

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20981> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Almomani, Rowida

**Title:** The use of new technology to improve genetic testing

**Issue Date:** 2013-06-19

## Nederlandse samenvatting

Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling en toepassing van nieuwe technieken voor het detecteren van kleine variaties (mutaties) in genomisch DNA. Deze technieken zijn:

- Smeltcurve analyse met hoge resolutie (High Resolution Melting Curve Analyse (HR-MCA) als pre-sequencing techniek gevolgd Sanger sequencing
- Gerichte verrijking van exonen op het X chromosoom en alle exonen in het genoom (whole exome) gevolgd door “Next Generation Sequencing” (NGS).

Hoofdstuk 2 beschrijft het toepassen en de implementatie van HR-MCA en Sanger sequencing als een efficiënte diagnostische voorscreeningsmethode voor het opsporen van kleine mutaties in alle exonen en exon-intron overgangen van het DMD (Duchenne Muscular Dystrophy) gen. Na de validatie van de techniek, werd het DNA onderzocht van 22 onafhankelijke DMD/BMD patiënten en 11 vrouwen bij wie eerder deleties en duplicaties in het DMD gen waren uitgesloten. Zeventien verschillende pathogene mutaties werden in deze groep gevonden, waarvan er tien nieuw waren ontstaan. De resultaten tonen aan dat HR-MCA een krachtige en goedkope diagnostische pre-sequencing-techniek is om kleine mutaties te detecteren in het DMD gen van patiënten en dragers.

In hoofdstuk 3 beschrijven we het verrijken van stukjes DNA sequenties met behulp van micro-arrays (385K NimbleGen arrays) om de exonen en de flankerende intron gebieden te kunnen sequencen van 112 genen, die mogelijk betrokken zijn bij mentale retardatie en aangeboren afwijkingen. De sequentie van het geselecteerde materiaal werd bepaald met behulp van Illumina-technologie en een data-analyse pijplijn werd gebouwd. Onze gegevens tonen aan dat:

- ten eerste, het verrijken van DNA sequenties met micro-arrays gevolgd door Illumina sequencing een effectief hulpmiddel is om belangrijke sequenties uit het menselijk genoom te selecteren;
- ten tweede alle bekende varianten met succes werden gedetecteerd;
- ten derde, alhoewel de totale ‘coverage’ aanzienlijk varieerde, de resultaten per regio reproduceerbaar waren en het de detectie van grote deleties en duplicaties (Copy Number

Variants) vergemakkelijkt, waaronder het opsporen van een gedeeltelijke deletie in het B3GALTL gen in een patiënten monster.

Voor de uiteindelijke diagnostische toepassing, kan de methode nog worden verbeterd, met name met betrekking tot het array ontwerp teneinde een meer gelijkmatige coverage van de te onderzoeken gebieden te verkrijgen.

In hoofdstuk 4, wordt X-exome capture beschreven, gevolgd door Illumina (Genome Analyzer II) sequencing bij twee index patiënten uit een Nederlands en een Italiaans gezin met Terminal Osseous Dysplasia (TOD). TOD is een X-gebonden dominante mannelijk-lethale ziekte, die wordt gekenmerkt door terminale skeletdysplasie, pigment afwijkingen, hypoplasie van de huid en regelmatig terugkerende digitale fibromen tijdens de kinderjaren. Eerdere koppelingsstudies met markers op het X chromosoom plaatsten het ziekte-veroorzakende gen in band Xq27.3-q28. Met behulp van data analyse werd een “stille” variant in het laatste nucleotide in exon 31 van het gen FLNA geïdentificeerd in beide patiënten. Dezelfde variant c.5217G>A werd ook gevonden in vier andere niet verwante patiënten en werd niet gevonden in 400 controle X-chromosomen, de 1000 genomen en de FLNA gen variant database. De variant co-segregeerde met ziekte in deze families. Onze gegevens laten zien dat door non-random X chromosoom inactivatie, het mutante allel niet tot expressie komt in de fibroblasten van een patiënt. RNA expressie van het mutante allel werd alleen gedetecteerd in gekweekte cellen van een chirurgisch verwijderd fibroma van een 3-jarig patiëntje, dat 15 jaar was bewaard. De variant activeert een cryptische splicing site waardoor de laatste 48 nucleotiden van exon 31 worden verwijderd. Op eiwitniveau, resulteert dit in een verlies van 16 aminozuren (p.Val1724\_Thr1739del) en naar verwachting de deletie van een sequentie op het oppervlak van filamine repeat 15. Onze gegevens tonen aan dat TOD wordt veroorzaakt door een enkele, unieke, herhaald nieuw ontstane mutatie in het FLNA gen.

Hoofdstuk 5 bespreekt whole exome sequencing om pathogene mutaties te identificeren die het autosomaal recessieve Spino Cerebellaire Ataxie type 7 (SCAR7) veroorzaken. Het SCAR7 locus werd eerder gemapt op chromosoom 11p15. We hebben nu het oorzakelijke gen voor SCAR7 geïdentificeerd middels exome sequencing in de familie van de de index patiënt. Twee verschillende mutaties, een missense en een splice-site mutatie werden gevonden in het TPP1

gen dat co-segregeert met de ziekte. Dezelfde mutaties werden gedetecteerd in een niet verwante andere patiënt met een vergelijkbaar fenotype. De patiënten toonden een lage activiteit van tripeptidyl peptidase-1, het eiwit dat wordt gecodeerd door *TPP1*. Het is al langer bekend dat volledige inactivering van dit gen de infantiele vorm van Neuronale Ceroid Lipofuscinosis (CLN2) veroorzaakt. De patiënten hadden geen epilepsie, geen oog afwijkingen, noch hadden zij curvilineaire lichaampjes bij elektronenmicroscopisch onderzoek van een huidbiopt, die karakteristiek zijn voor CLN2. Het langzaam progressieve beloop van de ziekte tot op oudere leeftijd is duidelijk anders dan de snelle en gestadige achteruitgang in de kinderjaren die kenmerkend is voor CLN2.

Hoofdstuk 6 beschrijft het sequencen van de exomen van drie patiënten met Chudley McCullough Syndroom (CMS) uit twee niet verwante Nederlandse gezinnen uit hetzelfde dorp. We identificeerden bij alle drie de patiënten dezelfde homozygote frameshift variant c.1473delG in het *GPSM2* gen. Deze variant werd middels Sanger sequencing homozygoot in de patiënten en in heterozygote vorm in hun ouders aangetoond. We laten zien dat deze variant is ontstaan in een gemeenschappelijk, zeldzaam haplotype. Onze gegevens bevestigen de recente bevinding van Doherty en co-auteurs, die varianten in *GPSM2* als oorzaak voor CMS beschrijven. De c.1473delG mutatie in *GPSM2*, die is geassocieerd met CMS, lijkt afkomstig van een gemeenschappelijke voorouder en is waarschijnlijk door mennonieten (doopsgezinde kolonisten) vanuit West-Europa naar Noord Amerika gebracht. Wij hebben tevens een Leiden Open source Variant Database (LOVD) voor het *GPSM2* gen opgezet met alle tot dusver bekende varianten.

In hoofdstuk 7 beschrijven we de succesvolle toepassing van whole exome sequencing bij het zoeken naar de genetische oorzaak van Facioscapulohumerale dystrofie type 2. FSHD is na spinale spieratrofie en de spierziekte van Duchenne de derde meest voorkomende myopathie, die wordt gekenmerkt door geleidelijk toenemende zwakte van de spieren in het gelaat, de schouder en de bovenarm spieren. In de meeste gevallen wordt FSHD veroorzaakt door samentrekking van de D4Z4 repeat op een allel gelegen op chromosoom 4 (FSHD1). Dit leidt tot een lokale verandering van de chromatinestructuur en stabiele expressie van het door D4Z4 gecodeerde DUX4 retrogen in skeletspieren. In andere gevallen komt de myopathie eveneens tot stand door chromatine verandering en stabiele DUX4 expressie, maar zonder de contractie van de D4Z4 repeat (FSHD2). Om de genetische oorzaak van FSHD2 en het locus dat verantwoordelijk is

voor de D4Z4 hypomethylatie te identificeren, werd whole exome sequencing uitgevoerd bij twaalf personen uit zeven onafhankelijke FSHD2 families: vijf met dominant overervende hypomethylatie en twee met sporadische hypomethylatie. Verschillende mutaties in het SMCHD1 gen (structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1) werden met uitzondering van één patiënt in alle aangedane individuen geïdentificeerd. We hebben Sanger sequencing gebruikt om de aanwezigheid van deze mutaties te bevestigen. En we hebben 12 aanvullende niet-verwante families met FSHD2 waarvan DNA of RNA beschikbaar was. We identificeerden in 15 van de 19 (79%) families heterozygote frameshift deleties, heterozygote missense en splice-site mutaties in *SMCHD1*. Mutaties in *SMCHD1* verminderen in grote mate het SMCHD1 eiwitgehalte in de skeletspieren met als gevolg algehele hypomethylatie, hetgeen leidt tot DUX4 expressie onafhankelijk van de contractie van de D4Z4 repeat. Daarnaast werd duidelijk dat mutaties in *SMCHD1*, dat is gelegen op chromosoom 18, onafhankelijk van het FSHD-permissieve DUX4 allel op chromosoom 4 wordt doorgegeven in een familie. Dit resulteert in een digeen overervingspatroon bij de aangedane personen. FSHD2 ontstaat uitsluitend bij personen die zowel de SMCHD1 mutatie als een normale grootte van de D4Z4 repeat geërfd hebben op een chromosoom 4 haplotype permissief voor DUX4 expressie. Dus *SMCHD1* is een epigenetische modifier van het D4Z4 metastabiele epi-allel en een belangrijke genetische determinant van FSHD2.

In hoofdstuk 8 worden de voors en tegens van de verschillende hierboven beschreven technieken besproken en komen we tot de conclusie dat de nieuwste technieken ons steeds sneller en beter in staat stellen de oorzakelijke genen voor ziekten op te sporen en moleculaire diagnoses te stellen.