



Universiteit
Leiden

The Netherlands

The human genome; you gain some, you lose some

Kriek, M.

Citation

Kriek, M. (2007, December 6). *The human genome; you gain some, you lose some*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12479>

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/1887/12479>

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

Chapter IV-3

Nederlandse samenvatting

In 1956 werd door Tjio en Levan het correcte aantal chromosomen in een menselijke cel gepubliceerd ($n = 46$). Op basis van deze bevinding werd een techniek ontwikkeld om chromosomen nader te onderzoeken; karyotypering met behulp van de lichtmicroscop (Caspersson, Lomakka, and Zech 1972; Yunis 1976). Een andere belangrijke doorbraak was de ontdekking van de Fluorescent *In Situ* Hybridisation (FISH) techniek (Ried *et al.* 1990; Landegent *et al.* 1985). Dit maakte het mogelijk om gericht relatief kleine veranderingen in het erfelijk materiaal van de mens te identificeren. Het werd echter duidelijk dat deze microscopische technieken beperkingen kennen, arbeidsintensief en kostbaar zijn. De belangrijkste beperking is dat veranderingen in het erfelijk materiaal kleiner dan 5-10 miljoen bouwstenen (= megabasen=Mb) zonder duidelijke specifieke klinische kenmerken bij een patiënt niet kunnen worden gediagnosticeerd. In de afgelopen jaren is een scala aan moleculaire technieken ontwikkeld met een hogere resolutie in vergelijking met karyotypering. Aanvankelijk gaven multicolour en multiprobe FISH uitkomst, echter deze technieken zijn niet in staat om veranderingen in het erfelijk materiaal kleiner dan ~2 Mb op te sporen (figuur 3). Southern blotting (Southern 1975) en Pulse field gel electrophoresis (PFGE) (van Ommen *et al.* 1986; Den Dunnen *et al.* 1987) zijn wel in staat deze submicroscopische veranderingen te detecteren, echter zij zijn arbeidsintensief en hebben een lage doorvoersnelheid. In 2000 en 2002 werden, respectievelijk, Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH) (Armour *et al.* 2000) en Multiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) (Schouten *et al.* 2002) technieken geïntroduceerd. Deze, op kwantitatieve PCR-gebaseerde, technieken zijn in staat om met een zeer hoge resolutie (overeenkomend met de probe lengte ~100-500 baseparen) meerdere plaatsen op het genoom te testen op de aanwezigheid van kopie-verschillen bij 96 patiënten in één reactie.

Hoofdstuk II-1 en hoofdstuk II-2 beschrijven twee studies waar gebruik is gemaakt van de MAPH techniek. De MLPA techniek is in deze studies gebruikt voor de verificatie van de gevonden veranderingen. In **hoofdstuk II-1** worden de 'chromosoom-eind' en interstitiële veranderingen (verandering binnen het chromosoom) samengevat, die gevonden zijn na het testen van 184 patiënten met een verstandelijke beperking. Ruim 4% van deze studiepopulatie had een verandering aan het einde van de chromosomen. Een onderverdeling in patiënten met een verstandelijke beperking met en zonder aanvullende dysmorphe / aangeboren afwijkingen resulteerde in de conclusie dat de kans op het vinden van veranderingen aan het einde van de chromosomen het grootst is bij patiënten met aanvullende afwijkingen. Deze bevinding is in overeenkomst met data uit de literatuur. Daarnaast werd met een relatief klein aantal geteste interstitiële gebieden ($n = 112$, inclusief gebieden die gerelateerd zijn aan microdeletie syndromen), zeven

veranderingen gedetecteerd. Dit bevestigde het idee dat het voorkomen van submicroscopische veranderingen in het erfelijk materiaal niet beperkt is tot de uiteinden van de chromosomen, maar dat overal langs de armen van de chromosomen afwijkingen kunnen ontstaan.

Hoofdstuk II-2 beschrijft de bevindingen van het testen van stukken genoom die geflankeerd worden door segmentale duplicaties. Dit zijn stukken erfelijk materiaal met een zeer hoge homologie (volgorde van de bouwstenen zijn vrijwel gelijk), waardoor ongelijke paring gevolgd door ongelijk ‘overstappen’ tot kopie-verschillen kunnen leiden (figuur 2A). Op basis van onze bevinding kon geconcludeerd worden, overeenkomend met de data uit de literatuur, dat kopie-verschillen vaker voorkomen tussen deze zogenaamde homologe gebieden dan elders in het genoom.

Ondanks dat MAPH, maar vooral MLPA momenteel wordt toegepast in meerdere, vooral Europese, diagnostische laboratoria voor het opsporen van veranderingen in vele verschillende genen, zijn zij niet in staat om genoom-breed te screenen op de aanwezigheid van mogelijke kopie-verschillen. Array-gebaseerde technieken (BAC-, oligo- en SNP arrays) zijn wel in staat om in één proef het gehele erfelijk materiaal van een patiënt te testen, waarbij de resolutie afhangt van wat aangebracht is op de array. De resolutie van deze technieken neemt steeds verder toe. Recent zijn SNP-gebaseerde opsporingstechnieken beschikbaar gekomen. Dit maakt het *niet alleen* mogelijk om naar kopie-verschillen te zoeken, maar ook naar verlies van heterozygositeit (diversiteit in het erfelijk materiaal) of naar niet-Mendeliaanse overerving te kijken. Gezien het feit dat het toepassen van karyotypering en genoombrede technieken met een hoge resolutie aanvankelijk relatief duur waren, is in **hoofdstuk II-3** een alternatieve manier van testen voorgesteld. Deze houdt in dat met behulp van MLPA, de plaatsen op het erfelijk materiaal getest worden, waarvan bekend is dat ze frequent veranderingen laten zien (bij een bepaalde studiepopulatie), alvorens genoombreed getest wordt. Karyotypering wordt alleen verricht voor een geselecteerde patiëntengroep die bij MLPA en genoombrede technieken geen verandering liet zien of voor het uitsluiten van een Robertsoniaanse translocatie (versmelting tussen de centromeren van twee chromosomen, die geen functionele korte arm hebben). Ondertussen zijn de kosten van array onderzoek substantieel gedaald, waardoor de MLPA stap vóór het uitvoeren van array gebaseerde technieken niet meer noodzakelijk is.

Op basis van de resultaten die beschreven staan in **hoofdstuk III-1** kan geconcludeerd worden dat verschillende technieken, zoals MAPH/MLPA-, FISH analyse en array gebaseerde technieken, elkaar aanvullen in plaats van dat ze ‘concurrenten’ zijn. In dit hoofdstuk wordt duidelijk dat de verschillende aspecten van een gecompliceerde

herrangschikking op een chromosoom slechts gedefinieerd kon worden door het toepassen van meerdere technieken. Deze complexe herrangschikking bleek te bestaan uit een deletie en een duplicatie in het 22q11 gebied op twee verschillende chromosomen 22, gecombineerd met een tweede deletie die verderop op de lange arm van het chromosoom was gelocaliseerd. Daarnaast werd op basis de bevindingen in deze studie beargumenteerd dat een deletie dichtbij het centromeer van chromosoom 22 (het Cat-eye syndroom gerelateerd gebied), waarschijnlijk niet gerelateerd is aan een klinisch beeld.

In **hoofdstuk III-2** beschrijven wij hoe de toepassing van een hoge resolutie techniek (array-CGH) heeft geleid tot de identificatie van de oorzaak van het Peters Plus syndroom, een zeldzame ernstige aandoening. Dit is de eerste autosomaal recessieve aandoening die is opgelost door toepassing van array-CGH.

Hoofdstuk III-3 beschrijft het inzoomen van een gebied op de korte arm van chromosoom 16 dat verantwoordelijk is voor het ATR-16 syndroom (Alpha Thalassemie Retardatie syndroom, waarvan de oorzaak op het 16^e chromosoom is gelegen). Met behulp van 3 kleuren MLPA werd het ATR-16 gerelateerde gebied nader gespecificeerd. Aangezien de klinische kenmerken van de ATR-16 patiënten weinig specifiek zijn, wordt aangeraden om bij een patiënt met een verstandelijke beperking en bloedarmoede een eenvoudig hematologische test te laten verrichten. In geval van een microcytaire hypochrome anemie (specifieke vorm van bloedarmoede) met een normaal ijzer gehalte kan gericht moleculair diagnostisch onderzoek (MLPA) naar ATR-16 worden aangevraagd.

De toepassing van vier hoge resolutie technieken voor de identificatie van de breekpunten in vier verschillende patiënten met overlappende deleties op de korte arm van chromosoom 2 is beschreven in **hoofdstuk III-4**. De resultaten van de verschillende technieken waren vergelijkbaar. Door de toepassing van de nieuwe hoge resolutie technieken wordt de resolutie van de chromosoom analyse sterk verbeterd. Echter, de eerste publicaties benadrukken het frequente voorkomen van kleine kopie-verschillen bij gezonde mensen (Iafate *et al.* 2004; Sebat *et al.* 2004; Redon *et al.* 2006). Met behulp van array-CGH en SNP arrays werd vastgesteld dat ongeveer 12% van het humane genoom 'onschuldige' kopie-verschillen kan bevatten. Dit is nog maar een klein deel van de variatie die in het humane genoom wordt aangetroffen bij vergelijking op sequentie-niveau. Recent is de volgorde van de bouwstenen van het erfelijk materiaal van één persoon gepubliceerd, namelijk die van de Nobelprijswinnaar James Watson. Dit onderzoek leverde 600.000 niet eerder gerapporteerde veranderingen op. Dit illustreert dat genoombreed sequencen (het bepalen van de volgorde van het gehele erfelijk

materiaal van de mens) het probleem van de interpretatie van de resultaten bij mensen met een aandoening exponentieel zal vergroten ten opzichte van de 'onbekende' veranderingen waar we nu mee geconfronteerd worden. Het is daarom van zeer groot belang om eerst veel kennis op te doen over de variaties in het erfelijk materiaal bij grote groepen gezonde mensen en daarnaast over variaties die voorkomen in patiënten met een goed gedefiniëerd klinisch beeld (Ropers 2007).

Bij vele patiënten wordt nu een oorzaak gevonden voor hun verstandelijke beperking, waar dit vroeger niet mogelijk was. Om echter alle gegevens, die door de nieuwe technieken beschikbaar komen, goed te interpreteren, is veel werk nodig. Uiteindelijk kan onze kennis van het menselijke genoom zodanig toenemen dat wij per bouwsteen of in elk geval per gen weten of dit een rol speelt in de ontwikkeling van ons verstand.

