



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Genetic causes of growth disorders

Duyvenvoorde, H.A. van

### Citation

Duyvenvoorde, H. A. van. (2013, June 25). *Genetic causes of growth disorders*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/21013>

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/1887/21013>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/21013> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Duyvenvoorde, Hermine van

**Title:** Genetic causes of growth disorders

**Issue Date:** 2013-06-25

10



**Summary**

**Samenvatting**

## Summary

Growth in humans, primarily longitudinal growth, is a complex process which starts at conception and proceeds through various developmental stages, mainly controlled by genetic factors and to a lesser degree by environmental, psychosocial and nutritional factors. The GH-IGF-I axis is an important regulator of longitudinal growth, what is evident from the observation that genetic defects in this axis have been shown to be responsible for abnormal growth. These mutations, however, are rare and do not explain the 'normal' variation in height among people. This thesis focuses on the detection of genetic defects in the GH-IGF-I axis that may explain growth disorders. Initially the so-called 'candidate gene approach' was used, examining various genes in the GH-IGF-I axis. After that, a whole genome approach was used to identify novel genes involved in aberrant growth using whole genome microarray studies (SNP arrays) and next-generation sequencing. Also, for some genes genotype-phenotype correlations were established. With this we have tried to acquire more insight in the regulation of longitudinal growth.

*Chapter 1* presents a general introduction and the outline of this thesis.

In **part A** the candidate gene approach in the GH-IGF-I axis is described. In *Chapters 2 and 3* the first family with a heterozygous mutation in the *IGF1* gene associated with severe short stature and subsequent studies on the structural and functional characteristics of the mutant IGF-I protein are described. The two children presented with severe short stature (height SD score -4.1 and -4.6), microcephaly and low circulating IGF-I levels. Genetic analysis revealed a heterozygous duplication of four nucleotides in exon 4, resulting in a frame shift and a premature stopcodon. Until that point there was some evidence that heterozygosity for an *IGF1* defect was associated with a modest decrease of height, but it had never been associated with extreme short stature. We hypothesized that the putative truncated mutant IGF-I protein had a dominant negative effect on the wild type IGF-I protein, resulting in the extreme short stature observed in this family. The mutant IGF-I protein was synthetically derived to study the structural and functional characteristics of this putative truncated IGF-I protein. These studies revealed that the severe short stature was not caused by a dominant negative effect of the truncated protein, rejecting our hypothesis. Based on the clinical, structural and functional data we speculated that the growth failure was caused by a combination of partial IGF-I deficiency, placental IGF-I insufficiency, and other (not yet identified) genetic factors. In the following years, this growth disorder proved to be successfully treated with growth hormone. This study was the first to indicate that besides homozygous *IGF1* mutations, heterozygous mutations can also result in short stature.

Another candidate gene in the GH-IGF-I axis is *IGFALS*. Homozygous molecular defects of *IGFALS* can cause moderate short stature, pubertal delay and insulin insensitivity. Since the first report of a homozygous *IGFALS* mutation, a total of 16 unique homozygous or compound heterozygous mutations in 21 patients with ALS deficiency have been described. In **Chapter 4** the family members of a large Kurdish family carrying a homozygous, a heterozygous or no mutation in the *IGFALS* gene are described. The three index cases (brothers) presented with short stature (height SD score -4.2, -3.6 and -4.4), microcephaly, low circulating IGF-I and IGFBP-3, and undetectable ALS levels. Two were known with a low bone mineral density and one of them had suffered from two fractures. Genetic analysis revealed a homozygous duplication of one nucleotide in exon 2, resulting in a frame shift and a premature stopcodon. The IGF-I, IGFBP-3, and ALS 150 kDa ternary complex was absent in the sera of the three patients, and ALS proteins were not detected with Western blot. IGFBP-1 and IGFBP-2 plasma levels were low and there was a mild insulin resistance. Five heterozygous carriers of the *IGFALS* mutation tended to have a lower height and head circumference than five non-carriers, and had low plasma ALS and IGFBP-3 levels. Bone mineral (apparent) density was low in two out of three homozygous carriers, and also in four out of nine relatives. A benefit of this study was that the effect of the mutation could be investigated against the same genetic background, as well as the possible effect of carrying a heterozygous mutation. This led to the hypothesis that there might be a gene-dosage effect, resulting in a small negative effect on height and head circumference in heterozygous carriers. The international acid-labile subunit consortium investigated the impact of heterozygosity for *IGFALS* gene mutations on short stature in as many affected patients and families with mutations in *IGFALS* as possible, including the family we described, and concluded that heterozygosity indeed resulted in approximately 1.0 SDS height loss in comparison with wild type family members. An important lesson learned from these studies on ALS deficiency is that local IGF-I appears to be more important for growth than circulating IGF-I.

**Part B** describes the candidate gene approach in the GH-IGF-I axis in combination with a whole genome approach using single-nucleotide polymorphism (SNP) array analysis. The candidate gene approach was extended, because this strategy can be very labour intensive, no novel genes involved in growth can be identified, and we hypothesized that the phenotype caused by various genetic defects can be more heterogeneous than expected. In **Chapter 5** we investigated 100 children born small for gestational age (SGA) with persistent short stature for intragenic (small) CNVs in 18 growth-related genes with MLPA. This resulted in 2 patients with a *de novo* heterozygous 15q terminal deletion containing the complete (patient A) and partial (patient B) *IGF1R* gene. In patient A, serum IGF-I was

low (-2.78 SDS), probably because of a coexisting GH deficiency. Functional studies using skin fibroblast demonstrated similar levels of IGF-I receptor (IGF1R) autophosphorylation compared with controls, a tendency toward reduced total IGF1R protein expression, and reduced intracellular activation of protein kinase B/Akt upon a challenge with IGF-I. Functional studies using skin fibroblasts to test the theory that haploinsufficiency leads to a 50% reduction of fully functional IGF1Rs revealed that this was not the case, although IGF1R expression tended to be lower. However, other functional studies showed that downstream signaling was reduced. We hypothesize that the consequences of *IGF1R* haploinsufficiency may be cell type dependent, with possibly a relatively strong effect in growth plate chondrocytes, whereas the effect in the fibroblast model is less pronounced. In this study only MLPA was used to detect CNVs. Since sequence analysis of the 18 growth-related genes was not performed, mutations in these genes could not be excluded. In **Chapter 6** we investigated short children with apparent GH insensitivity (low IGF-I and normal GH secretion) using the candidate gene approach (sequence analysis and MLPA of 5 candidate genes in the GH-IGF-I axis) in combination with SNP array analysis to detect (larger) CNVs with a size >150 kb. Patients were divided into three groups based on height and IGF-I SDS, with a low height SDS and IGF-I level in group 1, moderate short stature associated with a low IGF-I in group 2 and short stature with serum IGF-I levels in the lower half of the normal range in group 3. This led to the detection of three patients in group 1 with two novel heterozygous *STAT5B* mutations, in two of them combined with novel heterozygous *IGFALS* variants. In groups 2 and 3 the association between genetic variants and short stature was uncertain. The heterozygous *STAT5B* mutations appeared to be involved in the observed GH insensitivity, but the association between the genetic variants in *IGFALS* and short stature remains uncertain. It is however conceivable that primary IGF-I deficiency resulting in short stature can also be associated with the cumulative effect of digenic or oligogenic defects. Besides the variants in the candidate genes, novel CNVs in 6 children were identified. It is possible that in some of these patients the CNVs are associated with the phenotype, but no clear candidate genes were present. This finding is in line with a recent report on an association between the presence of low-frequency genomic deletions in children with short stature. In this study we show that in severely short children with a low circulating IGF-I, genetic testing is advised. The yield in terms of established diagnoses was 33%. In children with less severe short stature and/or modestly decreased serum IGF-I levels, the likelihood of finding variants in these genes is much lower, suggesting that other, as yet unknown, genes play a role.

In **part C** the whole genome approach solely is described, using SNP array analysis in 149 unrelated families (162 patients) with short stature of unknown origin to identify novel



genes associated with short stature (**Chapter 7**). If possible, analysis of co-segregation of the CNV with the phenotype in families was performed, for confirming potentially pathogenic variants. In this study CNVs were detected in 40 families. In 6 families (4%) a known cause of short stature was found (*SHOX* deletion or duplication, *IGF1R* deletion), in two combined with a potentially pathogenic CNV. In 33 families (22.1%) one or more potentially pathogenic CNVs (n=40) were identified; in 9 families these CNVs occurred *de novo* or segregated with short stature. Several of the deleted or duplicated genes may be considered as potential candidate genes for growth disorders, including 4 genes previously associated with height in the genome-wide association studies (*ADAMTS17*, *PRKG2/BMP3*, *PAPPA*, *TULP4*). However, future studies will be needed to support the role of these and other genes in longitudinal growth regulation.

**Part D** describes the combined whole genome approach using whole exome sequencing (WES) and subsequent functional studies in the identification and characterization of a novel activating *NPR2* gene mutation which results in extremely tall stature of 221 cm in a healthy male (**Chapter 8**). GH overproduction, known syndromes, and a deletion in chromosome 15q25.2q25.3 containing 8 protein-coding genes and mutations in these genes on the remaining allele had been excluded as the cause of tall stature. WES was performed and a heterozygous missense mutation in the *NPR2* gene was detected. Resulting in an amino acid change at position 655 from Arginine to Cysteine, in the kinase homology domain of *NPR2*. The mutation was not present as a known variant in all available databases. The *NPR2* mutation and 15q25.2q25.3 deletion were not found in the patient's sister or son, who are not as tall as the proband. Transfection studies of the mutant *NPR2* protein in HEK293 cells resulted in increased basal and CNP stimulated *NPR2* activity and co-expression of wild type and mutant *NPR2* resulted in increased activity, almost as high as those with mutant *NPR2* alone, suggesting a dominant positive effect. Co-immunoprecipitation studies confirmed heterodimer forming of wild type and mutant *NPR2*. Studies using skin fibroblasts of the patient showed increased *NPR2* activity after stimulation with CNP, confirming that the mutant *NPR2* enhances CNP-*NPR2*-cGMP signalling. This pathway is critically involved in bone development by stimulating growth plate chondrocyte differentiation and proliferation. Based on these results and a previously found activating *NPR2* mutation resulting in tall stature, we conclude that the identified *NPR2* mutation in our patient is responsible for the extremely tall stature.

In **Chapter 9** the major findings of this thesis are summarized and critically reviewed and future perspectives are discussed. First it is discussed that the candidate gene approach proved to be successful in the diagnosis of several patients with short stature. However, the



candidate gene approach also has its disadvantages. It is very labour intensive, particularly if the phenotype is not typical for a certain gene defect, no novel genes involved in growth can be identified, and if the phenotype caused by a genetic defect is more heterogeneous than expected, it will not be recognized. Second, a new strategy is discussed combining the candidate gene and whole genome approach. This did not lead to the identification of novel genes, but did identify mutations in the GH-IGF-I axis and led to the hypothesis that short stature can also be associated with the cumulative effect of digenic or oligogenic defects. Third, whole genome SNP array analysis proved to be a good method to identify potential candidate genes for growth disorders, although future studies will be needed to support the potential role of these genes. Finally, using a new activating *NPR2* mutation which results in extremely tall stature, it was illustrated that the use of WES combined with functional studies is successful in the identification and characterization of novel mutations in growth related genes.



## Samenvatting

De groei van de mens, waarmee primair de lengtegroei wordt bedoeld, is een complex proces dat begint bij de conceptie en verloopt via verschillende ontwikkelingsstadia. Groei is voornamelijk gereguleerd door genetische factoren en in mindere mate door omgevings-, psychosociale en voedingsfactoren. De GH-IGF-I as is een belangrijke regulator van lengtegroei, wat onder andere blijkt uit de observatie dat genetische afwijkingen in deze as verantwoordelijk zijn voor abnormale groei. Deze mutaties zijn echter zeldzaam en kunnen de 'normale' variatie in lengte tussen mensen niet verklaren. Dit proefschrift richt zich op de detectie van genetische defecten die een groeistoornis kunnen verklaren. Aanvankelijk is hiervoor de zogenaamde 'kandidaatgen aanpak' gebruikt, waarbij diverse genen in de GH-IGF-I as zijn onderzocht. Daarna is met een genoom-brede aanpak gezocht naar nog onbekende genen die betrokken zijn bij afwijkende groei met behulp van genoom-brede microarray studies (SNP arrays) en 'next-generation sequencing'. Ook zijn voor enkele genen genotype-fenotype correlaties vastgesteld. Wij hebben geprobeerd om hiermee meer inzicht te verkrijgen in de regulatie van longitudinale groei.

In *Hoofdstuk 1* wordt een algemene introductie en de opbouw van dit proefschrift gepresenteerd.

In *deel A* wordt de kandidaatgen aanpak in de GH-IGF-I as beschreven. In de *Hoofdstukken 2 en 3* wordt de eerste familie beschreven met een heterozygote mutatie in het *IGF1* gen welke geassocieerd is met een zeer kleine lengte en de hierop volgende studies naar de structurele en functionele eigenschappen van het mutant IGF-I eiwit. De twee kinderen presenteerden met zeer kleine lengte (lengte SD score -4,1 en -4,6), microcefalie (een geringe hoofdomtrek) en lage circulerende IGF-I spiegels in het bloed. Genetische analyse toonde een heterozygote duplicatie van vier nucleotiden in exon 4, resulterend in een frame shift en een prematuur stopcodon. Tot dat moment waren er weliswaar aanwijzingen dat heterozygotie voor een *IGF1* defect een kleine afname van de lengte zou kunnen veroorzaken, maar het was nog nooit in verband gebracht met extreem kleine lengte. We veronderstelden dat het verkorte mutant IGF-I eiwit een dominant negatief effect op het wild type IGF-I eiwit zou kunnen hebben, wat de extreme kleine lengte in deze familie zou kunnen veroorzaken. Het mutant IGF-I eiwit werd gesynthetiseerd om de structurele en functionele kenmerken van dit verkorte IGF-I eiwit te bestuderen. Deze studies toonden aan dat de zeer kleine lengte niet werd veroorzaakt door een dominant negatief effect van het verkorte eiwit, en daarmee werd onze hypothese dus verworpen. Gebaseerd op de klinische, structurele en functionele gegevens speculeren we

dat de groeiafwijking is veroorzaakt door een combinatie van partiële IGF-I deficiëntie, placentaire IGF-I insufficiëntie en andere (nog niet geïdentificeerde) genetische factoren. In de hierop volgende jaren bleek dat de groeistoornis succesvol behandeld kon worden met groeihormoon. Deze studie was de eerste die liet zien dat naast homozygote *IGF1* mutaties, ook heterozygote *IGF1* mutaties kunnen resulteren in een kleine lengte.

Een ander kandidaatgen in de GH-IGF-I as is *IGFALS*. Homozygote moleculaire defecten in *IGFALS* kunnen een matig kleine lengte, vertraging van de puberteit en insuline ongevoeligheid veroorzaken. Sinds het verschijnen van de eerste rapportage over een homozygote *IGFALS* mutatie, zijn er in totaal 16 unieke homozygote of compound heterozygote mutaties in 21 patiënten met ALS deficiëntie beschreven. In **Hoofdstuk 4** worden de familieleden van een grote Koerdische familie beschreven, die een homozygote, een heterozygote of geen mutatie in het *IGFALS* gen dragen. De drie index patiënten (broers) presenteerden met kleine lengte (lengte SD score -4,2, -3,6 en -4,4), microcefalie, lage bloedspiegels van IGF-I en IGFBP-3, en onmeetbaar lage ALS spiegels in het bloed. Twee van de jongens waren bekend met een lage botmineraaldichtheid en één van hen had twee botbreuken gehad. Genetische analyse toonde een homozygote duplicatie van één nucleotide in exon 2, resulterend in een frame shift en een prematuur stopcodon. Het 150 kDa grote ternaire complex van IGF-I, IGFBP-3 en ALS was afwezig in de sera van de drie patiënten en er werden geen ALS eiwitten gedetecteerd met Western blot. IGFBP-1 en IGFBP-2 plasmaspiegels waren laag en er was een milde insulineresistentie. Vijf heterozygote dragers van de *IGFALS* mutatie neigden naar een kleinere lengte en een geringere hoofdomvang dan vijf niet-dragers, en hadden lage ALS en IGFBP-3 waarden in het bloed. De botdichtheid was laag in twee van de drie homozygote dragers, en ook in vier van de negen familieleden. Een voordeel van deze studie was dat het effect van de mutatie onderzocht kon worden tegen dezelfde genetische achtergrond, evenals het mogelijke effect van het dragen van een heterozygote mutatie. Dit leidde tot de hypothese dat er mogelijk een gen-dosis effect is, resulterend in een klein negatief effect op lengte en hoofdomvang in heterozygote dragers. Hierna heeft ook het internationale ALS consortium onderzoek gedaan naar de impact van heterozygotie voor *IGFALS* mutaties op kleine lengte in zoveel mogelijk aangedane patiënten en families, met inbegrip van de familie die wij hebben beschreven. In deze publicatie kon worden bevestigd dat heterozygotie inderdaad resulteerde in een lengteverlies van ongeveer 1,0 SDS in vergelijking met familieleden zonder een afwijking van het *IGFALS*. Deze en andere studies naar patiënten met ALS deficiëntie hebben laten zien dat het lokaal geproduceerde IGF-I belangrijker is voor groei dan circulerend IGF-I.

**Deel B** beschrijft de kandidaatgen aanpak in de GH-IGF-I as in combinatie met een genoom-brede aanpak. Hierbij hebben we gebruik gemaakt van de zogenaamde “single-nucleotide polymorphism (SNP) array analyse”. De belangrijkste reden om de kandidaatgen aanpak uit te breiden was dat deze strategie zeer arbeidsintensief kan zijn, en dat hiermee geen nieuwe genen betrokken bij groei kunnen worden geïdentificeerd. Daarnaast realiseerden wij ons dat het fenotype veroorzaakt door verschillende genetische defecten veel heterogener kan zijn dan verwacht. In **Hoofdstuk 5** onderzochten we 100 kinderen, die klein werden geboren voor de zwangerschapsduur (‘small for gestational age’, SGA) waarbij de achterstand in lengtegroei vervolgens niet werd gecompenseerd door ‘inhaalgroei’. Wij hebben hiervoor de zogenaamde MLPA techniek gebruikt (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), waarmee intragene (kleine) ‘copy number variants’ (CNVs) in 18 groei-gerelateerde genen konden worden onderzocht. Dit resulteerde in 2 patiënten met een *de novo* heterozygote terminale 15q deletie, welke het volledige (bij patiënt A) en gedeeltelijke (bij patiënt B) *IGF1R* gen bevatte. Serum IGF-I was laag (-2,78 SDS) bij patiënt A, waarschijnlijk als gevolg van een eveneens aanwezige GH deficiëntie. Functionele studies met huidfibroblasten lieten een vergelijkbare IGF-I receptor (*IGF1R*) autofosforylering zien als in huidfibroblasten van controles, een tendens tot verminderde *IGF1R* eiwitexpressie en een verminderde intracellulaire activering van proteïne kinase B/ Akt na stimulering met IGF-I. Met functionele studies met behulp van huidfibroblasten hebben wij daarna de hypothese getoetst dat haploinsufficiëntie van *IGF1R* tot een 50% reductie van volledig functionele IGF-I receptoren leidt. Dit bleek niet het geval te zijn, hoewel de *IGF1R* expressie wel lager leek te zijn. Andere functionele studies lieten echter zien dat de intracellulaire signalering verminderd was. Onze hypothese is, dat de gevolgen van *IGF1R* haploinsufficiëntie afhankelijk kan zijn van het celtype, met mogelijk een relatief sterk effect in groeischijf chondrocyten, terwijl het effect in het fibroblast model minder uitgesproken is. In dit onderzoek werd alleen MLPA gebruikt om CNVs te detecteren. Aangezien er geen sequentieanalyse van de 18 groei-gerelateerde genen werd uitgevoerd kunnen mutaties in deze genen niet worden uitgesloten. In **Hoofdstuk 6** hebben we kinderen met een kleine lengte en aanwijzingen voor GH ongevoeligheid (een lage bloedspiegel van IGF-I bij een normale groeihormoon secretie) onderzocht met de kandidaatgen aanpak (sequentieanalyse en MLPA van 5 kandidaatgenen in de GH-IGF-I as) in combinatie met SNP (single nucleotide polymorphism) array analyse om (grotere) ‘copy number variants’ (CNVs) op te sporen, met een afmeting van > 150 kb. Patiënten werden verdeeld in drie groepen op basis van lengte en IGF-I SDS. Kinderen met een lage lengte SDS en IGF-I waarde werden ondergebracht in groep 1; kinderen met een matig kleine lengte die wel een laag IGF-I hadden werden ondergebracht in groep 2; en kinderen met kleine lengte met serum IGF-I waarden in de onderste helft van het normale gebied kwamen in groep 3.

Hierbij werden drie patiënten in groep 1 gevonden met twee nieuwe heterozygote *STAT5B* mutaties, in twee daarvan gecombineerd met nieuwe heterozygote *IGFALS* varianten. In de groepen 2 en 3 was de associatie tussen genetische varianten en kleine lengte onzeker. Er waren voldoende aanwijzingen dat de heterozygote *STAT5B* mutaties betrokken zijn bij de waargenomen GH ongevoeligheid, maar de associatie tussen de genetische varianten in *IGFALS* en kleine lengte blijft onzeker. Het is echter denkbaar dat IGF-I deficiëntie resulterend in kleine lengte ook geassocieerd kan worden met het cumulatieve effect van een defect in twee (digeen) of meer genen (oligogeen). Naast de varianten in de kandidaatgenen zijn er nieuwe CNVs in 6 kinderen geïdentificeerd. Het is mogelijk dat in sommige van deze patiënten de CNVs geassocieerd kunnen worden met het fenotype, maar er waren geen duidelijke kandidaatgenen aanwezig. Deze bevinding is in lijn met een recent rapport over een associatie tussen de aanwezigheid van laag frequente genomische deleties in kinderen met een kleine lengte. In deze studie hebben we aangetoond dat het raadzaam is om bij kinderen met een zeer kleine lengte en een laag circulerend IGF-I genetisch onderzoek te verrichten. De opbrengst in termen van vastgestelde diagnoses was 33%. Bij kinderen met minder kleine lengte en/of matig verlaagde serum IGF-I waarden, is de waarschijnlijkheid van het vinden van varianten in deze genen veel lager, wat suggereert dat andere, nog onbekende, genen een rol spelen.

In **deel C** wordt de genoom-brede aanpak beschreven, gebruik makend van SNP array analyse in 149 niet-verwante families (162 patiënten) met een kleine lengte door onbekende oorzaak. Hiermee kunnen nieuwe genen worden gevonden die zijn geassocieerd met kleine lengte (**Hoofdstuk 7**). Indien mogelijk werd co-segregatie analyse van de CNV met het fenotype in de familie uitgevoerd, voor het bevestigen van potentieel pathogene varianten. In deze studie werden CNVs gedetecteerd in 40 families. In 6 families (4%) werd een bekende oorzaak van kleine lengte gevonden (*SHOX* deletie of duplicatie, *IGF1R* deletie), in twee daarvan gecombineerd met een potentieel pathogene CNV. In 33 families (22,1%) werden één of meer potentieel pathogene CNVs ( $n = 40$ ) geïdentificeerd, en in 9 families ontstonden deze CNVs *de novo* of segregeerden ze met kleine lengte. Verschillende van de gedeleteerde of geduplicateerde genen kunnen worden beschouwd als potentiële kandidaatgenen voor groeistoornissen, met inbegrip van 4 genen die eerder in verband werden gebracht met lengte in genoom-brede associatie studies (*ADAMTS17*, *PRKG2/BMP3*, *PAPP4*, *TULP4*). Er zijn echter aanvullende studies nodig om de rol van deze en andere genen in de regulatie van longitudinale groei te ondersteunen.

**Deel D** beschrijft de gecombineerde genoom-brede aanpak door middel van exoom-brede sequencing (whole exome sequencing, WES) en de hierop volgende functionele studies.

Deze aanpak was succesvol voor de identificatie en karakterisering van een nieuwe activerende *NPR2* mutatie, welke resulteert in een zeer grote lengte van 221 cm in een verder gezonde man (**Hoofdstuk 8**). Groeihormoon overproductie, bekende syndromen en een deletie in chromosoom 15q25.2q25.3 met 8 eiwit-coderende genen en mutaties in deze genen op het andere allel waren uitgesloten als de oorzaak van de grote lengte. De heterozygote missense mutatie in het *NPR2* gen resulteert in een aminozuurverandering op positie 655 van Arginine naar Cysteine, in het kinase homologie domein van *NPR2* en is niet aanwezig als bekende variant in alle beschikbare databases. De *NPR2* mutatie en de 15q25.2q25.3 deletie werden niet gevonden in de zus en de zoon van de patiënt, die niet zo lang waren als de patiënt. Transfectie studies van het mutant *NPR2* eiwit in HEK293 cellen resulteerde in verhoogde basale en CNP gestimuleerde *NPR2* activiteit. Co-expressie van wild type en mutant *NPR2* resulteerde in verhoogde activiteit, bijna even hoog als die met mutant *NPR2* alleen. Co-immunoprecipitatie studies bevestigden heterodimeer vorming van wild type en mutant *NPR2*. Studies met huidfibroblasten van de patiënt toonden een toegenomen *NPR2* activiteit na stimulatie met CNP, hetgeen bevestigt dat de *NPR2* mutant de CNP-*NPR2*-cGMP signalering versterkt. Deze signaleringsroute is kritisch betrokken bij botontwikkeling door stimulering van chondrocyt differentiatie en proliferatie in de groeischijven van de lange pijpbeenderen. Op basis van deze resultaten en een eerder door Japanse onderzoekers gevonden activerende *NPR2* mutatie welke resulteerde in grote lengte, concluderen we dat de geïdentificeerde *NPR2* mutatie in onze patiënt verantwoordelijk is voor de extreem grote lengte.

In **Hoofdstuk 9** worden de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift samengevat en kritisch beoordeeld en worden toekomstperspectieven besproken. In de eerste plaats is gebleken dat de kandidaatgen aanpak succesvol kan zijn bij de diagnose van patiënten met een kleine lengte. Deze aanpak heeft echter ook nadelen. Het is zeer arbeidsintensief, vooral als het fenotype niet typisch is voor een bepaald gendefect, er kunnen geen nieuwe genen betrokken bij groei mee worden geïdentificeerd en wanneer het fenotype veroorzaakt door een genetisch defect heterogener is dan verwacht, dan wordt het niet altijd herkend. Vervolgens wordt een nieuwe strategie bediscussieerd die de kandidaatgen en genoom-brede aanpak combineert. Deze heeft niet geleid tot de identificatie van nieuwe genen, maar heeft wel mutaties geïdentificeerd in de GH-IGF-I as. Tevens werden aanwijzingen gevonden dat kleine lengte ook kan worden veroorzaakt door een cumulatief effect van digene of oligogene defecten. Daarna wordt bediscussieerd dat een genoom-brede SNP array analyse een goede methode is om potentiële kandidaatgenen voor groeistoornissen te identificeren, hoewel aanvullende studies nodig zullen zijn om de mogelijke rol van deze genen bij de afwijkende lengtegroei te ondersteunen. Tenslotte wordt aan de hand van een



nieuwe activerende *NPR2* mutatie welke resulteert in zeer grote lengte geïllustreerd dat het gebruik van WES gecombineerd met functionele studies succesvol is in de identificatie en karakterisering van nieuwe mutaties in groei gerelateerde genen.