



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Detecting copy number changes in genomic DNA - MAPH and MLPA

White, S.J.

Citation

White, S. J. (2005, February 3). *Detecting copy number changes in genomic DNA - MAPH and MLPA*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/651>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/651>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Summary

The work presented in this thesis describes the further development and application of two techniques for the detection of copy number changes in genomic DNA, namely Multiplex Amplifiable Probe Hybridization (MAPH) and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Both techniques allow the quantitative analysis of up to 50 loci in a single reaction.

The initial work involved analysis of the *DMD* gene, mutations in which cause Duchenne and Becker Muscular Dystrophy (DMD/BMD). MAPH was used for the detection of deletions and duplications in Duchenne Muscular Dystrophy patients (Chapter 2.1). Using this approach several small duplications and deletions were identified. It is especially noteworthy that a duplication of exon 2 was described for the first time, yet is the single most common duplication found. A further investigation of duplications in the *DMD* gene, using both MAPH and MLPA, is described in chapter 2.2. Among several novel duplications found were several non-contiguous duplications and triplications, as well as a duplication that lead to a deletion at the mRNA level. Such cases emphasize the importance of screening all exons within the gene for rearrangements, and show that the reading-frame rule used for the prediction of disease progression has to be used with caution when duplications are involved.

Although detecting the causative mutation is obviously critical for the patient, determining the carrier status of relatives is also important. This is made considerably easier when the mutation to look for has already been identified in the patient. We took advantage of this in developing a rapid approach for testing female relatives of affected patients (Chapter 2.3).

There are many other forms of muscular dystrophy known. Among these are the recessive forms of the limb-girdle muscular dystrophies. In contrast to DMD/BMD, the mutation spectra of these diseases show that small mutations affecting only one or a few nucleotides are almost exclusively the cause of the disease. There are, however, situations when mutations can not be found at all, or only in one allele. In one such patient a single exon deletion was found in the sarcoglycan gamma (SGCG) gene. The same deletion had been described in two patients from another country, and breakpoint analysis showed the identical, complex rearrangement. The fact that this mutation segregated with the same haplotype in the three, unrelated individuals strengthened the argument for a common ancestor (Chapter 3).

Although MAPH is ideally suited for the analysis of exonic deletions and duplications, it can also be applied to the detection of larger rearrangements. Such changes, known to be involved in developmental delay, were investigated in a cohort of patients with mental retardation. Along

with the expected changes involving the subtelomeric regions, several interstitial rearrangements were found (Chapter 4). The discovery of affected regions in these patients will hopefully lead to the identification of the genes responsible for the development delay.

Given the relative simplicity of the assay, MLPA is becoming the technique of choice in diagnostic settings. A drawback of the technique, however, is the costly and time-consuming cloning required for generating probes. To circumvent this we developed a two color method using synthetic oligonucleotides only, and tested it by screening the *EXT1* and *EXT2* genes, involved in Hereditary Multiple Exostoses (HME). Using this we showed that partial gene deletions do occur in both genes, and account for 5-8% of all HME cases (Chapter 5.1). The same approach was also used to detect a deletion in the *EP300* gene in a patient with Rubinstein-Taybi Syndrome (RSTS), showing for the first time that mutations in this gene also cause the disease (Chapter 5.2). This simple manner of probe development should facilitate quantitative analysis of other genes in the future.

It is known that ~5% of the genome is composed of duplicons, which are highly similar sequences present in more than one copy. These are difficult to characterize by sequencing, and complicate Single Nucleotide Polymorphism (SNP) analysis. A number of apparently SNP-containing loci within these regions were analyzed by MLPA, which showed for several of the cases that differences seen between samples were the result of variations in copy number (Chapter 6). These multisite variants (MSVs) may appear as SNPs unless correctly analyzed, and application of techniques such as MLPA will be necessary to provide a clearer picture of the contribution of MSVs to genomic variation. Techniques such as MAPH and MLPA are therefore not only applicable to the search for intragenic deletions and duplications in disease, but also to the high resolution analysis of genomic variation.

Samenvatting

Het onderzoek dat in dit proefschrift uiteengezet wordt beschrijft de verdere ontwikkeling en toepassing van twee technieken voor het detecteren van veranderingen in kopie aantal in genomisch DNA, namelijk Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH) and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Beide technieken maken het mogelijk tot 50 loci kwantitatief te analyseren in één enkele reactie.

Aanvankelijk richtte het onderzoek zich op de analyse van het *DMD* gen, waarin mutaties Duchenne en Becker spierdystrofie (DMD/BMD) veroorzaken. MAPH werd gebruikt voor de detectie van deleties en duplicaties in DMD patiënten (Hoofdstuk 2.1). Met deze aanpak werden meerdere kleine deleties en duplicaties gevonden. Het is vooral opmerkelijk dat voor het eerst een duplicatie van exon 2 werd gevonden terwijl dit de meest voorkomende duplicatie bleek te zijn. Een diepgaand onderzoek naar duplicaties in het *DMD* gen, gebruik makend van zowel MAPH als MLPA, is beschreven in hoofdstuk 2.2. Onder de verschillende nieuwe duplicaties die werden gevonden bevonden zich ook enkele niet-aaneengesloten duplicaties en triplicaties, als ook een duplicatie die leidt tot een deletie in het mRNA. Zulke gevallen benadrukken het belang van het screenen van alle exonen in het gen voor herrangschikkingen, en tonen aan dat de leesraam regel voor het voorspellen van ziekte verloop voorzichtig gebruikt moet worden wanneer het duplicaties betreft.

Hoewel het detecteren van de onderliggende mutatie uiteraard essentieel is voor de patiënt, is het bepalen van eventueel dragerschap van familieleden ook zeer belangrijk. Dit is een stuk eenvoudiger indien de mutatie waarnaar gezocht moet worden in de patiënt reeds is gevonden. We hebben hiervan gebruik gemaakt voor het ontwikkelen van een snelle aanpak voor het testen van vrouwelijke familieleden van aangedane patiënten (Hoofdstuk 2.3).

Er zijn vele andere vormen van spierdystrofie bekend. Hieronder bevinden zich de recessieve vormen van limb-girdle spierdystrofieën. In tegenstelling tot DMD/BMD, tonen de mutatie spectra dat kleine mutaties van één of enkele nucleotiden vrijwel de enige oorzaken zijn van deze ziekten. Er zijn echter gevallen waarbij geen enkele mutatie gevonden kan worden, of in slechts één van de twee allelen. In één zo'n patiënt werd een deletie gevonden van een heel exon in het sarcoglycan gamma (*SGCG*) gen. Dezelfde deletie was eerder beschreven in twee patiënten uit een ander land, en breukpunt analyse toonde dezelfde, complexe herrangschikking. Het feit dat deze mutatie overerft met hetzelfde haplotype in deze drie niet-verwante individuen versterkt het argument voor het bestaan van een gezamenlijke voorouder (Hoofdstuk 3).

Hoewel MAPH bij uitstek geschikt is voor de analyse van exon deleties en duplicaties, kan het ook gebruikt worden voor het detecteren van grotere herrangschikkingen. Zulke veranderingen die een rol

spelen in vertraging van de ontwikkeling werden onderzocht in een groep patiënten met mentale retardatie. Naast de verwachte veranderingen van de subtelomere gebieden werden verschillende herrangschikkingen in de gebieden daartussen gevonden (Hoofdstuk 4). Het ontdekken van aangedane gebieden in deze patiënten leidt hopelijk tot de identificatie van genen die verantwoordelijk zijn voor de ontwikkelings achterstand. Dankzij de relatieve eenvoud van de analyse wordt MLPA de techniek van keuze in de diagnostiek. Een nadeel van de MLPA techniek is echter dat het kloneren van de benodigde probes duur en tijdrovend is. Om dit te omzeilen hebben we een twee kleuren methode ontwikkeld waarbij we alleen gebruik maken van synthetische oligonucleotides, deze methode hebben we uitgetoetst door de *EXT1* en *EXT2* genen te screenen die een rol spelen bij Erfelijke Multiple Exostosen (HME). Hiermee hebben we aangetoond dat gedeeltelijke gen deleties in beide genen voorkomen, en verantwoordelijk zijn voor 5-8 % van alle HME gevallen (Hoofdstuk 5.1). Dezelfde methode werd ook gebruikt om een deletie in het *EP300* gen in een patiënt met Rubinstein-Taybi Syndroom (RSTS) aan te tonen, hiermee voor het eerst aantonend dat mutaties in dit gen ook deze ziekte veroorzaken (Hoofdstuk 5.2). Deze eenvoudige methode van probes maken zou de kwantitatieve analyse van andere genen in de toekomst moeten vereenvoudigen. Het is bekend dat ~5 % van het genoom bestaat uit duplicons, dit zijn sterk overeenkomstige sequenties die in meer dan één kopie aanwezig zijn. Deze zijn moeilijk te analyseren door middel van sequenzen en bemoeilijken Single Nucleotide Polymorphism (SNP) analyses. Een aantal schijnbaar SNP bevattende plaatsen in deze gebieden werden geanalyseerd met MLPA, waarmee werd aangetoond dat in meerdere gevallen de verschillende patronen tussen monsters te wijten waren aan verschillen in kopie aantal (Hoofdstuk 6). Deze ‘multisite variants’ (MSVs) kunnen zich voordoen als SNPs tenzij ze correct worden geanalyseerd, waarbij toepassing van een techniek zoals MLPA noodzakelijk is om een beter beeld te krijgen van de bijdrage van MSVs aan genoom variatie. Technieken zoals MAPH en MLPA zijn daarom niet alleen geschikt voor het zoeken naar deleties en duplicaties in ziektegenen maar ook voor de hoge resolutie analyse van genoom variatie.