betekent dat op dit moment met behulp van karyotypering, FISH en MLPA tezamen in 12 tot 13% van de patiënten met MR/MCA een oorzakelijke afwijking wordt gedetecteerd.

Op zoek naar meer submicroscopische afwijkingen

Een aantal jaren geleden is een techniek ontwikkeld die in feite deze 3 onderzoeken (karyotypering, FISH, MLPA) combineert in één enkel experiment en bovendien met een veel hogere resolutie, het zogenaamde array onderzoek. Dit is een techniek waarbij simultaan zeer veel punten op het humane genoom worden geanalyseerd op het voorkomen van duplicaties en deleties. We zijn in Nijmegen al in 2003, als een van de eerste laboratoria in de wereld, gestart deze techniek toe te passen in het diagnostische traject van een beperkt aantal geselecteerde patiënten. In eerste instantie met een eigenhandig gemaakte array met 3.500 meetpunten verdeeld over de chromosomen. In 2004 werd deze array vervangen door een array (weer zelf ontwikkeld) met 32.000 te analyseren meetpunten en in 2007 zijn we overgestapt op een commerciële array (de zogenaamde SNP array van de firma Affymetrix) met meer dan 250.000 meetpunten. Afgezet tegen de 500 tot 600 bandjes die microscopisch zichtbaar zijn over alle chromosomen tezamen, geeft dit een duidelijk beeld wat betreft de toegenomen resolutie, en dit is nog niet het einde. Er zijn inmiddels al arrays beschikbaar met zo'n twee miljoen meetpunten. Door deze hoge resolutie kan met één onderzoek bij veel meer MCA/MR patiënten dan voorheen (15 tot 20%) een afwijking worden gevonden in het genoom die ten grondslag ligt aan de problematiek. Wanneer een genetische verandering bij de patiënt gevonden wordt, zullen - net als bij een chromosoomafwijking - tevens de ouders onderzocht worden. Wij zullen dan voorstellen ook van beide ouders bloed af te nemen en voor verder onderzoek naar ons op te sturen. Ook zullen we bij afwijkende bevindingen in een aantal gevallen

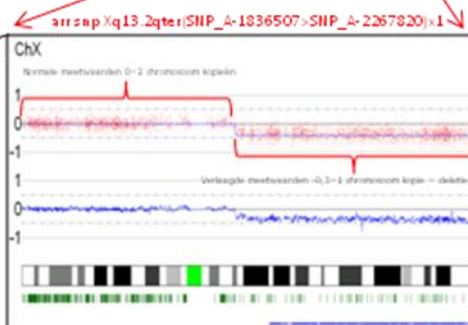
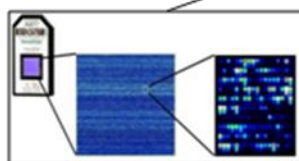
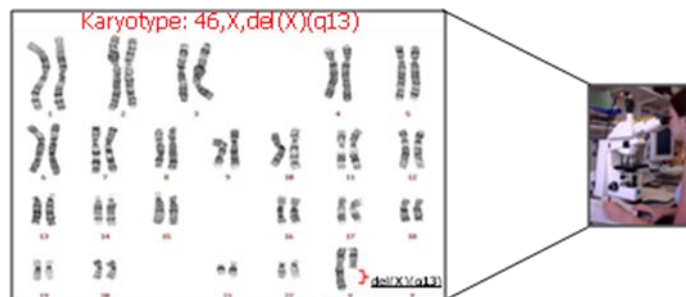
alsnog chromosomenonderzoek of FISH-onderzoek bij de patiënt moeten verrichten om de afwijking goed te kunnen duiden in verband met de voorlichting van de ouders en eventueel andere familieleden. Voor deze voorlichting wordt de patiënt en de ouders doorverwezen naar de sectie Klinische Genetica binnen onze afdeling.

Techniek

Voor het array onderzoek gebruiken we een commerciële array van de firma Affymetrix; deze zogenaamde 250K SNP array bevat ruim 250.000 stukjes DNA van elk 25 baseparen lang waarmee het patiënten DNA geanalyseerd wordt.

Uit het afgenomen (EDTA) bloed van de patiënt wordt DNA geïsoleerd dat vervolgens na een aantal bewerkingen op de array wordt gebracht, waar het kan binden aan de reeds aanwezige stukjes DNA. Elk van de ~250.000 DNA fragmenten correspondeert met een specifieke chromosomale positie. De hoeveelheid patiënten DNA die door ieder meetpunt op de array wordt gebonden is een maat voor de hoeveelheid DNA die voor dat stukje chromosoom in de patiënt aanwezig is. Vervolgens worden alle 250.000 meetpunten op de array individueel geanalyseerd om de hoeveelheid gebonden patiënten DNA per meetpunt vast te kunnen stellen en vergeleken met een groot aantal controles. Op deze manier kan worden bepaald of bij een patiënt ergens in zijn genoom te veel of te weinig DNA aanwezig is. Indien er te veel materiaal aanwezig is spreken we van een duplicatie en als er te weinig aanwezig is spreken we van een deletie. Deze analyse wordt ook grafisch weergegeven, waarvan een voorbeeld hieronder is weergegeven. De grafiek laat een array analyse zien van een patient met een deletie van een groot deel van de lange arm van een van de X-chromosomen. Elke rode stip in de grafiek is een individueel meetpunt op de array. Op de verticale as staat de maat voor de hoeveelheid gebonden patiënten DNA. De waarde 0 is gelijk aan een normale hoeveelheid DNA (2 kopieën), > 0 is een duplicatie en < 0 is een deletie. Op de horizontale as staat de positie op het betreffende chromosoom (dat tevens onder de grafiek schematisch is weergegeven).

Figuur 1a: Karyogram van een vrouw met een zeer grote deletie van de lange arm van een van de X-chromosomen. In onderstaand figuur 1b ziet u een analyse van deze zelfde vrouwelijke patiënt op de 250K SNP array van Affymetrix.



Figuur 1b: Weergave van de genomische analyse van bovenstaande patiënte op de 250K SNP microarray (weergave beperkt tot chromosoom X). Alle chromosomale meetpunten geven een individuele meetwaarde (rode puntjes). Duidelijk zichtbaar in de grafiek is een verlaging van alle meetpunten die op de microarray aanwezig zijn voor het deel van het X-chromosoom dat in de patiënte is gedeleteerd. Boven in het figuur de naamgeving voor een dergelijke deletie waarbij de twee meetpunten van de array worden genoemd waar de deletie in het chromosoom begint en eindigt.

Beperkingen:

Met de Affymetrix SNP-array kan het gehele genoom (m.u.v. het Y-chromosoom) geanalyseerd worden met een gemiddelde resolutie van ongeveer 200.000 baseparen (200 kb (Hehir-Kwa et al., 2007)). Deze resolutie geldt echter niet voor alle regio's, zoals centromeergebieden en heterochromatische regio's.

Gebalanceerde afwijkingen kunnen niet met een SNP-array analyse gedetecteerd worden. Laag mozaïeke deleties en duplicaties, aanwezig in minder dan 20% van de cellen, zijn niet met zekerheid te detecteren, maar dit is niet anders dan bij chromosomenonderzoek.

De verandering van aanpak heeft ook gevolgen voor de wijze van aanvraag.

Aanvraag

Voor dit onderzoek zijn **twee buizen EDTA-bloed** (7-10 ml; bij neonaten minimaal 2 buisjes van 2 ml) nodig i.v.m. DNA-isolatie en **één buisje van 5 ml heparinebloed** (neonaten 2 ml) voor een chromosomenkweek.

Het bloed kan samen met een aanvraagformulier voor [postnataal genoomonderzoek](#) per post bij kamertemperatuur verstuurd worden naar de sectie Cytogenetica, afd. Antropogenetica, routenr. 848.

Bij additionele aanvragen voor DNA-diagnostiek kan gebruik worden gemaakt van het aanvraagformulier voor [DNA-onderzoek](#) (onder sectie DNA-diagnostiek).

Indien bij een patiënt al eerder DNA-onderzoek is verricht door de sectie DNA-diagnostiek, dan kan meestal op het resterende DNA monster (mits dit van voldoende kwaliteit is) array diagnostiek worden uitgevoerd. In dit geval is het insturen van alleen een aanvraagformulier voldoende.

De uitslagtermijn voor het array onderzoek bedraagt net als voor regulier chromosomenonderzoek maximaal 8 weken. Voor pasgeborenen jonger dan 6 maanden is de uitslagtermijn maximaal 3 weken (telefonisch aanmelden). Bij deze patiëntjes zal vooralsnog ook in alle gevallen chromosomenonderzoek worden uitgevoerd.

Secretariaat:

Tel.: 024 – 36 14104 – 36 14105

Fax: 024 – 36 68751

Email: cytosec@antrg.umcn.nl

Website: www.humangenetics.nl

Postadres:

UMC St Radboud

Sectie Cytogenetica, afdeling Antropogenetica

Routenr. 848

Postbus 9101

6500 HB Nijmegen