

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20506> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Aten, Emmelien

Title: New techniques to detect genomic variation

Issue Date: 2013-02-07

Nederlandse samenvatting

Ons genoom toont variatie in structuur en samenstelling van het DNA. Alle soorten variatie tezamen worden 'genomische variatie' genoemd. De identificatie en analyse van genomische variatie is belangrijk om neutrale varianten ('niet-pathogeen') te onderscheiden van varianten die een rol spelen bij ziekten ('pathogeen'). Identificatie van nieuwe 'ziektegenen' zal onze kennis van de moleculaire pathogenese van genetische aandoeningen vergroten. Iedere technische vooruitgang in de genetische analyse openbaarde nieuwe niveaus van variatie, uiteenlopend van enkelvoudige nucleotide verschillen tot volledige veranderingen in het chromosoom. Veranderingen in het chromosoom die groter zijn dan 5-10 Mb zijn op te sporen met de gebruikelijke karyotypering. Andere technieken maken het mogelijk om kleinere afwijkingen te ontdekken, die zich onder de resolutie van de conventionele karyotypering bevinden. Dit betreft met name Fluorescent in situ hybridisation (FISH), Array comparative genome hybridisation (Array-CGH) en SNP-arrays, maar ook andere methoden zoals Multiplex ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Deze submicroscopische veranderingen heten CNV's: copy number variations. High resolution melting curve analysis (HRMA) en Sanger sequencing zijn ontwikkeld om nucleotide veranderingen (sequence variatie) te detecteren. Toepassing van nieuwe technologieën als Whole-exome sequencing (WES) en whole genome sequencing (WGS) helpen om de technische leemte te overbruggen tussen kwantitatieve (CNV) en kwalitatieve (sequentie-varianten) DNA-verschillen.

De toepassing van nieuwe DNA-methoden resulteert in toenemende mate in de ontdekking van varianten waarvan de betekenis voor ziekten onduidelijk is ('unclassified variants') en dit vraagt om het maken van keuzes in de varianten die vervolgstudie verdienen. Als er onduidelijkheid bestaat over de pathogene consequentie van een variant moet het effect in detail worden bestudeerd op andere niveaus (functionele studies, RNA-studies, in silico analyses en databases).

Dit promotieonderzoek beschrijft de ontwikkeling en de toepassing van moleculaire technieken voor het ontdekken van (pathogene) genomische variatie in de context van genetische aandoeningen.

Hoofdstuk 1 voorziet in een algemene introductie in humane genetica en de verschillende typen van genomische variatie in relatie tot ziekte en gezondheid. Het geeft een overzicht van cytogenetische en moleculaire technieken en bespreekt de voordelen en de nadelen van verschillende technieken. Opties voor interpretatie en classificatie van varianten zijn toegevoegd.

Hoofdstuk 2 bespreekt methoden om CNV's in het menselijk genoom te vinden. Voor de bestudering van 320 patiënten met verstandelijke beperking werd een specifieke 1400-

plex array ontwikkeld. In 9% van deze populatie werd een pathogene CNV gevonden. Bovendien werd HRMA gebruikt als nieuwe methode om CNVs te bevestigen, die eerder met arrays gevonden waren.

Hoofdstuk 3 rapporteert over het gebruik van Array-CGH en SNP-array voor de beschrijving van een *de novo* chromosoom 19p-deletie bij een patiënt met verstandelijke beperking, Split Hand Foot Malformation (SHFM) en Tetralogie van Fallot (hartafwijking). Als aanvulling op deze casus werden 21 andere SHFM-patiënten bestudeerd met MLPA om de aanwezigheid van CNVs te onderzoeken in genen binnen het deletie-interval. EPS15L1 werd op grond van zijn functie aangemerkt als kandidaat-gen voor Split Hand Foot Malformation (SHFM).

De hoofdstukken 4 en 5 bespreken verscheidene toepassingen van HRMA en demonstreren het succes van HRMA als pre-sequencing-techniek. Met behulp van HRMA werd gevonden dat mutaties in het MBTPS2-gen verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van Keratosis Follicularis Spinulosa Decalvans (KFSD). In drie families (Nederlands, Amerikaans en Engels) werd een missense mutatie geïdentificeerd. Functionele studies toonden aan dat dit een pathogene mutatie is. Bij bestudering van de X-inactivatie konden verschillen in allelische expressie gekoppeld worden aan het klinische phenotype van vrouwelijke dragers. Mutaties in MBTPS2 zijn ook beschreven in het Ichthyosis Follicularis Atrichia Photophobia (IFAP) syndroom, dat klinisch overlap toont met KFSD.

Hoofdstuk 6 beschrijft drie families met Terminal Osseous Dysplasia (TOD), waarbij X-exoom sequencing werd toegepast om de genetisch oorzaak voor deze aandoening op te sporen. In voorgaande studies werd een locatie gevonden op het X-chromosoom (Xq27.3-q28) waarin het veroorzakende gen zou kunnen liggen. Met behulp van WES werd een missense-variant gevonden in het FLNA-gen. De voorspelling was dat deze variant splicing zou veroorzaken. Aanvankelijk toonde RNA-analyse in huidcellen van de patiënt geen expressie van het mutante allel. Echter, aanvullende RNA-analyse in 15 jaar oud fibroomweefsel bevestigde de activering van een cryptische splice-site, resulterend in een deletie, die het leesraam niet verstoort. Om het pathogenetische mechanisme van de FLNA-mutatie in TOD te bestuderen, werd een 3D-eiwit model gebouwd. Hieruit bleek dat de deletie leidt tot het verlies van aminozuren die belangrijk zijn voor de eiwitstructuur en dat dit mogelijk belangrijke eiwit-eiwit-interacties beïnvloedt. In de patiënten en gezonde familieleden werd naar hun X-inactivatie patroon gekeken. Hierbij werd vastgesteld dat in patiënten het X-chromosoom met het mutante allel volledig geïnactiveerd was, terwijl gezonde familieleden een willekeurige inactivatie van een van de twee X-chromosomen toonden. Dit suggereert dat er al vroeg in de ontwikkeling selectie plaatsvindt tegen

cellen met expressie van een mutant FLNA-eiwit en dat dit een belangrijke rol speelt bij de ontwikkeling van de ziekte.

Hoofdstuk 7 belicht het gebruik van WES bij het opsporen van de genetische oorzaak in een familie met het Aarskog-Scott-syndroom. Hierbij werd een branchpoint-mutatie in het FGD1-gen gevonden (-35 bp intronisch), die met Sanger sequencing in een diagnostisch laboratorium niet werd gevonden. RNA-analyse bevestigde een effect op splicing. Dit werk laat zien dat WES geschikt is om diepere intronische varianten te detecteren, hoewel de techniek daarvoor niet specifiek ontworpen is.

Hoofdstuk 8 beschrijft de ontdekking van mutaties in het ARID1B-gen, een SWI/SNF chromatin-remodelling complex, als de genetische oorzaak van het Coffin-Siris-syndroom (CSS). Eén casus van een trio (ouders+kind) en twee sporadische patiënten werden met WES getest, uitgaande van een autosomaal recessief overervingsmodel. Nadat initiële analyse geen relevante varianten opleverde, werd een dominant overervingsmodel toegepast. Hierbij werden *de novo* truncerende mutaties gevonden in alle patiënten. Door aan te tonen dat CSS geen autosomaal recessief overervende aandoening is, kon het herhalingsrisico voor ouders op een volgend kind met CSS worden teruggebracht tot 1-2%. Ook in andere CSS-patiënten, in patiënten met andere syndromen en voor bepaalde vormen van kanker zijn mutaties beschreven in genen die betrokken zijn bij SWI/SNF chromatin remodelling. Dit wijst erop dat mutaties in chromatine-remodelling factoren een significante bijdrage leveren aan menselijke ziekten.

In **hoofdstuk 9** wordt de ontwikkeling van technieken bediscussieerd met de daarmee gepaard gaande strategieën om ziektegenen op te sporen en de betekenis van varianten te interpreteren.



TCCGAGGTTCCCTGGGA
TCCGAGGTTCCCTGGGA
GTTCCCTTCCGAGGTTTC
AATGAGGAATCCGCCG
GTGAGAGGCCCCGTCT
GTACCTACTGAGGTTTC
GAGTTATGGTTTCCTT
TCCGAGGTTGTAAATTT
AAAATTTGAAAATCTGG
TGCCTACTGAGGTTCC
GTGCCTACTGAGGTTTC
GAGCCCCGTCTGGTA
GTTCCCTTCCGAGGTTTC
GGTTCCCTTCCGAGTT
TTCCTTCCGACTTCC