`การจำแนกการเกิดทรานสโลเกชันของโครโมโซมที่มองไม่เห็นใต้กล้องในผู้ป่วยในกลุ่มอาการ microdeletion
Submicroscopic identification of chromosomal translocation in patients with microdeletion syndromes

วรภา หีบจันทร์ตรี* ณัชชารีย์ จงพรชัย และ ชนินทร์ ลิ่มวงศ์

Worapa Heepchantree*, Natcharee Jongpornchai and Chanin Limwongse

ห้องปฏิบัติการโครโมโซมกลาง สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพ 10700

Siriraj Central Cytogenetic Laboratory, Department of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700

**Corresponding author: worapah@hotmail.com*

บทคัดย่อ

ผลจากการทำคาริโอไทป์ของผู้ป่วยโรค Velocardiofacial และ Prader-Willi syndrome พบการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนระหว่างโครโมโซม Y และ 22 และ ระหว่างโครโมโซม15 และ 22 และพบการขาดหายของยีน *TUPLE1* and *SNRPN* จากการตรวจโดยใช้เทคนิค FISH จึงอาจสรุปว่าการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนในผู้ป่วยทั้งสองคนนั้นเป็นแบบ unbalanced translocation ดังนั้นจึงแนะนำให้ตรวจทั้งคาริโอไทป์และเทคนิคทาง molecular cytogenetic มาประกอบกันในการจำแนกการตรวจการขาดหายไปของโครโมโซมซึ่งมองไม่เห็นใต้กล้อง และ/หรือ ที่เกิดจากแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมแบบ unbalanced

คำสำคัญ: การขาดหายไปของโครโมโซมที่มองไม่เห็นใต้กล้อง, ทรานสโลเกชันของโครโมโซม, กลุ่มอาการที่เกิดจากการขาดขนาดเล็กของโครโมโซม

Keywords: cryptic/submicroscopic deletion, chromosomal translocation, microdeletion syndrome

ABSTRACT

The rearrangements between chromosome Y and 22, and chromosome 15 and 22 in patients with Velocardiofacial and Prader-Willi syndromes were observed by karyotyping. The deletion of *TUPLE1* and *SNRPN* genes were also detected by Fluorescence *in situ* Hybridization. It can be concluded that the rearrangements were unbalance translocations. Therefore, the combination of karyotyping and molecular cytogenetic tests should be recommended to identify submicroscopic chromosome deletion and/or unbalanced rearrangement.

บทนำ

Microdeletion syndrome เป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากการขาดหายขนาดเล็กบนโครโมโซม ที่ไม่สามารถมองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (sub microscopic chromosome deletion) ด้วยเทคนิคการย้อมแถบขวาง (banding) ที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ ซึ่งส่วนใหญ่ผู้ป่วยโรคในกลุ่มนี้จะมี

karyotype ปกติ (46,XX/46,XY) โดยแต่ละกลุ่มอาการของโรคที่เกิดก็จะมีความสัมพันธ์กับการขาดหายของ gene บนโครโมโซม เช่น Di-George หรือ Velocardiofacial syndrome เป็นโรคที่มากกว่า 95% เกิดจากการขาดหายของยีน *TUPLE1* บนแขนยาวของโครโมโซม 22 ที่ตำแหน่ง 11.2 (22q11.2) ซึ่งผู้ป่วยมักจะมีลักษณะใบหน้าจำเพาะ มีความผิดปกติของหัวใจ ระบบภูมิคุ้มกัน การเจริญเติบโตและพัฒนาการ มีระดับแคลเซียมในเลือดต่ำ ส่วน Prader-Willi syndrome เป็นโรคที่ประมาณ 70 % ของผู้ป่วยมีการขาดหายของยีน *SNRPN* บนแขนยาวของโครโมโซม 15 ที่ตำแหน่ง 11.2 (15q11.2) ผู้ป่วยโรคนี้ในวัยเด็กมักจะมีปัญหาเรื่องกล้ามเนื้ออ่อนแรง ความยากลำบากให้อาหาร การเจริญเติบโตไม่ดีและการพัฒนาล่าช้า ซึ่งอาการเหล่านี้ส่งผลกระทบทำให้เกิดโรคอ้วน (Theisen and Shaffer, 2010)

Whole arm translocation เป็นการแลกเปลี่ยนระหว่างแขนของ non-homologous chromosome โดยมีการเชื่อมต่อที่บริเวณเซนโทรเมียร์ ซึ่ง Robertsonian translocation คือรูปแบบหนึ่งของ whole arm translocation ที่เกิดจากการเชื่อมต่อระหว่างแขนยาวซึ่งเป็นส่วนของ vast majority of genes ของ acrocentric chromosome (โครโมโซมที่ 13, 14, 15, 21 และ 22) ทำให้เห็นลักษณะเหมือนโครโมโซมหนึ่งแท่ง ส่วนของแขนสั้นซึ่งเป็นส่วนของ non-essential genes ก็จะเชื่อมต่อกัน แต่ส่วนนี้มักจะหายไประหว่างขบวนการแบ่งเซลล์ จึงทำให้เห็นว่ามีจำนวนโครโมโซมเป็น 45 แท่ง โดยขบวนการ Robertsonian translocation มักเป็นแบบ balance คือมีการเชื่อมต่อระหว่างแขนยาวของโครโมโซม แต่ไม่มีการเพิ่มขึ้นหรือหายไปของยีนบนโครโมโซม จึงไม่ทำให้เกิดความผิดปกติต่อร่างกาย อย่างไรก็ตาม ถ้าขบวนการนี้เกิด translocation แบบ unbalance คือมีการเพิ่มหรือขาดหายไปของยีนบนโครโมโซมใดโครโมโซมหนึ่ง จะทำให้เกิดความผิดปกติทั้งด้านรูปร่าง การเจริญเติบโตและพัฒนาการ (Kim and Shaffer, 2002) ซึ่งความผิดปกติของโครโมโซมแบบนี้มักจะมองไม่เห็น จากการวิเคราะห์ผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (submicroscopic) โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการ

การศึกษานี้เป็นการเสนอตัวอย่างการตรวจหาความผิดปกติของผู้ป่วย ที่สงสัยว่าเป็นโรคในกลุ่ม microdeletion syndrome ในห้องปฏิบัติการโครโมโซมกลางศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ใช้ทั้งเทคนิคการย้อม banding และ fluorescence *in situ* hybridization (FISH) มาประกอบกันเพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้อง และสามารถนำไปใช้ในการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์กับผู้ป่วยและครอบครัว

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมโครโมโซมจากเลือด

ตัวอย่างเลือกจากผู้ป่วยรายที่ 1 เป็นเด็กผู้ชาย แพทย์สงสัยว่าเป็นโรค Velocadiofacial syndrome และผู้ป่วยรายที่ 2 เป็นเด็กผู้หญิง แพทย์สงสัยว่าเป็นโรค Prader-Willi syndrome เตรียมโครโมโซมจากเลือด ตามวิธีมาตรฐาน โดยหยดเลือดปริมาตร 500 µl ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI ปริมาตร 4.5 ml ที่มี penicillin/streptomycin (10,000 IU/ml;10,000 µg/ml) fetal calf serum อยู่ 20% และ PHA 100 µl นำขวดเลี้ยงเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 72 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์และเตรียมสไลด์ตามวิธีมาตรฐาน

การตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิค FISH

ทำตามวิธีที่ระบุใน package insert ที่แนบมากับ DNA probe ที่ใช้ (Abbott Molecular) โดย

วิเคราะห์ความผิดปกติบนเซลล์ในระยะ metaphase วิเคราะห์และรายงานผลความผิดปกติของโครโมโซม จากสไลด์ที่ผ่านการย้อมแถบสี และ FISH ตามหลักของ ISCN 2009 (Shaffer *et al*., 2009)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมพบว่าผู้ป่วย Velocadiofacial syndrome มีคาริโอไทป์เป็น 45,X,der(Y;22)(q10;q10) ดังแสดงใน Figure 1a คือ มีโครโมโซมทั้งหมด 45 แท่ง และมี derivative chromosome ที่มีลักษณะเหมือน whole arm translocation ระหว่างแขนยาวของโครโมโซม 22 และโครโมโซมY และเมื่อนำมาตรวจต่อด้วยเทคนิค FISH พบว่า เซนโทรเมียร์ของ derivative chromosome นั้นคือ เซนโทรเมียร์ของโครโมโซม Y ดังแสดงใน Figure 2a นอกจากนั้นยังพบว่ายีน *TUPLE1* บน derivative chromosome หายไป (Figure 2b)

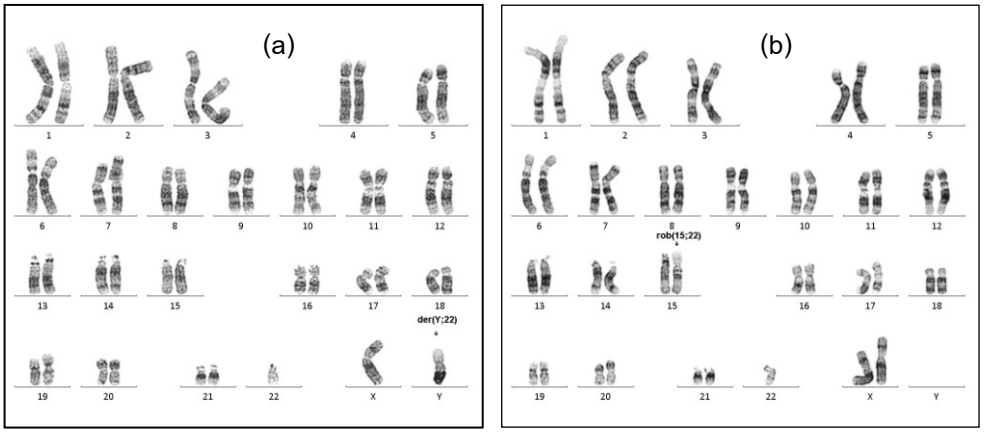

Figure 1 A karyotype of a patient with Velocadiofacial syndrome: 45,X,der(Y;22)(q10;q10)(a) and karyotype of a patient with Prader-Willi syndrome: 45,XX,rob(15;22)(q10;q10)(b)

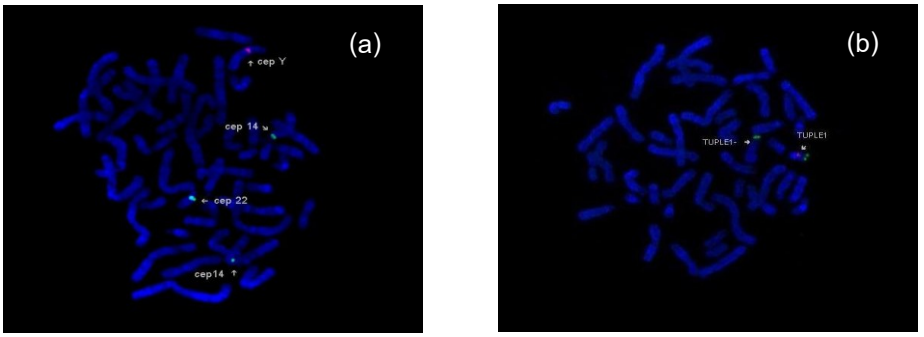

Figure 2 Identification of centromere on derivative chromosome using CEP 14/22 and CEP Y probes (a) and the detection of *TUPLE1* gene deletion using LSI TUPLE1 probe (b) in a patient with Velocadiofacial syndrome. See color figure on the website.

ส่วนผลจากการวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมในผู้ป่วย Prader-Willi syndrome พบว่ามีคาริโอไทป์ เป็น 45,XX,rob(15;22)(q10;q10) ดังแสดงใน Figure 1b คือ มีโครโมโซมทั้งหมด 45 แท่ง และมี Robertsonian translocation ระหว่างแขนยาวของโครโมโซม 15 และโครโมโซม 22 และเมื่อนำมาตรวจด้วยเทคนิค FISH พบว่าทั้งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซม15 และยีน *SNRPN* บน rob(15;22) หายไป (Figure 3)

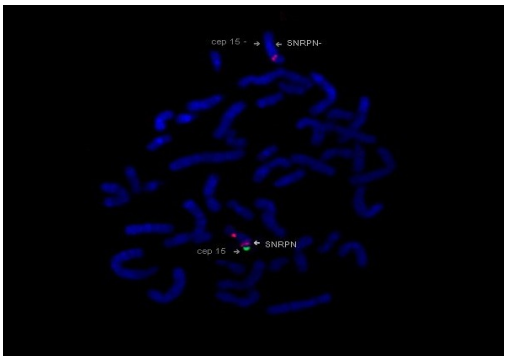

Figure 3 Detection of *SNRPN* gene deletion using LSI SNRPN probe in a patient with Prader-Willi syndrome. See color figure on the website.

ดังนั้น ในกรณีที่ตรวจวิเคราะห์หาความผิดปกติของโครโมโซมแล้วพบว่า คาริโอไทป์มีความผิดปกติแบบ whole arm หรือ Robertsonian translocation และ/หรือมีลักษณะทางคลินิคที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มอาการ microdeletion ควรจะตรวจโดยใช้เทคนิคอื่นๆ ร่วมด้วย ได้แก่ FISH หรือ microarrays (Vissers *et al*., 2010; Gekas *et al*., 2011) เพื่อยืนยันว่ามีการขาดหายไปของยีนที่อยู่ใกล้บริเวณเซนโทรเมียร์ หรือมีความผิดปกติแบบ unbalance translocation หรือไม่ โดยเฉพาะในการวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis) เนื่องจากการตรวจหาความผิดปกติจากคาริโอไทป์เพียงอย่างเดียว อาจจะเกิดความผิดพลาดจากการอ่านภายใต้กล้องที่ไม่ชัดเจน เพื่อนำใช้ประกอบในการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ (genetic counseling) ที่ถูกต้องและมีประโยชน์ต่อการวางแผนการตรวจของบุคคลอื่นๆ ในครอบครัวนั้น (Theisen and Shaffer, 2010)

สรุปผลการทดลอง

จากผลการวิเคราะห์การตรวจโครโมโซมและจากเทคนิค FISH ร่วมกัน สามารถเขียนผลการตรวจของผู้ป่วย Velocadiofacial syndrome รวมเป็น 45,X,der(Y)t(Y;22)(p11.2;q11.2),-22.ish del(22) (q11.2q11.2)(TUPLE1-) และคาริโอไทป์ของผู้ป่วย Prader-Willi syndrome เป็น 45,XX,-15,der(22)t(15;22) (q11-13;p11.2).ish del(15) (q11-13q11-13)(SNRPN-) จากการศึกษานี้จึงเป็นการสนับสนุนการบริการในห้องปฏิบัติการโครโมโซมกลางศิริราช ที่ใช้การตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยการย้อมแถบสีควบคู่กับการตรวจโดยใช้เทคนิค FISH ในผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคในกลุ่ม microdeletion syndrome และโรคอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

Gekas J, Vallée M, Castonguay L, Laframboise R, Maranda B, Piedboeuf B and Rousseau F (2011) Clinical validity of karyotyping for the diagnosis of chromosomal imbalance following array comparative genomic hybridization. J Med Genet 48: 851–855.

Kim SR and Shaffer LG (2002) Robertsonian translocations: Mechanisms of formation, aneuploidy, and uniparental disomy and diagnostic considerations. Genet Test 6:163–168.

Shaffer LG, Slovak ML and Campbell LJ (2009)

An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. In: Shaffer LG, Slovak ML and Campbell LJ (eds) Basel: S. Karger.

Theisen A and Shaffer LG (2010) Disorder caused by chromosome abnormalities. App Clin Genet 3: 159–174.

Vissers LELM, De Vries BBA and Veltman JA (2010) Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. J Med Genet 47: 289–297.