



Moleculaire diagnostiek toegepast op spierdystrofieën

Mutatieanalyse, screening en prenatale diagnostiek

Jens Van Bouwel

Promotoren

Dr. Sofie Symoens, Centrum voor Medische Genetica Gent
Annelies De Beuf, Karel de Grote Hogeschool

Proefschrift tot het behalen van de graad van
Professionele bachelor in de Biomedische Laboratoriumtechnologie
Afstudeerrichting Medische Laboratoriumtechnologie
Hoboken, juni 2017

Voorwoord

Voor mijn eerste project aan de KdG bezocht ik het Centrum voor Medische Genetica in Brussel. Na die rondleiding begon ik meteen te mijmeren: “Als ik ooit in een soortgelijke omgeving stage zou kunnen doen, of zou kunnen werken...”. Bijna 3 jaar later blik ik met een tevreden gevoel terug op een intense en leerrijke stageperiode in het Centrum voor Medische Genetica in Gent, die mijn verwachtingen op basis van het bezoek in Brussel moeiteloos overtroffen heeft. Zonder een aantal mensen was dit eindwerk echter niet tot stand gekomen, en ik wil hen dan ook oprecht bedanken.

In de eerste plaats wil ik alle medewerkers van het CMGG bedanken voor hun hulp en uiteraard mijn stageleidster, dr. Sofie Symoens, in het bijzonder. Met al haar kennis en ervaring loodste zij mij doorheen de wereld van de medische genetica. Haar aanstekelijk enthousiasme en oprechte waardering voor mijn inspanningen werkten erg motiverend. Ondanks haar drukke agenda stond ze altijd paraat om op mijn vragen te antwoorden en om mijn tekst na te lezen. Voorts kon ik ook bij het diensthoofd van het labo, prof. dr. Paul Coucke, terecht met mijn vragen. Hoewel hij niet mijn promotor was, polste hij regelmatig naar de stand van zaken.

Naast een uitdagende opdracht kreeg ik ook drie toffe begeleiders die allemaal ontzettend veel tijd hebben geïnvesteerd in mijn eindwerk. Mauro, Petra en Eline: jullie verdienen een heel hartelijke dankjewel voor al jullie tijd, geduld en moeite en voor jullie antwoorden op al mijn vragen. Het deed veel deugd dat jullie zo openstonden voor mijn ideeën, ook al bleken ze niet altijd even goed te zijn.

Mijn promotor op KdG, mevrouw De Beuf, zette bij het nalezen de puntjes op de i zodat ik mijn tekst met een gerust hart kon indienen. Ook onze stagecoördinator, mevrouw Wachters, verdient een speciaal woordje van dank voor haar vertrouwen, waardoor ze mij naar deze stageplaats liet gaan.

Het spreekt voor zich dat ook mijn naaste familie niet mag ontbreken in dit dankwoord. Zij hebben mij elk op hun manier gesteund en zorgden dat ik mij dit jaar enkel maar hoefde te focussen op mijn studie.

Tessa De Roo, MLT-student van de Hogeschool Gent, wil ik graag van harte bedanken voor al haar voorbereidend werk aan ons gemeenschappelijk primerpanel voor mijn laatste proeven. Tot slot wil ik ook de andere medestudenten in het CMGG bedanken voor hun goede raad en ontspannende babbels. Ondanks de “taalbarrières” tussen Gent, West-Vlaanderen, Antwerpen en Limburg heb ik mij tussen al het harde werk door ook *vree wijs* geamuseerd met hen.

Ik wens u veel leesplezier bij het lezen van mijn eindwerk en hoop dat ik mijn enthousiasme op een gepaste manier heb kunnen overbrengen in mijn tekst.

Samenvatting

Het Centrum voor Medische Genetica in Gent (CMGG) heeft, net als de 7 andere erkende Belgische genetische centra, de taak om erfelijke aandoeningen in kaart te brengen. Het CMGG focust zich in het bijzonder op een aantal spier- en bindweefsel-aandoeningen, zoals de Limb-Girdle Muscular Dystrophies (LGMD). Cruciale technieken in de zoektocht naar een genetische diagnose zijn *whole exome of whole genome sequencing*, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en Sanger sequencing.

Voor de diagnose van LGMD gebruikt men een genpanel dat recent fors werd uitgebreid van 31 naar 141 genen. Patiënten waarvoor nog geen diagnose kon gesteld worden, werden opnieuw geanalyseerd op zoek naar causale mutaties in de 110 nieuwe genen. Dit leverde een bijzonder interessante mutatie op (verlies van het startcodon in het *BVES*-gen), die nog niet eerder bij een patiënt werd vastgesteld. De onderzoeksprocedure voorziet dat alle mogelijke ziekteverwekkende mutaties moeten worden bevestigd met de Sanger methode. Vervolgens worden ze ingedeeld in het internationale 5-klassen systeem. De nieuw ontdekte mutatie wordt voorlopig ondergebracht in klasse 4 (likely pathogenic) in afwachting van functionele studies die uitgevoerd worden in samenwerking met het UZ Gent.

Bij een andere groep van 110 nog niet gediagnosticeerde patiënten werden de stalen opnieuw onderzocht voor een recent beschreven mutatie in een intron van het *COL6A1*-gen. Deze mutatie werd bij de exoomanalyse dus onvermijdelijk gemist. Er werd op de stalen achtereenvolgens PCR, next-generation sequencing en Sanger uitgevoerd. Met de geschikte primers kon de mutatie echter bij geen enkele patiënt worden aangetoond, hoewel de gebruikte bron een hoge prevalentie inschatte.

Zodra patiënten een genetische diagnose hebben, kunnen ze eventueel in het CMGG verder terecht voor prenataal advies. Op die manier hoopt men te vermijden dat kinderen van een getroffen patiënt dezelfde mutatie zouden erven. Pre-implantatie genetische diagnostiek (PGD) is de sleuteltechniek in deze dienstverlening. Om de betrouwbaarheid en het aanbod van PGD op te schroeven en te valideren waren enkele experimenten nodig. De toekomstige ouders staan bloed af waaruit lymfocyten worden geïsoleerd. Hieruit optimaliseert men de PCR-condities die nodig zijn om te kunnen bepalen of een embryo de mutatie al dan niet draagt. Gezien de beperkte omvang van een embryonaal biopt moet de eerste poging meteen de goede zijn, wat de noodzaak van de PCR-optimalisatie verklaart. Momenteel isoleert men de lymfocyten op een omslachtige wijze uit de culturen: de laborant moet onder een microscoop met een naald de cellen opzuigen en uitblazen in een epje. Als alternatief werd een verdunningsprotocol ontworpen en getest, maar dit voldeed (voorlopig?) niet aan de vereisten. Men hoopt het aantal ziektes waarvoor PGD kan aangeboden worden, uit te breiden. Hiervoor kan men een kit gebruiken om het embryonaal DNA te vermenigvuldigen vóór de eigenlijke PCR. Dit moet uiteraard zonder fouten gebeuren. Dit was helaas niet het geval bij de uitgeteste Repli-g kit. De meerderheid van een panel heterozygote SNP's werd namelijk niet teruggevonden in DNA dat door de kit werd geamplificeerd voorafgaand aan PCR en Sanger.

Inhoudsopgave

| | |
|--|----|
| Voorwoord | 1 |
| Samenvatting..... | 2 |
| Lijst met gebruikte afkortingen | 5 |
| I Moleculair genetische diagnostiek..... | 6 |
| 1 Inleiding | 6 |
| 1.1 Limb-Girdle Muscular Dystrophy..... | 6 |
| 1.1.1 Algemene achtergrond van de ziekten..... | 6 |
| 1.1.2 Onderverdeling in types op basis van het overervingspatroon | 7 |
| 1.1.3 Verdeling in subtypes | 10 |
| 1.1.4 Algemeen chronologisch verloop van het diagnosticeren | 10 |
| 1.1.5 Gedetailleerde bespreking van de LGMD1-subtypes..... | 14 |
| 1.1.6 Gedetailleerde bespreking van de LGMD2-subtypes..... | 18 |
| 1.1.7 Genetische diagnostiek | 21 |
| 1.2 Collageen type VI..... | 23 |
| 1.2.1 Structuur en functie..... | 23 |
| 1.2.2 Klinisch beeld van de geassocieerde ziekten..... | 25 |
| 1.2.3 Mutaties als oorzaak van Bethlem myopathie of Ullrich musculaire dystrofie | 27 |
| 2 Materialen en methoden | 31 |
| 2.1 Algemene workflow voor variantbevestiging en COL6A1-screening..... | 31 |
| 2.2 Next Generation Sequencing (NGS) | 32 |
| 2.3 PCR en enzymatische opzuivering..... | 33 |
| 2.4 Sanger sequencer..... | 37 |
| 2.5 Opzuivering met magnetische beads | 39 |
| 2.6 COL6A1 screening..... | 39 |
| 3 Resultaten..... | 40 |
| 3.1 LGMD en exoomanalyse..... | 40 |
| 3.2 COL6A1 screening..... | 43 |
| 4 Bespreking..... | 44 |
| 4.1 LGMD en exoomanalyse..... | 44 |
| 4.2 COL6A1 screening..... | 46 |
| 5 Besluit | 47 |
| II Pre-implantatie genetische diagnostiek (PGD) | 49 |
| 1 Inleiding | 49 |
| 2 Materialen en methodes..... | 52 |

| | | |
|-----|---|----|
| 2.1 | Ontvangst van het EDTA-staal en inzetten van de lymfocytencultuur | 52 |
| 2.2 | Isoleren en lyseren van lymfocyten uit de gegroeide lymfocytencultuur..... | 53 |
| 2.3 | PCR oppuntstelling | 53 |
| 2.4 | Testen van de leefbaarheid van lymfocytenculturen..... | 55 |
| 2.5 | Aangepaste isolatieprocedure..... | 55 |
| 2.6 | Testen van de betrouwbaarheid van de amplificatiekit..... | 60 |
| 3 | Resultaten..... | 62 |
| 3.1 | Onderzoek levensduur lymfocytenculturen..... | 62 |
| 3.2 | Aangepaste isolatieprocedure..... | 65 |
| 3.3 | Testen van betrouwbaarheid Repli-g kit | 69 |
| 4 | Discussie | 72 |
| 4.1 | Houdbaarheid lymfocytenculturen | 72 |
| 4.2 | Verdunningsprotocol..... | 72 |
| 4.3 | Repli-g kit..... | 75 |
| 5 | Besluit | 76 |
| | Algemeen besluit..... | 78 |
| | Lijst met figuren..... | 79 |
| | Lijst met tabellen..... | 81 |
| | Bibliografie | 83 |
| | Bijlagen | 1 |
| | Bijlage 1: Leidraad voor het diagnosticeren van LGMD (Narayanaswami, et al., 2014) | 1 |
| | Bijlage 2: DNA-verdunningen van de patiëntenstalen voor de COL6A1-screening | 2 |
| | Bijlage 3: Rapporten na classificatie van positieve varianten uit het labo in Napels..... | 3 |
| | Bijlage 4: Blanco en ingevuld rekenblad voor de lymfocytenverdunningen..... | 7 |
| | Bijlage 5: Primerspecificaties voor SNP panel | 8 |
| | Bijlage 6: Resultaten SNP panel getest op genomisch DNA en Repli-g product | 9 |

[Bronvermelding logo titelblad](#)

Op 30 september 2017 zal voor de derde keer de wereldwijde “LGMD Awareness Day” plaatsvinden. Een collectief van patiënten, artsen, zorgverleners en onderzoekers probeert met de jaarlijkse “Awareness Day” deze zeldzame ziekte bekender te maken bij het grote publiek.

<http://lgmd-info.org/lgmd-awareness-day/>

Lijst met gebruikte afkortingen

| | |
|-------|---|
| A | Adenine |
| ACMG | American College of Medical Genetics and Genomics |
| ADSA | Automated DNA Storage Application |
| BM | Bethlem Myopathy |
| C | Cytosine |
| CK | Creatinekinase |
| CM | Cardiomyopathie |
| CMGG | Centrum voor Medische Genetica Gent |
| ddNTP | Dideoxynucleoside trifosfaat |
| DNA | Desoxyribonucleïnezuur |
| dNTP | Deoxynucleoside trifosfaat |
| EDMD2 | Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy type 2 |
| EDTA | Ethyleendiaminetetra-azijnzuur |
| EMG | Elektromyografie |
| FCS | Fetal Calf Serum |
| G | Guanine |
| Gly | Glycine (aminozuur) |
| IL-2 | Interleukine-2 |
| LAF | Laminar Air Flow |
| LGMD | Limb-Girdle Muscular Dystrophy |
| MLT | Medisch laboratoriumtechnoloog |
| MRC | Medical Research Council |
| MRI | Magnetic resonance imaging |
| NCV | Nerve conduction velocity |
| NGS | Next-generation sequencing |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PGD | Pre-implantatie genetische diagnostiek |
| PHA | Phytohemagglutine |
| RNA | Ribonucleïnezuur |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute medium |
| SNP | Single nucleotide polymorphism |
| T | Thymine |
| UCMD | Ullrich Congenital Muscular Dystrophy |
| UZ | Universitair Ziekenhuis |
| WES | Whole exome sequencing |
| WGS | Whole genome sequencing |
| WT | Wildtype |

I Moleculair genetische diagnostiek

1 Inleiding

1.1 Limb-Girdle Muscular Dystrophy

1.1.1 Algemene achtergrond van de ziekten

Stevenson lanceerde in 1953 als eerste de overkoepelende term “Limb-Girdle Muscular Dystrophy” op basis van zijn bevindingen bij een cohort van 24 families. Hoewel Stevenson een aantal klinische eigenschappen van de ziektes opsomt, benadrukt hij meteen dat het onderscheid tussen de ziekte van Duchenne en andere dystrofieën soms niet of moeilijk gemaakt kan worden, omwille van variatie in symptomen, klinische tekens en de leeftijd waarop de aandoening tot uiting komt (Stevenson, 1953). Kort na het artikel van Stevenson vergeleken Walton en Natrass verschillende classificaties en pasten ze het classificatiemodel van Stevenson verder aan op basis van hun bevindingen uit een onderzoek van 105 cases. Zo splitsten zij de casussen met aantastingen van de gelaatsspieren af van de overige patiënten. Hierdoor kon de meerderheid van de musculaire dystrofieën worden onderverdeeld in drie grote groepen, namelijk Duchenne, facioscapulohumerale en limb-girdle types. Zij concludeerden op basis van hun observaties dat de groepen klinisch en genetisch verschillen van elkaar (Walton & Natrass, 1954).

Vandaag weet men dankzij de spectaculaire vooruitgang in de moleculaire diagnostiek dat de groep van de limb-girdle musculaire dystrofieën een bijzonder heterogene en uitgebreide groep van erfelijke neuromusculaire aandoeningen is, waar naar schatting 1 op 100 000 personen door getroffen wordt. Dit cijfer is een algemene indicatie, maar varieert naargelang het subtype van de ziekte, de populatie en de bronnen (Iyadurai & Kassar, 2014).

Meestal vertonen de patiënten een langzaam toenemende zwakte in de ledematen aan beide zijden van het lichaam vanaf de schouders en heupen. De leeftijd waarop de eerste symptomen merkbaar worden, is moeilijk te voorspellen en varieert soms zelfs sterk binnen één familie. Ruwweg kan men zeggen dat de ziekte zich begint te manifesteren rond of kort na de adolescentie. Er zijn echter subtypes die al tot uiting komen in de eerste levensjaren, terwijl andere personen soms pas op de leeftijd van 60, 70 of zelfs 80 jaar klachten beginnen te ontwikkelen. De ziektes kennen in de regel een progressief verloop: na ongeveer 20 tot 30 jaar is de patiënt niet meer in staat om zelfstandig te wandelen, al zijn ook hier variaties mogelijk tussen de subtypes. Een eenvoudige vuistregel zegt dat hoe later de ziekte verschijnt, hoe minder ernstig de prognose is (Iyadurai & Kassar, 2014) (Narayanaswami, et al., 2014) (Pegoraro & Hoffman, 2012) (Nigro & Savarese, 2014).

Gezien de brede waaier aan klinische beelden en het groot aantal genen dat betrokken is bij deze spierziekten, is het niet eenvoudig om een overkoepelend beeld van de LGMD te schetsen. In de volgende hoofdstukken worden daarom zowel de klinische als genetische aspecten van de ziektes verder in detail besproken.

1.1.2 Onderverdeling in types op basis van het overervingspatroon

De LGMD worden onderverdeeld in twee grote groepen op basis van het overervingspatroon. LGMD1 zijn de dominante vormen en kennen acht subtypes, aangeduid van LGMD1A tot LGMD1H. Intussen werden er meer dan 20 recessieve vormen ontdekt, die samen de groep LGMD2 vormen en op analoge wijze verder worden benoemd met letters. Tot slot zijn er ook enkele X-gebonden vormen die deze nomenclatuur niet volgen (Nigro & Savarese, 2014) (Iyadurai & Kassari, 2014).

Ongeveer 10% van alle LGMD behoren tot de LGMD1-groep met een **autosomaal dominante overerving**. Intussen zijn er **8 loci** waarop gekende mutaties gelegen zijn. Deze vormen zijn eerder mild en komen pas later in de volwassenheid aan de oppervlakte. Hierdoor heeft de index patiënt (*proband*) vaak al kinderen, zonder dat er prenataal advies kon worden aangeboden. Er bestaat voor elke nakomeling van de proband een risico van 50% dat hij of zij het gemuteerde allel van zijn of haar ouder heeft geërfd. Eén van de ouders van de proband kan het gemuteerde allel hebben, wat maakt dat eventuele broers of zussen van de proband eveneens 50% kans hebben om de mutatie geërfd te hebben. Op hun beurt kunnen ook zij het allel doorgeven aan elk van hun kinderen (Pegoraro & Hoffman, 2012). Tabel 1 geeft de geassocieerde genen en hun eiwitproduct weer. Het gen dat leidt tot subtype 1H is nog niet bekend.

Tabel 1: Overzicht van de genen en hun eiwitproducten die gelinkt zijn aan de autosomaal dominante subtypes van LGMD.

| Subtype | Gen en locus | Eiwitproduct |
|---------|----------------------|---------------|
| 1A | <i>MYOT</i> (5q31.2) | Myotilin |
| 1B | <i>LMNA</i> (1q22) | Lamin A/C |
| 1C | <i>CAV3</i> (3p25.3) | Caveolin 3 |
| 1D | <i>DNAJB6</i> (7q36) | HSP40 |
| 1E | <i>DES</i> (2q35) | Desmin |
| 1F | <i>TNPO3</i> (7q32) | Transportin 3 |
| 1G | <i>HNRPDL</i> (4q21) | HNRPDL |
| 1H | ? (3p23) | ? |

Er zijn uitzonderingen waarbij er geen familiale voorgeschiedenis gekend is. Dit kan gebeuren wanneer de personen overlijden voor de eerste symptomen verschijnen, of wanneer de klachten niet herkend worden. Het is belangrijk om te benadrukken dat er ook *de novo* mutaties kunnen voorkomen in families zonder LGMD-voorgeschiedenis, waardoor de patiënt als eerste met de ziekte geconfronteerd kan worden.

De **26 autosomaal recessieve vormen** komen beduidend frequenter voor dan de dominante vormen en zijn bovendien ook ernstiger in hun verloop. Men schat dat ze gemiddeld bij 1 op 15 000 personen voorkomen, maar dit cijfer is afhankelijk van de populatie. Kenmerkend is dat de recessieve vormen gewoonlijk al vanaf de kindertijd tot uiting komen. Volgens de meest recente bronnen zijn er momenteel 26 LGMD-subtypes met recessieve overerving bekend (Kaplan & Hamroun, 2015) (Kniffin, OMIM #616812, 2016) (Kniffin, OMIM #617072, 2016) (Kniffin, OMIM #617232, 2016). Tabel 2 toont de genen en eiwitten die gelinkt zijn aan de recessieve subtypes.

Enkel bij homozygote personen en compound heterozygoten¹ zal de ziekte zich ontwikkelen, terwijl de heterozygoten asymptomatische dragers van het gemuteerde gen zijn. De ouders van de proband zijn obligate heterozygote dragers en hebben elk hun gemuteerde gen doorgegeven. Bij eventuele toekomstige zwangerschappen van het heterozygote koppel is genetisch advies dan ook sterk aangewezen. Eventuele broers of zussen van de proband lopen ook risico's: de wetten van Mendel indachtig, hebben zij 50% kans om drager te zijn, 25% kans om de ziekte te hebben en 25% kans om het normale gen van beide ouders overgeërfd te hebben. Ze kunnen zich eventueel laten testen om uit te sluiten of zij het gemuteerde gen dragen. De nakomelingen van de proband zijn sowieso dragers. Vooral de dragers kunnen gebaat zijn met genetisch advies: het risico bestaat immers dat ook hun partner een drager is, met de gekende gevolgen voor hun eventuele kinderen (Pegoraro & Hoffman, 2012).

Tabel 2: Overzicht van de genen en eiwitproducten die gelinkt zijn aan de autosomaal recessieve subtypes van LGMD.

| Type | Gen en locus | Eiwitproduct | Type | Gen en locus | Eiwitproduct |
|-----------|------------------------|----------------------------------|-----------|--------------------------|--|
| 2A | <i>CAPN3</i> (15q15) | Calpain 3 | 2N | <i>POMT2</i> (14q24) | Protein-O-mannosyl transferase 2 |
| 2B | <i>DYSF</i> (2p13.2) | Dysferlin | 2O | <i>POMGnT1</i> (1p34.1) | POMGnT1 |
| 2C | <i>SGCG</i> (13q12) | γ-sarcoglycan | 2P | <i>DAG1</i> (3p21) | Dystroglycan |
| 2D | <i>SGCA</i> (17q21.33) | α-sarcoglycan | 2Q | <i>PLEC1</i> (8q24) | Plectin |
| 2E | <i>SGCB</i> (4q12) | β-sarcoglycan | 2R | <i>DES</i> (2q35) | Desmin |
| 2F | <i>SGCD</i> (5q33) | δ-sarcoglycan | 2S | <i>TRAPPC11</i> (4q35) | Transport protein particle complex 11 |
| 2G | <i>TCAP</i> (17q12) | Telethonin | 2T | <i>GMPPB</i> (3p21) | GDP-mannose pyrofosforylase B |
| 2H | <i>TRIM32</i> (9q33.1) | E3 ubiquitin ligase | 2U | <i>ISPD</i> (7p21) | Isoprenoid synthase domain containing |
| 2I | <i>FKRP</i> (19q13.3) | Fukutin | 2V | <i>GAA</i> (17q25.3) | Alpha-1,4-glucosidase |
| 2J | <i>TTN</i> (2q24.3) | Titin | 2W | <i>LIMS2</i> (2q14) | Lim and senescent cell antigen-like domains ² |
| 2K | <i>POMT1</i> (9q34.1) | Protein-O-mannosyl transferase 1 | 2X | <i>BVES</i> (6q21) | Blood vessel epicardial substance |
| 2L | <i>ANOS1</i> (11p13) | Ancotamin 5 | 2Y | <i>TOR1AIP1</i> (1q25.2) | LAP1B |
| 2M | <i>FKTN</i> (9q31) | Fukutin | 2Z | <i>POGLUT1</i> (3q13.33) | Protein-O-glucosyltransferase 1 |

Tot slot zijn er **6 X-gebonden vormen** van LGMD. Deze syndromen volgen niet de nomenclatuur van LGMD1 en 2, maar zijn veelal genoemd naar hun ontdekker. Deze ziekten gaan vaak gepaard met

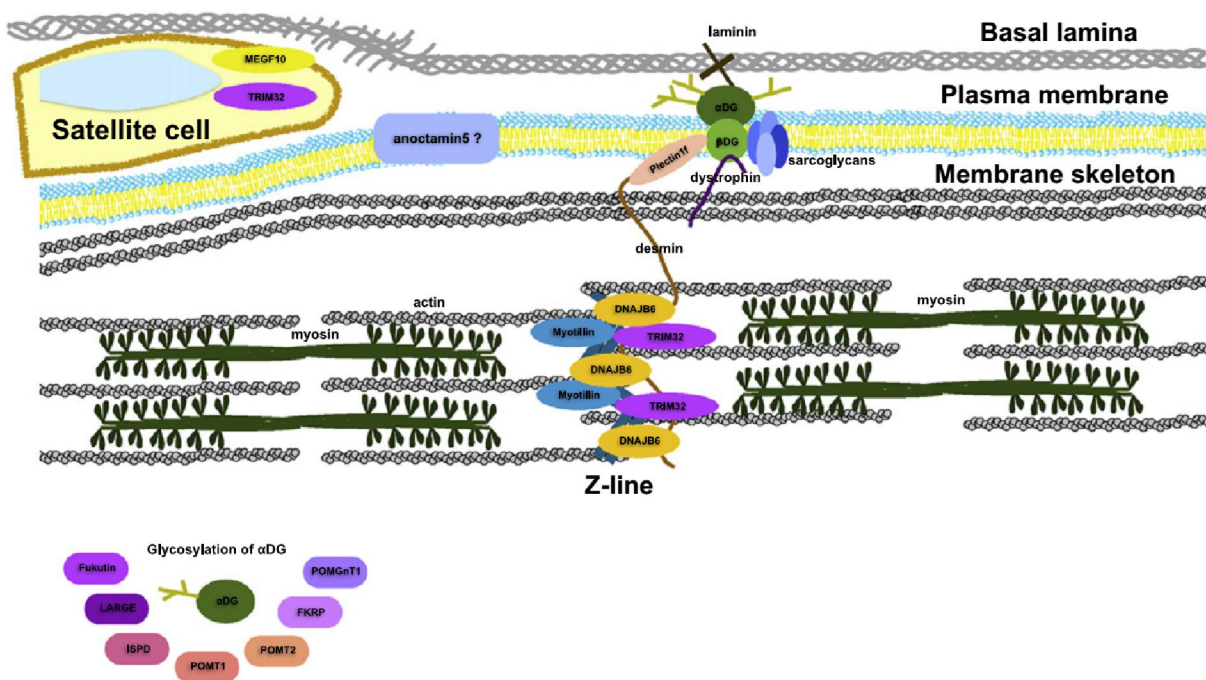
¹ Compound heterozygoten zijn personen die 2 verschillende gewijzigde allelen hebben op een bepaalde locus.

hartproblemen, aantasting van de ademhalingspiers en mentale retardatie. Sommige vormen resulteren in vroegtijdige dood, hoofdzakelijk ten gevolge van hartfalen (Iyadurai & Kassar, 2014) (Nigro & Savarese, 2014). De betrokken genen en eiwitten zijn opgelijst in Tabel 3.

Tabel 3: Overzicht van de genen en eiwitproducten die gelinkt zijn aan de X-gebonden vormen van LGMD.

| Subtype | Gen en locus | Eiwitproduct |
|------------------|---------------|--|
| Duchenne | DMD (Xp21.1) | Dystrophin |
| Becker | DMD (Xp21.1) | Dystrophin |
| Barth | TAZ (Xq28) | Tafazzin |
| Emery-Dreifuss 1 | EMD (Xq28) | Emerin |
| Emery-Dreifuss 6 | FHL1 (Xq26.3) | Four-and-a-half LIM protein 1 |
| Danon | LAMP-2 (Xq24) | Lysosome-associated membrane protein 2 |

Figuur 1 toont een schematisch overzicht van de eiwitten die frequent aangetast worden bij verschillende LGMD-subtypes. Op de figuur is te zien waar deze eiwitten zich bevinden in de spieren, of hoe hun functie invloed kan hebben op de werking van de spieren. Een defect in een gen dat de glycosylering van α -dystroglycaan reguleert, affecteert op die manier dit eiwit.



Figuur 1: Schematisch overzicht van de functie of ligging van de aangetaste eiwitten in de spieren bij verschillende types van LGMD (Mitsuhashi & Kang, 2012). De verschillende eiwitten grijpen elk op een andere plaats en andere manier in op de normale spierwerking. Daarnaast zijn er 7 genen betrokken bij de glycosylering van α -dystroglycaan. Een mutatie in één van deze 7 genen kan dus een slecht effect hebben op α -dystroglycaan, hoewel dit gen intact kan zijn.

1.1.3 Verdeling in subtypes

Zoals eerder aangehaald kunnen de groepen LGMD1 en LGMD2 verder onderverdeeld worden in respectievelijk 8 en 26 subtypes. Binnen de recessieve vormen bestaat er een zekere verwantschap tussen bepaalde subtypes.

Zo overweegt men om de sterk verwante **sarcoglycanopathieën** los van de andere LGMD-subtypes te classificeren. Sarcoglycanen zijn onderdeel van het dystrofinecomplex² en bestaan uit alfa-, beta-, gamma- en delta-sarcoglycaan. Deze componenten worden genetisch gecodeerd en een mutatie met verlies van functie in één van de verantwoordelijke genen leidt tot LGMD2C, LGMD2D, LGMD2E of LGMD2F. Bij deze 4 subtypes zien we dat zowel de hart- als de ademhalingsfunctie worden aangetast en dat de symptomen van de ziekte reeds in de kindertijd tot uiting komen (Nigro & Savarese, 2014).

Zes subtypes van LGMD2 (I, K, M, N, O en P) zijn het gevolg van mutaties in *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *FKTN*, *FKRP*, of *DAG1* en worden overkoepelend benoemd als **dystroglycanopathieën**. Door de mutaties vermindert de glycosylatie van dystroglycaan, met een brede klinische range als gevolg. De symptomen variëren van een milde spierdystrofie tot zeer ernstige oog- en hersenaandoeningen, waaronder het Walker-Warburg-syndroom (Iyadurai & Kassam, 2014) (Nigro & Savarese, 2014) (Pegoraro & Hoffman, 2012).

Bij de bespreking van de genetische diagnostiek en de mutaties in 1.1.5 en 1.1.6 worden de subtypes gedetailleerder toegelicht op basis van een aantal overzichten uit de literatuur.

1.1.4 Algemeen chronologisch verloop van het diagnosticeren

Er bestaat dus een zeer breed spectrum aan klinische LGMD fenotypes waardoor het niet steeds eenvoudig is om een juist specifiek ziektebeeld te bepalen. Bijgevolg moet een patiënt heel wat onderzoeken ondergaan vooraleer de diagnose gesteld kan worden. In dit onderdeel wordt op basis van een aantal artikels een mogelijk chronologisch verloop geschetst vanaf de eerste presentatie tot de diagnose.

De patiënt biedt zich meestal aan bij de arts met **klachten over verzwakking of pijn** in de proximale spieren van de armen en benen, of in de spieren die de aanhechting aan de schouder- of bekkengordel verzorgen. Geregeld ziet men echter andere patronen waarbij de distale spieren of de scapuloperoneale spieren verzwakt zijn. Een eerste oriënterend onderzoek kan een aantal elementen aan het licht brengen die in de richting van één of enkele subtypes wijzen. Een voorbeeld is de aanwezigheid van een zogenaamde *scapula alata* of afstaand schouderblad, weergegeven in Figuur 2,

² Dit complex bestaat uit verschillende eiwitten die de extracellulaire matrix, het sarcolemma en het actine cytoskelet aan elkaar linken in skeletspieren en hartspierweefsel (Ehmsen, Poon, & Davies, 2002).

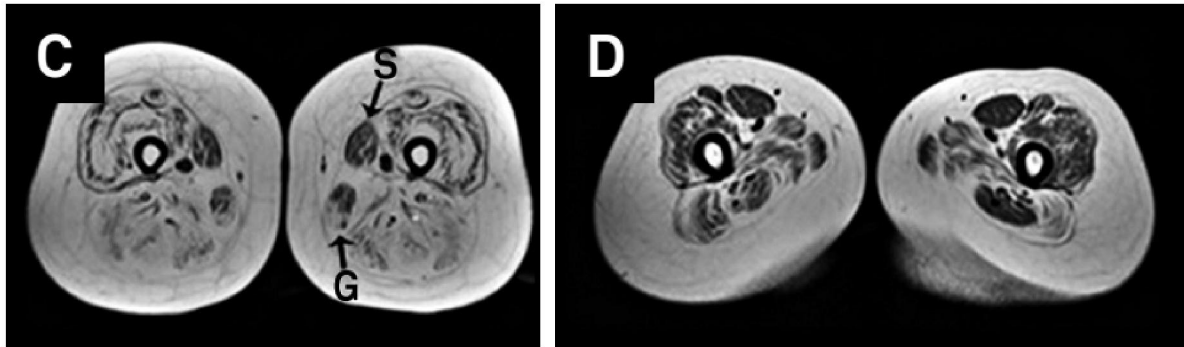
bij patiënten die lijden aan één van de sarcoglycanopathieën of LGMD2A, of asymmetrische spierzwakte bij LGMD1A-patiënten. Deze observaties volstaan echter niet om een definitieve diagnose te kunnen stellen, maar kunnen wel de waaier aan mogelijkheden vernauwen zodat men gerichter kan testen. Ook de eventuele manifestatie van complicaties zoals hartproblemen, kunnen de lijst met mogelijke oorzaken merkelijk verkleinen (Narayanaswami, et al., 2014).



Figuur 2: Persoon met duidelijke scapula alata aan de rechterzijde (Shoulderdoc, 2016).

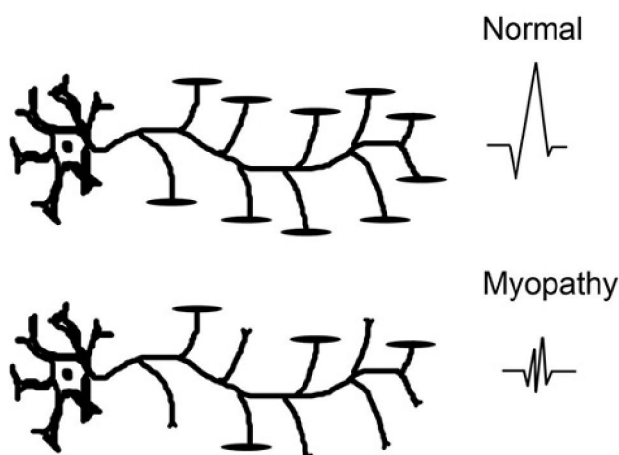
Het feit dat de leeftijd waarop symptomen voor het eerst gemeld worden zeer sterk kan variëren, maakt dat dit gegeven niet altijd een betrouwbaar diagnostisch criterium is. Vaak laat men het **creatinekinase (CK) gehalte** in het bloedserum bepalen ter indicatie. Dit enzym bevindt zich normaal in het spierweefsel, maar kan als gevolg van spierletsels of spierontstekingen naar het bloedserum lekken. Vooral bij patiënten met een recessieve vorm is het CK-gehalte gewoonlijk verhoogd, maar een normale waarde mag echter niet gebruikt worden om een diagnose uit te sluiten. De normaalwaarde voor dit spierenzym is maximaal 170 U/L voor mannen en maximaal 145 U/L voor vrouwen, terwijl dat bij sommige LGMD-patiënten tot 100 keer verhoogd kan zijn (Braem, Diagnostische enzymen, 2016).

Beeldvorming door *magnetic resonance imaging (MRI)* kan worden aangewend om een onderscheid te maken tussen sommige types. Zo toont MRI prominente veranderingen in de hamstrings en adductoren bij patiënten met LGMD2I. LGMD2A tast op dezelfde manier deze spieren aan, met eveneens zichtbare veranderingen in de mediale gastrocnemius en soleus. Figuur 3 is een voorbeeld van veranderingen die zichtbaar kunnen zijn op een MRI scan. Andere types LGMD vertonen op beeldvormingen daarentegen variabele aantastingen, waardoor MRI niet geschikt is om een presumptieve diagnose te stellen (Russell, Weiss, Distad, & Castellani, 2014).



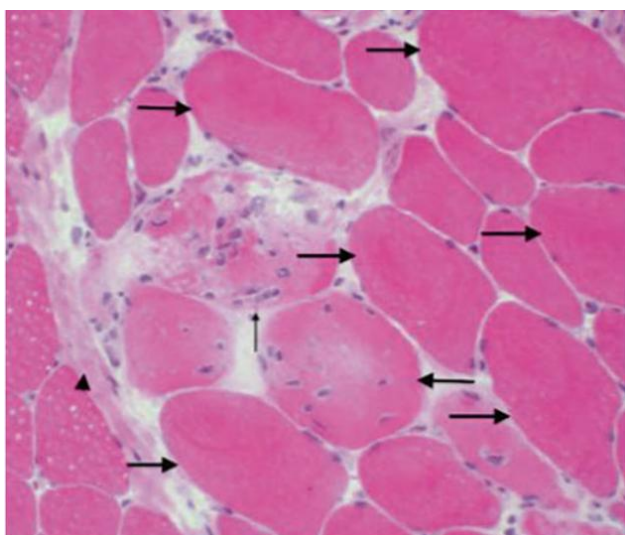
Figuur 3: MRI beelden van de dijspieren van een persoon met LGMD2A (C) en van haar zus die veel mildere symptomen heeft (D). Beide zussen hebben dezelfde mutatie en daarnaast heeft de mildst aangetaste zus nog een tweede mutatie. Er is een duidelijke aantasting van de spieren te zien in de patiënte met ernstige symptomen (C), terwijl de spieren van haar zus beduidend minder aangetast zijn (D). De pijlen in (C) tonen 2 spieren die relatief weinig zijn aangetast (*musculus sartorius* en *musculus gracilis*). Dit illustreert de sterke fenotypische variabiliteit van LGMD (Veloso de Albuquerque, Neto, Alencar da Silva, Zanotelli, & Reed, 2015).

Gespecialiseerdere technieken zoals spierbiopsies en elektrodiagnostiek worden regelmatig uitgevoerd, maar zijn eerder aspecifiek en kunnen dus niet gebruikt worden om duidelijk elk subtype te onderscheiden. Niettemin draagt **elektrodiagnostiek** bij in het diagnostisch proces door de neurogene afwijkingen te onderscheiden van de primaire spierafwijkingen en door informatie te leveren die toelaat om de ernst en prognose beter in te schatten. Bij *nerve conduction velocity* (NCV) wordt de tijd gemeten die een elektrisch signaal nodig heeft om een aangebrachte elektrode te bereiken. Zowel de functie van de sensorische als van de motorische zenuwen worden op deze manier geëvalueerd om eventuele onderliggende neurologische problemen uit te sluiten. Een elektromyografie (EMG) meet de elektrische activiteit van de spieren door fijne naaldelektrodes in te brengen in de spieren. Patiënten met spierdystrofieën vertonen op deze onderzoeken afwijkingen gelinkt aan myopathieën. Hierbij zullen afzonderlijke spiervezels niet of slecht functioneren. Figuur 4 toont een vergelijking van een normale actiepotentiaal met een actiepotentiaal van een persoon met een myopathie (Paganoni & Amato, 2013) (Mills, 2005).



Figuur 4: Schematische voorstelling van motorische units en de actiepotentiaal bij een normale persoon en een persoon met een myopathie. Bij een myopathie worden afzonderlijke spiervezels aangetast, wat resulteert in korte, smalle actiepotentialen in meerdere fases. Neuronen en axonen worden niet aangetast (Paganoni & Amato, 2013).

Bij heel wat patiënten wordt er op weg naar een diagnose een **spierbiopsie** uitgevoerd met vaak aspecifieke resultaten. De verschillende types leiden tot een brede waaier aan degeneratieve beelden: de spiervezels kunnen lobules bevatten, gesplitst of ringvormig zijn, terwijl individuele spiervezels abnormale vacuoles, hyalinisatie of tekens van necrose kunnen vertonen. In het algemeen kan er ook sprake zijn van musculaire atrofie of een toename van bindweefsel in de spieren. De biopten kunnen gekleurd worden met immunohistochemische technieken om het expressiepatroon van één of meerdere eiwitten te visualiseren. Afhankelijk van dit resultaat kan men in een volgende stap onderzoeken of een eventueel tekort aan een eiwit het gevolg is van een genetische mutatie. Deze kleuringen laten wel toe om patiënten met een sarcoglycanopathie, calpainopathie of dysferlinopathie van elkaar te onderscheiden, maar niet om het exacte subtype te definiëren binnen deze groepen (Narayanaswami, et al., 2014) (Pegoraro & Hoffman, 2012). Figuur 5 toont het resultaat van een spierbiopt van een patiënt met LGMD2C.



Figuur 5: Foto van een spierbiopt van een patiënt met LGMD2C. Er zijn hypertrofische vezels (grote pijlen), beperkte tekenen van ontsteking (kleine pijlen) en toegenomen fibrosis (pijlpunt) zichtbaar. Het spierweefsel werd gekleurd met de hematoxyline-eosine kleuring. (Russell, Weiss, Distad, & Castellani, 2014).

Voor veel patiënten bieden de conventionele testen jammer genoeg geen soelaas en moet de arts genetische onderzoeken laten uitvoeren. Belangrijk om weten is dat men pas prenatale diagnostiek kan aanbieden wanneer de patiënt genetisch gediagnosticeerd is en men de mutatie dus kent. Bovenstaande onderzoeken kunnen echter toch zodanige resultaten opleveren, waardoor het voor de arts mogelijk is om gericht één of enkele genen te laten onderzoeken op mutaties. Wat het stellen van de diagnose nog bemoeilijkt, is het feit dat één genotypische variatie niet bij alle patiënten op dezelfde manier tot uiting komt. Omgekeerd geldt ook dat één fenotype niet noodzakelijk het resultaat is van slechts één gemuteerd gen. De stappenplannen in bijlage 1 kunnen door de artsen als leidraad gebruikt worden bij het stellen van diagnoses en bij het gericht (laten) uitvoeren van (genetische) onderzoeken (Narayanaswami, et al., 2014).

1.1.5 Gedetailleerde bespreking van de LGMD1-subtypes

De 8 autosomaal dominante LGMD1-subtypes zijn zeldzamer dan de recessieve groep en komen gewoonlijk pas tot uiting op volwassen leeftijd. Er zijn voor de meeste dominante aandoeningen reeds genetische defecten ontdekt, terwijl anderen nog niet al hun geheimen hebben prijsgegeven. Tabel 4 vat de voornaamste klinische manifestaties van LGMD1-subtypes samen (Iyadurai & Kassar, 2014) (Pegoraro & Hoffman, 2012) (Nigro & Savarese, 2014).

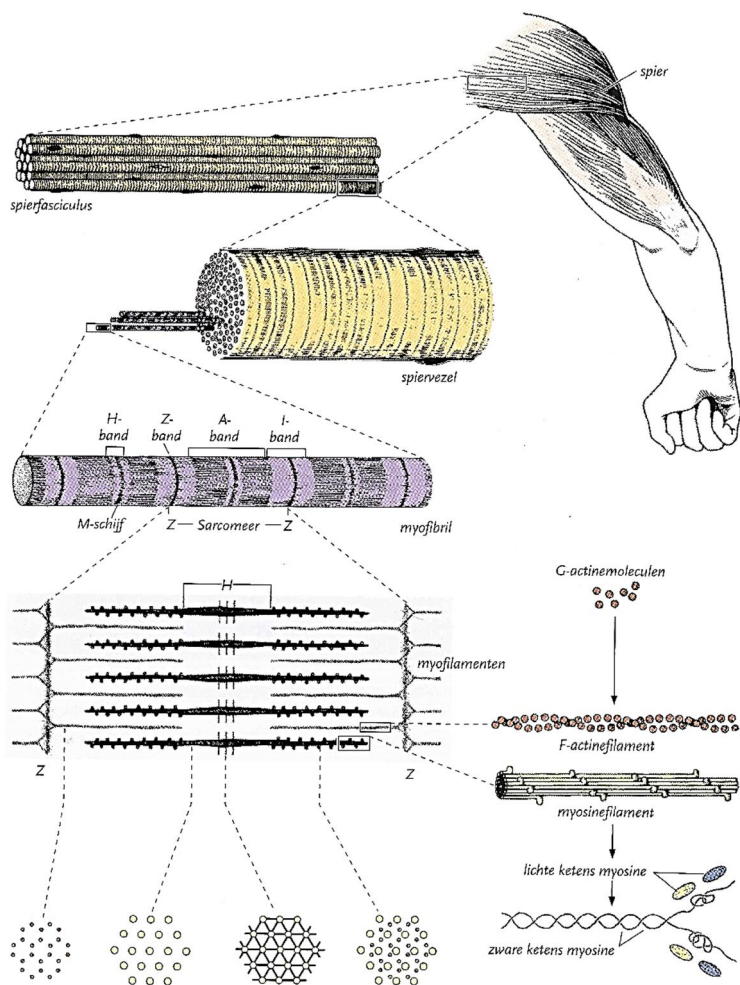
Tabel 4: Overzicht van de klinische verschijnselen van de LGMD1-subtypes (CK = Creatinekinase).

| Type | Start | Progressie | CK-stijging | Klinisch beeld |
|------|-----------|------------|---------------|--|
| 1A | Volwassen | Traag | 1-5x, tot 15x | Proximale zwakte, cardiomyopathie mogelijk |
| 1B | Variabel | Traag | 1-6x | Proximale zwakte onderste ledematen, frequent cardiomyopathie |
| 1C | Kind | Traag | 10-15x | Krampen, hypertrofie kuit, matige zwakte, frequent cardiomyopathie |
| 1D | Volwassen | Traag | 1-5x | Proximale zwakte, geen cardiomyopathie |
| 1E | Volwassen | Traag | 2-5x, tot 10x | Proximale zwakte, vergroting hart, aritmie, frequent cardiomyopathie |
| 1F | Variabel | Variabel | 1-6x | Heup en schoudergordel verzwakt, geen cardiomyopathie |
| 1G | Variabel | Traag | 1-9x | Proximale zwakte onderste ledematen, geen cardiomyopathie |
| 1H | Variabel | Traag | 1-10x | Proximale zwakte onderste ledematen, geen cardiomyopathie |

LGMD1A wordt veroorzaakt door missense³ mutaties in het myotilinegen (*MYOT*). Andere mutaties in *MYOT* vindt men terug in myofibrillaire myopathie en in *spheroid body myopathy*. Het gen codeert het eiwit myotiline, dat ter hoogte van de Z-schijf een rol speelt bij het koppelen van actinefilamenten. De mutaties veroorzaken abnormaliteiten in de Z-schijf en de myofibrillen, met een verstoorde structuur van het sarcomeer als gevolg. De positie van de Z-schijf in de structuur van skeletspieren wordt verder toegelicht in Figuur 6.

Patiënten ervaren een symmetrische verzwakking vanuit de benen die progressief de armen, polsen en vingers kan aantasten. In sommige gevallen worden ook de gelaats- en nekspieren getroffen. De ziekte komt in het algemeen pas in de tweede helft van het leven aan de oppervlakte en kent een relatief traag verloop waarbij gemiddeld 10 jaren verstrijken tussen de eerste symptomen en het moment dat de patiënt niet meer zelfstandig kan stappen. Tijdens deze periode heeft de patiënt meestal spier- en gewrichtspijnen ontwikkeld en is er bij de helft van de patiënten sprake van cardiomyopathie als complicatie. Aantasting van de ademhalingsspieren en spraak zijn zeldzamere complicaties (Iyadurai & Kassar, 2014) (Pegoraro & Hoffman, 2012) (Nigro & Savarese, 2014).

³ Een missense mutatie is een mutatie waarbij 1 nucleotide verandert en waarbij het nieuwe codon codeert voor een ander aminozuur.

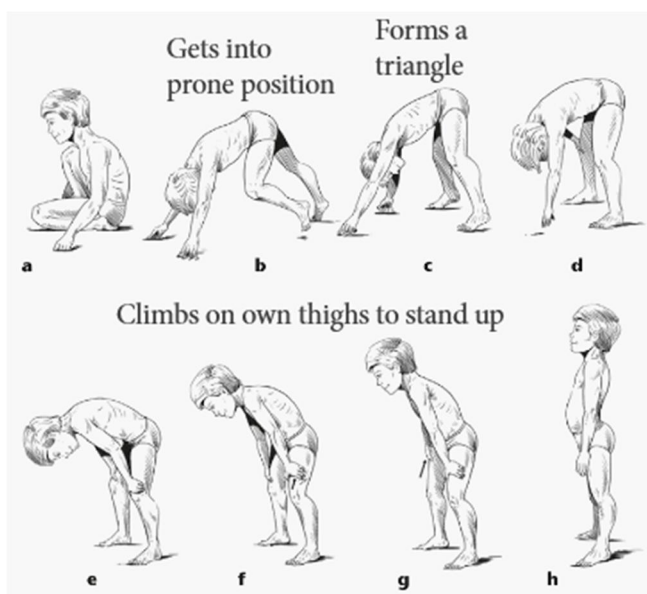


Figuur 6: Overzicht van de spierstructuur op verschillende niveaus ingezoomd. De skeletspieren zijn opgebouwd uit spierbundels, spiervezels en myofibrillen. Deze myofibrillen zijn samengesteld uit sarcomeren, de contractiele eenheden van de spier. Het sarcomeer bestaat uit actine- en myosinefilamenten. De A-band bestaat uit myosinefilamenten die op het einde deels overlappen met actinefilamenten. Aan het andere uiteinde zijn de actinefilamenten gehecht aan de Z-schijf (Junquiera & Carneiro, 2007).

LGMD1B wordt veroorzaakt door missense of synonieme⁴ mutaties in de eerste 11 exonen van het *LMNA*-gen. De producten (*lamines*) zijn structurele eiwitten en maken samen met andere eiwitten deel uit van de nucleaire *lamina*-laag aan de nucleoplasmatische zijde van het binnenste kernmembran. Veranderingen in dit eiwitnetwerk hebben directe gevolgen voor de structuur, grootte en vorm van de celkernen. Mutaties in dit gen kunnen niet alleen tot LGMD-1B leiden, maar tot nog minstens 10 andere allelische ziekten, zoals *Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy type 2* (EDMD2). De patiënten ervaren op jonge leeftijd (meestal vóór de leeftijd van 20 jaar) een beiderzijdse verzwakking van de proximale beenspieren. Gemiddeld worden de armen 10 tot 20 jaar na de eerste symptomen eveneens aangetast. Bij meer dan de helft van de patiënten verschijnt een cardiomyopathie als complicatie, wat kan leiden tot een plots overlijden (Iyadurai & Kassir, 2014) (Pegoraro & Hoffman, 2012) (Nigro & Savarese, 2014).

⁴ Een synonieme mutatie is een mutatie waarbij de verandering van nucleotide geen verandering in aminozuur teweeg brengt. Op eiwitniveau is de mutatie dus niet zichtbaar.

LGMD1C is het gevolg van mutaties in het caveoline-3 gen (*CAV3*) en kan gepaard gaan met zeer gevarieerde symptomen, zelfs binnen dezelfde familie. Het genproduct behoort tot de caveolines en is een membraanproteïne dat enkel in spieren tot expressie komt. Caveoline-3 zorgt enerzijds voor de verbinding tussen het cytoskelet en de extracellulaire matrix en anderzijds voor de transmissie van het elektrisch signaal voor de samentrekking van de spiercellen. De ziektes als gevolg van een mutatie in één van de caveolines brengt men samen onder de term “*caveolinopathieën*”. Hiertoe behoren naast LGMD1C verscheidene andere hart- en neuromusculaire aandoeningen. De symptomen van LGMD1C kunnen reeds rond de leeftijd van 5 jaar beginnen, terwijl andere personen pas als volwassene te maken krijgen met de ziekte. De patiënten hebben moeite met wandelen, vertonen een hypertrofie van de kuitspieren, krijgen last van spierkrampen na inspanningen en vertonen een positieve beweging van Gowers (Iyadurai & Kassir, 2014) (Pegoraro & Hoffman, 2012) (Nigro & Savarese, 2014). De screeningstest van Gowers wordt vooral gebruikt bij kinderen met de ziekte van Duchenne, maar kan ook breder toegepast worden. De kinderen moeten proberen om vanuit een liggende of geknieelde positie zo snel mogelijk recht te staan zonder hun armen of handen te gebruiken. Bij ernstige vormen ziet men dat de patiënten eerst op de knieën gaan zitten en zich daarna met gestrekte armen afduwen op de grond om de benen te kunnen strekken. De handen, voeten en heupen vormen zo een driehoek, waarna de patiënt met de handen op de knieën en bovenbenen duwt om zich verder te rechte. Figuur 7 toont deze verschillende stappen.



Figuur 7: Illustratie van de verschillende stappen in de beweging van Gowers (Epo Medicine, 2016). De patiënten hebben de armen nodig om vanaf een liggende of zittende positie stelselmatig rechtop te komen (a-d). Ze gebruiken hun handen om op de bovenbenen te duwen om zichzelf rechtop te duwen (e-h).

Deze duidelijke vormen verschijnen echter pas in een verder stadium van de ziektes, waardoor het vooral belangrijk is om ook oog te hebben voor de vroegste vormen van het teken van Gowers. Moeizamer rechtkomen, instabiliteit of gebruik maken van één hand kunnen vroegtijdige signalen zijn en mogen liefst niet genegeerd of gemist worden. Het kan immers helpen om door middel van

bijkomende onderzoeken sneller een diagnose te stellen waardoor de patiënt vlugger gerichte behandelingen kan krijgen. Aangezien de meeste aandoeningen met een positief teken van Gowers erfelijk zijn, kan een vroege vaststelling er toe bijdragen dat men de ouders nog tijdig kan informeren indien zij nog een kinderwens hebben (Chang & Mubarak, 2012) (Larner, 2016).

Het vierde dominante subtype **LGMD1D** wordt veroorzaakt door missense mutaties in het *DNAJB6* gen. Eiwitten uit de DNAJ-familie beschikken over een zogenaamd J-domein en zijn als “chaperone” betrokken bij verschillende cellulaire processen zoals eiwitvouwing en assemblage. Er zijn meerdere missense mutaties in *DNAJB6* bekend die de opruimende en beschermende functies van het eiwit aantasten, waardoor foutief gevouwen proteïnes niet worden verwijderd en waardoor een toxische situatie ontstaat.

Patiënten met LGMD1D ervaren gewoonlijk eerst een toenemende verzwakking in de heupregio en later meestal ook in de schoudergordel. Een typisch kenmerk is een waggelende tred als gevolg van de verzwakking in de heupsieren. Deze duidelijke symptomen verschijnen na de adolescentie, maar het tijdstip varieert tussen de leeftijd van 20 en 60 jaar. De ziekte gaat gepaard met een redelijk trage vooruitgang, waarbij de patiënt pas 20 tot 30 jaar na de eerste symptomen afhankelijk wordt van een rolstoel. Afhankelijk van de leeftijd waarop de symptomen begonnen, is het dus mogelijk dat de patiënt (bijna) zijn hele verdere leven zelfstandig kan blijven wandelen. Men ziet een lichte hypertrofie van de kuiten en gewoonlijk ook een licht verhoogde CK-waarde. Voorlopig zijn er geen complicaties gemeld waarbij het hart en de ademhaling worden aangetast, maar tot 20% van de patiënten kampt wel met slikproblemen (Iyadurai & Kassar, 2014) (Pegoraro & Hoffman, 2012) (Nigro & Savarese, 2014).

LGMD1E is één van de zogenaamde *desminopathieën*, waarbij het *DES*-gen gemuteerd is. Dit gen codeert voor desmine, een eiwit dat sterk aanwezig is in hart- en skeletspierweefsel. Het is dan ook niet verwonderlijk dat de patiënten hartproblemen hebben. Beide atria en ventrikels zijn vergroot en er zijn hartritmestoornissen merkbaar vanaf ongeveer twintigjarige leeftijd. Dit kan op latere leeftijd (30-50 jaar) leiden tot hartfalen en een plots overlijden, ook al werden er nog geen eerdere hartklachten opgemerkt. Ook gerelateerde skeletspierproblemen beginnen vanaf de volwassenheid (Iyadurai & Kassar, 2014) (Pegoraro & Hoffman, 2012) (Nigro & Savarese, 2014).

Voor de overige drie types werden er voorlopig nog geen, of pas vrij recent, causale genmutaties ontdekt. **LGMD1F** illustreert nogmaals de variatie en onvoorspelbaarheid die eerder in dit werk meermaals werd aangehaald. Dit subtype werd oorspronkelijk in één grote Spaanse familie beschreven op basis van 32 familieleden verspreid over 5 generaties. De aanvangsleeftijd varieert van minder dan 1 jaar tot 58 jaar, maar twee derde van de patiënten kreeg al vóór de leeftijd van 15 te maken met de ziekte. Bij alle patiënten werden zowel de schouder- als bekkengordel aan beide zijden aangetast, waarbij de bekkengordel het eerst en het ernstigst getroffen was. De MRC (Medical Research Council) graad van aantasting was echter sterk verschillend tussen de familieleden, gaande van quasi niet aangetast (0) tot zwaar gehandicapt en nauwelijks mobiel (4+) (Firman, 2009).

Vooral bij de vroegtijdig ontstane ziektes kregen de patiënten af te rekenen met complicaties zoals vroege distale verzwakking, *scapula alata* en een milde verzwakking van de gelaatsspieren. Het *TNPO3*-gen werd geïdentificeerd als drager van een frameshift mutatie⁵ waarbij een stopcodon verloren gaat. Het eiwitproduct transportine-3 bevindt zich in de omgeving van de kern als importine (Iyadurai & Kassar, 2014) (Pegoraro & Hoffman, 2012) (Nigro & Savarese, 2014).

Ook bij **LGMD1G** patiënten werd onlangs het oorzakelijk verband gelegd en hier bleek het onderliggende gen *HNRPDL* te zijn. Het eiwitproduct participeert in de mRNA-biogenese en -metabolisme. Bij de onderzochte patiënten zag men dat dit subtype een relatief mild verloop kent met een late start en een trage progressie (Iyadurai & Kassar, 2014) (Pegoraro & Hoffman, 2012) (Nigro & Savarese, 2014).

Voor het voorlopig laatste dominante subtype **LGMD1H** kent men het gemuteerde gen nog niet. Dit type werd beschreven op basis van 11 familieleden uit Zuid-Italië, en kent net als LGMD1G een relatief milde prognose. De meeste patiënten werden pas rond 50 jaar getroffen en hadden een hypertrofie in de kuiten, verminderde reflexen en een hypotrofie in de schouder- en bekkengordel (Iyadurai & Kassar, 2014) (Pegoraro & Hoffman, 2012) (Nigro & Savarese, 2014).

1.1.6 Gedetailleerde bespreking van de LGMD2-subtypes

Een bespreking van elk van de 26 subtypes met recessieve overerving zou ons in het kader van dit bachelorproefschrift te ver leiden. Daarom worden enkel de meest frequente subtypes besproken. Tabel 5 geeft een overzicht van de klinische manifestaties van alle LGMD2-subtypes (Iyadurai & Kassar, 2014) (Pegoraro & Hoffman, 2012) (Nigro & Savarese, 2014).

Tabel 5: Samenvatting van de voornaamste klinische gevolgen van de verschillende LGMD2-subtypes.

| Type | Start | Progressie | CK-stijging | Klinisch beeld (Cardiomyopathie = CM) |
|------|--------------|------------|-------------|---|
| 2A | Adolescentie | Matig | 3-20x | Proximale zwakte, moeilijk lopen/stappen, traplopen, atrofie kuit en zeldzame CM |
| 2B | Adolescentie | Traag | 5-40x | Distale zwakte, moeilijk lopen, traplopen, stappen, tijdelijke hypertrofie kuit en mogelijk CM |
| 2C | Kindertijd | Snel | 10-70x | Proximale zwakte benen, moeilijk lopen/stappen, krampen na inspanning, hypertrofie kuit, zware CM |
| 2D | Kindertijd | Snel | 10-70x | Proximale zwakte, <i>scapula alata</i> , soms hypertrofie kuit en zware CM |
| 2E | Kindertijd | Snel | 10-70x | Proximale zwakte, vnl heupgordel, zeldzame CM |
| 2F | Kindertijd | Snel | 10-70x | Ernstige proximale zwakte, krampen, hypertrofie kuit en CM mogelijk |
| 2G | Adolescentie | Traag | 3-30x | Moeilijk stappen, lopen, traplopen, "foot drop" |

⁵ Een frameshift mutatie is een insertie of deletie van enkele nucleotiden. Het aantal verwijderde of toegevoegde basen is geen veelvoud van 3, waardoor het leesvenster verschuift.

| | | | | |
|----|------------------------|----------|-----------------|---|
| 2H | Adolescentie | Traag | 1-20x | Zwakke gezicht en hals, waggelende tred, moeilijk traplopen, geen CM |
| 2I | Kindertijd | Matig | 5-40x | Proximale zwakte, moeilijk lopen/stappen, ademhalingsproblemen, CM |
| 2J | Adolescentie | Traag | 10-40x | Proximale zwakte erger dan distaal, geen CM |
| 2K | Kindertijd | Traag | 10-40x | Proximale zwakte, lichte mentale achterstand, pseudohypertrofie, geen CM |
| 2L | Volwassen | Traag | 1-80x | Heup en schoudergordel, atrofie biceps, kuit en quadriceps, mogelijk zwakte gezichtsspieren, geen CM |
| 2M | < 5 jaar | Matig | 10-70x | Proximale zwakte benen, reactie op steroïden, verslechtering na koorts, hypertrofie kuit, dij, triceps, Mogelijk CM |
| 2N | Prenataal / kindertijd | Matig | 5-15x | Moeite met lopen en opstaan, geen mentale achterstand, zeldzame CM |
| 2O | Kindertijd | Matig | 2-10x | Proximale zwakte, moeite met opstaan en traplopen, mogelijk hals aangetast, hypertrofie kuit & quadriceps, geen CM |
| 2P | Kindertijd | Matig | 20x | Laat stappen, mentale achterstand, waggelend, moeilijk met trappen, geen CM |
| 2Q | Kindertijd | Traag | 10-50x | Laat stappen, moeite met traplopen, algemene spierzwakte en atrofie, geen CM |
| 2R | Adolescentie | ? | Normaal | Ernstige zwakte ledematen, milde zwakte gezicht en schouderbladen, probleem bij prikkelgeleiding |
| 2S | Adolescentie | Traag | 9-16x | Proximale zwakte, scapula alata, waggelen, spierpijn, vermoeidheid, moeite met traplopen, zeer lichte CM |
| 2T | Kindertijd | ? | Stijging | Microcefalie, proximale zwakte, mentale achterstand, mogelijk CM |
| 2U | Variabel | Matig | 6-50x | Myoglobulinurie, proximale zwakte benen, hypertrofie kuit en tong, verminderde longfunctie, mogelijk CM |
| 2V | Variabel | Variabel | 1-20x | Mogelijk CM |
| 2W | Kindertijd | Matig | ? | Zwakke ledematen, hypertrofie kuit, matige CM |
| 2X | Variabel | Traag | Gestegen | Lichte verzwakking benen, pacemaker nodig |
| 2Y | Adolescentie | Traag | N of ↑ | Proximale zwakte benen, later distaal, gedaalde longfunctie, milde CM |
| 2Z | Volwassen | Traag | Lichte stijging | Proximale zwakte en atrofie, gedaalde longfunctie |

Een belangrijk aantal patiënten in het CMGG heeft mutaties die gelinkt zijn aan het **LGMD2L**-subtype, waarbij het *ANO5*-gen is aangetast. Het anoctamine-5 eiwit is een chloridekanaal dat gereguleerd wordt door calcium. Mutaties in dit gen kunnen leiden tot een verstoord membraamherstel. De ziekte wordt gekenmerkt door een laattijdig begin: de eerste symptomen komen pas na de leeftijd van 20 jaar aan de oppervlakte en in sommige gevallen zelfs pas rond 55 jaar. De eerste verzwakkingen verschijnen ter hoogte van de schouder- en heupgordel en evolueren naar een atrofie van de quadriceps en biceps, terwijl de distale armspieren gespaard blijven. Opmerkelijk voor dit subtype is de asymmetrie van de atrofie en zwakte in de kuit, quadriceps en biceps.

De meeste patiënten blijven mobiel, maar ervaren wel spierpijn (onafhankelijk van inspanning) en moeilijkheden bij traplopen. Het CK-gehalte kan tot 80 keer verhoogd zijn en ook EMG en spierbiopsies kunnen typische aanwijzingen vertonen. Bij ernstig aangetaste personen kan men een toename in bindweefsel of ontstekingen zien in een spierbiopsie. Op vlak van frequentie is dit subtype een buitenbeentje: bij andere subtypes ziet men dat mannen en vrouwen ongeveer even frequent en even ernstig zijn aangetast, maar bij LGMD2L worden vrouwen beduidend minder vaak getroffen. Voor Noord-Europa schat men dat enkel dit subtype verantwoordelijk is voor 10 tot 20% van alle gevallen van LGMD (Iyadurai & Kassari, 2014) (Nigro & Savarese, 2014).

Een ander frequent en wereldwijd voorkomend fenotype, dat tot 10% van de LGMD-gevallen in de VS verklaart, is het **LGMD2A**-subtype. Dit subtype staat ook bekend als calpainopathie. De naam is afgeleid van het gemuteerde calpaïne-3 eiwit dat gecodeerd wordt door het *CAPN3*-gen. Calpaïnes zijn eiwitten met een proteasefunctie die onder controle staan van calciumionen. Wanneer deze functie verstoord wordt, kan dit leiden tot problemen met het herstel van membranen van spiercellen en de organisatie van het sarcomeer. Momenteel zijn er meer dan 300 mutaties bekend in dit gen (Iyadurai & Kassar, 2014) (Nigro & Savarese, 2014).

De patiënten met LGMD2A hebben wel een symmetrische atrofie en zwakte, die gewoonlijk starten in de heupregio. Dit uit zich in moeilijkheden bij het lopen en traplopen. Bij de meeste personen volgen pas in een later ziektestadium ook schouderklachten. Een frequente complicatie is de progressieve aantasting van de ademhalingspijpen, wat op zijn beurt hartcomplicaties kan uitlokken. Als gevolg van de brede waaier aan mutaties, is er een heel gevarieerd klinisch spectrum. De ernst en voortschrijding van de ziekte hangt in sterke mate af van de soort mutatie: de patiënten met 2 nonsense⁶ mutaties hebben logischerwijze een ernstig en snel verslechterend ziektebeeld. De leeftijd waarop de symptomen starten is eveneens variabel, net als de leeftijd waarop de patiënt niet meer zelfstandig kan stappen. Deze tijdstippen kunnen variëren van de peutertijd tot ongeveer 40 jaar oud, maar gemiddeld ziet men de eerste symptomen in de puberteit (Iyadurai & Kassar, 2014) (Nigro & Savarese, 2014).

Men gebruikt de gekende medische technieken (EMG, biopsie, MRI) om een indicatie van de diagnose te krijgen, maar dit is niet altijd voldoende specifiek. Naast de kleuringen op het spierweefsel kan men ook een Western blot analyse uitvoeren op het biopt. Ook dit is onvoldoende specifiek: gedaalde calpaïne-3 niveau's kunnen namelijk ook voorkomen bij andere ziektes, terwijl normale eiwitgehalten en een normale proteolytische functie LGMD2A niet uitsluiten. Vandaar de noodzaak om terug te grijpen naar genetisch onderzoek om een sluitende diagnose te kunnen bieden. Zelfs duidelijke klinische gevallen vereisen een genetische bevestiging alvorens genetisch advies bij de voortplanting kan gegeven worden (Iyadurai & Kassar, 2014) (Nigro & Savarese, 2014).

Naast deze twee frequent voorkomende subtypes, zijn er ook vormen van LGMD2 die zeer zeldzaam zijn en pas recent werden ontdekt. **LGMD2X** is een subtype dat pas in 2016 werd beschreven op basis van een artikel van Schindler en collega's. Zij ontdekten een homozygote missense mutatie in het *BVES*-gen bij een Albanese familie. Verschillende familieleden kampten met duidelijke hartritmestoornissen die opgevangen moesten worden met een pacemaker. De aangetaste grootvader kreeg pas rond zijn veertigste spierklachten in de onderste ledematen, waardoor hij 20 jaar later niet meer kon stappen. Zijn kleinzonen hadden reeds in hun tienerjaren dezelfde hartproblemen, maar vertoonden nog geen

⁶ Een nonsense mutatie is een puntmutatie waarbij een vroegtijdig stopcodon wordt ingebouwd. Het eiwit is dus beduidend korter dan normaal en verliest meestal zijn functionaliteit.

proximale spierzwakte. Ze kregen net als hun grootvader een pacemaker. Er werden spierbiopsies uitgevoerd en na microscopisch onderzoek zag men verschillende veranderingen die wezen op een spierdystrofie. Men stelde eveneens verhoogde CK-waarden in het serum vast (Schindler, et al., 2016) (Kniffin, OMIM #616812, 2016).

1.1.7 Genetische diagnostiek

1.1.7.1 Bespreking genpanel

Het CMGG gebruikte tot vrij recent een genpanel met een dertigtal genen om LGMD te diagnosticeren. Onlangs is men overgestapt op een veel uitgebreider panel van 141 genen die gelinkt zijn aan verschillende neuromusculaire aandoeningen. Toch biedt zelfs dit grotere aantal genen nog niet voor elke patiënt een genetische diagnose. Voor het genpanel van het CMGG op punt stond, werden er enkele patiëntstalen doorgestuurd naar het Telethon Institute of Genetics and Medicine in Napels. Dit labo bood als één van de eerste labo's een uitgebreid neuromusculair genpanel aan, en hanteert vandaag een genpanel van 199 genen. Een snelle vergelijking met het huidige panel in Gent leerde dat er 116 genen in beide panels zaten. Dit wil dus enerzijds zeggen dat er 83 genen in het Italiaanse labo worden onderzocht die niet in Gent worden bekeken, en dat er anderzijds 25 genen wel in Gent maar niet in Napels worden onderzocht (Tabel 6). Er werd beslist om 2 genen uit het Italiaanse panel toe te voegen aan de volgende update van het LGMD-panel in Gent, wat het aantal diagnostische genen op 143 genen zal brengen. Als test worden momenteel de 83 genen die wel in Napels maar niet in het CMGG onderzocht worden, toegevoegd aan het bestaande panel van 141 genen. De researchafdeling zal het effect van deze nieuwe uitbreiding onderzoeken en op basis van deze resultaten zal men de meest significante genen selecteren om toe te voegen aan een volgende update.

Tabel 6: Vergelijking van de genen in het huidige LGMD-panel dat gebruikt wordt in het CMGG en het panel dat gebruikt wordt in het labo in Napels.

| | Wel in CMGG | Niet in CMGG | Totaal Napels |
|----------------|-------------|--------------|---------------|
| Wel in Napels | 116 | 83 | 199 |
| Niet in Napels | 25 | --- | |
| Totaal CMGG | 141 | | |

Verder opzoekwerk leverde verschillende andere neuromusculaire genpanels op (afkomstig van de University of Chicago, Genedx.com, Fulgent Therapeutics, Genetests.org en het voormelde labo in Napels), met een gezamenlijk aantal van 186 unieke genen die nog zouden kunnen toegevoegd worden. De klinische relevantie van elk van deze genen kon echter niet beoordeeld worden. Het potentiële aantal van 327 genen (de huidige 141 genen + 186 nieuwe genen afkomstig uit de 5 panels) klinkt aanlokkelijk, want men zou verwachten dat dit tot een veel hoger aantal diagnoses zou kunnen leiden. Toch voegt men best niet zomaar alle mogelijke genen toe: dit kan immers ook ten koste gaan

van de specificiteit van het panel, waardoor de diagnostische relevantie daalt. De kans bestaat dat men een variant in een gen vindt dat niet in overeenstemming is met het fenotype van de patiënt. Bovendien betekent een uitbreiding van deze omvang ook een verhoging in analysetijd en kostprijs.

Het voordeel van exoom- of genoomanalyse is dat men wel over alle genetische informatie van de patiënt beschikt. Zelfs als een patiënt (nog) geen diagnose heeft gekregen, blijven de exoom- of genoomdata wel beschikbaar in het labo en kan men later deze data herbekijken wanneer er bijvoorbeeld nieuwe genen aan het panel worden toegevoegd.

1.1.7.2 Mutatieanalyse en variantclassificatie

Gezien de enorme genetische variatie tussen individuen is het niet verwonderlijk dat het onderzoeken van 141 genen heel wat varianten oplevert. Natuurlijk verklaren niet alle varianten de ziekte van de persoon: het is dus de kunst om enkel de (mogelijke) pathogene varianten eruit te filteren en enkel deze varianten te bevestigen met de Sanger techniek. Er zijn verschillende manieren om de bekomen data te analyseren en te filteren tot een overzichtelijk aantal.

De eerste stap is meestal het instellen van de gewenste frequenties: omdat alle LGMD-subtypes zeldzaam zijn, heeft het weinig nut om te kijken naar varianten die bij meer dan 2% van de populatie voorkomen. Daarna kan er eventueel nog verder geselecteerd worden op het effect van de variant: een synonieme mutatie heeft een kleinere kans om ziekteverwekkend te zijn dan een nonsense mutatie of frameshift mutatie. Verder wordt er steeds gekeken of de persoon homozygoot of heterozygoot is, en of de aandoening dominant, recessief of X-gebonden wordt overgeërfd. Andere belangrijke parameters zijn het effect op een splice-site. Een mutatie die een splice-site beïnvloedt, kan ernstige gevolgen hebben voor de rest van het eiwit. Dit wordt geïllustreerd in 1.2.3. Een ander hulpmiddel om de impact van een variant in te schatten, zijn de verschillende predictieprogramma's die, elk op een ander aspect, de variant beoordelen. Zo rapporteert ClinVar of een variant "pathogenic" of "likely pathogenic" is, of eerder "likely benign" tot "benign". Het SIFT-programma en de Grantham-score beoordelen het effect van de aminozuurverandering op het hele eiwit. Hierbij wordt onder meer rekening gehouden met de positie en de aard van het aminozuur. Sommige aminozuren hebben immers sterk gelijkende eigenschappen terwijl anderen zeer sterk kunnen verschillen. De Grantham-score kwantificeert dit verschil tussen onderlinge aminozuren: hoe hoger de score, hoe groter het verschil en hoe dramatischer het effect van de substitutie.

De bekomen varianten worden ingedeeld volgens het internationale systeem met 5 klassen. De varianten uit klasse 1 ("benign"), 2 ("likely benign") en 3 ("uncertain significance")⁷ worden niet gemeld

⁷ Klasse 3 wordt enkel gerapporteerd afhankelijk van het genpanel. Het kan ook gebeuren dat varianten initieel als klasse 3 worden beschouwd, maar nadien op basis van onderzoek van familieleden worden aangepast naar klasse 4 (of klasse 2).

aan de aanvragende arts. Enkel de varianten van klasse 4 (“likely pathogenic”) en 5 (“pathogenic”) worden als dusdanig gerapporteerd aan de arts. De laboranten voegen de bevestigde varianten toe in de Ford-module van het CMGG, waarna een rapport verschijnt met de klasse die aan de variant toegekend werd. Sommige argumenten wegen zwaarder door in de finale optelsom van de beoordeling. Zo kan één zeer sterk bewijs van pathogeniciteit de balans meteen doen kantelen naar klasse 4 of 5. Dit geldt bijvoorbeeld voor nonsense of frameshift varianten in een gen waarvan het verlies van functie van het eiwit gekend is als ziektemechanisme (Richards, et al., 2015). Indien verschillende criteria of predicties elkaar tegenspreken, wordt er gewoonlijk “conflicting interpretations” vermeld en wordt de variant ondergebracht in klasse 3.

1.2 Collageen type VI

Zoals in het vorige gedeelte besproken werd, bevat het huidige screeningspaneel heel wat meer genen dan enkel de reeds gekende LGMD-genen. Het screeningspaneel kan op die manier gebruikt worden om een brede waaier aan bindweefselaandoeningen te diagnosticeren. Twee van die ziekten kennen in belangrijke mate een klinische overlap met de reeds besproken LGMD-subtypes. Deze ziekten zijn het gevolg van onderliggende defecten in één van de genen die voor de α -ketens van het collageen type VI eiwit coderen, namelijk *COL6A1*, *COL6A2* en *COL6A3*, en bijkomend ook voor *COL12A1*, coderend voor collageen type XII. Bij een groot aantal patiënten werd er in het CMGG reeds een screening gedaan van de exonen van deze genen om mogelijke causale mutaties op te sporen, maar bij 147 patiënten werd er geen oorzakelijke mutatie aangetroffen in één van deze vier genen.

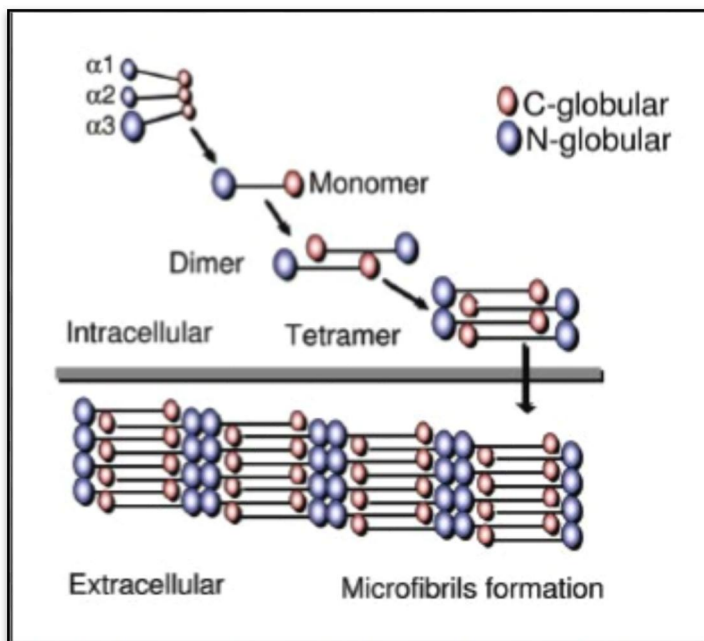
Recent werd in de literatuur een nieuwe mutatie beschreven die diep intronisch gelegen is in het *COL6A1*-gen, maar toch een ernstige dystrofie kan veroorzaken (Cummings, et al., 2016). Omdat er bij het screenen van de exonen slechts 20 basenparen van de aangrenzende intronen mee gecoverd worden, kon de nieuw beschreven mutatie niet worden aangetoond. In hun publicatie schatte Cummings et al. dat tot een kwart van de voorheen niet-gediagnosticeerde patiënten mogelijk deze mutatie zou dragen en dit zou dan eventueel hun ziektebeeld kunnen verklaren. Mijn taak bestond er in om de stalen van deze patiënten opnieuw te analyseren met een nieuw primerpaar, gericht op het specifieke intron.

1.2.1 Structuur en functie

De verschillende collageen types spelen een centrale rol in het menselijk lichaam. Al het collageen samen is goed voor 30% van het totale drooggewicht van het lichaam (Junqueira & Carneiro, 2007). Collageen type VI is een collageen type dat in de extracellulaire matrix van heel wat weefsels aanwezig is en netwerken kan vormen in de spieren, huid, pezen en bloedvaten. Dit type collageen is opgebouwd uit drie alfa-ketens die elk door aparte genen worden gecodeerd en *COL6A1*, *COL6A2* en *COL6A3*

worden genoemd. Logischerwijze kunnen mutaties in deze genen eventueel een negatieve impact hebben op de structuur van het collageeneiwit, wat tot uiting komt in een spectrum aan fenotypes (Bönnemann, 2011). Enkele jaren geleden ontdekte men nog drie andere ketens die door andere genen worden gecodeerd (*COL6A4*, *COL6A5* en *COL6A6*). Hun functie en mogelijke rol in de ziektes van Bethlem en/of Ullrich is voorsnog onduidelijk (Fitzgerald, Rich, Zhou, & Hansen, 2008) (Sabatelli, et al., 2012).

Alvorens dieper in te gaan op deze ziektes, is het belangrijk om kort de structuur van collageen toe te lichten om op die manier beter de impact van de mutaties te kunnen inschatten. De drie *COL6A* genen coderen elk voor een verschillende α -keten en deze vormen samen een heterotrimeer. Elke α -keten bevat een domein met een triple helix dat men het *short triple helical domain* noemt. Deze drievoudige helix komt tot stand dankzij het typische aminozuurpatroon Gly-X-Y dat zich herhaalt vanaf de C-terminus van het eiwit. In een volgende synthesestap zullen twee van deze domeinen antiparallel aan elkaar gekoppeld worden tot een dimeer en vervolgens vormen twee dimeren een tetrameer. Het tetrameer wordt dan pas uit de cel uitgescheiden in de matrix. In de extracellulaire matrix maken de tetrameren kop-staartverbindingen om het collageen type VI netwerk te vormen. Figuur 8 vat de beschreven stappen samen (Bönnemann, 2011).



Figuur 8: Overzicht van de synthese van collageen type VI (Reed, 2009). Intracellulair worden de verschillende collageen type 6 ketens gevormd en gekoppeld tot een heterotrimeer. 2 heterotrimeren vormen samen een dimeer en vervolgens worden 2 dimeren samengevoegd tot een tetrameer. Extracellulair worden de tetrameren in de juiste richting aan elkaar gekoppeld om het eigenlijke netwerk te vormen.

Gelet op de netwerkvormende eigenschappen en de alomtegenwoordigheid van collageen type VI, is de voornaamste functie van dit eiwit het verankeren van cellen aan de extracellulaire matrix en aan elkaar. Daarnaast interageert collageen met verschillende andere collageen types, celreceptoren en

mogelijk ook met sarcoglycaan- en dystroglycaancomplexen. Collageen type VI blijkt ook een stimulerende rol te hebben voor verschillende processen of cellen: DNA-synthese in mesenchymcellen, migratie van neurale lijstcellen en het in stand houden van de morfologie van epitheelcellen (Bönnemann, 2011) (Groulx, et al., 2011).

1.2.2 Klinisch beeld van de geassocieerde ziekten

Mutaties in één van de drie *COL6A*-genen kunnen de kwaliteit van collageen type VI ernstig aantasten en op die manier leiden tot een gevarieerd spectrum aan ziektes. De fenotypes die relatief éénvoudig te beschrijven zijn, bevinden zich aan de uiteinden van dit spectrum: enerzijds vertoont Bethlem myopathie een eerder mild ziektebeeld, terwijl Ullrich musculaire dystrofie ernstiger is. Tussen deze uitersten bevinden zich nog een aantal intermediaire fenotypes, met wisselende ernst afhankelijk van de onderliggende mutatie. De meeste van deze spierziekten hebben enkele gemeenschappelijke kenmerken, voornamelijk op vlak van de hypermobile gewrichten (Bönnemann, 2011).

1.2.2.1 Ullrich musculaire dystrofie (UCMD)

De musculaire dystrofie van Ullrich wordt meestal reeds op jonge leeftijd vastgesteld omdat er een aantal kenmerken reeds vanaf de geboorte zichtbaar zijn of in de eerste levensjaren tot uiting komen. De patiënten hebben een verminderde spierkracht, contracturen in de gewrichten en vertonen een zeer kenmerkende hyperlaxiteit in de gewrichten van de voeten, handen en vingers, zoals geïllustreerd wordt in Figuur 9. Het is daarom niet verwonderlijk dat de ontwikkeling van motorische vaardigheden zoals kruipen en stappen vertraagd is. In de meeste gevallen kan de patiënt tijdelijk kruipen of stappen, maar verliest hij dit vermogen reeds tijdens de vroege tienerjaren. De zwaarst getroffen patiënten zullen echter nooit, of enkel met hulpmiddelen, kunnen stappen (Bönnemann, 2011).



Figuur 9: Typische hypermobilitéit van de vingers van een patiënt met Ullrich musculaire dystrofie (Bönnemann, 2011) (Foto eigendom van Prof. Dr. Marjo Van Der Knaap, VUMC Amsterdam).

Een ander ernstig probleem bij de UCMD-patiënten is scoliose. Dit is een toestand waarbij de wervelkolom zijwaarts gekromd is. Gezien de progressieve aard van scoliose, vereist deze aandoening bij de meeste patiënten een operatieve ingreep (U.Z. Leuven, 2015).

Aangezien collageen type VI veelvuldig aanwezig is in de huid, gaat een ziekte gerelateerd aan dit eiwit dikwijls ook gepaard met dermatologische verschijnselen. Verstoorde littekenvorming is hiervan het belangrijkste voorbeeld. Eén van de ernstigste complicaties is bovendien de aantasting van de luchtwegen als gevolg van een verzwakking van het middenrif enerzijds en een verstijfde ribbenkast anderzijds. Deze combinatie zorgt ervoor dat de meeste patiënten op termijn te maken krijgen met (nachtelijke) ademhalingsproblemen en een verminderde longcapaciteit. Het ontbreken van kunstmatige ondersteuning van de ademhaling is een voornamelijk doodsoorzaak bij deze patiënten. Tot slot krijgen de zwaarst getroffen patiënten geregeld te kampen met eet- en slikproblemen, al dan niet gecombineerd met gastro-oesofageale reflux. In tegenstelling tot de patiënten met sommige LGMD-subtypes blijven mensen met Ullrich musculaire dystrofie gespaard van hartcomplicaties als gevolg van hun ziekte (Bönnemann, 2011).

1.2.2.2 Bethlem myopathie (BM)

De myopathie van Bethlem is in vele opzichten beduidend milder dan UCMD, maar ook deze ziekte is meestal reeds merkbaar van bij de geboorte. De kinderen zijn minder ernstig verzwakt dan patiënten met UCMD, hebben een minder extreme hypermobiliteit en vertonen minder uitgesproken contracturen in de gewrichten. Deze contracturen zijn niet altijd aanwezig en hebben zelfs de neiging om in eerste instantie af te nemen. Pas rond de leeftijd van 10 jaar verschijnen er in de spieren, pezen en gewrichten nieuwe contracturen, met een mogelijke beperking van de functie tot gevolg. Rond deze leeftijd is de spierzwakte stabiel of neemt de zwakte zelfs af dankzij de normale toename in spiermassa en spierkracht tijdens de puberteit. Rond de leeftijd van 30 tot 40 jaar duikt er echter opnieuw een traag voortschrijdende spierverswakking op, waardoor de meerderheid van de 60-plussers hulp nodig heeft bij het wandelen (Bönnemann, 2011) (Lampe, Flanigan, Bushby, & Hicks, 2012) (Jöbsis, 1999).

De patiënten kunnen op termijn hinder ondervinden van een afname van de longcapaciteit, zij het in mindere mate dan de patiënten met de musculaire dystrofie van Ullrich. Toch is een nauwgezette opvolging in de vorm van regelmatige slaapstudies aangewezen om de symptomen te verlichten. Tot slot ziet men eveneens huidcomplicaties zoals bij patiënten met UCMD, en werden er tot op heden evenmin hartcomplicaties gerapporteerd (Bönnemann, 2011).

1.2.2.3 Intermediaire fenotypes en overlap met andere aandoeningen

Niet alle patiënten zijn echter onder te brengen bij de hierboven beschreven ziektes: bij sommigen is hun fenotype ernstiger dan dat van Bethlem-patiënten, doch tegelijk beduidend milder dan dat van Ullrich-patiënten. Zo hebben ze vaak een prominentere verzwakking dan BM-patiënten, maar kunnen ondanks hun aanzienlijke spierzwakte wel langer zelfstandig wandelen dan personen met de ziekte van Ullrich. Opnieuw vormen progressieve ademhalingsproblemen belangrijke complicaties (Bönnemann, 2011).

Soms kan het gebeuren dat patiënten op basis van een klinisch onderzoek de diagnose van LGMD krijgen omdat ze wel een proximale verzwakking, maar niet de typische contracturen in de gewrichten hebben. In veel gevallen kan genetische diagnostiek een uitkomst bieden, hoewel het mogelijk is dat éénzelfde mutatie in de ene familie een LGMD-beeld veroorzaakt, terwijl een andere familie de typische kenmerken van Bethlem myopathie ontwikkelt. Soms vindt men deze schijnbare discrepantie zelfs binnen dezelfde familie met dezelfde mutatie (Bönnemann, 2011).

Ook myosclerose vertoont, naast duidelijke verschillen, ook enkele gelijkenissen met het fenotype van Bethlem myopathie. Reeds in de 19^e eeuw lanceerde Duchenne deze term voor een situatie waarbij de spiervezels in een spierbiopt volledig ingekapseld waren in een bindweefselmantel (Duchenne, 1868). De patiënten hebben dezelfde contracturen als Bethlem-patiënten, maar zonder de typische spierverzwakking (Bönnemann, 2011).

1.2.3 Mutaties als oorzaak van Bethlem myopathie of Ullrich musculaire dystrofie

Zoals eerder beschreven zijn de triple helices ingebouwd in collageen type VI volgens een repetitief Gly-X-Y patroon waarbij het aminozuur glycine een belangrijke rol speelt. Het is dan ook niet verwonderlijk dat elke missense mutatie die ergens in de aminozuurketen glycine doet verdwijnen grote structurele gevolgen heeft voor het ganse collageen type VI eiwit, omdat hierdoor de helixstructuur lokaal verloren gaat. Bij Bethlem-patiënten ontdekt men meestal een dominante missense mutatie in één van de *COL6A* genen, hetzij afkomstig van één van de ouders, hetzij *de novo* ontstaan. Afhankelijk van de plaats van de mutatie heeft de substitutie van glycine grotere of minder grote fenotypische gevolgen. Dit laatste kan een verklaring zijn voor de zone met intermediaire fenotypes zoals hiervoor reeds besproken. Een andere veelvoorkomende mutatie van Bethlem myopathie is een inframe deletie⁸ in exon 14 van *COL6A1*, waardoor een veelvoud van 3 nucleotiden ontbreken (Bönnemann, 2011).

⁸ Een inframe deletie is een deletie van een veelvoud van 3 nucleotiden. Hierdoor verschuift het leesvenster niet.

Uit de voorgaande beschrijving bleek duidelijk dat de musculaire dystrofie van Ullrich een ernstiger fenotype heeft. Dit doet vermoeden dat de onderliggende mutaties een zwaardere impact op collageen type VI hebben dan de mutaties bij Bethlem myopathie. De vroegst ontdekte mutaties bleken recessieve nonsense mutaties te zijn. Verder onderzoek van spierbiopten en gekweekte huidfibroblasten toont aan dat de patiënt in kwestie geen collageen type VI heeft. Ook hier heeft de plaats van de mutatie een invloed op de ernst van de ziekte: indien de mutatie gelegen is in een exon met een alternatieve splicing, dan zijn de gevolgen iets minder erg. Bij *inframe exon-skipping mutations*⁹ speelt de locatie eveneens een belangrijke rol. Indien het ontbrekende exon codeert voor een sequentie aan de N-terminale zijde, kan de defecte keten wel ingebouwd worden in het monomeer. Wanneer een soortgelijke mutatie zich aan de C-terminale zijde bevindt, kunnen deze aangetaste ketens niet meer ingebouwd worden, wat aanleiding geeft tot een ernstiger fenotype (Bönnemann, 2011).

Alle mutaties die gepaard gaan met een frameshift hebben hetzelfde effect als een recessieve nonsense mutatie. Voorbeelden van dit soort mutaties zijn onder andere splice-site mutaties waarbij een exon wordt overgeslagen en inserties of deleties van een aantal nucleotiden dat geen veelvoud is van 3 (Bönnemann, 2011).

Naast deze mutaties is mozaïcisme een mogelijke verklaring voor de intra-familiale variatie. In dat geval heeft de patiënt minstens twee genetisch verschillende cellijnen als gevolg van een fout in de vroege celdelingen tijdens de foetale periode. Op die manier kunnen bijvoorbeeld alle spiercellen in het lichaam een mutatie dragen, terwijl andere cellijnen gespaard blijven. Het defect komt dan ook enkel tot expressie in de aangetaste cellen (U.Z. Brussel Centrum voor Medische Genetica, 2016) (Donkervoort, et al., 2015). Door gebruik te maken van kwantitatieve PCR-technieken konden onderzoekers de graad van mozaïcisme berekenen in verschillende weefseltypes. Wanneer deze mutatie wordt doorgegeven aan de kinderen, bestaat de kans dat zij een ernstiger fenotype ontwikkelen dan de ouders. Dit fenomeen zorgt voor bijkomende moeilijkheden wanneer men genetisch advies verstrekt aan een koppel met een kinderwens. Ook in verschillende andere COL-genen, gelinkt aan Osteogenesis Imperfecta en Ehlers-Danlos syndroom, heeft men reeds mozaïcisme kunnen aantonen (Donkervoort, et al., 2015).

Mozaïcisme biedt een extra onderzoekspiste wanneer een kind met een bepaalde mutatie wordt gediagnosticeerd, maar waarbij deze mutatie niet kan teruggevonden worden bij de ouders. Indien de ouders geen of milde klachten hebben, kan men overwegen om verschillende weefsels te onderzoeken omdat de expressie van de mutatie mogelijk weefselspecifiek kan zijn.

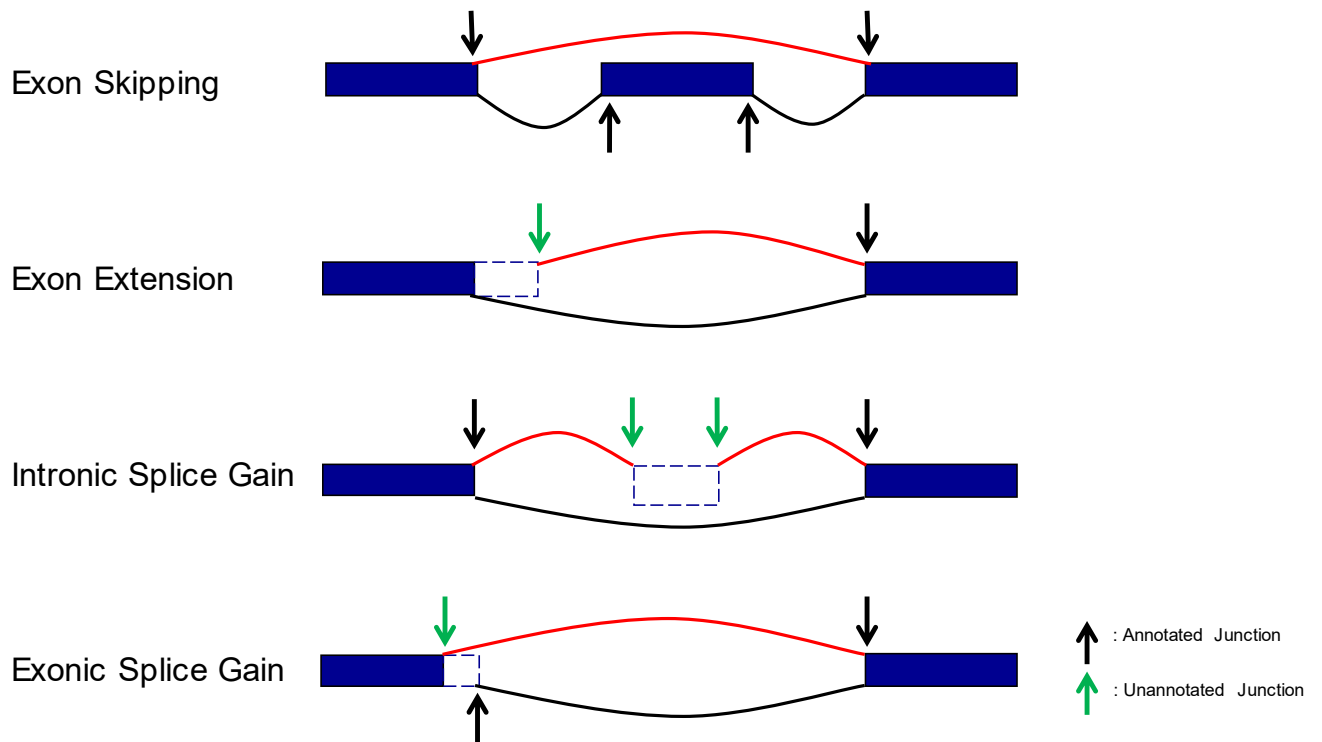
⁹ Inframe exon-skipping mutations zijn mutaties waarbij een exon wordt overgeslagen, maar waarbij het leesvenster wel behouden blijft. D.w.z. dat de volgende exonen in principe wel normaal worden afgelezen.

Een recent artikel haalde verschillende voorbeelden aan waarbij transcriptoomsequencing gebruikt werd als aanvullende techniek om erfelijke ziektes vast te stellen. De onderzoekers selecteerden patiënten bij wie eerdere sequencerings van het genoom of exoom geen diagnose opleverden. Uit spierbiopten werd RNA geëxtraheerd en gesequeneerd, dat nadien onderzocht werd op afwijkende splice-sites. Een opvallende bevinding was een frequente *de novo* mutatie in het intron tussen exon 11 en 12. Deze intronische mutatie veroorzaakt een nieuwe splice-site, waardoor er een pseudo-exon wordt gevormd. 72 basenparen verder eindigt dit pseudo-exon op een cryptische acceptor splice-site¹⁰. Als gevolg van deze nieuwe splicing worden er 24 aminozuren extra toegevoegd aan de keten, waardoor het Glycine-X-Y patroon en de drievoudige helix verloren gaan. De onderzoekers schatten op basis van hun resultaten dat tot een kwart van alle cases suggestief voor collageen type VI-gerelateerde dystrofie, maar negatief na exonsequencing, te wijten zouden zijn aan deze *de novo* mutatie (Cummings, et al., 2016). De genomische coördinaat van de mutatie is door de onderzoekers vastgesteld op chr21:47409881, wat overeenkomt met c.930+189C>T (Cummings, et al., 2016).

Deze schatting vormde het uitgangspunt voor de uitgevoerde screening. Indien de cijfers uit het artikel kloppen, zouden we deze mutatie meermaals moeten terugvinden in de geselecteerde groep patiënten uit het CMGG. Dankzij deze screening zouden tot een kwart van de onderzochte patiënten uit deze groep een diagnose krijgen die hun fenotype verklaart.

Figuur 10 toont de voornaamste effecten van mutaties in een splice regio, waarbij een exon overgeslagen, verlengd, toegevoegd of verkort kan worden. De derde situatie is een schematische weergave van het gevolg van de intronische mutatie in het *COL6A1* gen waarop de screening gefocust was.

¹⁰ Een cryptische splice-site is een locatie die in normale omstandigheden niet als splice-site gebruikt wordt, of slechts in heel beperkte mate. Door een mutatie vlakbij een cryptische splice-site kan deze locatie plots zeer sterk geactiveerd worden en resulteren in oneigenlijke splice-producten. Dit kan tot diverse ziektes leiden (Kapustin, et al., 2011).

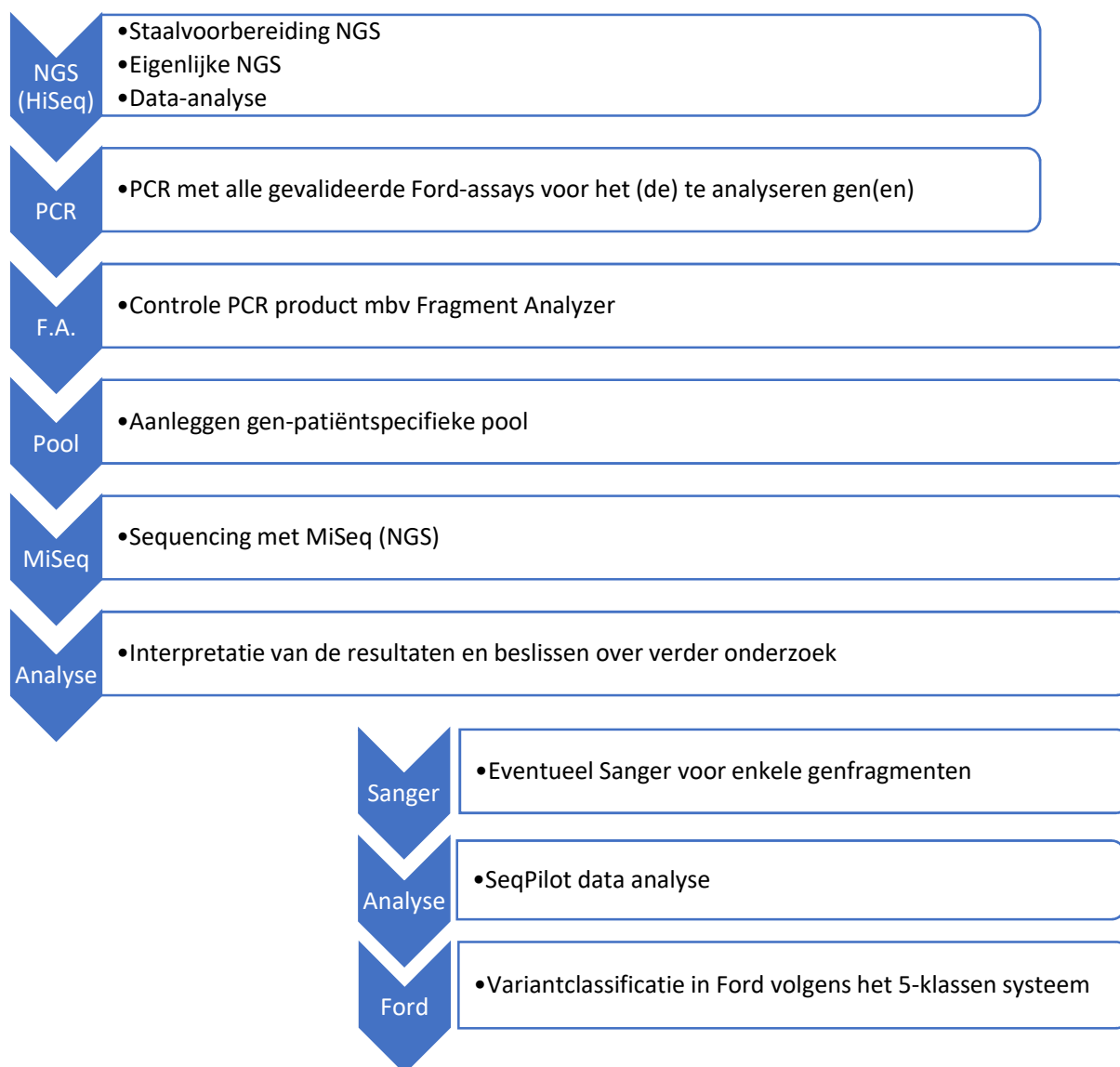


Figuur 10: Schematische voorstelling van enkele mogelijke effecten van een mutatie t.h.v. splice-sites (Cummings, et al., 2016). In het eerste geval wordt een exon overgeslagen door het verlies van de donor-site van het middelste exon. Het stuk dat overspannen wordt door de rode lijn wordt weggeknipt. In het tweede geval wordt een exon verlengd door mutaties die de normale splicedonor-site verlegd hebben. In het derde geval wordt er een pseudo-exon gevormd in een gebied dat normaal intronisch is, als gevolg van een nieuwe splice-acceptor locatie. Het laatste geval toont een verkorting van een exon als gevolg van een verplaatsing van de splicedonor-site.

2 Materialen en methoden

2.1 Algemene workflow voor variantbevestiging en *COL6A1*-screening

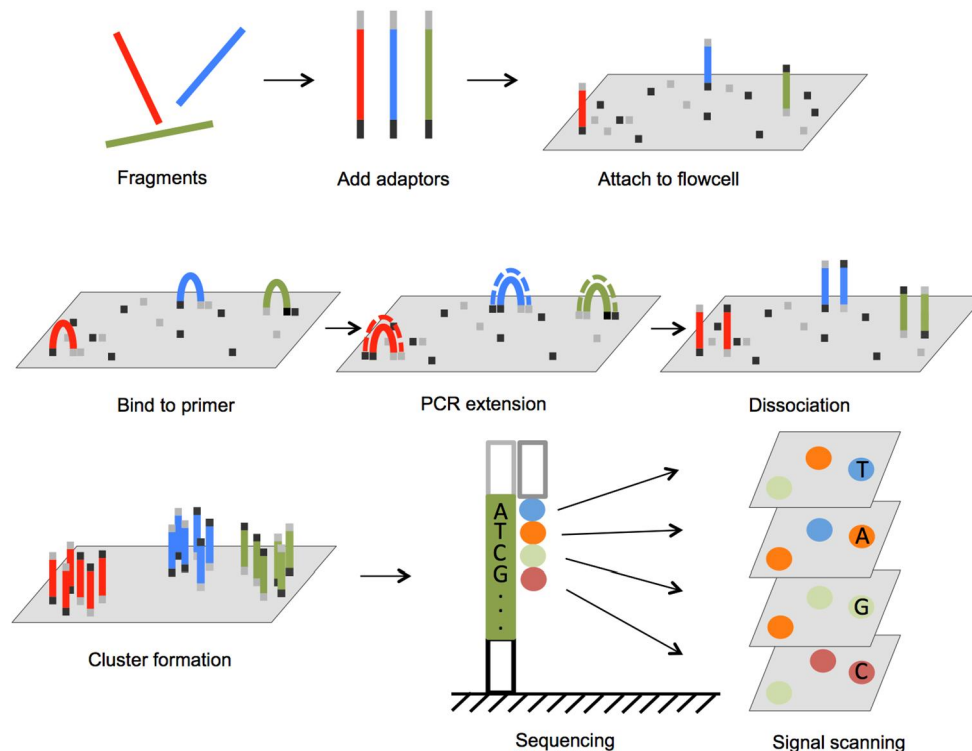
In het labo gebeurt er eerst een DNA-extractie op het bloedstaal alvorens de eigenlijke analyse gestart wordt. Deze genomische DNA-extractie wordt met een robot uitgevoerd en wordt hier niet verder besproken. Daarna volgt de specifieke staalvoorbereiding en analyse voor de next generation sequencing. Anno 2017 heeft elk centrum voor medische genetica een Next Generation Sequencing toestel. Bij de eigenlijke uitvoering van de proeven werd deze techniek niet gebruikt, maar gezien het belang ervan in de mutatieanalyse is een korte beschrijving van deze techniek op zijn plaats. Figuur 11 toont de algemene workflow van de handelingen die werden uitgevoerd voor de praktische experimenten. Elk van deze stappen worden verder uitgediept in 2.2 en volgende.



Figuur 11: Schematische voorstelling van de workflow tijdens het uitvoeren van de praktische experimenten.

2.2 Next Generation Sequencing (NGS)

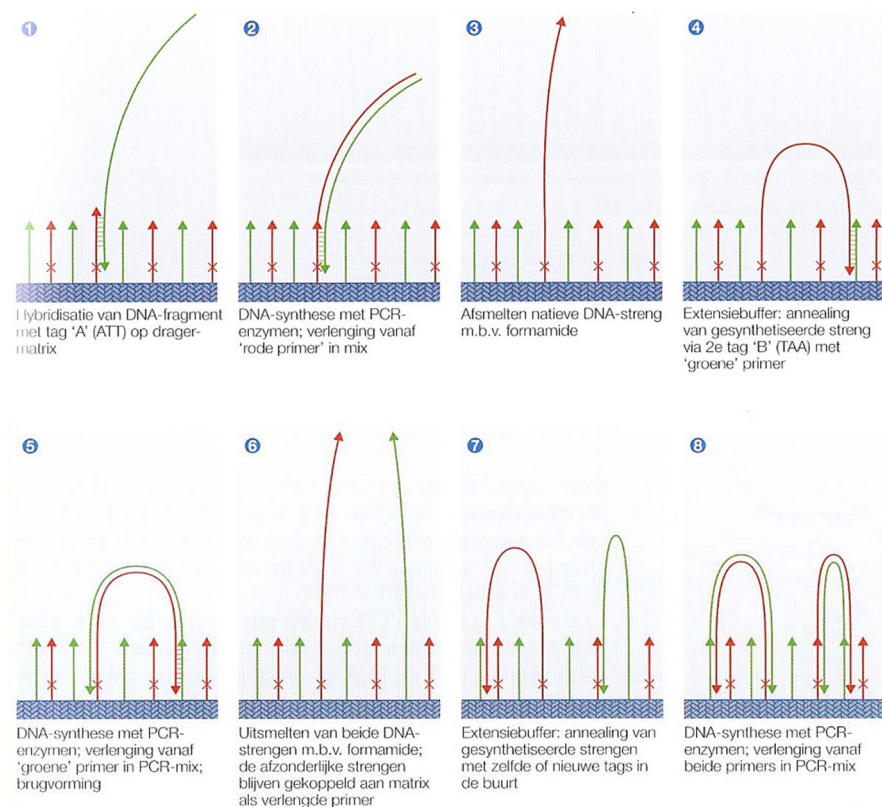
De kracht van NGS zit in het feit dat er ontzettend veel verschillende genen tegelijk kunnen worden geamplificeerd. Daarom noemt men NGS ook wel *massive parallel sequencing*. Het hele proces bestaat uit 4 grote fasen, die worden getoond op Figuur 12.



Figuur 12: Overzicht van de verschillende stappen in het NGS-proces (Lu, Shen, Warren, & Walter, 2016). Tijdens de eerste stap worden de stalen in fragmenten verdeeld en worden er adaptors aan deze fragmenten toegevoegd. Vervolgens worden de fragmenten gebonden aan de flowcell en worden ze verlengd in clusters (clusteramplificatie). De gevormde clusters worden nadien gesequeneerd door gebruik te maken van fluorescent gelabelde nucleotiden. Tegelijk worden er miljoenen fluorescente signalen over de hele flowcell gemeten. De laatste stap is het juist aligneren en analyseren van de bekomen data.

De staalvoorbereiding voor NGS vraagt momenteel nog veel manueel werk dat meerdere werkdagen bestrijkt. De uitvoerige beschrijving van al deze stappen zou ons te ver leiden en wordt niet verder behandeld. Het genomisch DNA wordt gefragmenteerd en hieraan worden de juiste adaptors gekoppeld. De fragmenten worden voorzien van een unieke “barcode” zodat men achteraf de juiste fragmenten bij de juiste patiënt kan zetten. Al deze geprepareerde fragmenten noemt men de “NGS library”.

Tijdens de tweede stap wordt de “library” op de flowcell gebracht en hybridiseren de fragmenten op de oppervlakte van de flowcell. Hierna gebeurt de zogenaamde *cluster amplification*. De fragmenten worden in clusters geamplificeerd met brugamplificatie (Figuur 13).

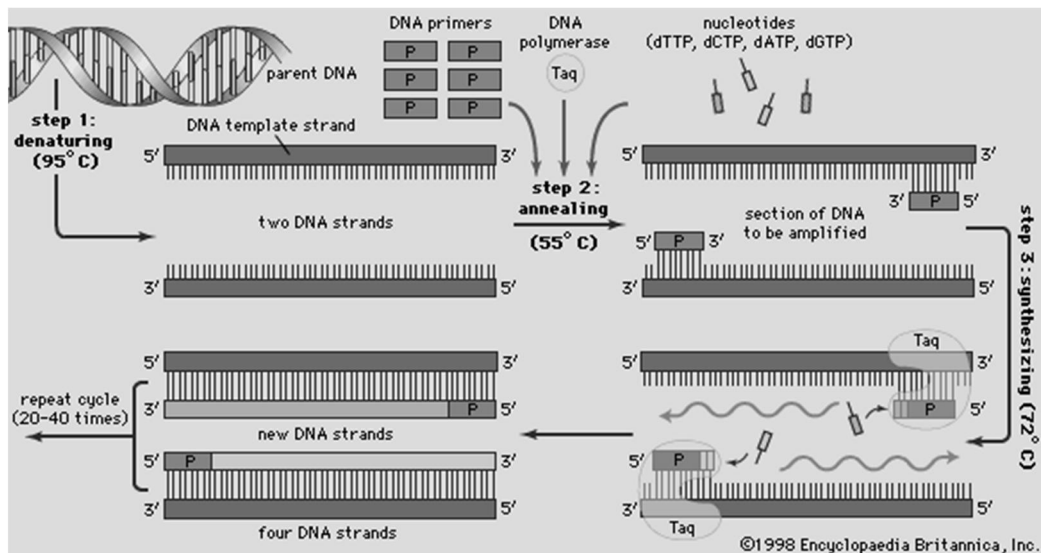


Figuur 13: Overzicht van de stappen tijdens de brugamplificatie om de clusters te vormen. Het fragment bindt via een "tag" op het oppervlak van de flowcell. Het fragment wordt verlengd en vervolgens wordt de oorspronkelijke DNA-streng verwijderd. De gevormde streng bindt via een andere "tag" aan een andere primer op de flowcell en het proces herhaalt zich (Braem, Next Generation Sequencing, 2016).

Bij de volgende stap worden de bekomen clusters gesequeneerd door het meten van ontelbare fluorescente signalen. Tot slot worden alle clusters vergeleken en juist gealigneerd. De data-analyse toont dan waar de sequenties afwijken ten opzichte van de referentiesequentie.

2.3 PCR en enzymatische opzuivering

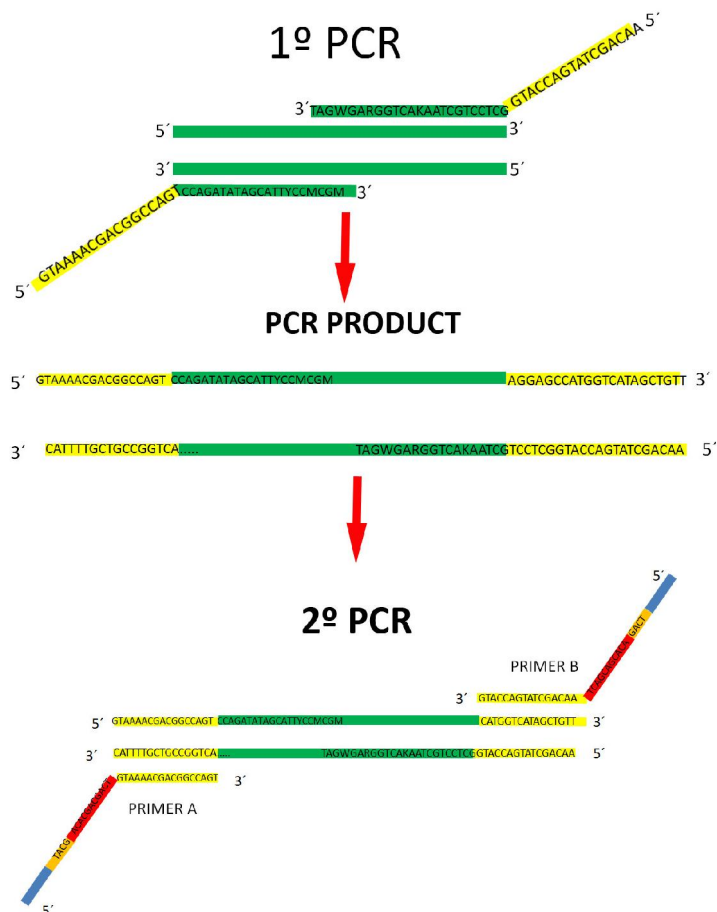
Zowel bij het bevestigen van varianten als bij de *COL6A1*-screening was PCR de eerste stap in het proces. Een PCR of *Polymerase Chain Reaction* begint met een kleine hoeveelheid DNA en vermenigvuldigt specifieke DNA-fragmenten op een exponentiële manier. Na ongeveer 35 cycli stopt de reactie en is er meer dan voldoende DNA aanwezig voor het vervolg van de analyses. Elke PCR-cyclus bestaat uit 3 stappen: denaturatie, annealing en elongatie. In theorie verdubbelt het aantal kopieën bij elke cyclus, waardoor er maximaal 2^{35} kopieën in het mengsel zitten na de reactie. Essentiële factoren in dit proces zijn uiteraard het startmateriaal, de primers, de enzymen en de bouwstenen voor de vermenigvuldiging van het gewenste fragment. Figuur 14 toont schematisch de verschillende stappen in het PCR-proces.



Figuur 14: Schematisch overzicht van de stappen in 1 PCR-cyclus (Fester, 2005). Het dubbelstrengig DNA wordt eerst gesmolten tot 2 enkele strengen, waarop in een volgende stap de primers kunnen binden ("annealing"). Vervolgens verlengt een polymerase-enzym de primers door nucleotiden aan te hechten aan het 3' uiteinde van de primers. Het resultaat zijn 2 paar dubbelstrengige DNA-fragmenten. Door deze cyclus 30 à 40 keer te herhalen bekomt men een exponentiële hoeveelheid DNA.

Bij de **denaturatie** wordt de temperatuur verhoogd tot 95°C om het oorspronkelijk dubbelstrengig DNA te smelten tot 2 enkele strengen. Op deze temperatuur zijn de polymerase-enzymen niet werkzaam. Na deze stap daalt de temperatuur tot ongeveer 55 à 60°C. Hierbij binden de primers complementair aan de enkele streng (**annealing**), en bakenen op die manier het fragment af dat geamplificeerd moet worden. Vervolgens stijgt de temperatuur tot 72°C voor de **elongatie**: de optimale temperatuur voor het Taq-polymerase. Dit enzym verlengt de primer met de juiste nucleotiden, zodat de oorspronkelijke enkele streng plaatselijk opnieuw een dubbele streng wordt. Wanneer de temperatuur opnieuw stijgt tot 95°C, zullen deze strengen opnieuw van elkaar gescheiden worden, waardoor er 4 enkelvoudige strengen in de oplossing zijn (2 strengen van het oorspronkelijke dubbelstrengig DNA en 2 nieuw aangemaakte strengen).

Het CMGG werkt volgens de Ford-filosofie om efficiënt, dit wil zeggen zuinig met producten en kostenbesparend, te werken. In dit kader worden er steeds dezelfde M13-sequentie (Forward: tgtaaacgacggccagt en Reverse: caggaacagctatgacc) aan de primers gehangen (Figuur 15). De reden hiervan wordt toegelicht bij de bespreking van de Sanger methode.



Figuur 15: Principe van universele primers (Seq Answers forum, 20). Aan de eerste primer hangt een universele sequentie (gele sequentie op de figuur). Eén van de mogelijke universele sequenties is de M13-sequentie (niet afgebeeld op de figuur). In een tweede reactie (vb. Sanger) kan men dan universele primers (primer B op de figuur) gebruiken die binden op de universele sequentie van de eerste primer.

De PCR-reacties werden volgens onderstaand protocol uitgevoerd (De Leener, 2016). De strikte scheiding tussen pre-PCR en post-PCR handelingen moet steeds gerespecteerd worden om contaminatie te vermijden. In het pre-PCR labo worden de DNA stalen verdund tot een concentratie van 20 ng/ μ L en worden de reactiemengsel bereid voorafgaand aan de PCR-reactie.

- Verdunningen DNA-oplossingen:
 - Gebruik het sjabloon werkblad om eenvoudig de te pipetteren volumes DNA en water uit te rekenen. De verdunning gebeurt tot 20 ng/ μ L.
 - Bepaal vooraf het aantal assays, zodat de hoeveelheid DNA-verdunning hierop kan afgestemd worden.
- Werkoplossingen primers:
 - Bevoegde personen maken 2 μ M-verdunningen van de benodigde primers vanuit een stockoplossing van 100 μ M in Tris-EDTA buffer.

- Reactiemengsel voor PCR:
 - Gebruik voor elke reactie 5 μL Kapa2G Robust Hot Start Ready Mix (Kapa Biosystems, lotnummer KM5702), 2,5 μL DNA-verdunning en 2,5 μL primerverdunning.
 - Maak afhankelijk van de analyse een geschikte mastermix. Bereken hiervoor het aantal assays per patiënt of het aantal patiënten per gen.
 - Pipetteer de benodigde hoeveelheid Kapa Ready Mix in een epje en voeg de vereiste hoeveelheid primerverdunning OF DNA-verdunning toe in functie van de analyse.
 - Vortex en centrifugeer deze mastermix. Voeg 7,5 μL mastermix per welletje toe.
 - Voeg 2,5 μL DNA-verdunning OF primerverdunning toe, afhankelijk van de samenstelling van de mastermix.

Bij een PCR-reactie zijn niet enkel de temperaturen van belang, ook de tijdsduur van elke stap is nauw omljnd. Tabel 7 toont het gebruikte PCR-programma (De Leeneer, 2016).

Tabel 7: PCR-programma met gebruikte tijden en temperaturen.

| Stap | Tijd | Temperatuur |
|------------------------------|----------|-------------|
| 1. Activatie | 3 min | 95°C |
| 2. Denaturatie | 15 sec | 95°C |
| 3. Annealing | 10 sec | 60°C |
| 4. Elongatie | 15 sec | 72°C |
| 35 cycli stap 2 tot 4 | | |
| 5. Finaal | 1 min | 72°C |
| 6. Koeling | ∞ | 15°C |

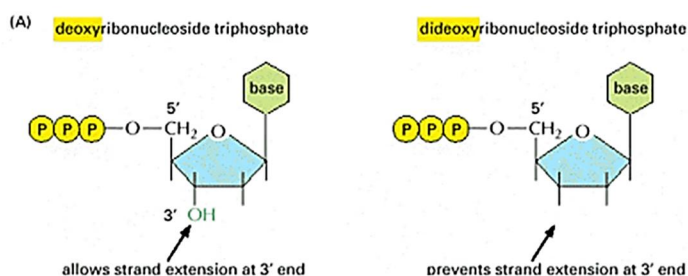
Na het PCR-programma worden de producten gecontroleerd om na te gaan of er wel degelijk amplificatie heeft plaatsgevonden. Deze controlestap kan bij de interpretatie van de resultaten belangrijk zijn om een eventueel probleem te situeren. Dit gebeurt op het Fragment Analyzer toestel, dat werkt volgens het principe van capillaire elektroforese. Voor de analyse op de Fragment Analyzer wordt er 2 μL van het PCR product samengevoegd met 22 μL 1XTE dilution buffer (Advanced Analytical, lotnummer 01DAYS01) in een 96-well plaat. De plaat wordt afgedekt bewaard in de koelkamer bij 5°C. Wanneer de plaat vol is, voegt een laborant de DNA-ladder (DNF 910 dsDNA) toe. Dit mengsel bevat DNA-fragmenten van een verschillende lengte, die als referentie gebruikt worden voor de te onderzoeken PCR-producten. Daarna zet een laborant de plaat op de Fragment Analyzer.

Na deze stap zijn er verschillende mogelijkheden. Bij de experimenten met de verdunde lymfocytenculturen stopte het praktisch werk hier. Wanneer er grote hoeveelheden gesequeneerd moeten worden, worden de producten per patiënt gepoold en ingezet op het MiSeq toestel voor NGS. Om, indien nodig, de juiste sequentie van een fragment te bepalen, moet er verdergegaan worden met een enzymatische opzuivering, gevolgd door de eigenlijke sequenering. De opzuivering gebeurt volgens onderstaand protocol (Vereecke, 2014):

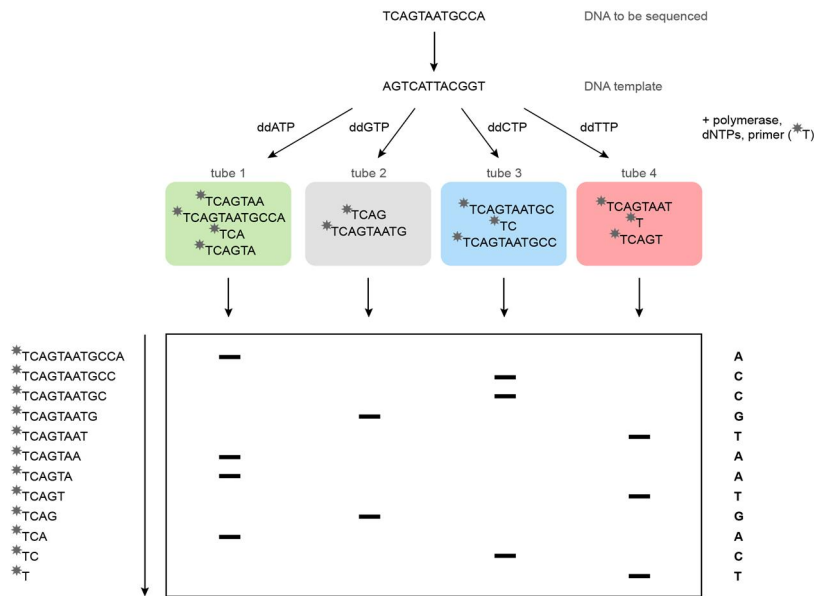
- Vul het aantal stalen in op het werkblad om het benodigde volume te berekenen.
- Neem de enzymen uit de diepvries (-20°C) en zet ze op ijs.
- Maak per reactie een mengsel van 0,05 µL Exonuclease I (20 000 U/mL), 0,2 µL Antarctic Phosphatase (5 000 U/mL) en 0,75 µL water. Wegens de kleine volumes is het noodzakelijk om minstens 1 µL Exonuclease te pipetteren en de andere volumes aan te passen. De overschot van de mix kan ingevroren worden.
- Pipetteer 1 µL van dit mengsel in een welletje en voeg hier 5 µL PCR-product aan toe. Pipetteer op en neer om te mengen.
- Incubeer gedurende 15 minuten bij 37°C en inactiveer vervolgens de enzymen door gedurende 20 minuten te verwarmen bij 80°C. Deze stappen zitten geprogrammeerd in de PCR-toestellen.

2.4 Sanger sequencing

De gezuiverde producten kunnen nu gesequeneerd worden met de Sanger methode. Deze techniek gebruikt naast de gewone nucleotiden (dNTP's) ook zogenaamde stopnucleotiden (ddNTP's). Bij de Sanger techniek hecht een primer aan het uiteinde van een PCR-product, waarna de primer verlengd wordt. Bij het verlengen bepaalt het toeval of er een dNTP dan wel een ddNTP wordt ingebouwd. Wanneer een ddNTP wordt ingebouwd, is er in een volgende stap geen verlenging meer mogelijk omdat het vrije 3' OH-uiteinde ontbreekt in een ddNTP (Figuur 16). De sequencing duurt ongeveer 25 cycli en gebeurt (in theorie) bij alle kopieën van het PCR-product. De 4 verschillende soorten ddNTP's zijn gelabeld met een ander fluorescent molecule. Na de cycli zitten er in het mengsel fragmenten van verschillende lengte, met op het einde een ddNTP (Vereecke, 2014) (Figuur 17).



Figuur 16: Structuur van de dNTP's en de ddNTP's. Door de ontbrekende OH-groep kan er geen volgend nucleotide worden ingebouwd aan een ddNTP (Vereecke, 2014).



Figuur 17: Overzicht van het originele Sanger-principe (ATD Bio, sd). Hierbij werden er 4 verschillende buisjes gebruikt met daarin alle dNTP's en slechts 1 soort ddNTP (vb. ddATP). In elke buis zat een mengsel van fragmenten die allemaal eindigden op het overeenkomstige ddNTP (vb. ddATP). Deze fragmenten hadden een verschillende lengte. Alle buizen werden gescheiden via gelektroforese, waardoor men de nucleotidensequentie kon aflezen.

De primers in de Sanger reactie zijn gericht tegen de M13-sequenties van de primers uit de PCR-reactie. Op die manier moeten er enkel unieke primers ontworpen worden voor de PCR-reacties, en kan men hetzelfde primerkoppel gebruiken voor de Sanger sequencering, ongeacht het gen dat men wenst te sequencen. Tabel 8 toont de samenstelling van de reactiemix voor 1 reactie. Tabel 9 geeft het gebruikte programma op de PCR-toestellen (Vereecke, 2014).

Tabel 8: Samenstelling reactiemix voor 1 reactie.

| Volume | Product |
|--------|--------------------------|
| 4 µL | Water |
| 2 µL | ABI-buffer |
| 2 µL | Primer (1 µM verdunning) |
| 0,5 µL | DMSO |
| 0,5 µL | RR-mix |
| 1 µL | Gezuiverd PCR-product |

Tabel 9: Sequenceringsprogramma op de gebruikte PCR-toestellen.

| Tijd | Temperatuur |
|------------------------------|-------------|
| 5 min | 95°C |
| 10 sec | 95° |
| 5 sec | 55°C |
| 4 min | 60°C |
| 25 cycli stap 2 tot 4 | |
| ∞ | 15 °C |

2.5 Opzuivering met magnetische beads

Na Sanger sequenceren volgt een finale zuivering met magnetische beads alvorens het product kan afgegeven worden om gemeten te worden. Bij deze meting wordt het fluorescent signaal van de ddNTP's gemeten, die op het einde van elk fragment zitten. Daarom moeten de ongebruikte ddNTP's uiteraard uit de oplossing verwijderd worden om te vermijden dat hun fluorescent signaal interfereert bij de meting. De magnetische beads halen het DNA uit de oplossing en daarna worden de ongebruikte nucleotiden uit de oplossing verwijderd met verschillende wasstappen. Als wasvloeistof wordt 85% zuiver ethanol gebruikt. Nadien worden de beads opnieuw opgelost in water, waardoor het gewenste DNA terug in de oplossing komt. Uit deze oplossing wordt 30 µL gepipetteerd voor analyse op het ABI 3130XL of ABI 3730XL toestel. Tabel 10 geeft stapsgewijs de procedure weer (Vereecke, 2014).

Tabel 10: Procedure opzuivering met magnetische beads.

| Stap | Volume | Product | Handeling |
|------|--|------------------------|--|
| 1 | 10 µL | Clean DTR beads | Toevoegen aan elke sequentiereactie |
| 2 | 45 µL | 85% Ethanol | Toevoegen en op en neer pipetteren |
| 3 | Zet de plaat 3 minuten op de magneet | | |
| 4 | Verwijder na incubatie het supernatans zonder beads mee te nemen | | |
| 5 | 100 µL | 85% Ethanol | Toevoegen + 30 sec incuberen op magneet |
| 6 | Verwijder na incubatie het supernatans zonder beads mee te nemen | | |
| 7 | Herhaal stap 5 en 6 en laat nadien minstens 10 minuten drogen aan de lucht | | |
| 8 | 40 µL | Water | Toevoegen voor analyse en beads resuspenderen |
| 9 | Plaats de homogene suspensie op de magneet gedurende 30 seconden. | | |
| 10 | 30 µL | Vloeistof zonder beads | Overbrengen naar speciale ABI-plaat voor sequencen |

2.6 COL6A1 screening

De 147 DNA-stalen waarop de COL6A1 screening werd uitgevoerd, dateerden van 2004 tot 2017 en bevonden zich op verschillende plaatsen in de archieven. De meest recente stalen konden automatisch opgeroepen worden met het ADSA-archiveringssysteem (Automated DNA Storage Application). De stalen tussen 2006 en 2014 waren in het andere systeem opgeslagen en moesten manueel uit de rekken gehaald worden. Bij het opzoeken van de stalen in de archiefsystemen konden 36 stalen niet gevonden worden en bleek het staal van patiënt P108 leeg te zijn, waardoor er slechts met 110 stalen werd verder gewerkt.

De teruggevonden stalen werden, gespreid over verschillende weken, geanalyseerd volgens de gebruikelijke Ford-workflow beschreven in 2.1. Gebruikmakend van de werkbladen werd berekend

hoe de stalen verdund moesten worden tot een eindconcentratie van 20 ng/ μ L. Hiervoor werd er aan een vast volume van 50 μ L water een bepaald volume van het staal toegevoegd, zoals opgelijst in bijlage 2. Tijdens de uitvoering werden 6 patiënten per vergissing twee keer gescreend, maar dit werd pas ontdekt na het inzetten van de MiSeq run. In de tabel in bijlage 2 zijn deze patiënten en het lege staal van P108 weggelaten, waardoor de nummering verspringt van P101 naar P109. Zoals weergegeven in de tabel in bijlage 2 konden bijna alle gebruikte stalen op de berekende manier verdund worden. De stalen waarvoor er onvoldoende materiaal aanwezig was, werden verdund met 10 μ L water. Indien er slechts een minuscule hoeveelheid in het staal overbleef, werd deze druppel onverdund gebruikt omdat toevoegen van 10 μ L water het aanwezige DNA te sterk zou verdunnen.

De PCR-reacties werden ingezet volgens het protocol dat beschreven wordt in 2.3. De primers werden besteld bij Integrated DNA Technologies (Forward primer: 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT ACA GCA CTA ACA AGC CTT CC-3'; Reverse primer: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCA CCT TGT AGC CCT TGG G-3') In het kader van de Ford-workflow werd ook aan dit primerkoppel de M13-sequentie toegevoegd. Hierdoor worden de primers zogenaamde universele primers. Deze M13-sequentie heeft geen invloed op de bindingsplaats van de primer.

Na de PCR werden er steekproefsgewijs enkele stalen getest op de Fragment Analyzer om te controleren of de amplificatie geslaagd was. Vervolgens werden de stalen gepoold voor afgifte aan de MiSeq sequencer. Dit toestel werkt volgens het principe van capillaire elektroforese.

De PCR-producten worden verzameld in gen-patiëntspecifieke pools zoals beschreven in de procedure. In dit geval was er telkens maar 1 assay per patiënt en moesten de PCR-producten verdund worden met water tot het vereiste minimumvolume. Na analyse op Fragment Analyzer werd hiervoor aan het resterende PCR-product 10 μ L water toegevoegd. De verdunde producten werden daarna afgegeven voor analyse op het MiSeq toestel. Na ongeveer 10 dagen waren de Excel rapporten beschikbaar en kon beoordeeld worden welke stalen bevestigd moesten worden met de Sanger sequenceringsmethode. Enkel de stalen met de gezochte variant of met een te lage *coverage* van het onderzochte intron werden weerhouden voor bevestiging met Sanger. De werkwijze voor de Sangerbevestiging staat beschreven in 2.4 en 2.5.

3 Resultaten

3.1 LGMD en exoomanalyse

Tijdens het praktisch werk werden alle stappen uitgevoerd voor verschillende varianten: het opzoeken van mogelijke varianten, varianten bevestigen met de Sanger techniek en varianten classificeren in de Ford-module.

Bij het opzoeken van varianten werden verschillende filters gebruikt in het programma SeqPloer. Zoals eerder vermeld, wordt er in eerste instantie gefilterd op de frequentie van de variant: varianten met een frequentie van meer dan 2% zijn hoogstwaarschijnlijk niet in verband te brengen met de zeldzamere LGMD-ziektes. Daarna worden de overgebleven varianten onderzocht op de kans dat ze ziekteverwekkend zijn. Dit gebeurt met ondersteuning van diverse predictieprogramma's en populatiedatabanken. De (recessieve) nonsense of frameshift mutaties zijn zeer grote kanshebbers om een ziekte te veroorzaken. Bij de analyse van één van de niet-opgehelderde patiënten werd in zijn *BVES*-gen bovendien een zeer zeldzame mutatie ontdekt die nog niet eerder werd beschreven in de literatuur. Zoals besproken in 1.1.6 is dit gen verantwoordelijk voor het ernstige LGMD2X-subtype. Aangezien dit een subtype met recessieve overerving is, zijn enkel de homozygote personen effectief ziek. Bij de man werd een homozygote mutatie gevonden in het eerste nucleotide van het startcodon in dit gen (c.1A>G ; p.Met1Valex). Er werden meteen primers ontworpen en na 2 pogingen werd deze mutatie succesvol bevestigd met Sanger en gerapporteerd aan de aanvragende neuroloog. Tabel 11 geeft een overzicht van de varianten uit klasse 4 en 5 die gevonden werden na de heranalyse van het exoom met het uitgebreide genpanel. Tabel 12 toont enkel de varianten van klasse 3. Mogelijk kunnen deze varianten nog overgaan naar klasse 4 (of klasse 2) indien er meer gegevens, zoals stalen van familieleden, ter beschikking komen.

Tabel 11: Overzicht varianten van klasse 4 (likely pathogenic) en klasse 5 (pathogenic) die gevonden werden na de heranalyse van de exoomdata met het uitgebreide genpanel. (AR = Autosomaal Recessief, AD = Autosomaal Dominant)

| Gen | c.notatie | p.notatie | Homo/heterozyg. | Overerving | Klasse | Aantal patiënten |
|--------------|----------------------|--------------------|-----------------|------------|--------|------------------|
| ACTA1 | c.808G>T | p.Gly270Cys | ? | AR/AD | 5 | 1 |
| ANOS | c.191dupA | p.Asn64fs | Homozygoot | AR | 5 | 2 |
| ANOS | c.1213C>T | p.Gln405Ter | Heterozygoot | AR | 5 | 1 |
| BVES | c.1A>G | p.Met1Valex | Homozygoot | AR | 4 | 1 |
| CAPN3 | c.2105C>T | p.Ala702Val | Heterozygoot | AR | 4 | 1 |
| CAPN3 | c.883_886delinsCTT | p.(Asp295Leufs*57) | Heterozygoot | AR | 5 | 1 |
| CAPN3 | c.1355-1G>C | p.? | Heterozygoot | AR | 5 | 1 |
| DYSF | c.3770G>A | p.Trp1257* | Heterozygoot | AR | 4 | 1 |
| SGCA | c.229C>T | p.Arg77Cys | Heterozygoot | AR | 4 | 1 |
| TTN | c.84370_84373delGAGT | p.Glu28124fs | Heterozygoot | AR/AD | 4 | 1 |

Tabel 12: Overzicht van de varianten van klasse 3. (AR = Autosomaal Recessief, XLD = X-linked Dominant)

| Gen | c.notatie | p.notatie | Homo/heterozyg. | Overerving | Aantal patiënten |
|--------------|-----------|-------------|-----------------|------------|------------------|
| ALG13 | c.2578C>G | p.Pro860Ala | Heterozygoot | XLD | 2 |
| ANOS | c.2698A>C | p.Met900Leu | Heterozygoot | AR | 1 |
| ANOS | c.2141C>G | p.Thr714Ser | Heterozygoot | AR | 1 |
| CAPN3 | c.2257G>A | p.Asp753Asn | Heterozygoot | AR | 2 |
| CAPN3 | c.2323A>G | p.Met775Val | Heterozygoot | AR | 1 |
| DYSF | c.1530C>G | p.Asp496Glu | Heterozygoot | AR | 1 |

| | | | | | |
|-------------|-------------------------|----------------|--------------|----|---|
| DYSF | c.5015C>T | p.(Ser1672Phe) | Heterozygoot | AR | 1 |
| DYSF | c.757C>T | p.(Arg253Trp) | Heterozygoot | AR | 3 |
| DYSF | c.3702+9G>T | p.? | Heterozygoot | AR | 1 |
| DYSF | c.5194G>C | p.Glu1732Gln | Heterozygoot | AR | 1 |
| DYSF | c.910G>A | p.Asp304Asn | Heterozygoot | AR | 1 |
| DYSF | c.2902A>T | p.Met968Leu | Heterozygoot | AR | 1 |
| TTN | c.30811+5_30811+7delGCC | / | Heterozygoot | AR | 1 |

Verder werden in het verleden vier patiëntenstalen naar het voormelde labo in Napels gestuurd voor een exoomanalyse met hun genpanel. Na uitvoering van de analyse ontving het CMGG een rapport met de gevonden varianten en kon er begonnen worden met de bevestiging van deze varianten met de Sanger methode. Voor sommige varianten waren hiervoor meerdere pogingen nodig. Enerzijds omdat er niet meteen een bruikbare sequentie werd gevonden, maar ook omdat het Italiaanse labo foute gegevens had doorgegeven, waardoor het foute exon werd onderzocht.

Tabel 13 toont de varianten die door het Italiaanse labo gerapporteerd werden en de resultaten van de Sanger bevestiging uitgevoerd in het CMGG. Het is duidelijk dat slechts een minderheid van de varianten die oorspronkelijk gerapporteerd werden, wel degelijk bevestigd kon worden via de Sanger methode. In bijlage 3 staan de rapporten na de variantclassificatie van de positieve varianten.

Tabel 13: Overzicht van de resultaten vanuit het labo in Napels en de resultaten na bevestiging in het CMGG.

| Patiënt | Gen | G notatie | C notatie | P notatie | Bevestigd |
|-----------|----------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| P1 | HSPG2 | 1_22182115_22182115 | c.5755C>T | p.Arg1919Cys | Positief |
| | HSPG2 | 1_22200457_22200458 | c.3706_3707_ins | p.D1236fs | Vals-positief |
| | PGM1 | 1_64089432_64089432 | c.300+1G>A | | Positief |
| | NEB | 2_152541383_152541383 | c.2743_2744ins | p.V915delinsAGAVSV | Vals-positief |
| | TTN | 2_179456099_179456100 | c.60352_60353insT | p.E11053fs | Vals-positief |
| | GBE1 | 3_81698005_81698005 | c.691+2T>C | | Positief |
| | ETFDH | 4_159611537_159611538 | C.461_462ins | p.A154delinsAX | Vals-positief |
| | FLNC | 7_128496694_128496695 | c.7275_7276ins | p.E2425delinsETAPAT | Vals-positief |
| | POLG | 15_89860605_89860605 | c.3643+2T>C | | Positief |
| | POLG | 15_89872172_89872172 | c.1023+2T>G | | Vals-positief |
| P2 | MYOT | 5_137219281_137219281 | c.1024+1G>T | | Vals-positief |
| P3 | DES | 2_220283381_220283381 | c.197T>G | p.L66R | Vals-positief |
| | COL12A1 | 6_75833070_75833070 | c.6922C>G | p.Pro2308Ala | Positief |
| | COL12A1 | 6_75851837_75851837 | c.1375_1376ins | p.D459delinsVSLVRSH | Vals-positief |
| | GAA | 17_78086829_78086829 | c.2040+3A>C | | Vals-positief |
| | GAA | 17_78086833_78086833 | c.2040+7T>G | | Vals-positief |
| P4 | TTN | 2_179404402_179404402 | c.98390A>G | p.Asn32797Ser | Positief |
| | TTN | 2_179433075_179433076 | c.77783_77784_ins | p.V25928delinsVSLVRSH | Vals-positief |
| | POMT1 | 9_134384293_134384293 | c.266-5A>G | | Vals-positief |

Voor andere stalen die geanalyseerd werden in het CMGG bleek de coverage te laag te zijn na NGS. Deze stalen belandden op de zogenaamde "To Fill" lijst om de ontbrekende exonen opnieuw te

sequencen met de Sanger methode. Dit stelde geen problemen en leverde enkel varianten uit klasse 1 op. Voor een laatste groep stalen werden er varianten gevonden na NGS en deze varianten moesten nog bevestigd worden met Sanger. Al deze varianten konden effectief bevestigd worden en werden nadien ingedeeld in het 5-klassensysteem.

3.2 COL6A1 screening

Er werden in totaal 110 patiënten onderzocht op de aanwezigheid van de intronische mutatie tussen exon 11 en 12 in hun *COL6A1*-gen. Patiënten P1 tot en met P30 werden geanalyseerd met MiSeq run 171 van 17/02/2017. De resultaten werden op 28/02/2017 beoordeeld en hieruit bleek dat er één patiënt (P30) een variant had op één nucleotide naast de beschreven mutatie (c.930+188G>A). Omdat ook de coverage van dit intron lager was dan 31 reads, werd dit staal bevestigd met Sanger. Voor patiënten P29 en P30 rapporteerde MiSeq een variant in het eerste exon, hoewel dit normaal gezien niet mee gecovert werd. Deze varianten werden buiten beschouwing gelaten omdat deze exonen niet gecovert moesten worden tijdens deze screening.

In run 172 werden P31 tot en met P60 geanalyseerd. P52 kon niet getest worden omdat er in eerste instantie een fout DNA-nummer op de lijst stond. Het DNA-nummer werd gecorrigeerd door de stagebegeleider, waarna het juiste staal probleemloos kon meegenomen worden bij de volgende analyse. Uit run 172 werd één patiënt weerhouden (P50) omdat het rapport een coverage van 0 gaf. Mogelijk werd er onvoldoende DNA meegenomen omdat er nog maar heel weinig materiaal in het buisje aanwezig was. Bij de overige patiënten uit deze run werden er geen varianten gevonden en was de coverage bovendien voldoende hoog zodat deze resultaten als betrouwbaar mochten beschouwd worden.

Run 173 bevatte 31 patiënten (P61 tot en met P90 + het juiste staal voor P52). Ook hier werden geen varianten gevonden, maar wel bleken 4 stalen (P63, P66, P68 en P81) een te lage coverage te hebben. Deze stalen werden dan ook apart gehouden om te bevestigen met Sanger.

Tot slot werden de laatste 20 patiënten geanalyseerd in run 175. Bij deze run werden, zoals reeds vermeld onder punt 2.3, per ongeluk ook 6 stalen (P85 tot en met P90), die reeds meegenomen waren in run 173, een tweede keer geanalyseerd. Omdat er geen discrepantie was tussen de rapporten van run 173 en run 175 werden deze stalen niet bevestigd met Sanger. Geen enkele patiënt in deze run bleek de mutatie te hebben en alle stalen werden voldoende goed gecovert. Uit deze run werd dan ook geen enkel staal bevestigd met Sanger.

De 6 weerhouden stalen werden bevestigd met de Sanger methode. Omdat alle stalen bevestigd werden omwille van een te lage coverage, was er geen aanleiding om te veronderstellen dat deze patiënten de mutatie zouden dragen. Bij 3 van de 6 patiënten (P30, P68 en P81) volstond 1

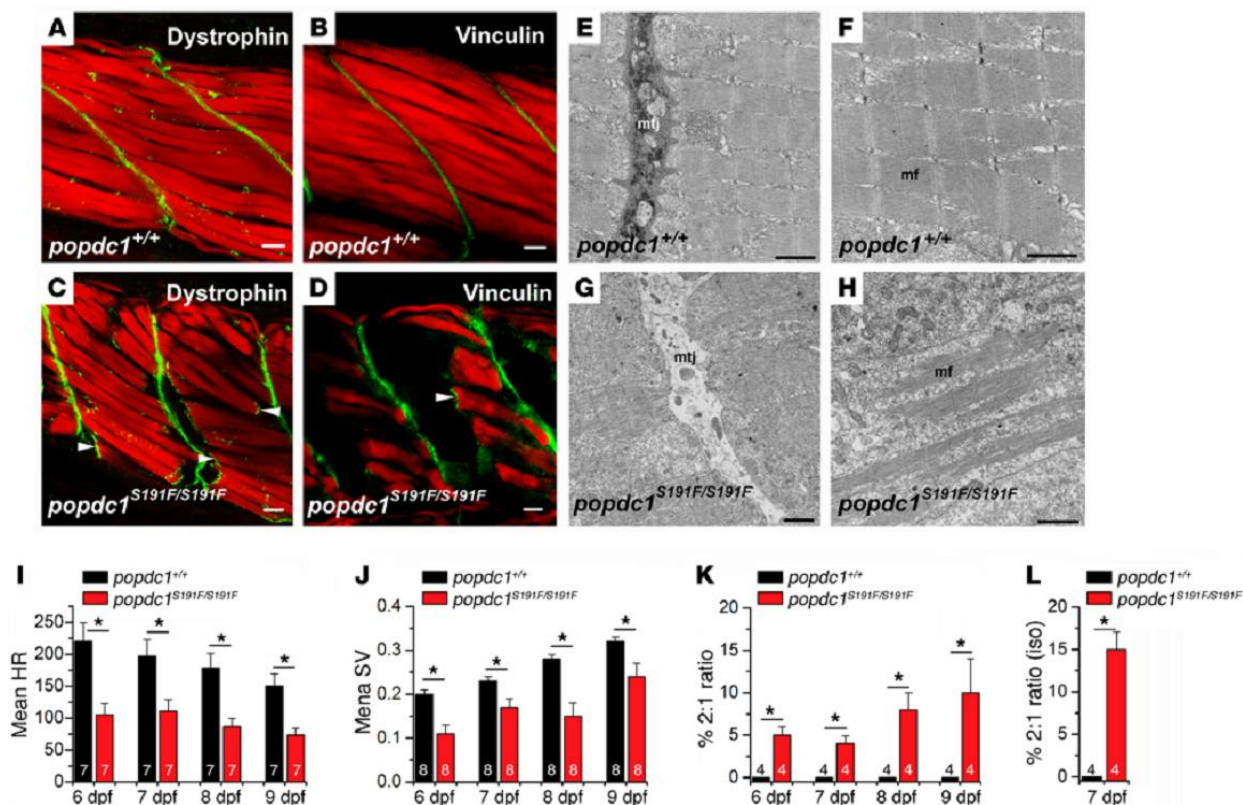
Sangerbevestiging om vast te stellen dat de mutatie c.930+189 C>T niet aanwezig was. De overige 3 patiënten hadden een mislukte sequentie en daarvoor werd opnieuw een Sangerbevestiging uitgevoerd. De tweede bevestiging toonde dat P63 en P66 de mutatie op c.930+189 niet hadden. Voor P50 was de sequentie opnieuw mislukt. Dit is wellicht te wijten aan het feit dat er bijna geen staal meer kon worden meegenomen, of dat er een ander probleem met het DNA staal is. Bij 1 van de patiënten (P30) rapporteerde MiSeq een variant (c.930+188G>A) 1 nucleotide vóór de onderzochte variant. Bij deze bevestiging werd dus wel een variant verwacht, maar ook de variant c.930+188G>A kon niet bevestigd worden met Sanger.

4 Bespreking

4.1 LGMD en exoomanalyse

Onlangs werden er 110 genen toegevoegd aan het bestaande LGMD-panel. Bij de heranalyse van onopgeloste patiënten kwamen een aantal mogelijke causale varianten aan het licht, voornamelijk in het *ANO5*- en het *CAPN3*-gen. Verder zijn er nog talrijke varianten uit klasse 3 gevonden in het *DYSF*-gen. De belangrijkste ontdekking is zonder twijfel de homozygote mutatie in het startcodon van het *BVES*-gen, waardoor dit startcodon verloren gaat. Deze mutatie werd meteen bevestigd en aan de aanvragende arts als een mutatie uit klasse 4 (“likely pathogenic”) gerapporteerd.

Bij eerder onderzoek stelde men vast dat het *BVES*-gen een belangrijke regulerende functie heeft in hart- en spiercellen omdat het eiwitproduct een hoge affiniteit heeft voor cyclisch AMP. Op basis van spierbiopsies kan men al een eerste idee krijgen van de rol van dit gen, maar om de functie van een gen beter te achterhalen worden vaak diermodellen gebruikt. Men schakelt het gewenste gen gericht uit in zebrafissen of muizen om de effecten hiervan te bestuderen. Wanneer dezelfde mutatie in het *BVES*-gen van zebrafissen werd ingebouwd, zag men duidelijk dat de embryo's hart- en spierproblemen ontwikkelden die erg leken op de symptomen bij de Albanese patiënten uit het onderzoek (Figuur 18) (Schindler, et al., 2016).



Figuur 18: Resultaten van immunohistochemische kleuringen op wildtype-zebravissen (WT) en homozygoot gemuteerde zebravissen. A en B tonen de kleuringen voor dystrofine en vinculine (groen) in de WT-vissen, terwijl dezelfde eiwitten bij de gemuteerde vissen (C en D) duidelijk niet normaal zijn gekleurd. E en F zijn elektronenmicroscopische beelden van een skeletspier uit de WT-zebravissen. G en H tonen aan dat de gemuteerde vissen spierletsels vertonen. Tot slot geven de grafieken een indicatie van de hartfunctie: in I en J is te zien hoe de hartslag (I) en slagvolume (J) afwijkingen vertoont bij de gemuteerde vissen. K en L tonen dat er procentueel veel meer gevallen van 2:1 Atrioventriculaire blok zijn bij de gemuteerde vissen dan bij de wildtype zebravissen. Dit toont aan dat de missense mutatie invloed heeft op de spieren en het hartritme.

Bij de patiënt van het CMGG verwacht men dat het eiwitproduct van het *BVES*-gen volledig afwezig is, aangezien het startcodon verloren is gegaan en daardoor de translatie niet kan beginnen. De neuroloog bevestigde dat de opgespoorde mutatie in overeenstemming is met het klinisch fenotype van de patiënt. Bij eerdere onderzoeken werden er reeds spier- en huidbiopsies afgenomen bij deze man, maar op dat moment vond men nog geen oorzaak. Op deze weefsels worden nu gerichte immunohistochemische kleuringen uitgevoerd om zo het expressiepatroon van het *BVES* eiwit in beeld te brengen. Verwacht wordt dat het *BVES* eiwit niet zal kunnen aangekleurd worden bij de patiënt, wat zijn afwezigheid bewijst.

Tijdens de stageperiode werden verschillende varianten, die ontdekt waren met NGS, nadien bevestigd met Sanger. Dit waren veelal varianten uit klasse 1 ("benign") of klasse 3 ("uncertain significance"). Bij het bevestigen van varianten die in een extern labo werden gevonden, werd spijtig genoeg vastgesteld dat een groot deel van de door hen gerapporteerde varianten vals positief waren. Dit kan uiteraard zeer vervelende gevolgen hebben voor de patiënten. Zonder bevestiging zouden heel wat patiënten, louter op basis van deze externe resultaten, immers te horen kunnen krijgen dat men had kunnen achterhalen welke mutatie ze hadden. In sommige gevallen kon mogelijk, op basis van deze resultaten,

zelfs al gestart zijn met prenataal advies. In de toekomst zal het CMGG daarom alle resultaten van dit labo dan ook grondig bevestigen alvorens deze door te geven aan de patiënt.

Een *whole genome sequencing* (WGS) of *whole exome sequencing* (WES) wordt normaal enkel bij patiënten die suggestief zijn voor een bepaalde aandoening uitgevoerd. Op basis van klinische resultaten wordt er dan gericht gezocht naar mutaties in genen die verantwoordelijk zijn voor dat specifieke fenotype van de patiënt. Alle resultaten die rechtstreeks gelinkt zijn aan het fenotype noemt men in het Engels *primary findings*. Deze term zet de poort open naar een tweede begrip, namelijk *secondary findings*: dit zijn varianten die geen rol spelen in de ziekte waarvoor de patiënt initieel onderzocht werd, maar die wel van medisch belang zijn bij andere aandoeningen, zoals sommige kankertypes. De genetische labo's zijn verplicht om deze varianten ook te rapporteren.

Daarnaast bestaan er ook de zogenaamde *incidental findings*. Wanneer alle data bekeken worden, kan men soms "per ongeluk" een pathogene mutatie vinden in een gekend ziektegen met ernstige gevolgen. Zowel voor de *secondary findings* als voor de *incidental findings* zijn er richtlijnen en lijsten met genen opgesteld door het American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG).

Het al dan niet rapporteren van zulke onverwachte resultaten brengt onvermijdelijk een ethische discussie op gang. De patiënt gaat er immers vanuit dat hij, in het "beste" geval, enkel een genetische diagnose krijgt voor de aandoening waarvoor hij gescreeend werd. In principe heeft hij ook enkel toestemming gegeven voor die specifieke screening. Toch kan het gebeuren dat hij uit het niets te horen krijgt dat hij nog meer ziekteverwekkende mutaties draagt. Het is maar de vraag of de patiënt dit had willen weten. In de rapporten van het ACMG wordt vermeld dat men deze bedenking heeft gemaakt, maar dat men het "*right not to know*" niet vindt opwegen tegen de "*fiduciary duty*" van het labopersoneel en betrokken artsen. Het gaat immers om een select aantal ernstige erfelijke aandoeningen, die evenzeer gevolgen hebben voor het nageslacht van de patiënt in kwestie. Voorts raadt men aan dat de arts, die de oorspronkelijke screening heeft aangevraagd, de mogelijke gevolgen van de *incidental* of *secondary findings* uitlegt aan de patiënt (Green, et al., 2013).

4.2 COL6A1 screening

In een artikel waarin de impact van transcriptoomanalyse werd geïllustreerd, bespraken Cummings et al. een intronische mutatie tussen exon 11 en exon 12 van het *COL6A1*-gen. Deze mutatie geeft aanleiding tot de vorming van een pseudo-exon van 72 basenparen, waardoor het eiwitproduct 24 aminozuren extra bevat. Hierdoor verliest het collageen type VI eiwit de typische triple helixstructuur, met ernstige implicaties voor de functionaliteit. De onderzoekers maakten op basis van hun bevindingen een schatting van de incidentie van deze mutatie en concludeerden dat tot een kwart van de onopgeloste cases, suggestief voor collageen type VI-gerelateerde ziektes, verklaard zou kunnen worden door dit fenomeen.

Om bovenstaande bevindingen te toetsen, werd een soortgelijke groep patiënten geselecteerd waarvoor een eerdere exoomanalyse van de *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* en *COL12A1*-genen geen causale mutatie aan de oppervlakte bracht. Bij deze analyse werd het intron tussen exon 11 en 12 slechts gecoverd tot 20 basenparen ná exon 11 en 20 basenparen vóór exon 12, terwijl de besproken mutatie gelegen is op c.930+189.

Van de 110 geteste patiënten werden 6 patiëntenstalen verder onderzocht met de Sanger techniek omwille van een te lage coverage na MiSeq analyse. De 104 stalen met voldoende hoge coverage waren allemaal negatief voor de variant uit het artikel. Ook bij de bevestigde stalen was de variant c.930+189 C>T niet aanwezig. Er was één patiënt bij wie de bevestiging na 2 pogingen nog niet gelukt was, omdat er te weinig staal beschikbaar was. De overige stalen die bevestigd werden, hadden wel een bruikbare sequentie die aantoonde dat de persoon de variant niet droeg. Na analyse van de 110 patiënten bleek dus geen enkele patiënt drager van deze variant te zijn, terwijl we, op basis van de schatting in voormeld artikel, konden verwachten dat er rond de 28 patiënten positief zouden zijn.

5 Besluit

Bij de heranalyse van de onopgeloste patiënten werden enkele interessante varianten ontdekt, met als uitschieter een mutatie die nog niet beschreven werd in de literatuur. Momenteel onderzoeken de collega's in het UZ Gent, in het kader van een mogelijke publicatie, volop de effecten van deze mutatie op de eiwitfunctie en de gevolgen voor de spier- en hartspiercellen van de patiënt. Op basis van de genetische diagnose van LGMD2X zal de man verder opgevolgd worden door een multidisciplinair team van specialisten. Uit het artikel van Schindler et al. bleek dat patiënten met LGMD2X grote kans op hartritmestoornissen hebben, waarbij er meestal een pacemaker moet ingeplant worden. Afhankelijk van de familiale situatie van de patiënt in kwestie is ook het opvolgen van de naaste familieleden ten zeerste aangewezen en kunnen deze personen eveneens in aanmerking komen voor prenatale diagnostiek.

Uit de rapporten van een buitenlands labo werden heel wat varianten bevestigd, maar blijkbaar waren het leeuwendeel van deze varianten vals-positief. Indien deze vergissingen niet tijdig worden opgemerkt, bestaat het risico dat het labo deze fouten doorgeeft aan de patiënt. Het hoeft geen betoog dat zulke situaties nadelig zijn voor alle betrokken partijen, maar in de eerste plaats uiteraard voor de patiënten zelf. Voor hen zou dit een zoveelste tegenslag kunnen zijn bij hun zoektocht naar een definitieve diagnose. Ook voor de betrokken labo's is het hoge aantal vals-positieve resultaten een onprettige vaststelling. Door goede afspraken tussen beide labo's kan men deze situaties in de toekomst hopelijk vermijden. Het spreekt voor zich dat het CMGG vanaf nu alle resultaten van externe labo's zal dubbelchecken alvorens deze aan de patiënten door te geven. Verder lijkt het niet

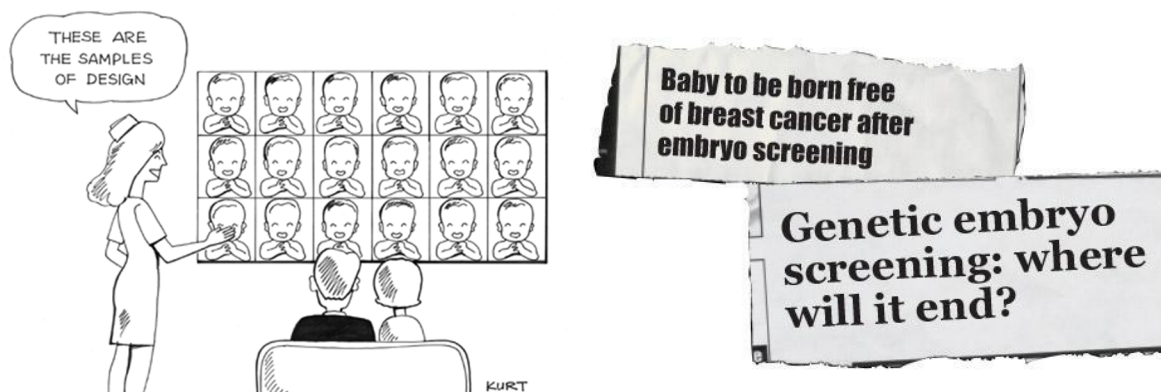
onverstandig om het Italiaanse labo op de hoogte te brengen van de talrijke vals-positieve resultaten. Zo kunnen zij de nodige stappen ondernemen om ook hun eigen patiënten meer accurate resultaten te kunnen garanderen.

Voor de *COL6A1*-screening werd er een groep van 147 patiënten geselecteerd volgens vergelijkbare criteria als waarmee de patiënten geselecteerd werden in het onderzoek van Cummings et al. Van deze 147 patiënten konden er slechts 110 worden geanalyseerd omdat de overige stalen ontbraken in de diverse archiveringssystemen. Volgens het onderzoek zouden tot een kwart van de niet-gediagnosticeerde patiënten kunnen verklaard worden door de mutatie die in het artikel beschreven werd. De mutatie is gelegen in het intron tussen exon 11 en exon 12.

Voor alle stalen werd een PCR ingezet met het ontworpen primerpaar. Na PCR volgde een MiSeq-analyse. Voor 6 stalen was de coverage te laag, zodat een Sanger bevestiging nodig was. Uiteindelijk bleek geen enkele van de onderzochte patiënten de mutatie te hebben. Het artikel dat als uitgangspunt gebruikt werd, voorspelde dat tot een kwart van de patiënten, die suggestief waren voor een collageen type VI-gerelateerde ziekte, deze mutatie zou hebben.

De belangrijkste conclusie is dat men steeds kritisch moet omspringen met resultaten uit de literatuur of afkomstig van derden. Uit de besproken gevallen is immers gebleken dat niet alle diagnostische laboresultaten even betrouwbaar zijn, en dat het niet altijd mogelijk is om de resultaten van een ander onderzoek te extrapoleren naar de eigen bevindingen.

II Pre-implantatie genetische diagnostiek (PGD)



Figuur 19: Kritische bedenkingen bij PGD (Don Quijote, 2011) (Big Picture, 2014).

Naast het werk rond moleculaire diagnostiek en mutatieanalyse vormde pre-implantatie genetische diagnostiek (PGD) het tweede grote onderdeel van de stageperiode. **Deze techniek wordt in het CMGG enkel gebruikt bij koppels die reeds een genetische diagnose hebben.** Zij kunnen ervoor kiezen om met eigen genetisch materiaal embryo's te laten selecteren die hun genetische aandoening niet hebben. Op die manier bespaart men het nageslacht van de ziekte of het dragerschap ervan. De technische mogelijkheden beperken zich echter niet enkel tot deze situaties en zouden kunnen leiden tot zogenaamde "designer baby's". Hierbij zouden de toekomstige ouders als het ware hun kind kunnen "selecteren" naar hun eigen wensen. Dit verklaart waarom men soms ook wel de term "embryoselectie" gebruikt. Het is daarom ook niet verwonderlijk dat de techniek ethische vragen oproept. Tegenstanders durven opwerpen dat het selecteren van embryo's zonder mutatie overeenkomt met "voor God spelen" en vinden dat de natuur zijn gang moet kunnen gaan. Zonder te diep te willen ingaan op het ethische en morele debat, is het hier wel op zijn plaats om te benadrukken dat men sommige beslissingen terdege moet afwegen en in vraag moet durven stellen.

1 Inleiding

Het CMGG biedt patiënten niet enkel de mogelijkheid om hun aandoening genetisch te laten bevestigen, maar een andere belangrijke dienstverlening is het verstrekken van prenataal advies en het aanbieden van prenatale moleculaire diagnostiek. Meestal betreft het mensen uit een bepaalde risicogroep die extra onderzoeken wensen op hun ongeboren kind. Dit kunnen vrouwen zijn die op hogere leeftijd zwanger worden, of koppels die reeds geconfronteerd werden met genetische aandoeningen bij een eerder kind. Indien bij één van de ouders of familieleden een erfelijke aandoening werd vastgesteld, dan lopen deze personen immers een aanzienlijk risico om die ziekte

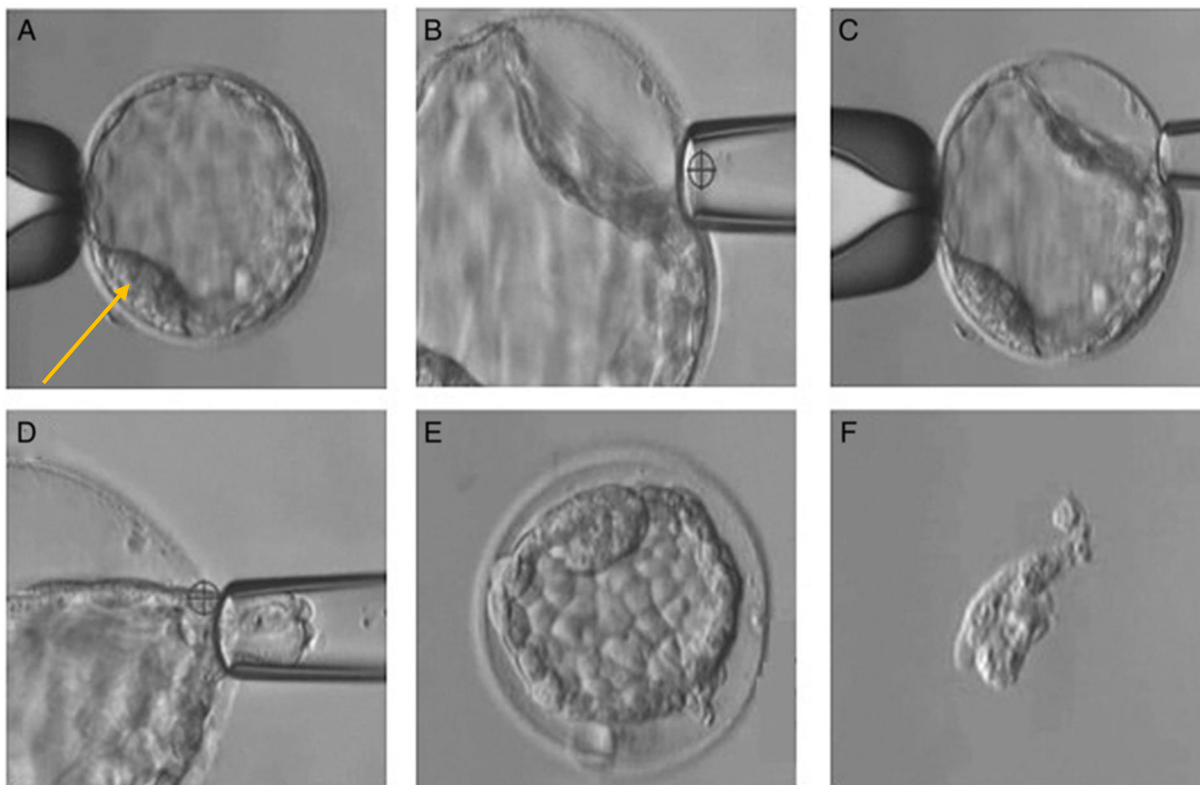
door te geven aan hun kinderen. In 1.1.2 werden reeds een aantal mogelijke situaties besproken en werd een inschatting van de risico's gegeven.

Naast bekende genetische defecten bij de ouders kunnen ook spontane fouten in het genetisch materiaal van het kind (*de novo* mutaties) of niet-genetische invloeden, zoals omgevingsfactoren, een ernstige aandoening veroorzaken. In deze gevallen wordt de aandoening vaak pas later tijdens de zwangerschap of zelfs pas na de bevalling ontdekt (Vlaamse Centra voor Menselijke Erfelijkheid, 2017).

Zwangere vrouwen hebben tegenwoordig de mogelijkheid om via een aantal prenatale onderzoeken een beeld te krijgen van de gezondheidstoestand van hun ongebooren kind. De echografie is zeer bekend, maar ook de vlokkentest, vruchtwaterpunctie en navelstrengpunctie zijn onderzoeken die heel wat informatie aan het licht kunnen brengen. Men kan beslissen om extra onderzoek te doen naar de aanwezigheid van chromosomale aandoeningen, zoals het syndroom van Down, of trachten monogene aandoeningen op te sporen. Deze categorie van ziektes worden veroorzaakt door mutaties in één gen, die doorgegeven kunnen worden door de ouders. Indien men weet dat één van de ouders een monogene aandoening heeft, of drager is van een mutatie, kan men prenataal onderzoek aanbevelen. Afwijkingen op echografie zijn eveneens een argument om uitgebreider onderzoek uit te voeren (Vlaamse Centra voor Menselijke Erfelijkheid, 2017).

Afhankelijk van het soort aandoening gelden er andere voorwaarden¹¹ vooraleer koppels in aanmerking komen voor de vroegst mogelijke prenatale diagnostische techniek. Dit onderzoek wordt pre-implantatie genetische diagnostiek (PGD) genoemd en hierbij worden enkele cellen geïsoleerd uit de trofocoderm van een embryo van 5 of 6 dagen oud. Figuur 20 toont elke stap van de embryonale biopsie (Capalbo, et al., 2014). In het DNA van deze embryonale cellen gaat men dan gericht op zoek of de specifieke mutatie ook in het embryo terug te vinden is. Op die manier kan men enkel een embryo dat de mutatie niet heeft in de baarmoeder plaatsen. PGD kan daarom enkel bij kunstmatige bevruchtingen worden toegepast en niet bij een natuurlijke zwangerschap. De voorafgaande *in-vitro* fertilisatie gebeurt niet in het CMGG en wordt hier dan ook niet verder toegelicht (Symoens, Van Acker, & Van Holm).

¹¹ Bij een autosomaal recessieve aandoening moeten beide ouders op zijn minst drager zijn van dezelfde mutatie. PGD wordt niet aangeboden om dragerschap bij het kind te vermijden. Voor een autosomaal dominante aandoening is het voldoende als 1 van de ouders een mutatie draagt. Bij dominante aandoeningen zijn er immers geen gezonde dragers.



Figuur 20: Overzicht van de stappen bij het uitvoeren van een biopsie van trofoblaster uit de trofoblast (dag 5-7). (A): Blastocyst voor start van de biopsie, met zichtbare Inner Cell Mass (zie pijl), waaruit het embryo zal ontwikkelen. (B) en (C): Door de opening zuigt de pipet medium naar buiten om de trofoblastcellen los te maken van de wand. (D): Trofoblastcellen worden opgezogen en met verschillende korte laserpulsen losgemaakt van het embryo. (E): Blastocyst na de biopsie. (F) De opgezogen cellen worden vrijgelaten (Capalbo, et al., 2014). Al deze stappen worden uitgevoerd in het IVF-labo van het UZ Gent.

Omdat de causale mutaties per familie verschillen, is er een individueel gerichte aanpak vereist en wordt in het CMGG voor elke PGD een voorbereidende oppuntstelling uitgevoerd. Hiervoor leveren de ouders een EDTA-bloedstaal, welke gebruikt wordt om een lymfocytencultuur op te starten. Na enkele dagen worden vanuit deze lymfocytencultuur 32 aliquots (epjes) gevuld met daarin telkens 3 tot 8 lymfocyten per epje. Deze handeling gebeurt handmatig en is daardoor eerder omslachtig en tijdrovend. Om de capaciteit te verhogen en de werklust te verlagen werd daarom gezocht naar een alternatieve methode waarbij de lymfocytencultuur verdund wordt. Parallel aan het testen van het verdunningsprotocol werd tevens een schatting gemaakt van de houdbaarheidstermijn van lymfocytenculturen.

In het kader van een mogelijke uitbreiding van het bestaande aanbod werd ook verder onderzocht of de zeer beperkte DNA-hoeveelheid uit een embryonaal staal kan geamplificeerd worden voorafgaand aan de eigenlijke PCR-reacties. Hiervoor beschikt het labo over de Repli-g Single Cell kit van de firma Qiagen. Vanzelfsprekend dient deze kit zeer betrouwbaar zijn: indien er in de producten van de kit stukken van het oorspronkelijke DNA ontbreken of fouten bevatten, dan worden deze fouten meegenomen in het vervolg van de procedure. Indien het kopiëren niet voldoende betrouwbaar

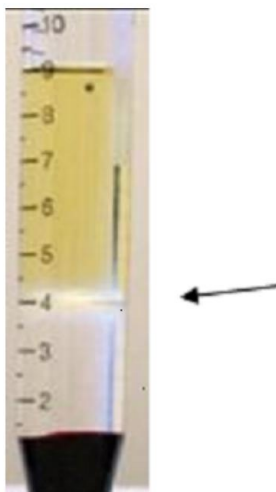
gebeurt, bestaat namelijk het risico dat de causale mutatie gemist wordt en dat een embryo met de mutatie toch wordt ingeplant bij de moeder.

Om de betrouwbaarheid van de kit na te gaan, werd samen met een medestudente een panel met *single nucleotide polymorphisms* (SNP's) opgesteld vanuit verschillende biodatabanken. Bij het samenstellen werd expliciet rekening gehouden met de ligging, zodat elk chromosoom minstens één SNP leverde. Bovendien werd gekozen voor SNP's met een hoge graad van heterozygositeit. Dit criterium was vooral van belang voor de medestudente omdat zij een soort genetische identiteitskaart moest opstellen om staalwisseling te voorkomen. Er werd van één patiënt een genomisch DNA-staal onderzocht om het genotype van deze persoon voor elk van de SNP's te bepalen. Tegelijkertijd werden enkele epjes met lymfocyten van diezelfde persoon eerst behandeld met de Repli-g kit om nadien de resultaten te kunnen vergelijken met die van het genomisch DNA-staal.

2 Materialen en methodes

2.1 Ontvangst van het EDTA-staal en inzetten van de lymfocytencultuur

Na de administratieve ontvangst van het bloedstaal van het te onderzoeken koppel, wordt uit het bloed een celcultuur van de lymfocyten opgestart. De laboranten scheiden met behulp van Lymphoprep™ (STEMCELL Technologies) de lymfocyten van de granulocyten en rode bloedcellen. Deze scheiding gebeurt door centrifugeren, waarbij een dichtheitsgradiënt ingesteld wordt. Op Figuur 21 is te zien dat de lymfocyten na het centrifugeren mooi op de overgang tussen het bloedplasma en de laag Lymphoprep gelegen zijn (Goderis, 2015).



Figuur 21: Scheiding na centrifugeren: de lymfocyten liggen op de scheidingslaag tussen het bloedplasma en Lymphoprep.

De geïsoleerde lymfocyten worden overgebracht in een buis en aangelengd met RPMI-groeimedium zonder foetaal kalfsserum (FCS)¹². Na centrifugeren en wassen worden de cellen overgebracht in een celcultuurfles met 3 mL RPMI aangerijkt met 10% FCS en 150 µL groeifactor Interleukine-2. Tot slot wordt er nog 3 µL PHA (Phytohemagglutinin, M-form) toegevoegd als stimulator voor de proliferatie van de lymfocyten (Biological Industries, sd), waarna de cultuur geïncubeerd wordt bij 37°C en 5% CO₂. De culturen worden 2 keer per week voorzien van verse voedingsstoffen en groeifactoren. Hiervoor wordt er telkens 2 mL RPMI met 10% FCS en 100 µL IL-2 toegevoegd in de cultuurfles (Goderis, 2015).

2.2 Isoleren en lyseren van lymfocyten uit de gegroeide lymfocytencultuur

Na een groeifase van minimaal 3 dagen kunnen de lymfocyten geïsoleerd worden voor het verder verloop van de PGD oppuntstelling. Voor deze isolatie gebruikt men volgende werkwijze:

- Verdun 20 µL cultuur in een petrischaaltje met 15 mL *Phosphate Buffered Saline (PBS)*.
- Neem voor elke patiënt ongeveer 32 epjes met 10 µL proteïnase K op ijs.
- Plaats de capillaire naald aan het uiteinde van een rubberen darm.
- Kijk door de microscoop om de bewegingen van de naald in het petrischaaltje te kunnen volgen en zuig voor elk epje 3 tot 9 lymfocyten op, naar analogie met het aantal cellen in het embryonale biopt.
- Blaas de cellen uit in een epje en plaats het epje meteen op ijs.
- Plaats de gevulde epjes in een PCR-toestel en laat ze 3 uur incuberen bij 65°C en inactieveer het proteïnase-enzym vervolgens door gedurende 10 minuten te verhitten op 95°C.

Door het lyseren barsten de lymfocyten open en komt het DNA vrij in de oplossing (Symoens, Van Acker, & Van Holm). Het tijdrovende isolatieproces is één van de voornaamste beperkende factoren die maken dat er relatief weinig PGD stalen kunnen behandeld worden met de huidige technieken en middelen.

2.3 PCR oppuntstelling

Het geïsoleerde DNA uit de vorige stap wordt nu gebruikt om de PCR-condities te toetsen en bij te schaven waar nodig. Elke PCR wordt *in duplo* ingezet vanuit 4 µL lysaat en volgt in eerste instantie de Ford-workflow (zie deel I hoofdstuk 2.1). De grootte van het PCR product wordt bepaald door middel van capillaire elektroforese op Fragment Analyzer.

¹² FCS of Fetal Calf Serum wordt vaak gebruikt bij celculturen omwille van zijn hoog gehalte aan voedingsstoffen en embryonale groeifactoren (Sigma Aldrich, sd).

Het kan gebeuren dat de normale Ford-condities niet geschikt zijn om een degelijke amplificatie te verkrijgen. In dat geval wordt de voorgaande procedure herhaald met aangepaste condities totdat er een specifiek en voldoende intens bandje verschijnt op Fragment Analyzer. Meestal wordt de annealingstemperatuur verlaagd of verhoogd in functie van de smelttemperatuur van het primerkoppel, ofwel voegt men extra cycli toe aan het programma. Soms gebruikt men een touch-down programma¹³ om de annealingstemperatuur stapsgewijs te laten dalen, waarna 40 cycli volgen bij de laagste annealingstemperatuur. Tabel 14 en Tabel 15 geven een overzicht van enkele frequent gebruikte programma's bij de PCR oppuntstelling (Symoens, Van Acker, & Van Holm).

Tabel 14: Oorspronkelijk Ford-programma met daarnaast enkele wijzigingen zoals regelmatig gebruikt bij de oppuntstelling.

| Oorspronkelijk Ford-programma | | | Aangepast Ford-programma | | |
|-------------------------------|--------|-------------|------------------------------|--------|---|
| STAP | TIJD | TEMPERATUUR | STAP | TIJD | TEMPERATUUR |
| 1. activatie | 3 min | 95°C | 1. activatie | 3 min | 95°C |
| 2. denaturatie | 15 sec | 95°C | 2. denaturatie | 15 sec | 95°C |
| 3. annealing | 10 sec | 60°C | 3. annealing | 10 sec | Afhankelijk (60°, 56°, 70°, ...) |
| 4. elongatie | 15 sec | 72°C | 4. elongatie | 15 sec | 72° |
| 35 cycli stap 2 tot 4 | | | 40 cycli stap 2 tot 4 | | |
| 5. finaal | 1 min | 72°C | 5. finaal | 1 min | 72° |
| 6. koeling | ∞ | 15°C | 6. koeling | ∞ | 15°C |

Tabel 15: Touch-down programma dat gebruikt kan worden bij het oppuntstellen van de reactiecondities. De annealingstemperatuur met * daalt elke cyclus met 1°C tot de uiteindelijke temperatuur die gebruikt wordt in de volgende 40 cycli.

| Stap | Tijd | Temperatuur |
|------------------------------|--------|-------------|
| 1. activatie | 4 min | 94°C |
| 2. denaturatie | 20 sec | 94°C |
| 3. annealing | 15 sec | 58°C* |
| 4. elongatie | 1 min | 72°C |
| 12 cycli stap 2 tot 4 | | |
| 5. denaturatie | 40 sec | 94°C |
| 6. annealing | 40 sec | 46°C |
| 7. elongatie | 40 sec | 72°C |
| 40 cycli stap 5 tot 7 | | |
| 8. finaal | 10 min | 72°C |
| 9. koeling | ∞ | 15°C |

¹³ Touchdown PCR wordt gebruikt wanneer de primers aspecifiek neigen te binden op lagere temperaturen. Door een hogere starttemperatuur kunnen de primers makkelijker aan de juiste positie binden. Wanneer de temperatuur daalt, is er dan reeds een grotere hoeveelheid van het juiste product aanwezig.

Wanneer men door *trial and error* de optimale condities heeft gedefinieerd, wordt het bekomen PCR product gesequeneerd op basis van de Sanger-techniek om de mutaties te bevestigen (Symoens, Van Acker, & Van Holm).

2.4 Testen van de leefbaarheid van lymfocytenculturen

Voor deze test werden op hetzelfde moment 2 lymfocytenculturen bereid vanuit het bloed van één van de laboranten volgens de procedure beschreven in 2.1. Beide culturen werden opgestart op 16/3/2017. Elke dag werden uit beide culturen 3 aliquots microscopisch bekeken. Er werd trypaanblauw gebruikt om een onderscheid te kunnen maken tussen dode en levende lymfocyten. Aan elk aliquot van 5 µL werd 1 µL trypaanblauw toegevoegd. Tabel 16 toont het onderhoudsschema.

Tabel 16: Onderhoudsschema van de lymfocytenculturen die gebruikt werden bij het testen van de leefbaarheid.

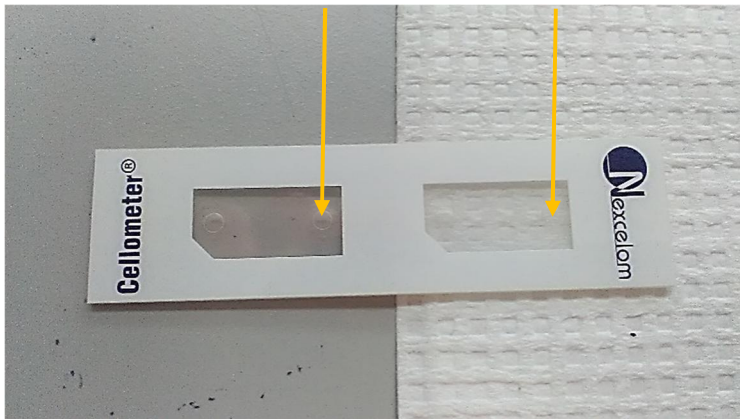
| Datum | Cultuur 1 | Cultuur 2 |
|--|--|--|
| 16/3/2017 | 3 mL RPMI met 10% FCS 150 µL Interleukine 2 3 µL PHA | 3 mL RPMI met 10% FCS 150 µL Interleukine 2 3 µL PHA |
| 20/3/2017 | 2 mL RPMI met 10% FCS 100 µL Interleukine 2 | 2 mL RPMI met 10% FCS 100 µL Interleukine 2 |
| 23/3/2017 28/3/2017 31/3/2017 4/4/2017 7/4/2017 | Op elke datum verversing met 2 mL RPMI met 10% FCS 100 µL Interleukine 2 | Niets toegevoegd na 20/3/2017 |

2.5 Aangepaste isolatieprocedure

Momenteel wordt de procedure beschreven in 2.1, 2.2 en 2.3 toegepast om PGD stalen te verwerken. Het belangrijkste knelpunt van de hele procedure is het isoleren van de lymfocyten door het opzuigen en uitblazen van de cellen. In dit eindwerk werd getracht om dit onderdeel aan te passen. Omdat één van de labo's in het CMGG over een Nexcelom Cellometer beschikt waarmee het aantal cellen in een celcultuur kan geteld worden, werd er gekozen om een verdunningsprotocol te ontwerpen en te testen of dit een valabel alternatief kan zijn voor het manueel opzuigen van de lymfocyten. Na het invullen van de tellingen, genereerde een rekenblad de volumes PBS die nodig waren om de verdunning te maken. In bijlage 4 staat een voorbeeld van het gebruikte rekenblad vóór en na het invullen van tellingen.

Aangezien een embryonale biopsie slechts uit enkele cellen bestaat, werd de cultuur verdund tot maximum 10 cellen in 5 μ L verdunning. Ter controle werden enkele aliquots van 5 μ L gekleurd met Trypaanblauw en microscopisch bekeken. Deze kleurstof kan levende cellen niet binnendringen, waardoor deze cellen niet gekleurd worden. Dode cellen daarentegen krijgen een donkerblauwe kleur. Er waren 2 culturen ter beschikking die gebruikt werden om het protocol te testen. De verdunningen werden gemaakt volgens onderstaand protocol.

- Haal de culturen uit de broedstoof en meng ze goed door te zwenken of schudden.
- Pipetteer met een P1000 pipet elke cultuur enkele malen op en neer. Maak voor elke cultuur een aparte verdunning van 0,2 mL cultuur en 0,2 mL PBS in een epje en pipetteer op en neer. Het is belangrijk dat de verdunning zo homogeen mogelijk is.
- Pipetteer 20 μ L uit de verdunning in één van de gaatjes op een Nexcelom telglasje. Doe dit langzaam en duw de pipet niet tot de tweede stand om luchtbellen te vermijden. Merk op dat er 2 culturen op hetzelfde glaasje gepipetteerd kunnen worden (Figuur 22).

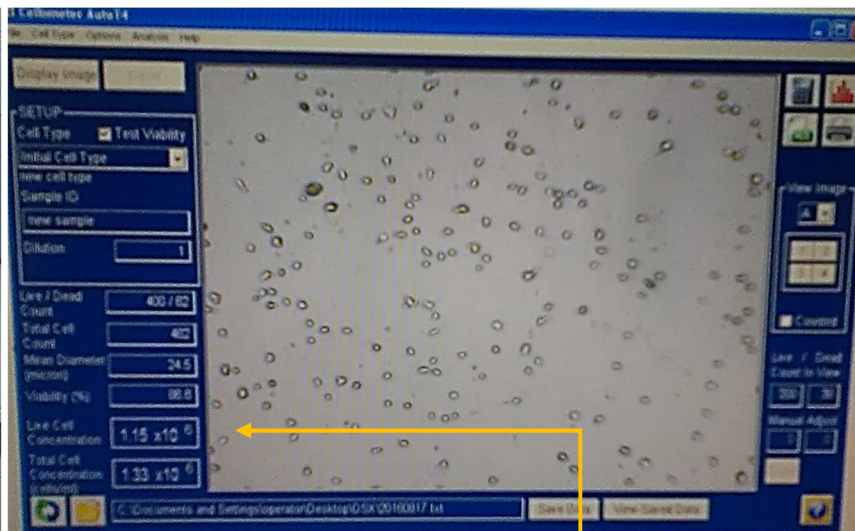


Figuur 22: Telglasje waarop 2 culturen gepipetteerd kunnen worden. Elke telkamer heeft 2 gaatjes: in het eerste wordt het staal gepipetteerd, terwijl de lucht langs het andere gaatje ontsnapt (eigen foto). De pijlen duiden de gaatjes aan waarin gepipetteerd kan worden.

- Plaats het telglasje op het teltoestel (Figuur 23). Open het programma, zet het celtype op “initial cell type”, druk op “display” en daarna op “count”. Tel elke cultuur (dus elke kant van het glaasje) 3 keer op deze manier en noteer het aantal levende cellen (Figuur 24).



Figuur 23: Nexcelom Cellometer Auto T4 teltoestel (eigen foto).



Figuur 24: Printscreen van het programma met de celconcentratie en het microscopisch beeld zichtbaar (eigen foto).

- Open het rekenblad en vul de getelde aantallen in op de voorziene plaatsen in de kader met “#cellen na verdunning 1”. Vul ook onderaan de oranje vakken in met het gewenst aantal cellen en de gewenste concentratie. De overige berekeningen worden automatisch gegenereerd.
- Maak vanuit de eerste verdunning een nieuwe verdunning. Pipetteer eerst met de P1000 pipet de eerste verdunning enkele keren op en neer. Neem 200 μL van de verdunde cultuur en voeg hieraan 800 μL PBS toe in een nieuw epje. Pipetteer de nieuwe verdunning op en neer.
- In de grijze kader op het rekenblad verschijnt de hoeveelheid PBS die moet toegevoegd worden om de eindverdunning te bekomen. Afhankelijk van het getelde aantal cellen kan hiervoor een 15 mL of een 50 mL tube gebruikt worden.
- Pipetteer 200 μL uit het tweede epje in de geschikte tube. Voeg hierna het vereiste volume PBS toe. Gebruik hiervoor de Pipet-Aid met een geschikte pipet (5 mL, 10 mL of 25 mL) en indien nodig een P1000 of P100 pipet om exact te werken. Gebruik een nieuwe punt wanneer de punt in contact is geweest met de verdunde celcultuur om contaminatie van de PBS-voorraad te vermijden.
- Meng de eindverdunning door op en neer te pipetteren met de Pipet-Aid en vervolgens goed te zwenken of schudden.

Wanneer deze procedure effectief gebruikt zou kunnen worden, dan kan men uit deze eindverdunning de aliquots pipetteren die nadien verder gelyseerd moeten worden zoals beschreven in 2.2.

Na het lyseren wordt het lysaat gebruikt voor de op puntstelling van de PCR-condities zoals uitgelegd werd in 2.3.

Tijdens het uittesten van het verdunningsprotocol werd er uiteraard nog een controlestap toegevoegd om de kwaliteit van de verdunningen na te gaan. De controle gebeurt door het microscopisch bekijken van aliquots van de eindverdunning, die gekleurd werden met trypaanblauw. Het is immers de bedoeling dat elk aliquot van de verdunning maximum 10 lymfocyten bevat. Trypaanblauw is echter cytotoxisch; daarom moeten de preparaten zeker binnen de 30 minuten bekeken worden omdat er nadien een vals verhoogd aantal dode cellen zichtbaar kunnen zijn.

- Pipetteer in een klein epje 15 μ L uit de eindverdunning en voeg 3 μ L trypaanblauw toe. Homogeniseer het mengsel goed door op en neer te pipetteren.
- Snij met de punt van een scalpel voorzichtig een dekglasje in 4 kwartjes.
- Neem een proper draagglaasje en pipetteer 6 μ L uit het kleine epje op het draagglaasje. Er kunnen 3 druppels naast elkaar liggen op één draagglaasje. Dek af met een kwart van een dekglasje en bekijk meteen onder de Leica fluorescentiemicroscop.
- Tel het aantal lymfocyten per dekglasje om te zien of de verdunning gelukt is. Een goede verdunning bevat 3 tot 10 cellen.

Om het protocol grondig te testen, is het nodig om een PCR uit te voeren vanuit de verdunning van de cultuur voordat de nieuwe isolatiestap kan worden geïncorporeerd in het hele protocol. Er werden 2 genen getest, namelijk het *SMAD3*- en het *ARSA*-gen. Voor beide genen werd een ander programma gebruikt, zoals beschreven in Tabel 17 (*SMAD3*) en Tabel 18 (*ARSA*), en een licht aangepaste reactiemix (Tabel 19).

Tabel 17: Aangepast Ford-programma voor het *SMAD3*-gen.

| Oorspronkelijk Ford-programma | | | Aangepast Ford-programma | | |
|-------------------------------|----------|-------------|------------------------------|----------|-------------|
| STAP | TIJD | TEMPERATUUR | STAP | TIJD | TEMPERATUUR |
| 1. activatie | 3 min | 95°C | 1. activatie | 3 min | 95°C |
| 2. denaturatie | 15 sec | 95°C | 2. denaturatie | 15 sec | 95°C |
| 3. annealing | 10 sec | 60°C | 3. annealing | 10 sec | 58°C |
| 4. elongatie | 15 sec | 72°C | 4. elongatie | 15 sec | 72° |
| 35 cycli stap 2 tot 4 | | | 40 cycli stap 2 tot 4 | | |
| 5. finaal | 1 min | 72°C | 5. finaal | 1 min | 72° |
| 6. koeling | ∞ | 15°C | 6. koeling | ∞ | 15°C |

Tabel 18: Touch-down programma dat gebruikt werd voor het ARSA-gen.

| Stap | Tijd | Temperatuur |
|------------------------------|--------|-------------|
| 1. activatie | 4 min | 94°C |
| 2. denaturatie | 20 sec | 94°C |
| 3. annealing | 15 sec | 58°C* |
| 4. elongatie | 1 min | 72°C |
| 12 cycli stap 2 tot 4 | | |
| 5. denaturatie | 40 sec | 94°C |
| 6. annealing | 40 sec | 46°C |
| 7. elongatie | 30 sec | 72°C |
| 40 cycli stap 5 tot 7 | | |
| 8. finaal | 10 min | 72°C |
| 9. koeling | ∞ | 15°C |

Tabel 19: Aangepaste Ford-mix voor 1 reactie zoals gebruikt voor de PCR's van SMAD3 en ARSA.

| Oorspronkelijke Ford-mix | | Aangepaste Ford-mix | |
|--------------------------|--------|-------------------------|--------|
| Stof | Volume | Stof | Volume |
| Ford mix | 5 µL | Ford mix | 10 µL |
| Primerverdunning (1 µM) | 2,5 µL | Primerverdunning (1 µM) | 5 µL |
| Staal | 2,5 µL | Staal | 5 µL |

In een volgende fase van het experiment werd opnieuw overgeschakeld naar de huidige isolatiemethode volgens onderstaand protocol.

- Verdun 40 µL cultuur met 15 mL PBS in een petrischaaltje.
- Pipetteer op en neer en neem aliquots van 500 µL.
- Centrifugeer de aliquots gedurende 10 minuten op 1000g. Werk na centrifugeren meteen door om te vermijden dat de zeer beperkte pellet opnieuw zou oplossen.
- Voeg voor elk van beide genen aan 4 of 5 epjes telkens 5 µL supernatans toe. Verwijder het resterende supernatans zonder de bodem van het epje te raken met de pipetpunt.
- Resuspendeer de bezonken cellen door het resterende volume op en neer te pipetteren en voeg 5 µL hiervan toe aan de reactiemix.

Er werd een alternatieve werkwijze gebruikt waarbij het genomen volume supernatans verkleind is. Bij het isoleren van de cellen wordt immers slechts een beperkte hoeveelheid vloeistof mee opgezogen. De nieuwe PCR's werden ingezet met 10 μ L Ford-mix, 5 μ L primer en een opgezogen hoeveelheid van de verdunde cultuur. De producten werden geanalyseerd met Fragment Analyzer.

2.6 Testen van de betrouwbaarheid van de amplificatiekit

Eerst en vooral werd een primerpanel bestaande uit 23 SNP's opgesteld door gebruik te maken van verscheidene biodatabanken. Om het primerpanel op te stellen werd onderstaande werkwijze gevolgd. Tijdens de validatie werd vastgesteld dat sommige primers betere resultaten opleverden bij een hogere annealingstemperatuur. Het uiteindelijke panel bestond uit 23 SNP's, waarbij elk autosomaal chromosoom en het X-chromosoom één SNP droegen.

- Zoek mogelijke SNP's in Biomart (Ensembl) op. Filter op regio (chromosoom), global minor allele frequency en exon variant.
- Gebruik andere databanken om de populatieverdeling te bekijken (Ensembl).
- Plak de referentiesequentie uit dbSNP in een Word bestand en verwijder spaties en enters.
- Ontwerp en bestel de primers (De Jaegere, Vereecke, & Baetens, 2016).
 - Duid de SNP aan in de referentiesequentie.
 - Baken langs beide kanten van de SNP een gebied van minimum 50 basen af met rechte haakjes.
 - Ga naar <http://bioinfo.ut.ee/primer3/> om de primers te ontwerpen:
 - Plak de sequentie van het afgebakende fragment.
 - Pas de design instellingen aan zoals beschreven in het protocol.
 - Klik op "pick primers" om de primers te genereren.
 - Gebruik de *in silico* PCR predictie van UCSC om de grootte van het PCR-product te voorspellen en om de smelttemperatuur van de primers te laten bepalen. Deze smelttemperatuur wordt gebruikt om de ideale annealingstemperatuur te kiezen.
- Los de gelyofiliseerde primers op en verdun de oplossing tot een werkconcentratie van 1 μ M.
- Valideer de primers met 1 staal en controleer met Fragment Analyzer.
- Bepaal de sequentie van de producten en hieruit de heterozygositeit via Finch TV.
- Verfijn de PCR-condities waar nodig.

De uitvoering van de eigenlijke proeven gebeurde als volgt:

- Zet de PCR in volgens de Ford-condities (5 μ L Ford mix, 2,5 μ L primer, 2,5 μ L DNA-verdunning). Zet de primers met een hogere annealingstemperatuur in op een aparte strip of plaat, want deze moeten in een apart PCR-toestel met een ander programma worden geplaatst.

- Controleer de PCR-producten op Fragment Analyzer.
- Zuiver de PCR-producten op met Exonuclease I en Antarctic Phosphatase.
- Gebruik de Sanger methode om de PCR-producten te sequencen.
- Zuiver de Sanger-producten met magnetische beads.
- Laat de gezuiverde producten analyseren door het ABI 3130XL of 3730 XL toestel.
- Beoordeel de bekomen sequenties met Finch TV. Gebruik de referentiesequentie om de SNP snel terug te vinden.

De gedetailleerde werkwijze voor PCR, Fragment Analyzer, enzymatische opzuivering, Sanger sequencering en magnetische opzuivering staan beschreven in het eerste deel van dit eindwerk.

Na analyse van de 23 sequenties werd besloten om 6 primers niet verder te gebruiken, omdat de sequenties onbruikbaar waren. De 17 resterende primers volstonden om het vervolg van het experiment op een betrouwbare manier te kunnen uitvoeren. Hieronder volgt de beschrijving.

- Vul 4 epjes met 3 tot 9 geïsoleerde lymfocyten. Gebruik **geen** proteïnase K, maar 2 μL PBS om de cellen in uit te blazen!
- Volg de werkwijze zoals beschreven in de bijsluiters van de Repli-g Single Cell kit (Qiagen).
 - Bereid denaturatiebuffer "D2" met 1,5 μL DTT¹⁴ (1 M) en 16,5 μL "reconstituted DLB Buffer"¹⁵.
 - Voeg 1,5 μL D2 buffer toe aan de 2 μL met de lymfocyten. Zwenk zachtjes en centrifugeer kort.
 - Incubeer vervolgens op 65°C gedurende 10 minuten.
 - Voeg 1,5 μL "Stop solution" toe. Zwenk zachtjes, centrifugeer kort en bewaar op ijs.
 - Maak een mastermix met volgende samenstelling. Mix en centrifugeer kort. Ontdooi de producten op kamertemperatuur en vortex. Ontdooi het DNA-Polymerase op ijs. Gebruik de mastermix meteen nadat het DNA-Polymerase werd toegevoegd.
 - 4,5 μL water
 - 14,5 μL Repli-g Reaction Buffer
 - 1 μL Repli-g DNA-Polymerase
 - Voeg per reactie 20 μL mastermix toe aan de 5 μL gedenateerd DNA.
 - Incubeer op 30°C gedurende 8 uur en inactieveer het polymerase door te verwarmen op 65°C gedurende 3 minuten. Bewaar het product tijdelijk op 4°C of voor langere tijd op -20°C.
 - Verdun een aliquot van het Repli-g product 1:100 voor een PCR reactie. Gebruik 2 μL DNA-verdunning voor elke PCR-reactie.

¹⁴ DTT: Dithiothreitol of Cleland's reagens. Dient om enzymen en eiwitten met vrije sulfhydrylgroepen te stabiliseren (Thermo Fisher Scientific, sd).

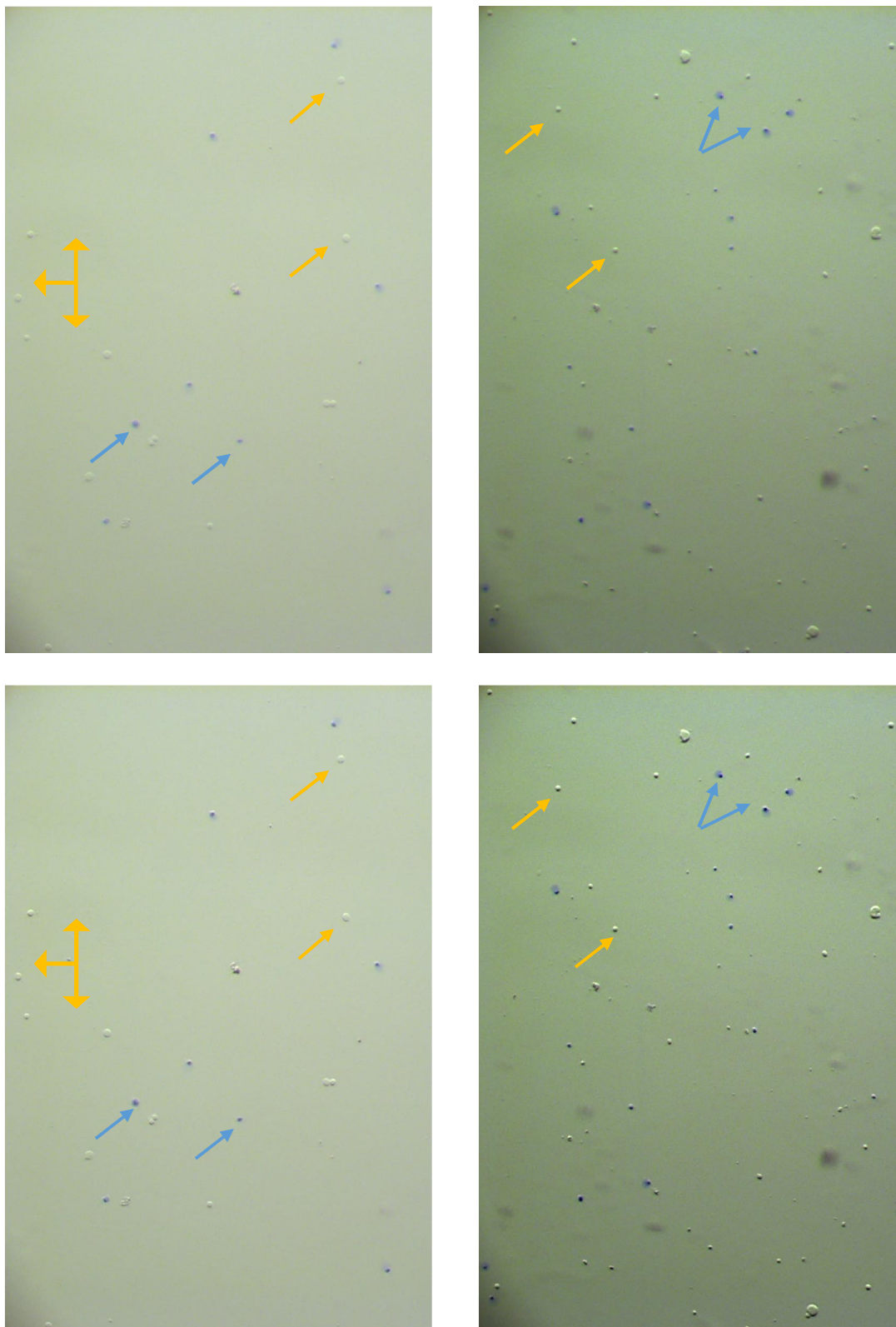
¹⁵ Afkorting DLB niet gevonden.

3 Resultaten

3.1 Onderzoek levensduur lymfocytenculturen

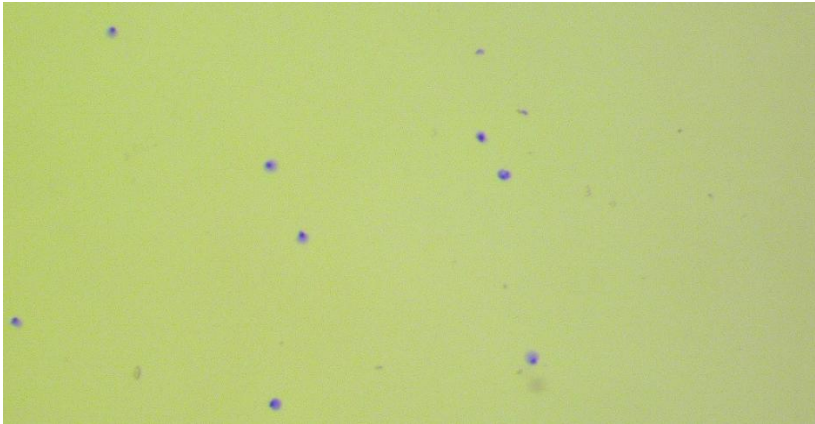
De culturen werden opgestart op 16/03/2017 en vanaf 21/03/2017 elke dag bekeken. Op basis van de kleuring met trypaanblauw werd een schatting gemaakt van het percentage levende cellen ten opzichte van het aantal dode (blauwgekleurde) cellen. Het duurde meer dan 2 weken vooraleer er een klein verschil was tussen de preparaten van de onderhouden cultuur en de preparaten van de cultuur die geen voeding had gekregen. De microscopische beelden waren zeer gelijklopend, met telkens ongeveer 70 tot 80% levende cellen. Voor de cultuur die niet onderhouden werd, nam dit aantal geleidelijk af naar 60 à 70%. Er waren van dag tot dag kleine fluctuaties in deze percentages, maar de schommelingen waren niet van die aard dat ze wezen op een significant verschil tussen beide culturen.

Vanaf 03/04/2017 viel het op dat de cellen van de niet onderhouden cultuur kleiner waren dan de cellen van de ververstete cultuur. Via de microscoop werden er foto's gemaakt van beide culturen, waarop bovendien het verschil in aantal dode cellen te zien is (Figuur 25). Voor de duidelijkheid zijn zowel de originele foto's als verscherpte versies van dezelfde foto's weergegeven.

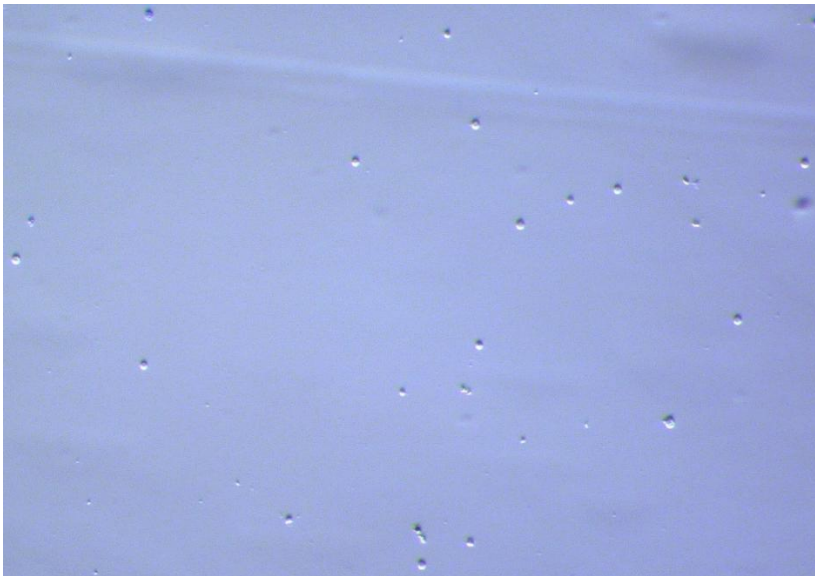


Figuur 25: Originale foto's van de onderhouden (linksboven) en niet-onderhouden cultuur (rechtsboven). Dezelfde foto's werden in Word 50% verscherpt (linksonder en rechtsonder). De gele pijlen tonen levende cellen, terwijl de blauwe pijlen dode cellen aanduiden.

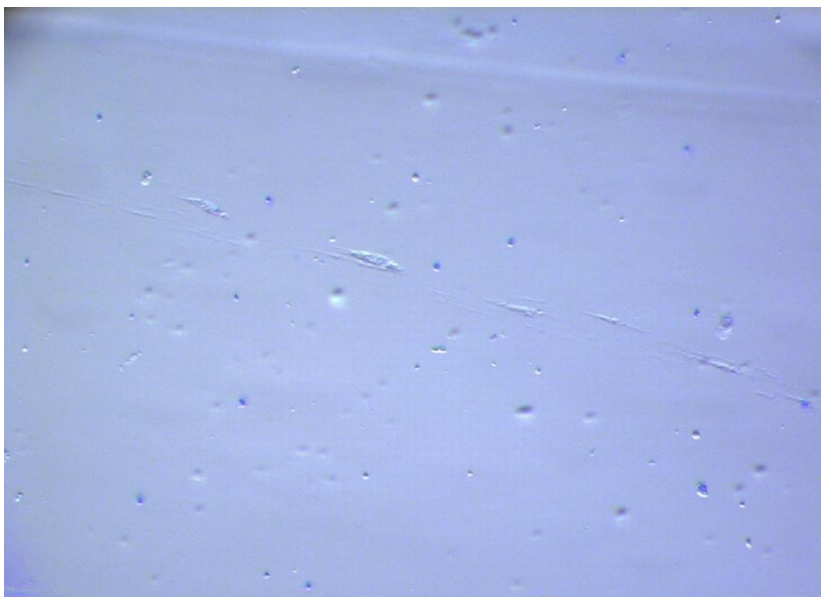
Na bijna 1 maand werd op 12/04/2017 het experiment uiteindelijk afgebroken. Tot dan waren er in beide culturen nog steeds een voldoende aantal levende cellen zichtbaar. Bij de laatste observaties had de onderhouden cultuur nog ongeveer 60 tot 70% levende cellen, terwijl de andere cultuur nog ongeveer 50% levende cellen had. Op 10/04/2017 waren nog slechts 20% levende cellen zichtbaar in de niet-onderhouden cultuur (Figuur 26). De aliquots die nadien nog gecontroleerd werden, bevatten ongeveer 50% levende cellen (Figuur 27 en Figuur 28).



Figuur 26: Gedetailleerde foto van dode cellen uit de niet-onderhouden cultuur (foto genomen op 10/4/2017).



Figuur 27: Foto van de onderhouden cultuur op 11/4/2017.



Figuur 28: Foto van de niet-onderhouden cultuur op 11/4/2017. Er zijn meer dode cellen (blauw gekleurd) en de levende cellen zijn kleiner dan de cellen van de onderhouden cultuur.

3.2 Aangepaste isolatieprocedure

Er werden meerdere tellingen uitgevoerd om na te gaan of het aantal cellen binnen de vooropgestelde grenzen lag. De tellingen gaven een onduidelijk beeld omdat het onderscheid tussen cellen en andere materie of luchtbelletjes soms zeer moeilijk te maken was. Dit kan betekenen dat er zaken als “cel” werden geteld die eigenlijk geen cellen waren, maar het is eveneens mogelijk dat sommige objecten ten onrechte niet als “cel” werden beschouwd. Het protocol werd na een eerste test door drie laboranten uitgevoerd ter controle.

Enkel op basis van de tellingen kon men dus niet met zekerheid besluiten of er wel degelijk cellen in de aliquots aanwezig waren. Daarom werden er voor elke cultuur enkele aliquots van de verdunning gemaakt en gelyseerd volgens de gebruikelijke procedure. Vanuit dit lysaat werden meerdere PCR-reacties ingezet voor het *SMAD3* en *ARSA*-gen. Het doel van de PCR-reacties was om te zien of er amplificatie optrad. Op die manier werd getracht te bewijzen of er al dan niet lymfocyten in de aliquots aanwezig waren.

De PCR-producten werden geanalyseerd met behulp van Fragment Analyzer. Figuur 29 toont de resultaten van het gelelektroforesepatroon, waarbij er duidelijk specifieke en aspecifieke bandjes zichtbaar zijn. Dit zou kunnen betekenen dat er toch lymfocyten in de aliquots aanwezig waren, hoewel de microscopische tellingen eerder het tegendeel leken te bewijzen. Zoals aangehaald was de microscopische interpretatie van de gekleurde aliquots niet eenvoudig.

De zone met korte, aspecifieke producten duidt wellicht op de aanwezigheid van primerdimeren. Waarschijnlijk was dit te wijten aan een relatief grote overmaat aan primer in de reactiemix. De primers die niet konden binden op het target-DNA, vormden bijgevolg primerdimeren. In de primerverduunning voor het ARSA-gen zaten 2 primerparen¹⁶, wat dus resulteert in 2 bandjes.



Figuur 29: Resultaten van Fragment Analyzer. Links van de lijn zijn de producten van SMAD3, rechts staan de ARSA-producten. "Epje" staat voor de reacties waarvoor er 7,5 μ L lysaat werd overgepipetteerd naar een epje met de reactiemix. "Rest lysaat" zijn de reacties waarvoor de mastermix werd toegevoegd aan de rest van het lysaat. De gele kader toont de aspecifieke primerdimeren. De blauwe kader toont links de producten van SMAD3 en rechts de verwachte producten van ARSA.

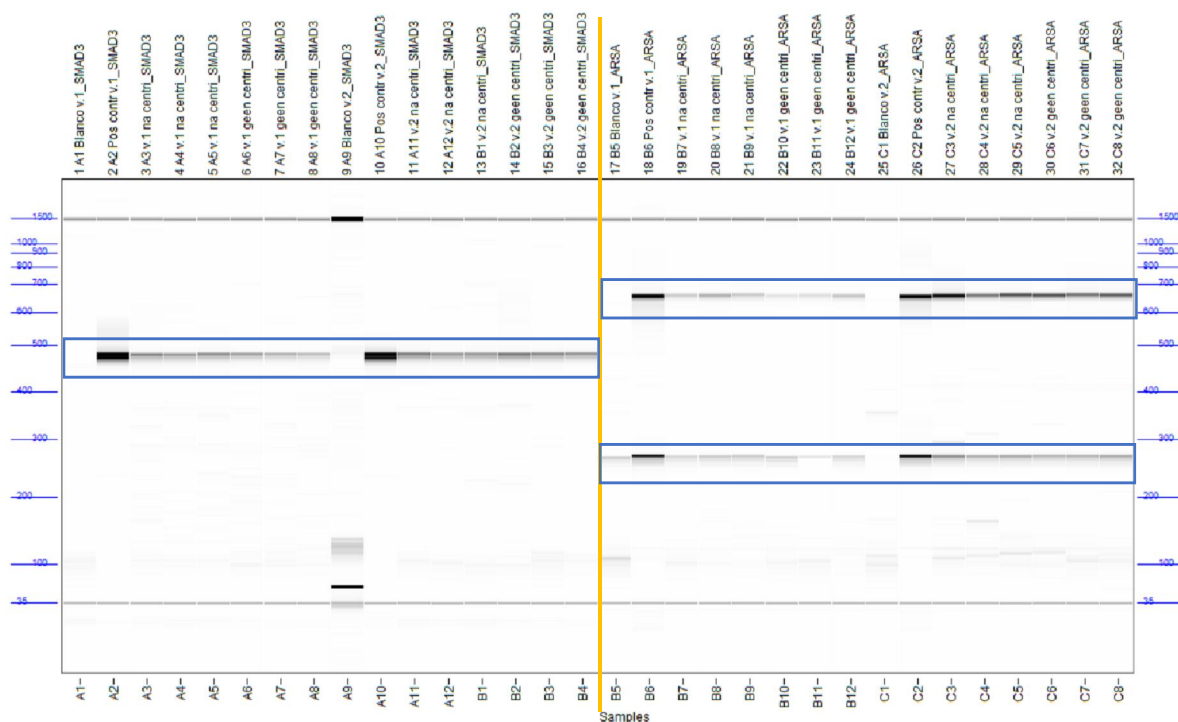
Er werden vervolgens aliquots van 2 verschillende verdunningsstappen genomen:

- Verdunning 1: 0,2 mL cultuur + 0,2 mL PBS
- Verdunning 2: 0,2 mL verdunning 1 + 0,8 mL PBS
- Vanuit elke verdunning 6 aliquots:
 - 3 aliquots 10 minuten gecentrifugeerd op 1000g
 - 3 aliquots niet gecentrifugeerd
- Voor elk aliquot:
 - 5 μ L aliquot verdunnen met 10 μ L water
 - 7,5 μ L verdunning per test voor het SMAD3-gen, 7,5 μ L verdunning per test voor het ARSA-gen.

¹⁶ Dit was voor een koppel met een recessieve aandoening. Hiervoor zitten 2 primerparen in de mix, wat resulteert in 2 bandjes op Fragment Analyzer.

Het gelelektroforesepatroon weergegeven in Figuur 30 toont aan dat er overall amplificatie heeft plaatsgevonden. Het vinden van amplificatie is opnieuw in tegenspraak met de microscopische tellingen, waar er geen lymfocyten met zekerheid gezien werden.

Het rapport van Fragment Analyzer leerde dat sommige niet-gecentrifugeerde aliquots hogere pieken hadden dan gecentrifugeerde aliquots, en dat de pieken van aliquots uit de tweede verdunning hoger waren dan de pieken van de aliquots uit de eerste verdunning. Het is zeer vreemd dat er in sommige gevallen een hogere piek gevonden werd bij aliquots uit de tweede verdunning.

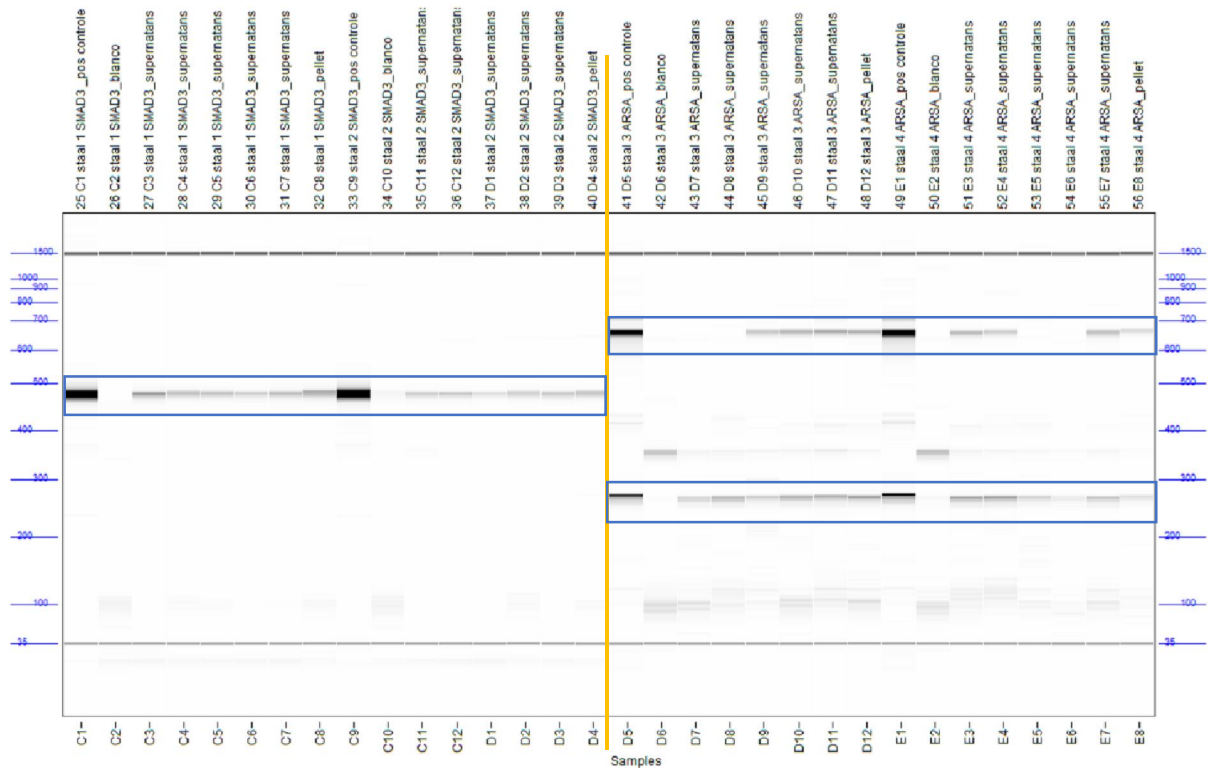


Figuur 30: Resultaat van Fragment Analyzer na centrifugeren van aliquots van verschillende tussenverduunningen. De blauwe kaders tonen de resultaten voor het SMAD3-gen (links van de gele lijn) en de verwachte producten van het ARSA-gen (rechts).

Achteraf bleek dat er een verkeerde blanco werd gebruikt: 20 μ L RPMI met 10% FCS werd verdund met 40 μ L water, en hiervan werd 7,5 μ L per reactie toegevoegd. Er is aspecifieke amplificatie zichtbaar op de gel als gevolg van stoffen aanwezig in het kalfsserum. In de volgende proeven werd een mengsel van Ford-mix, primerverduunning en water gebruikt als blanco. Er werd telkens een positieve controle meegenomen, die gemaakt werd door een willekeurig genomisch DNA-staal te verdunnen tot een concentratie van 20 ng/ μ L.

In de volgende stappen werden de verdunningen gemaakt volgens het huidige protocol, namelijk door 40 μ L cultuur toe te voegen aan 15 mL PBS. Van deze verdunning werden aliquots van 0,5 mL genomen en gecentrifugeerd op 1000g gedurende 10 minuten. Er werden reacties ingezet vanuit het

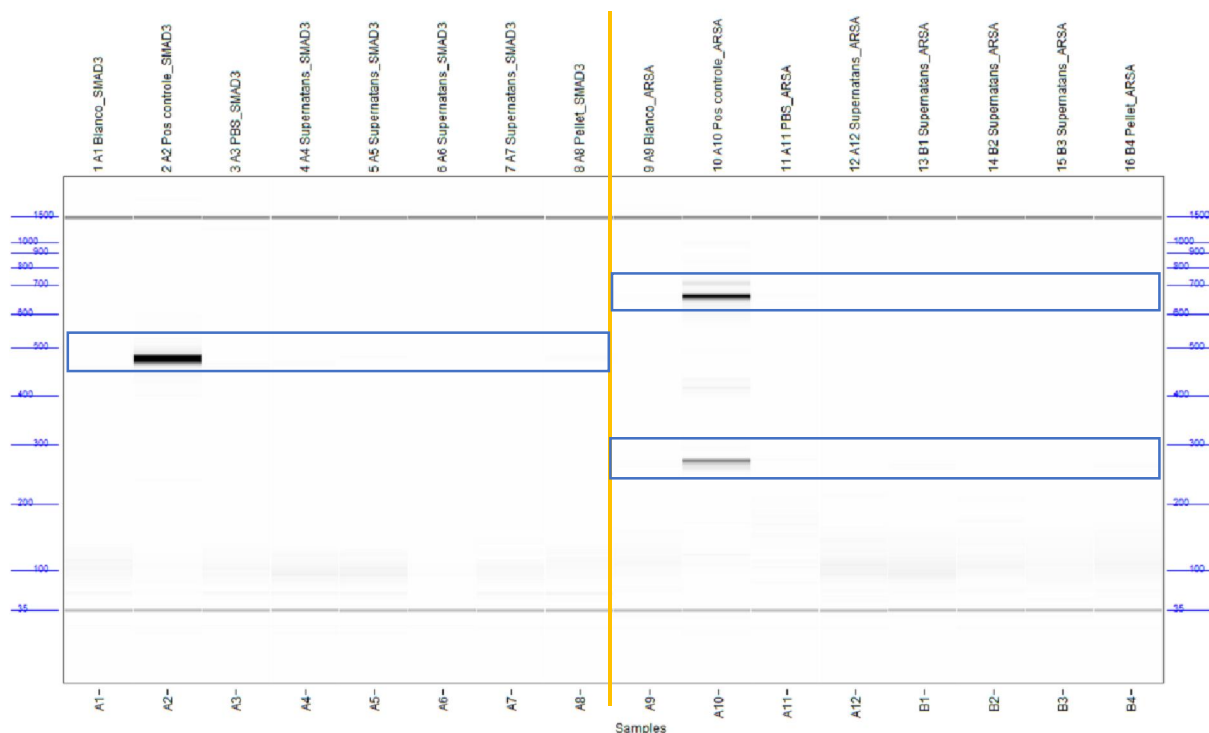
supernatans en de minimale celpellet die opgelost werd in een klein restvolume supernatans. Figuur 31 toont het bandenpatroon van deze PCR-producten. Het is duidelijk dat er opnieuw overal amplificatie is gebeurd. Voor deze reacties werd opnieuw een blanco en positieve controle meegenomen, die bijna overal de verwachte resultaten gaven. Bij de producten van het *ARSA*-gen bleken er enkele aspecifieke producten aanwezig te zijn. Een deel hiervan zullen waarschijnlijk opnieuw primerdimeren zijn als gevolg van de relatieve overmaat aan primer in de reactiemix.



Figuur 31: Resultaat van Fragment Analyzer na centrifugeren van aliquots. Er werd een PCR ingezet vanuit het supernatans en vanuit de opgeloste "pellet". De blauwe kaders tonen de verwachte resultaten voor het *SMAD3*-gen (links van de gele lijn) en de verwachte producten van het *ARSA*-gen (rechts).

Tot slot toont Figuur 32 het bandenpatroon van de laatste PCR's waarbij er enkel een opgezogen volume supernatans werd toegevoegd in plaats van enkele microliters. Dit werd gedaan omdat het eerder gebruikte volume supernatans niet in verhouding stond met het volume verdunde cultuur dat wordt opgezogen bij het isoleren van de cellen. Omdat er in de onverdunde cultuur ook dode lymfocyten zitten, kan het DNA van deze gelyseerde lymfocyten vrij "rondzwemmen" doorheen de cultuur. Dit vrij DNA kan dus mee worden opgenomen in het volume dat aan de PCR-reacties werd toegevoegd en zo aanleiding geven tot amplificatie. Indien dit gebeurt, weet men niet van hoeveel cellen het DNA afkomstig is, en kan het zijn dat dit een negatief effect heeft op de op puntstelling van de PCR-condities. Het laatste experiment trachtte uit te maken of het vrij DNA voor amplificatie zorgde, of dat het DNA afkomstig was van intacte lymfocyten. Daarom werd er voor dit experiment gewerkt met een zeer klein volume vloeistof, namelijk de hoeveelheid verdunde cultuur die meekomt met het opzuigen en uitblazen van de lymfocyten tijdens het isoleren. Het bandenpatroon van dit experiment

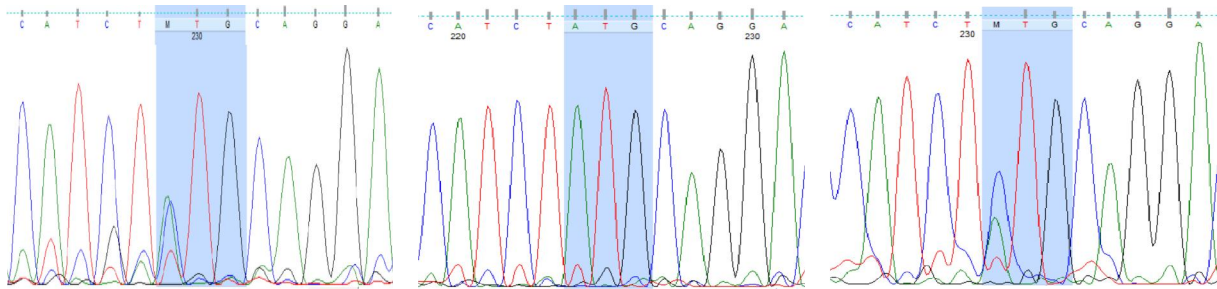
toont aan dat er geen amplificatie is gebeurd. Dit kan dus betekenen dat er geen lymfocyten in de PCR-reactie aanwezig waren, en dat er evenmin voldoende vrij DNA aanwezig was om geamplificeerd te kunnen worden. De overige proeven vertrokken steeds vanuit een volume van enkele microliters verdunde cultuur en leverden wel telkens amplificatie op. Het zou dus kunnen dat deze amplificatie het gevolg was van vrij DNA dat reeds in de verdunde cultuur aanwezig was, en dat er dus geen lymfocyten in de PCR-reactie zaten.



Figuur 32: Resultaten van Fragment Analyzer na centrifugeren van aliquots, waarna slechts een beperkt volume supernatans werd opgezogen en uitgeblazen in een epje met de reactiemix. De blauwe kaders tonen de resultaten voor het SMAD3-gen (links van de gele lijn) en de verwachte producten van het ARSA-gen (rechts).

3.3 Testen van betrouwbaarheid Repli-g kit

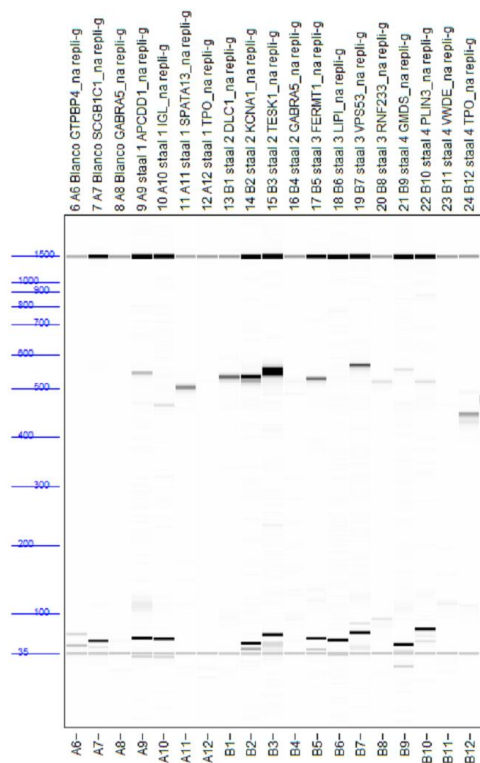
Bijlage 5 en 6 tonen de gekozen primers en de resultaten van de sequenties in het genomisch DNA. Op basis van de bekomen sequenties uit het genomisch DNA-staal werd besloten om 6 primers niet te testen op het product van de Repli-g kit, omdat deze sequenties niet bruikbaar waren. De overige 17 primers leverden een zeer mooie sequentie op: de persoon was heterozygoot voor 14 van deze SNP's en homozygoot voor de overige 3. Bij het bekijken van de sequentieresultaten van het *SCGB1C1*-gen viel op dat de man een extra variant had 2 plaatsen voorbij de eigenlijke SNP (c.211A>G). Deze extra variant werd mee in rekening gebracht bij het vergelijken van de resultaten met de sequenties afkomstig van het geamplificeerd DNA. Figuur 33 toont de sequenties van deze 3 nucleotiden in het genomisch DNA, een 1/50 en een 1/25 verdunning van het Repli-g product.



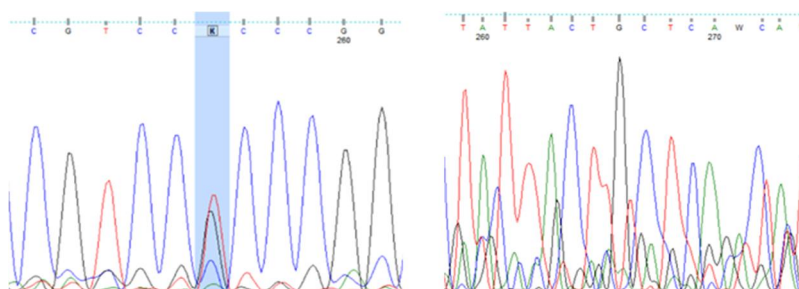
Figuur 33: Sequenties van het SCGB1C1-gen bekomen uit het genomisch DNA (links), een 1/50 (midden) en een 1/25 verdunning (rechts) van het Repli-g product.

Om de betrouwbaarheid van de kit te toetsen werd er enkel verder gewerkt met de 17 primers die een goede sequentie opleverden in het genomisch DNA. Uit de lymfocytencultuur van dezelfde persoon werden 4 epjes gevuld met 3 tot 9 cellen per epje. Na het volgen van de voorgeschreven procedure werden de 4 epjes gebruikt om te sequencen met de Sanger methode. In de bijsluiter werd aangeraden om het vermenigvuldigd product 1/100 te verdunnen alvorens te starten met PCR-reacties. Bij dit experiment werden 2 epjes 1/100 verdund en de andere 2 epjes werden 1/50 verdund. Er werden 2 pogingen ondernomen vanuit hetzelfde Repli-g product om tot een degelijk resultaat te komen.

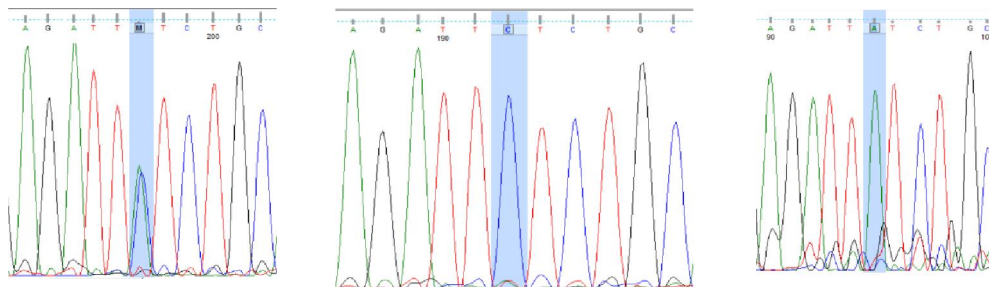
Figuur 34 toont de resultaten van Fragment Analyzer na een steekproef bij de eerste PCR-producten. Het is duidelijk dat er in veel gevallen geen of zeer zwakke banden te zien zijn op de gel, wat reeds doet vermoeden dat er geen succesvolle amplificatie heeft plaatsgevonden. De PCR-producten werden gesequeneerd met de Sanger techniek. Dit leverde zeer slechte resultaten op, zoals te zien op Figuur 35: er waren heel wat sequenties onbruikbaar of mislukt. Voor een aantal primers werden wel bruikbare sequenties bekomen, maar kwam het genotype niet overeen met het genotype dat gevonden werd in het genomisch DNA van dezelfde persoon. Dit wordt in Figuur 36 geïllustreerd voor het *JGL*-gen.



Figuur 34: Bandenpatroon van de PCR-producten vanuit het bekomen DNA na Repli-g. Staal 1 en 2 werden 50x verdund, staal 3 en 4 werden 100x verdund.



Figuur 35: De sequentie van het gDNA voor het APCCD-gen met de verwachte SNP in de blauwe balk (heterozygoot CT). Rechts op de figuur een deel van de mislukte sequentie voor hetzelfde gen vanuit een 100x verdund Repli-g product.



Figuur 36: Sequenties van het IGL-gen. De gDNA sequentie links toont de SNP (heterozygoot AC) in de blauwe balk. In het midden staat de sequentie vanuit het Repli-g product na 50x verdunden (homozygoot CC) en rechts staat het resultaat na het Repli-g product 25x te verdunden (homozygoot AA). In dit gen ging er een allel verloren na Repli-g en bovendien waren er verschillen tussen 2 verdunningen onderling. Opmerkelijk is dat overal de sequenties net voor en net na de blauwe balk hetzelfde zijn.

Na de eerste mislukte poging werd op aanraden van de laboratoriumsupervisor de proef herhaald met een verdunning van 1/25 en werden als steekproef voor 2 primers de Repli-g producten niet verdund. Ook deze resultaten waren niet goed: opnieuw waren er heel wat mislukte of onbruikbare sequenties en afwijkingen ten opzichte van de resultaten uit het genomisch DNA. In sommige gevallen waren er zelfs afwijkingen tussen de verschillende verdunningen die gebruikt werden. Bijlage 6 geeft een overzicht van de gebruikte primers en de resultaten na sequencen.

4 Discussie

4.1 Houdbaarheid lymfocytenculturen

Parallel aan de testen voor de aanpassing van het protocol werd onderzocht hoe lang een onderhouden cultuur en een niet onderhouden cultuur bruikbaar blijven. Hoewel na 2 à 3 weken bleek dat de cellen duidelijk kleiner werden, is het toch opvallend dat de cultuur zonder regelmatige verse voedingsstoffen zo lang levende cellen blijft behouden. Regelmatig toevoegen van verse voedingsstoffen zorgt er wel voor dat de cellen langer blijven leven en hun normale grootte behouden. In principe is het dus mogelijk om het isoleren van lymfocyten langer dan 2 weken uit te stellen, al zijn er dan, ook bij een onderhouden cultuur, reeds meer dode cellen merkbaar. Bij het isoleren van de lymfocyten worden geen kleurstoffen gebruikt en dus is het niet mogelijk om het onderscheid te maken tussen levende en dode cellen. Om die reden is het dan ook niet aangewezen om meer dan 2 weken te wachten met het isoleren van de cellen. Eventueel kan men overwegen om de cellen slechts 1 keer per week verse voeding te geven, maar hieraan zijn weinig voordelen verbonden. Het verversen duurt slechts enkele minuten en verbruikt weinig producten. Deze minieme aanpassing aan het protocol van de celcultuur heeft dus weinig meerwaarde.

4.2 Verdunningsprotocol

Omdat het CMGG op termijn hoopt om de PGD-testen uit te breiden en te laten accrediteren, dringen zich enkele aanpassingen of bijkomende testen op. Indien een accreditatie zou leiden tot een groter aantal aanvragen, dan is de huidige isolatietechniek een beperkende factor in de capaciteit van het labo. Er werd daarom gepoogd om deze techniek aan te passen zodat in de toekomst het isoleren van lymfocyten vlotter kan verlopen. Omdat het isoleren van een klein aantal lymfocyten de meest tijdrovende stap is, leek het vereenvoudigen van deze stap de meest aangewezen verbetering. Het verdunnen van de lymfocyten zou verschillende voordelen opleveren:

- Er zijn weinig handelingen nodig en deze kunnen op een korte tijd gedaan worden. De vereiste technieken zijn eenvoudig.

- De handelingen kunnen gespreid worden over verschillende LAF-kasten. Deze verhoging van de capaciteit is een troef indien er veel culturen tegelijk moeten worden verdund.
- De gebruiker kan eenvoudig de handelingen voor meerdere culturen tegelijk uitvoeren. Het volstaat om de epjes met verdunningen zorgvuldig te labelen.
- De tellingen door de Cellometer en de Excelberekeningen kunnen verzameld worden en kunnen ten allen tijde worden geraadpleegd, zowel digitaal als op papier.
- Het volgen van de procedure resulteert in een hogere standaardisering van de resultaten.
- De enige microscoop in het weefsellaboratorium hoeft niet gebruikt te worden voor het isoleren van lymfocyten en kan beschikbaar blijven voor andere onderzoeksactiviteiten.

Een rekenblad werd opgesteld om op basis van het aantal cellen in de onverdunde cultuur te berekenen hoe de cultuur verdund moest worden. Net als in de oorspronkelijke isolatietechniek is het de bedoeling dat de verdunning slechts 3 tot 9 cellen bevat in een volume van 5 μL . Omdat een doorsnee cultuur ongeveer 1 tot 1,5 miljoen cellen per mL kan bevatten, zijn er meerdere tussenverdunningen nodig om vlot en zuinig te kunnen werken. Na meerdere pogingen bleek dat er geen cellen zichtbaar waren in de microscopische preparaten. Dit kan te wijten zijn aan een aantal factoren die moeilijk te controleren of te verbeteren zijn.

Alles staat of valt uiteraard met de **meting van het aantal cellen** in de initiële cultuur. Hiervoor werd het Nexcelom Cellometer toestel gebruikt dat ingesteld kon worden voor verschillende celtypes. Er werd weliswaar steeds voor hetzelfde celtype gekozen, maar het was niet duidelijk of dit het meest geschikte type was. In eerste instantie werd er 20 μL rechtstreeks uit de cultuur gepipetteerd op het telglasje. Deze werkwijze gaf echter zeer grote verschillen bij meerdere tellingen uit dezelfde cultuur. Voor de volgende pogingen werd daarom eerst een verdunning gemaakt. Deze kon trouwens veel gemakkelijker gehomogeniseerd worden en hieruit werd de rest van het protocol uitgevoerd. Deze aanpassing had een zeer gunstig effect op de kwaliteit van de tellingen van de Nexcelom Cellometer.

Ook bij het verdere verloop van het protocol is het **homogeniseren** van de verdunningen een cruciale stap om een kwalitatief resultaat te bekomen. In de eerste stappen is het verschil tussen de hoeveelheid toegevoegde (verdunde) cultuur en de hoeveelheid verdunningsvloeistof relatief klein. Pas in de laatste stap wordt deze verhouding scheefgetrokken wanneer er 200 μL verdunde cultuur wordt toegevoegd aan meerdere milliliters PBS. Het grote eindvolume laat zich moeilijker homogeniseren en bovendien wordt er hieruit slechts 5 μL genomen. Wellicht is dit de belangrijkste oorzaak van het mislukken van de experimenten.

Mogelijk kunnen de toe te voegen **volumes verkleind** worden door extra verdunningsstappen toe te voegen of door de bestaande verdunningen opnieuw uit te rekenen. Wegens tijdsgebrek kon dit niet meer in de praktijk getest worden.

Hoewel er geen cellen gezien werden met de microscoop, leverden PCR-reacties van een aliquot van 5 μ L uit de eindverdunning toch amplificatie op. Omdat de testen werden uitgevoerd op oude culturen, is het niet ondenkbaar dat het DNA dat geamplificeerd werd, afkomstig was van dode cellen in de cultuur. Op basis van een geslaagde PCR kan men namelijk niet bewijzen dat er wel degelijk 3 tot 9 cellen in het aliquot aanwezig waren. Daarom werden er enkele mogelijkheden naar voren gebracht om de eventuele aanwezige **cellen** in het aliquot te **scheiden** van de vloeistof met eventueel vrij DNA. Centrifugeren was de enige methode die meteen kon getest worden. Men kan eventueel ook overwegen om een procedure met magnetische beads te ontwikkelen of om gebruik te maken van geavanceerde kleuringen of scheidingen op basis van (gelabelde) antilichamen. Dit kon echter niet uitgevoerd worden omdat de optimalisatie hiervan veel tijd vergt en deze technieken bovendien gepaard gaan met een aanzienlijke kostprijs.

In de literatuur werd geen bruikbare centrifugatiesnelheid en -tijd gevonden. Na overleg met de laboratoriumsupervisor en enkele laboranten werd beslist om de aliquots gedurende 10 minuten te centrifugeren op 1000g. Voor deze experimenten is het belangrijk dat de eventuele cellen intact blijven en een pellet vormen na centrifugatie, zodat het supernatans enkel vrij DNA bevat. Op die manier zou een PCR kunnen uitgevoerd worden van het supernatans en van de pellet.

De analyse van de bekomen PCR-producten gaf niet het verhoopte resultaat: de verschillen in intensiteit waren miniem en wellicht niet significant. Het is zeer moeilijk om te achterhalen wat hiervan de oorzaak kan zijn, maar wellicht was de instelling van de centrifuge niet optimaal. Er was bovendien nauwelijks een pellet zichtbaar, wat kan wijzen op een slechte centrifugatie of op een gebrek aan cellen. Met bijkomende testen kan getracht worden om het programma voor de centrifuge op punt te stellen. Men dient hierbij rekening te houden dat er geen scheiding optreedt wanneer er niet sterk genoeg wordt gecentrifugeerd, maar dat te hard centrifugeren de intacte cellen mogelijk kan beschadigen, waardoor er alsnog DNA vrijkomt. Eventuele intacte lymfocyten zullen tijdens het PCR-programma lyseren: ze worden gedurende een uur blootgesteld aan wisselende temperaturen tussen 60°C en 95°C. Op die manier komt het DNA vrij in het reactiemengsel. Achteraf, bij de interpretatie, is echter op geen enkele manier de herkomst van het DNA te achterhalen.

Vervolgens werden er enkele stalen ingezet waarbij er slechts een beperkte hoeveelheid supernatans werd opgezogen. Op die manier werd het volume vloeistof dat mee opgezogen wordt bij het isoleren van de cellen beter benaderd dan wanneer er 5 μ L werd gepipetteerd. Deze resultaten waren opnieuw niet volgens verwachting. Er werd bij deze stalen geen amplificatie gevonden in het supernatans, maar er werd evenmin een PCR-product gevonden bij de lymfocytenpellet.

Wanneer al deze resultaten naast elkaar worden gelegd, rijst het vermoeden dat er geen lymfocyten in de aliquots zaten. Er werden microscopisch niet met zekerheid lymfocyten gezien, en de bandenpatronen doen vermoeden dat de amplificaties het gevolg waren van vrij circulerend DNA. Een andere verklaring zou kunnen zijn dat de centrifuge niet optimaal was afgesteld. Mogelijk werden de aliquots te kort of te lang en/of te zwak of te sterk gecentrifugeerd. In de beschikbare bronnen (o.a. internet) kon hierover geen betrouwbare informatie gevonden worden zodat men deze condities verder zal moeten trachten te verfijnen via *trial and error*.

4.3 Repli-g kit

Tot slot werd de betrouwbaarheid van de Repli-g Single Cells kit (Qiagen) getest, doch slechts op stalen van één mannelijke patiënt. Er werd een panel van 23 heterozygote SNP's gevalideerd door een medestudente, waarna deze primers gebruikt werden om het genotype van de patiënt te bepalen op een genomisch DNA-staal. De Sanger sequencer was voor 17 van de 23 primers succesvol en toonde aan dat de man in 14 van deze 17 gelukte sequenties de verwachte SNP droeg. Nadien werden er lymfocyten van dezelfde patiënt behandeld met de Repli-g kit om het startmateriaal te vermenigvuldigen nog vóór de eigenlijke PCR-reacties. Om de juistheid van deze vermenigvuldiging na te gaan, werden de sequenties van de 17 primers opnieuw bepaald en vergeleken met het genotype dat bekomen werd uit het genomisch DNA.

Het is zeer opvallend dat er heel veel mislukte sequenties zijn: sommigen zijn slechts enkele tientallen basenparen lang of hebben een onleesbaar piekenpatroon. Voor andere genen werden de basen vóór en ná de SNP goed bepaald, maar werd één van de allelen van de SNP niet gelezen. Hierdoor leek de patiënt homozygoot te zijn, hoewel de sequenties uit het genomisch DNA toonden dat hij heterozygoot was voor dit polymorfisme. De SNP op het *IGL*-gen is hiervan een voorbeeld. Uit het genomisch DNA bleek de man heterozygoot te zijn (AC), terwijl de sequenties na behandeling met Repli-g toonden dat de man ofwel homozygoot CC ofwel homozygoot AA was.

Bovenstaande test werd herhaald met verschillende verdunningen, maar dit leverde geen duidelijke verschillen op. In de bijsluiter werd aangeraden om de producten 1/100 te verdunnen, maar de stalen met deze verdunning gaven het vaakst een mislukte sequentie. Wanneer dezelfde Repli-g producten slechts 25 keer of zelfs niet verdund werden, was er nog steeds een belangrijke afwijking te zien ten opzichte van de verwachte resultaten uit het genomisch DNA. Heel wat genen hadden zelfs verschillende sequenties wanneer hetzelfde product anders verdund werd.

De bekomen resultaten zouden op het eerste zicht voldoende zijn om de kit resoluut af te keuren. Toch moeten er enkele kanttekeningen gemaakt worden bij de bevindingen. Zo werden de lymfocyten volgens de gebruikelijke manier manueel "gepikt". Aangezien deze methode reeds uitvoerig werd getest, verwacht men niet meteen problemen bij dit deel van de proef. Zoals aangehaald in de

beschrijving van het protocol, werden alle gebruikte volumes gehalveerd ten opzichte van de voorgeschreven volumes. Omdat alles in verhouding werd aangepast, zou men niet verwachten dat dit voor problemen zou zorgen. Toch is het echter niet volledig uit te sluiten dat bijvoorbeeld het DNA-polymerase onvoldoende werkzaam kon zijn. Wanneer er ten gevolge van één van deze factoren onvoldoende DNA werd vermenigvuldigd, is het logisch dat de resultaten zeer wisselend zijn. Er werd immers steeds vanuit de 4 oorspronkelijke epjes met Repli-g product verdund.

Tot slot kunnen onzorgvuldigheden zoals pipetteerfouten eveneens een nefaste invloed hebben op de resultaten. Ook kunnen ethanolresten na de magnetische zuivering een storend effect hebben op de kwaliteit van de sequenties, waardoor er mogelijk meer sequenties mislukt zijn.

5 Besluit

Met het oog op toekomstige accreditaties werden enkele cruciale stappen in het hele PGD-proces herbekeken en reeds gekende pijnpunten onder de loep genomen. Het praktisch werk focuste op drie fasen in dit proces: de levensduur van lymfocytenculturen, het isoleren van cellen uit deze culturen en de voorafgaande vermenigvuldiging van het DNA afkomstig uit de geïsoleerde lymfocyten.

Er werden twee culturen een maand lang dagelijks microscopisch bekeken, waarbij één cultuur onderhouden werd en de andere geen verse voeding kreeg. Op basis van een kleuring met trypaanblauw kon een onderscheid gemaakt worden tussen dode en levende lymfocyten, zodat geschat kon worden hoe lang de culturen minstens 50% levende cellen behielden. Het was opmerkelijk dat beide culturen gedurende lange tijd bruikbaar bleven. Pas op het einde van de periode werd duidelijk dat de niet-onderhouden cellen kleiner en minder talrijk werden. Op basis van deze informatie kan men zich een beeld vormen van de periode waarin celculturen bruikbaar blijven om er lymfocyten uit te isoleren. De huidige test kan uitgebreid of verfijnd worden, door bijvoorbeeld langer te testen of door te bevestigen met PCR-reacties. Eventueel kan ook het Nexcelom Cellometer toestel ingeschakeld worden om een nauwkeurigere schatting te maken van het percentage levende cellen.

Vervolgens werd getracht om de huidige arbeidsintensieve isolatietechniek om te buigen naar een meer gebruiksvriendelijke methode, waarbij er uiteraard niet mag ingeboet worden aan de hoge kwaliteitsnormen voor de accreditatie van de ganse PGD-procedure. Voor de start van de experimenten leek het verdunnen van culturen de meest aangewezen methode. Tijdens de uitvoering werd getracht om de verdunningstechniek te staven met sluitende bewijzen, maar er werd vooralsnog geen nieuwe methode ontwikkeld die voldoet aan de vereisten. Er kunnen voorlopig geen resultaten voorgelegd worden die aantonen dat elk aliquot van een verdunde cultuur een beperkt aantal cellen bevat waarmee de PCR-condities geoptimaliseerd kunnen worden.

In 4.2 werden enkele suggesties gedaan om de verdunningstechniek te verbeteren, maar deze voorstellen konden nog niet getoetst worden in de praktijk. De meest eenvoudige manier is het aanpassen van de gebruikte volumes bij de verschillende verdunningen. Hierdoor moet er in de laatste verdunningsstap minder PBS toegevoegd worden, zodat de eindverdunning hopelijk een homogener mengsel oplevert.

Het verfijnen en uitdenken van nieuwe protocols is meestal een complexe evenwichtsoefening tussen accuraatheid, praktische haalbaarheid en financiële impact van een bepaalde techniek. Mits een verdere theoretische onderbouwing kunnen enkele van de gesuggereerde verbeteringen eventueel verder getest worden, zodat de beoogde verdunningstechniek uiteindelijk in een aangepaste vorm kan gebruikt worden.

Tot slot werd er ook een kit getest die men wilde gebruiken om het startmateriaal te vermenigvuldigen, zodat er meerdere PCR's kunnen uitgevoerd worden vanuit één embryonaal biopt. Het spreekt voor zich dat deze kit dan volkomen foutloos moet werken, zo niet bestaat de kans dat een mutatie gemist wordt, met alle gevolgen van dien. Op basis van de stalen van slechts één patiënt bleek deze kit echter niet aan de voorwaarden te voldoen. Heel wat sequenties waren mislukt of hadden belangrijke afwijkingen ten opzichte van de sequenties gevonden in het genomisch DNA. Eén van de mogelijke oorzaken is dat de kit zelf niet goed werkt, waardoor er nog vóór het sequencen reeds fouten zijn gebeurd. In principe zou men op basis van deze resultaten de kit kunnen afvoeren, maar om te vermijden dat de kit te snel wordt afgekeurd, is het wellicht zinvol om de hele procedure grondig te herhalen voor meerdere stalen, en eventueel met meerdere kits van hetzelfde type om "productiefouten" in de gebruikte kit uit te sluiten.

Algemeen besluit

In het CMGG kunnen patiënten zowel terecht voor een genetische diagnose als voor prenataal advies. De nood aan een genetische diagnose kan onder meer verklaard worden door het feit dat heel wat spieraandoeningen een klinische overlap hebben. Hierdoor is het niet altijd mogelijk om enkel op basis van klinische gegevens een diagnose te stellen. De genetische diagnose kan dan een nieuw licht op de situatie laten schijnen, of in zeldzame gevallen de diagnose van de arts corrigeren. In andere gevallen heeft de arts wel al een idee van de mogelijke causale mutatie en dient de genetische bevestiging van de diagnose vooral om de patiënt in de toekomst te kunnen begeleiden bij zijn of haar kinderwens. Wanneer men een gekende mutatie heeft, biedt prenataal advies een oplossing om te vermijden dat de eventuele kinderen dezelfde mutatie zouden dragen. PGD is hierbij een belangrijke techniek om enkel de embryo's zonder de mutatie te selecteren. Dit wil echter niet zeggen dat de toekomstige ouders verdere eisen kunnen stellen om hun kind te "designen". De PGD-procedure verloopt in verschillende stappen en neemt heel wat tijd in beslag. Sommige delen zijn nog voor verbetering vatbaar of onvoldoende gedocumenteerd om een accreditatie te kunnen behalen.

De resultaten van het praktisch werk lopen sterk uiteen, doch dit is inherent aan onderzoeks- of experimenteel werk. Na enkele weken stage werd een mutatie ontdekt die niet eerder beschreven was in de literatuur. Deze werd succesvol bevestigd en men voert nu een functionele studie uit met het oog op een wetenschappelijke publicatie. Dit mooie resultaat werd verbazend vlot behaald, terwijl andere delen van het praktisch werk heel wat voeten in de aarde hadden. Zo werden 110 patiënten gescreend op een recent ontdekte mutatie in een intron in *COL6A1*, waarbij de ontdekkers meenden dat tot een kwart van de suggestieve, maar nog onverklaarde, patiëntenpopulatie de mutatie zou hebben. In het CMGG vonden we evenwel in geen enkele van de 110 patiënten deze mutatie terug.

Ook voor het PGD-luik werden niet alle verwachtingen ingelost: er werd een kit getest om DNA te vermenigvuldigen nog voor er PCR werd uitgevoerd. De "Single Cell" kit faalde echter om het genetisch materiaal van enkele lymfocyten foutloos te kopiëren. Dit werd getest op basis van een heterozygoot SNP-panel waarvan we de resultaten van de kit vergeleken met het genotype van één willekeurig staal. Tot slot hoopte men de isolatieprocedure van de lymfocyten te vereenvoudigen, maar dit zelf ontworpen protocol stond na heel wat pogingen nog niet op punt. Er werden daarbij nog wel een aantal verbeteringen voorgesteld, zodat de nieuwe procedure hopelijk toch nog kan gebruikt worden.

Het belangrijkste besluit uit deze 12 weken stage is dat men in de wetenschap nooit iets *a priori* mag uitsluiten. Een kritische blik is absoluut nodig om zinvol werk te leveren: alle resultaten moeten steeds in vraag gesteld worden, ook al lijken ze op het eerste zicht weinig belangrijk. Een eigenschap die alle collega's in het CMGG gemeen hebben, is een open geest en een oog voor detail om ook de minder voor de hand liggende zaken op te pikken en verder uit te diepen. Hoewel sommige inspanningen achteraf tevergeefs kunnen blijken, kunnen andere bevindingen een schot in de roos zijn.

Lijst met figuren

| | |
|---|----|
| Figuur 1: Schematisch overzicht van de functie of ligging van de aangetaste eiwitten in de spieren bij verschillende types van LGMD (Mitsuhashi & Kang, 2012). | 9 |
| Figuur 2: Persoon met duidelijke scapula alata aan de rechterzijde (Shoulderdoc, 2016)..... | 11 |
| Figuur 3: MRI beelden van de dijspieren van een persoon met LGMD2A (C) en van haar zus die veel mildere symptomen heeft (D). (Veloso de Albuquerque, Neto, Alencar da Silva, Zanotelli, & Reed, 2015)..... | 12 |
| Figuur 4: Schematische voorstelling van motorische units en de actiepotentiaal bij een normale persoon en een persoon met een myopathie. (Paganoni & Amato, 2013). | 12 |
| Figuur 5: Foto van een spierbiopt van een patiënt met LGMD2C. (Russell, Weiss, Distad, & Castellani, 2014)..... | 13 |
| Figuur 6: Overzicht van de spierstructuur op verschillende niveaus ingezoomd. (Junquiera & Carneiro, 2007)..... | 15 |
| Figuur 7: Illustratie van de verschillende stappen in de beweging van Gowers (Epo Medicine, 2016). De patiënten hebben de armen nodig om vanaf een liggende of zittende positie stelselmatig rechtop te komen (a-d). Ze gebruiken hun handen om op de bovenbenen te duwen om zichzelf rechtop te duwen (e-h). | 16 |
| Figuur 8: Overzicht van de synthese van collageen type VI (Reed, 2009). | 24 |
| Figuur 9: Typische hypermobiliteit van de vingers van een patiënt met Ullrich musculaire dystrofie (Bönnemann, 2011) (Foto eigendom van Prof. Dr. Marjo Van Der Knaap, VUMC Amsterdam). | 25 |
| Figuur 10: Schematische voorstelling van enkele mogelijke effecten van een mutatie t.h.v. splice-sites (Cummings, et al., 2016). | 30 |
| Figuur 11: Schematische voorstelling van de workflow tijdens het uitvoeren van de praktische experimenten. | 31 |
| Figuur 12: Overzicht van de verschillende stappen in het NGS-proces (Lu, Shen, Warren, & Walter, 2016)..... | 32 |
| Figuur 13: Overzicht van de stappen tijdens de brugamplificatie om de clusters te vormen. (Braem, Next Generation Sequencing, 2016). | 33 |
| Figuur 14: Schematisch overzicht van de stappen in 1 PCR-cyclus (Fester, 2005)..... | 34 |
| Figuur 15: Principe van universele primers (Seq Answers forum, 20). | 35 |
| Figuur 16: Structuur van de dNTP's en de ddNTP's. Door de ontbrekende OH-groep kan er geen volgend nucleotide worden ingebouwd aan een ddNTP (Vereecke, 2014). | 37 |

| | |
|--|----|
| Figuur 17: Overzicht van het originele Sanger-principe (ATD Bio, sd). | 38 |
| Figuur 18: Resultaten van immunohistochemische kleuringen op wildtype-zebravissen (WT) en homozygoot gemuteerde zebravissen. | 45 |
| Figuur 20: Kritische bedenkingen bij PGD (Don Quijote, 2011) (Big Picture, 2014)..... | 49 |
| Figuur 20: Overzicht van de stappen bij het uitvoeren van een biopsie van trofoblasten uit de trofocoderm (dag 5-7) (Capalbo, et al., 2014).. | 51 |
| Figuur 21: Scheiding na centrifugeren: de lymfocyten liggen op de scheidingslaag tussen het bloedplasma en Lymphoprep..... | 52 |
| Figuur 22: Telglasje waarop 2 culturen gepipetteerd kunnen worden. Elke telkamer heeft 2 gaatjes: in het eerste wordt het staal gepipetteerd, terwijl de lucht langs het andere gaatje ontsnapt (eigen foto)..... | 56 |
| Figuur 24: Nexcelom Cellometer Auto T4 teltoestel (eigen foto). | 57 |
| Figuur 25: Printscren van het programma met de celconcentratie en het microscopisch beeld zichtbaar (eigen foto). | 57 |
| Figuur 26: Originele foto's van de onderhouden (linksboven) en niet-onderhouden cultuur (rechtsboven). Dezelfde foto's werden in Word 50% verscherpt (linksonder en rechtsonder)..... | 63 |
| Figuur 26: Gedetailleerde foto van dode cellen uit de niet-onderhouden cultuur (foto genomen op 10/4/2017). | 64 |
| Figuur 27: Foto van de onderhouden cultuur op 11/4/2017..... | 64 |
| Figuur 28: Foto van de niet-onderhouden cultuur op 11/4/2017.. | 65 |
| Figuur 29: Resultaten van Fragment Analyzer. Links van de lijn zijn de producten van SMAD3, rechts staan de ARSA-producten. "Epje" staat voor de reacties waarvoor er 7,5 μ L lysaat werd overgepipetteerd naar een epje met de reactiemix. "Rest lysaat" zijn de reacties waarvoor de mastermix werd toegevoegd aan de rest van het lysaat. De gele kader toont de aspecifieke primerdimeren. De blauwe kader toont links de producten van SMAD3 en rechts de verwachte producten van ARSA..... | 66 |
| Figuur 30: Resultaat van Fragment Analyzer na centrifugeren van aliquots van verschillende tussenverduunningen. De blauwe kaders tonen de resultaten voor het SMAD3-gen (links van de gele lijn) en de verwachte producten van het ARSA-gen (rechts). | 67 |
| Figuur 31: Resultaat van Fragment Analyzer na centrifugeren van aliquots. Er werd een PCR ingezet vanuit het supernatans en vanuit de opgeloste "pellet". De blauwe kaders tonen de verwachte resultaten voor het SMAD3-gen (links van de gele lijn) en de verwachte producten van het ARSA-gen (rechts). | 68 |
| Figuur 32: Resultaten van Fragment Analyzer na centrifugeren van aliquots, waarna slechts een beperkt volume supernatans werd opgezogen en uitgeblazen in een epje met de reactiemix. De blauwe | |

| | |
|---|----|
| kaders tonen de resultaten voor het SMAD3-gen (links van de gele lijn) en de verwachte producten van het ARSA-gen (rechts). | 69 |
| Figuur 34: Sequenties van het SCGB1C1-gen bekomen uit het genomisch DNA (links), een 1/50 (midden) en een 1/25 verdunning (rechts) van het Repli-g product. | 70 |
| Figuur 34: Bandenpatroon van de PCR-producten vanuit het bekomen DNA na Repli-g. Staal 1 en 2 werden 50x verdund, staal 3 en 4 werden 100x verdund..... | 71 |
| Figuur 35: De sequentie van het gDNA voor het APCCD-gen met de verwachte SNP in de blauwe balk (heterozygoot CT). Rechts op de figuur een deel van de mislukte sequentie voor hetzelfde gen vanuit een 100x verdund Repli-g product. | 71 |
| Figuur 36: Sequenties van het IGL-gen..... | 71 |

Lijst met tabellen

| | |
|--|----|
| Tabel 1: Overzicht van de genen en hun eiwitproducten die gelinkt zijn aan de autosomaal dominante subtypes van LGMD..... | 7 |
| Tabel 2: Overzicht van de genen en eiwitproducten die gelinkt zijn aan de autosomaal recessieve subtypes van LGMD..... | 8 |
| Tabel 3: Overzicht van de genen en eiwitproducten die gelinkt zijn aan de X-gebonden vormen van LGMD..... | 9 |
| Tabel 4: Overzicht van de klinische verschijnselen van de LGMD1-subtypes (CK = Creatinekinase).... | 14 |
| Tabel 5: Samenvatting van de voornaamste klinische gevolgen van de verschillende LGMD2-subtypes. | 18 |
| Tabel 6: Vergelijking van de genen in het huidige LGMD-panel dat gebruikt wordt in het CMGG en het panel dat gebruikt wordt in het labo in Napels..... | 21 |
| Tabel 7: PCR-programma met gebruikte tijden en temperaturen..... | 36 |
| Tabel 8: Samenstelling reactiemix voor 1 reactie. | 38 |
| Tabel 9: Sequenceringsprogramma op de gebruikte PCR-toestellen. | 38 |
| Tabel 10: Procedure opzuivering met magnetische beads. | 39 |
| Tabel 11: Overzicht varianten van klasse 4 (likely pathogenic) en klasse 5 (pathogenic) die gevonden werden na de heranalyse van de exoomdata met het uitgebreide genpanel. (AR = Autosomaal Recessief, AD = Autosomaal Dominant)..... | 41 |

| | |
|---|----|
| Tabel 12: Overzicht van de varianten van klasse 3. (AR = Autosomaal Recessief, XLD = X-linked Dominant)..... | 41 |
| Tabel 13: Overzicht van de resultaten vanuit het labo in Napels en de resultaten na bevestiging in het CMGG. | 42 |
| Tabel 14: Oorspronkelijk Ford-programma met daarnaast enkele wijzigingen zoals regelmatig gebruikt bij de oppuntstelling..... | 54 |
| Tabel 15: Touch-down programma dat gebruikt kan worden bij het oppuntstellen van de reactiecondities. De annealingstemperatuur met * daalt elke cyclus met 1°C tot de uiteindelijke temperatuur die gebruikt wordt in de volgende 40 cycli..... | 54 |
| Tabel 16: Onderhoudsschema van de lymfocytenculturen die gebruikt werden bij het testen van de leefbaarheid. | 55 |
| Tabel 17: Aangepast Ford-programma voor het SMAD3-gen..... | 58 |
| Tabel 18: Touch-down programma dat gebruikt werd voor het ARSA-gen..... | 59 |
| Tabel 19: Aangepaste Ford-mix voor 1 reactie zoals gebruikt voor de PCR's van SMAD3 en ARSA. | 59 |

Bibliografie

- ATD Bio. (sd). *ATD Bio*. Opgehaald van Sequencing, Forensic Analysis and Genetic Analysis: <http://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis>
- Big Picture. (2014, December). *Big Picture*. Opgehaald van Whose rights? Genetic testing before birth: <https://bigpictureeducation.com/whose-rights-genetic-testing-birth>
- Biological Industries. (sd). *Phytohemagglutinin-M (PHA-M), Liquid*. Opgehaald van Biological Industries: <http://www.bioind.com/phytohemagglutinin-m-pha-m-liquid/>
- Bönnemann, C. G. (2011). The collagen VI-related myopathies: Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. In R. C. Griggs, & A. A. Amato, *Muscular Dystrophies* (pp. 81-96). Amsterdam: Elsevier.
- Braem, C. (2016). Diagnostische enzymen. In C. Braem, *Cursus Klinische Chemie Theorie ML3* (pp. 18-21).
- Braem, C. (2016). Next Generation Sequencing. In C. Braem, *Moleculaire Biologie theorie 3BL*. Hoboken: Karel de Grote Hogeschool.
- Capalbo, A., Rienzi, L., Cimadomo, D., Maggiulli, R., Elliott, T., Wright, G., . . . Ubaldi, F. M. (2014). Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Human Reproduction*, 1173-1181.
- Chang, R. F., & Mubarak, S. J. (2012). Pathomechanics of Gowers' Sign. *Clinical orthopaedics and related research*, 1987-1991.
- Cummings, B. B., Marshall, J. L., Tukiainen, T., Lek, M., Donkervoort, S., Foley, A. R., . . . MacArthur, D. G. (2016, September 8). *Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing*. Opgehaald van Biorxiv: <http://biorxiv.org/content/early/2016/09/09/074153>
- De Jaegere, S., Vereecke, I., & Baetens, M. (2016). *Primerdesign voor Ford: geautomatiseerd en manueel*. Gent: UZ Gent.
- De Leeneer, K. (2016). *FORD algemeen protocol: PCR en sequencieren volgens de FORD-workflow*. Gent: Centrum voor Medische Genetica Gent.
- Don Quijote. (2011, Maart 22). *Don Quijote Spanish Language Learning*. Opgehaald van First baby born in Spain without a gene associated with cancer: <http://blog.donquijote.org/2011/3/first-baby-born-in-spain-without-a-gene-associated-with-cancer>
- Donkervoort, S., Hu, Y., Stojkovic, T., Voermans, N., Foley, A. R., Leach, M. E., . . . Bönnemann, C. G. (2015). Mosaicism for dominant collagen VI mutations as a cause for intra-familial phenotypic variability. *Human Mutation*, 48-56.
- Duchenne, G. (1868). Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myosclerotique. *Archives Générales de Médecine*, 5-25.
- Ehmsen, J., Poon, E., & Davies, K. (2002). The dystrophin-associated protein complex. *Journal of Cell Science*, 2801-2803.

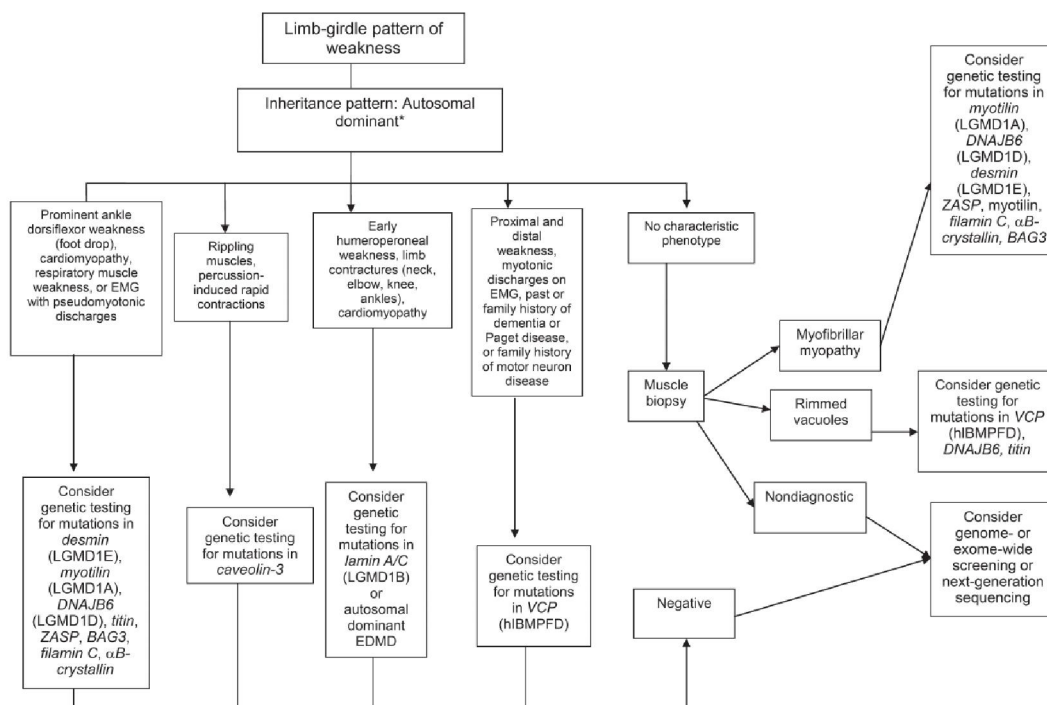
- Epo Medicine. (2016, November 12). *Gowers' Sign*. Opgehaald van Epo Medicine: <http://epomedicine.com/clinical-medicine/gowers-sign/>
- Fester, N. (2005, November 7). *PCR Lab*. Opgehaald van University of Las Vegas: https://faculty.unlv.edu/wmojica/PCR_LAB2.htm
- Firman, G. (2009, Maart 23). *Medical Research Council (MRC) Scale for Muscle Strength*. Opgehaald van Medical Criteria: <http://www.medicalcriteria.com/site/home/64-neurology/238-neuromrc.html>
- Fitzgerald, J., Rich, C., Zhou, F. H., & Hansen, U. (2008). Three Novel Collagen VI Chains, alpha4 (VI), alpha5 (VI) and alpha6 (VI). *Journal of Biological Chemistry*, 20170-20180.
- Goderis, N. (2015). *Isolatie van lymfocyten uit vers bloed*. Gent: UZ Gent.
- Green, R. C., Berg, J. S., Grody, W. W., Kalia, S. S., Korf, B. R., Martin, C. L., . . . Biesecker, L. G. (2013). ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genetics in Medicine*, 565-574.
- Groulx, J.-F., Gagné, D., Benoit, Y. D., Martel, D., Basora, N., & Beaulieu, J.-F. (2011). Collagen VI is a basement membrane component that regulates epithelial cell–fibronectin interactions. *Matrix Biology*, 195-206.
- Iyadurai, S. P., & Kassar, D. (2014). Limb-Girdle Muscular Dystrophies. In B. Katirji, H. J. Kaminski, & R. L. Ruff, *Neuromuscular Disorders in Clinical Practice* (pp. 1193-1211). New York: Springer-Verlag New York.
- Jöbsis, G. J. (1999). *Collagen VI mutations in Bethlem myopathy (PhD thesis)*. Amsterdam: Universiteit van Amsterdam.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2007). Bindweefsel. In L. C. Junqueira, & J. Carneiro, *Functionele Histologie* (pp. 117-148). Maarssen: Elsevier gezondheidszorg.
- Junquiera, L. C., & Carneiro, J. (2007). Spierweefsel. In L. C. Junquiera, & J. Carneiro, *Functionele Histologie* (pp. 265-286). Maarssen: Elsevier gezondheidszorg.
- Kalia, S. S., Adelman, K., Bale, S. J., Chung, W. K., Eng, C., Evans, J. P., . . . Miller, D. T. (2017). Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in Medicine*, 249-255.
- Kaplan, J.-C., & Hamroun, D. (2015). The 2016 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscular Disorders*, 991-1020.
- Kapustin, Y., Chan, E., Sarkar, R., Wong, F., Vorechowsky, I., Winston, R. M., . . . Dibb, N. J. (2011). Cryptic splice sites and split genes. *Nucleic Acids Research*, 5837-5844.
- Kniffin, C. L. (2016, Februari 12). *OMIM #616812*. Opgehaald van Muscular Dystrophy, Limb-Girdle, Type 2X; LGMD2X: <https://www.omim.org/entry/616812>
- Kniffin, C. L. (2016, Augustus 13). *OMIM #617072*. Opgehaald van Muscular Dystrophy, Limb-Girdle, Type 2Y; LGMD2Y: <https://www.omim.org/entry/617072>
- Kniffin, C. L. (2016, December 1). *OMIM #617232*. Opgehaald van Muscular Dystrophy, Limb-Girdle, Type 2Z; LGMD2Z: <https://www.omim.org/entry/617232>

- Lampe, A. K., Flanigan, K. M., Bushby, K. M., & Hicks, D. (2012, Augustus 9). *Collagen Type VI-Related Disorders*. Opgehaald van GeneReviews: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1503/?report=classic>
- Larner, A. J. (2016). Gowers' Manoeuvre, Gowers' Sign. In A. J. Larner, *A Dictionary of Neurological Signs* (p. 142). Springer.
- Lu, Y., Shen, Y., Warren, W., & Walter, R. (2016, Januari 14). *Intech Open*. Opgehaald van Next Generation Sequencing in Aquatic Models: <https://www.intechopen.com/books/next-generation-sequencing-advances-applications-and-challenges/next-generation-sequencing-in-aquatic-models>
- Mills, K. R. (2005). The Basics of Electromyography. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, ii32-ii35.
- Mitsuhashi, S., & Kang, P. B. (2012). Update on the Genetics of Limb Girdle Muscular Dystrophy. *Seminars in Pediatric Neurology*, 211-218.
- Muscles Used. (sd). *Gastrocnemius & Soleus (Calf)*. Opgehaald van Muscles Used: <http://www.musclesused.com/gastrocnemius-soleus-calf-muscles/>
- Narayanaswami, P., Weiss, M., Selcen, D., David, W., Raynor, E., Carter, G., . . . Amato, A. A. (2014). Evidence-based guideline summary: Diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies. *Neurology*, 1453-1463.
- Nigro, V., & Savarese, M. (2014). Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myologica*, 1-12.
- Paganoni, S., & Amato, A. (2013). Electrodiagnostic Evaluation of Myopathies. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America*, 193-207.
- Pegoraro, E., & Hoffman, E. P. (2012, Augustus 30). *Limb-Girdle Muscular Dystrophy Overview*. Opgehaald van GeneReviews (R): https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1408/#_NBK1408_pubdet_
- Presidential Commission for the Study of Bioethical Issues. (2016, Oktober 30). *For Researchers: Incidental and Secondary Findings*. Opgehaald van Bioethics Archive Georgetown University: <https://bioethicsarchive.georgetown.edu/pcsbi/sites/default/files/Researcher%20Primer%20Incidental%20Findings%2010.30.16.pdf>
- Reed, U. C. (2009, Juni). *Congenital muscular dystrophy. Part II: a review of pathogenesis and therapeutic perspectives*. Opgehaald van SciELO, Arquivos de Neuro-Psiquiatria: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2009000200035
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., . . . Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 405-424.
- Russell, J. W., Weiss, M. D., Distad, B. J., & Castellani, R. J. (2014). Muscle and Myotonic Diseases. In E. L. Feldman, W. Grisold, J. W. Russell, & W. N. Löscher, *Atlas of Neuromuscular Diseases: A Practical Guideline* (pp. 247-281). Wien: Springer-Verlag.

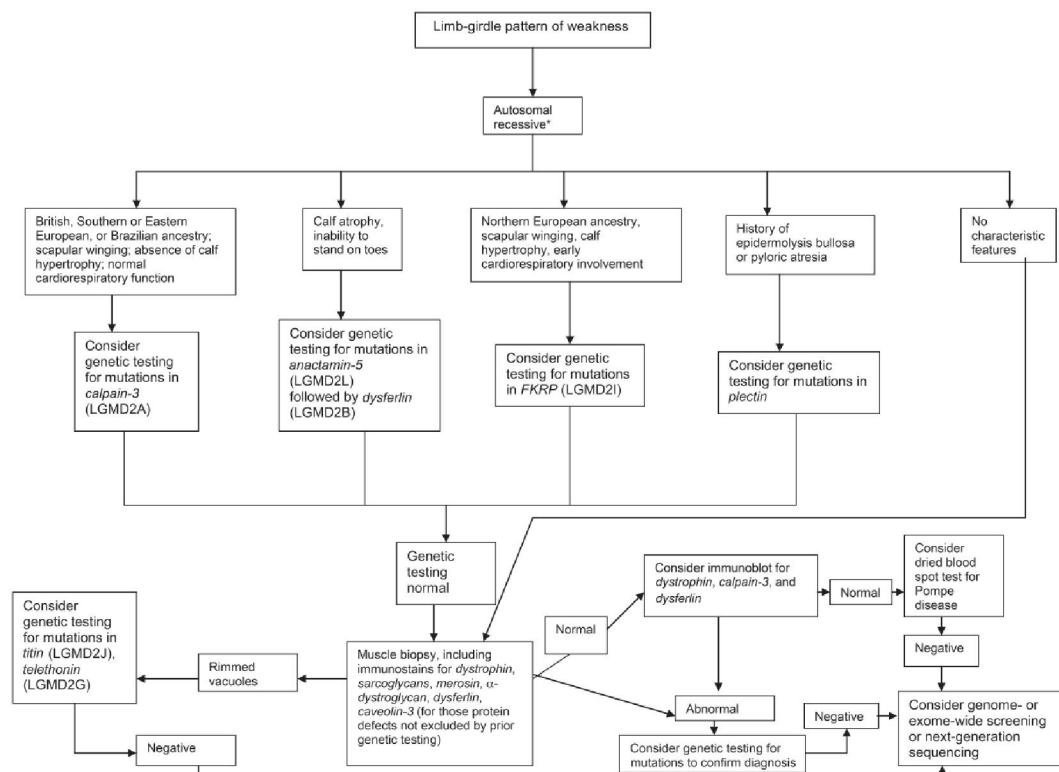
- Sabatelli, P., Gualandi, F., Gara, S. K., Grumati, P., Zamparelli, A., Martoni, E., . . . Wagener, R. (2012). Expression of collagen VI alpha 5 and alpha6 chains in human muscle and in Duchenne muscular dystrophy-related muscle fibrosis. *Matrix Biology*, 187-196.
- Schindler, R. F., Scotton, C., Zhang, J., Passarelli, C., Ortiz-Bonnin, B., Simrick, S., . . . Ferlini, A. (2016). POPDC1 (S201F) causes muscular dystrophy and arrhythmia by affecting protein trafficking. *The Journal of Clinical Investigation*, 239-253.
- Seq Answers forum. (20, November 2012). *Seq Answers forum*. Opgehaald van Primer design Universal tailed Amplicon: <http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=25128>
- Shoulderdoc. (2016, Februari 11). *Winging Scapula*. Opgehaald van Shoulderdoc: <https://www.shoulderdoc.co.uk/section/492>
- Sigma Aldrich. (sd). *Fetal Bovine Serum*. Opgehaald van Fetal Bovine Serum: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/cell-culture-products.html?TablePage=9628642>
- Stevenson, A. C. (1953). Muscular Dystrophy in Northern Ireland: I. An account of the condition in fifty-one families. *Annals of Eugenics*, 50-93.
- Symoens, S., Van Acker, P., & Van Holm, E. (sd). *Pre-implantatie Genetische Diagnostiek (PGD) voor monogene aandoeningen (ongepubliceerde versie)*.
- Thermo Fisher Scientific. (sd). *Thermo Fisher Scientific*. Opgehaald van DTT (dithiothreitol): Description: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R0861>
- U.Z. Brussel Centrum voor Medische Genetica. (2016, December 21). *Overerving*. Opgehaald van Centrum voor Medische Genetica UZ Brussel: http://www.brusselgenetics.be/moza%C3%AFcisme_nl?doscroll=true#L4-5107
- U.Z. Leuven. (2015, Januari 16). *Scoliose bij kinderen*. Opgehaald van Website van de dienst orthopedie van het UZ Leuven: <https://www.uzleuven.be/nl/scoliose-bij-kinderen>
- Veloso de Albuquerque, M. A., Neto, O. A., Alencar da Silva, F. M., Zanotelli, E., & Reed, U. C. (2015). Limb-girdle muscular dystrophy type 2A in Brazilian children. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 993-997.
- Vereecke, I. (2014). *Cycle sequencing manueel*. Gent: Centrum Medische Genetica Gent.
- Vlaamse Centra voor Menselijke Erfelijkheid. (2017). *Alles goed met mijn baby?* Opgehaald van Centrum voor Medische genetica Gent: <https://www.cmegg.be/nl/pati%C3%ABnt/brochures>
- Walton, J. N., & Nattrass, F. J. (1954). On the Classification, Natural History and Treatment of the Myopathies. *Brain Vol 77*, 169-231.

Bijlagen

Bijlage 1: Leidraad voor het diagnosticeren van LGMD (Narayanaswami, et al., 2014)



*Autosomal dominant, autosomal recessive, or X-linked inheritance may be responsible in sporadic cases. EDMD = Emery-Dreifuss muscular dystrophy; hBMPFD = hereditary inclusion body myopathy with Paget disease and frontotemporal dementia; LGMD = limb-girdle muscular dystrophy; VCP = valosin-containing protein.



*Autosomal dominant, autosomal recessive, or X-linked inheritance may be responsible in sporadic cases. LGMD = limb-girdle muscular dystrophy.

Bijlage 1: Schema's als leidraad bij diagnose van LGMD1 en LGMD2

Bijlage 2: DNA-verdunningen van de patiëntenstalen voor de COL6A1-screening

| Pat. Nr. | conc ng/uL | μL H2O | μL DNA |
|----------|------------|--------|---------|
| P1 | 1517 | 100 | 2,67 |
| P2 | 984 | 50 | 1,04 |
| P3 | 542 | 50 | 1,92 |
| P4 | 570 | 50 | 1,82 |
| P5 | 864 | 50 | 1,18 |
| P6 | 320 | 50 | 3,33 |
| P7 | 308 | 50 | 3,47 |
| P8 | 631 | 50 | 1,64 |
| P9 | 294 | 50 | 3,65 |
| P10 | 198 | 50 | 5,62 * |
| P11 | 162 | 50 | 7,04 |
| P12 | 384 | 50 | 2,75 |
| P13 | 621 | 50 | 1,66 |
| P14 | 321 | 50 | 3,32 * |
| P15 | 982 | 50 | 1,04 |
| P16 | 982 | 50 | 1,04 |
| P17 | 708 | 50 | 1,45 |
| P18 | 941 | 50 | 1,09 * |
| P19 | 284 | 50 | 3,79 |
| P20 | 724 | 50 | 1,42 |
| P21 | 889 | 50 | 1,15 |
| P22 | 84 | 50 | 15,63 |
| P23 | 321 | 50 | 3,32 |
| P24 | 50 | 50 | 33,33 * |
| P25 | 250 | 50 | 4,35 |
| P26 | 198 | 50 | 5,62 |
| P27 | 554 | 50 | 1,87 |
| P28 | 758 | 50 | 1,36 |
| P29 | 246 | 50 | 4,42 |
| P30 | 939 | 50 | 1,09 |
| P31 | 330 | 50 | 3,23 * |
| P32 | 403 | 50 | 2,61 |
| P33 | 166 | 50 | 6,85 * |
| P34 | 347 | 50 | 3,06 |
| P35 | 200 | 50 | 5,56 |
| P36 | 285 | 50 | 3,77 |
| P37 | 348 | 50 | 3,05 |
| P38 | ? | ** | |
| P39 | 300 | 50 | 3,57 |
| P40 | 331 | 50 | 3,22 |
| P41 | 370 | 50 | 2,86 |
| P42 | 444 | 50 | 2,36 |
| P43 | 529 | 50 | 1,96 |
| P44 | 252 | 50 | 4,31 |
| P45 | 210 | 50 | 5,26 |
| P46 | 256 | 50 | 4,24 |
| P47 | 348,3 | 50 | 3,05 |
| P48 | 210 | 50 | 5,26 * |
| P49 | 202 | 50 | 5,49 * |
| P50 | ? | ** | |
| P51 | 240 | 50 | 4,55 |
| P52 | 345 | 50 | 3,08 |
| P53 | 80 | 50 | 16,67 |
| P54 | 59 | 50 | 25,64 |
| P55 | 201,3 | 50 | 5,52 |

| Pat. Nr. | conc ng/uL | μL H2O | μL DNA |
|----------|------------|--------|---------|
| P56 | 64,1 | 50 | 22,68 |
| P57 | 393 | 50 | 2,68 |
| P58 | ? | ** | |
| P59 | 319 | 50 | 3,34 |
| P60 | 242 | 50 | 4,50 |
| P61 | 429 | 50 | 2,44 |
| P62 | 149 | 50 | 7,75 |
| P63 | 684,7 | 50 | 1,50 |
| P64 | 910,3 | 50 | 1,12 |
| P65 | 450,9 | 50 | 2,32 |
| P66 | 363,1 | 50 | 2,91 |
| P67 | 88,2 | 50 | 14,66 * |
| P68 | 112 | 50 | 10,87 |
| P69 | 264 | 50 | 4,1 * |
| P70 | 315 | 50 | 3,39 * |
| P71 | 402 | 50 | 2,62 |
| P72 | 300 | 50 | 3,57 |
| P73 | 522 | 50 | 1,99 |
| P74 | 339 | 50 | 3,13 |
| P75 | 309 | 50 | 3,46 |
| P76 | 52 | 50 | 31,25 |
| P77 | 223 | 50 | 4,93 |
| P78 | 57 | 50 | 27,03 |
| P79 | 365 | 50 | 2,90 |
| P80 | 564 | 50 | 1,84 |
| P81 | 77 | 50 | 17,54 |
| P82 | 449 | 50 | 2,33 |
| P83 | 63 | 50 | 23,26 |
| P84 | 43 | 50 | 43,48 |
| P85 | 253 | 50 | 4,29 |
| P86 | 350 | 50 | 3,03 |
| P87 | 203 | 50 | 5,46 |
| P88 | 142 | 50 | 8,20 |
| P89 | 440 | 50 | 2,38 |
| P90 | 291 | 50 | 3,69 |
| P91 | 750 | 50 | 1,37 |
| P92 | 1124 | 50 | 0,91 |
| P93 | 904,45 | 50 | 1,13 |
| P94 | 960 | 50 | 1,06 |
| P95 | 1062,4 | 50 | 0,96 |
| P96 | 643,88 | 50 | 1,60 |
| P97 | 341 | 50 | 3,12 |
| P98 | 643,8 | 50 | 1,60 |
| P99 | 378 | 50 | 2,79 |
| P100 | 312 | 50 | 3,42 |
| P101 | 207 | 50 | 5,35 |
| P109 | 288 | 50 | 3,73 |
| P110 | 252 | 50 | 4,31 |
| P111 | 383 | 50 | 2,75 * |
| P112 | 303 | 50 | 3,53 |
| P113 | 250 | 50 | 4,35 |
| P114 | 671,95 | 50 | 1,53 |
| P115 | 322 | 50 | 3,31 |
| P116 | 392 | 50 | 2,69 |
| P117 | 336 | 50 | 3,16 |

* : Onvoldoende DNA aanwezig: 10 μL water toegevoegd

** : geen water toegevoegd na overleg met Mauro Milazzo

Bijlage 3: Rapporten na classificatie van positieve varianten uit het labo in Napels


Ford - Variant classificatie
 FDVAR1700933

Classificatie datum: 2017-05-05 12:47:03
 Medewerker: Milazzo Mauro (MML)
 Classificatie code: FDVC1700889
 Variant code: FDVAR1700933
 Gen: HSPG2
 RefSeq transcript ID: NM_005529.5
 Build: GRCh37/HG19
 g-notatie: 1_22182115_22182115_G/A
 c-notatie: c.5755C>T
 p-notatie: p.Arg1919Cys
 Oude Classificatie:
 Patient: D1601758
 Status: Goedgekeurd supervisor
 Commentaar: exon 46

Centrum voor Medische Genetica, Gent
Diensthooft
prof. Bruce Poppe

CLASSIFICATIE

CLASS 3 (Uncertain significance)

Criteria: the criteria for benign (BS2,BP6) and pathogenic (PP3) are contradictory

CLASSIFICATIE OVERRULED

CLASS 2 (Likely benign)

Commentaar: In gnomAd reeds homozygoten gerapporteerd

POPULATIEDATA

- * BS2: voor ziektes met een volledige penetrantie op jonge leeftijd: de variant is aanwezig in gezonde volwassen individuen (literatuur of eigen onderzoek)
 - in heterozygote vorm voor autosomaal dominante aandoeningen
 - in homozygote vorm voor autosomaal recessieve aandoeningen
 - in hemizygoten vorm voor X-gebonden aandoeningen

| DATABASE | ID | MAF |
|--------------|-----------|---------|
| dbSNP | rs2229474 | |
| ExAc | | 0.01549 |
| EPS (EVS) | | 0.0064 |
| 1000 Genomes | | 0.002 |
| GoNL | | 0.01 |

GENOTYPE EN FENOTYPE VAN DE PATIENT

- * Niet onderzocht / niet van toepassing
- * Commentaar: heterozygoot

LITERATUUR EN DATABANKEN

- * BP6: variant is goedaardig volgens betrouwbare bronnen
- . ClinVar ID: RCV000178604.1 / RCV000400614.1 / RCV000351708.1

COMPUTATIONELE EN PREDICTIEVE GEGEVENS

- * PP3: meerderheid (3/5) van de predictieprogramma's voorspellen dat de variant schadelijk is
 - . MutationTaster: Disease causing (p-value: 0.987)
 - . SIFT: Deleterious (score: 0.02)
 - . PolyPhen 2: PROBABLY DAMAGING
 - . Align GVGD:
 - PP3 resultaat: /
 - BP4 resultaat: Class C0 (GV: 262.60 - GD: 0.00)
 - . Grantham: 180

FUNCTIONELE GEGEVENS

- * Niet onderzocht

SEGREGATIE-DATA

- * Geen informatie en/of stalen van familieleden voorhanden

ALLELISCHE GEGEVENS (VIA ONDERZOEK VAN DE OUDERS)

- * Niet onderzocht / niet van toepassing

Bijlage 3a: Variant in HSPG2 bij P1.

Classificatie datum: 2017-05-09 12:34:21 Centrum voor Medische Genetica, Gent
 Medewerker: Milazzo Mauro (MML)
 Classificatie code: FDVC1700897
 Variant code: FDVAR1700934 Diensthoofd
 Gen: GBE1 prof. Bruce Poppe
 RefSeq transcript ID: NM_000158.3
 Build: GRCh37/HG19
 g-notatie: 3_81698005_81698005_A/G
 c-notatie: c.691+2T>C
 p-notatie: p.?
 Oude Classificatie:
 Patient: D1601758
 Status: Goedgekeurd techniker
 Commentaar:

CLASSIFICATIE

| |
|----------------------------------|
| CLASS 3 (Uncertain significance) |
|----------------------------------|

Criteria: classification criteria for classification as benign or pathogenic are not met (PVS1,PP3)

POPULATIEDATA

* Geen van bovenstaande opties is van toepassing

| DATABASE | ID | MAF |
|--------------|-------------|------------|
| dbSNP | rs192044702 | |
| ExAc | | 0.002 |
| EPS (EVS) | | 0.00160375 |
| 1000 Genomes | | |
| GoNL | | |

GENOTYPE EN FENOTYPE VAN DE PATIENT

* Niet onderzocht / niet van toepassing

* Commentaar: Heterozygoot

LITERATUUR EN DATABANKEN

* Geen info gevonden

COMPUTATIONELE EN PREDICTIEVE GEGEVENS

* PP3: meerderheid (3/5) van de predictieprogramma's voorspellen dat de variant schadelijk is

- . SIFT: -
- . PolyPhen 2: -
- . Align GVGD: -
- . Human Splicing Finder: 100.00% (var: 0 - wt: 93.268)
- . Genesplicer: 100.00% (var: 0 - wt: 1.81)
- . NNSPLICE: 100.00% (var: 0 - wt: 0.994344)
- . MaxEntScan: 100.00% (var: 0 - wt: 10.4715)
- . NearestSSChange: -1
- . LocalSpliceEffect: 0
- . Splicesite finder like: 3.58% (var: 84.2314 - wt: 87.3609)

* PVS1: nonsense, frameshift, splice site verandering (positie +/-1 of +/-2) of exondeletie in een gen waar 'verlies van functie' een gekend ziektemechanisme is (m.a.w. indien eerder in dit gen voor deze aandoening dit type varianten als pathogene varianten gedefinieerd werden).

FUNCTIONELE GEGEVENS

* Niet onderzocht

SEGREGATIE-DATA

* Geen informatie en/of stalen van familieleden voorhanden

ALLELISCHE GEGEVENS (VIA ONDERZOEK VAN DE OUDERS)

* Niet onderzocht / niet van toepassing

Bijlage 3b: Variant in GBE1 bij P1.



CENTRUM MEDISCHE
GENETICA GENT

Ford - Variant classificatie

FDVAR1700932

| | | |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| Classificatie datum: | 2017-05-05 12:21:36 | Centrum voor Medische Genetica, Gent |
| Medewerker: | Milazzo Mauro (MML) | |
| Classificatie code: | FDVC1700888 | Diensthoofd |
| Variant code: | FDVAR1700932 | prof. Bruce Poppe |
| Gen: | COL12A1 | |
| RefSeq transcript ID: | NM_004370.5 | |
| Build: | GRCh37/HG19 | |
| g-notatie: | 6_75833070_75833070_G/C | |
| c-notatie: | c.6922C>G | |
| p-notatie: | p.Pro2308Ala | |
| Oude Classificatie: | | |
| Patient: | D1609184 | |
| Status: | Goedgekeurd supervisor | |
| Commentaar: | exon 43 | |

CLASSIFICATIE

CLASS 3 (Uncertain significance)

Criteria: classification criteria for classification as benign or pathogenic are not met (BP4.)

POPULATIEDATA

* Geen van bovenstaande opties is van toepassing

| DATABASE | ID | MAF |
|--------------|--------------------------|-----------|
| dbSNP | rs55997127 | |
| ExAc | | 0.0005336 |
| EPS (EVS) | | 0.0004 |
| 1000 Genomes | | 0.0002 |
| GoNL | Geen informatie gevonden | |

GENOTYPE EN FENOTYPE VAN DE PATIENT

* Niet onderzocht / niet van toepassing

* Commentaar: heterozygoot

LITERATUUR EN DATABANKEN

* Geen info gevonden

COMPUTATIONELE EN PREDICTIEVE GEGEVENS

* BP4: meerderheid (3/5) van de predictieprogramma's voorspellen dat de variant goedaardig is

- . MutationTaster:
 - BP4 resultaat: /
 - PP3 resultaat: Disease causing (p-value: 1)
- . SIFT: Tolerated (score: 0.14)
- . PolyPhen 2:
 - BP4 resultaat: /
 - PP3 resultaat: POSSIBLY DAMAGING
- . Align GVD: Class C0 (GV: 208.64 - GD: 0.00)
- . Grantham: 27

FUNCTIONELE GEGEVENS

* Niet onderzocht

SEGREGATIE-DATA

* Geen informatie en/of stalen van familieleden voorhanden

ALLELISCHE GEGEVENS (VIA ONDERZOEK VAN DE OUDERS)

* Niet onderzocht / niet van toepassing

Bijlage 3c: Variant in COL12A1 bij P3.

| | | |
|-----------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| Classificatie datum: | 2017-05-05 12:04:29 | Centrum voor Medische Genetica, Gent |
| Medewerker: | Milazzo Mauro (MML) | |
| Classificatie code: | FDVC1700887 | Diensthoofd |
| Variant code: | FDVAR1700931 | prof. Bruce Poppe |
| Gen: | TTN | |
| RefSeq transcript ID: | NM_001267550.1 | |
| Build: | GRCh37/HG19 | |
| g-notatie: | 2_179404402_179404402_T/C | |
| c-notatie: | c.98390A>G | |
| p-notatie: | p.Asn32797Ser | |
| Oude Classificatie: | | |
| Patient: | D1610574 | |
| Status: | Goedgekeurd supervisor | |
| Commentaar: | Exon 352 | |

CLASSIFICATIE

| |
|----------------------------------|
| CLASS 3 (Uncertain significance) |
|----------------------------------|

Criteria: classification criteria for classification as benign or pathogenic are not met (BP6,)

CLASSIFICATIE OVERRULED

| |
|-------------------------|
| CLASS 2 (Likely benign) |
|-------------------------|

Commentaar: In gnomAd reeds homozygoten gerapporteerd

POPULATIEDATA

* Geen van bovenstaande opties is van toepassing

| DATABASE | ID | MAF |
|--------------|------------------------|----------|
| dbSNP | rs149001703 | |
| ExAc | | 0.006887 |
| EPS (EVS) | | 0.0081 |
| 1000 Genomes | Geen information found | |
| GoNL | | 0.009 |

GENOTYPE EN FENOTYPE VAN DE PATIENT

* Niet onderzocht / niet van toepassing

* Commentaar: Heterozygoot

LITERATUUR EN DATABANKEN

* BP6: variant is goedaardig volgens betrouwbare bronnen

. ClinVar ID: RCV000419770.1 ; RCV000226471.1

COMPUTATIONELE EN PREDICTIEVE GEGEVENS

* Geen van bovenstaande opties

FUNCTIONELE GEGEVENS

* Niet onderzocht

SEGREGATIE-DATA

* Geen informatie en/of stalen van familieleden voorhanden

ALLELISCHE GEGEVENS (VIA ONDERZOEK VAN DE OUDERS)

* Niet onderzocht / niet van toepassing

Bijlage 3d: Variant in TTN bij P4.

De andere positieve varianten stonden nog niet in het FORD-systeem.

Bijlage 4: Blanco en ingevuld rekenblad voor de lymfocytenverduunningen

Rekenblad voor validatie verduunning van lymfocytenculturen Vul eerst de oranje vakken in.

Maak een eerste verduunning van 0,2 mL cultuur en 0,2 mL PBS.
Meet 20 µL verduunning op het toestel en vul de meetwaarden in.

| | cultuur 1 | cultuur 2 | |
|--|-----------|-----------|-------------|
| Gemeten aantal cellen in verduunning 1 | #DEEL/0! | #DEEL/0! | cellen |
| Gemeten volume in mL of µL | 1 | 1 | mL |
| = | 1000 | 1000 | µL |
| concentratie cellen na verduunning 1 | #DEEL/0! | #DEEL/0! | cellen / mL |
| = 0,2 mL onverdunde cultuur + 0,2 mL PBS | #DEEL/0! | #DEEL/0! | cellen / µL |

Maak vanuit epje 1 een 2e voorverduunning in epje 2

| | | | |
|--|----------|----------|-------------|
| genomen volume verduunning 1 uit epje 1 | 0,20 | 0,20 | mL |
| = | 200,00 | 200,00 | µL |
| aantal cellen in genomen volume verduunning 1 | #DEEL/0! | #DEEL/0! | cellen |
| Leng aan met PBS tot 1 mL. Gebruik hiervoor | 800,00 | 800,00 | µL PBS. |
| Concentratie cellen in epje 2 na verduunning 2 | #DEEL/0! | #DEEL/0! | cellen / µL |

Maak vanuit epje 2 een 3e verduunning in een 50 mL flacon

| | | | |
|--|----------|----------|------------|
| Neem hiervoor uit epje 2 met verduunning 2: | 200,00 | 200,00 | µL |
| Hierin zitten | #DEEL/0! | #DEEL/0! | lymfocyten |
| Voeg PBS toe om de eindverduunning te bekomen: | #DEEL/0! | #DEEL/0! | mL PBS |

| | | | |
|---|------|------|-------------|
| gewenst aantal cellen per epje | 10 | 10 | cellen |
| gewenste concentratie na eindverduunning cultuur | 2 | 2 | cellen / µL |
| volume eindverduunning cultuur per epje toevoegen | 5,00 | 5,00 | µL |

+ 1 µL Trypaan Blauw per te tellen dekglaasje

Indien 3 druppels op 1 draagglaasje: 15 µL eindverduunning + 3 µL Trypaan Blauw ==> 6 µL op draagglaasje pipetteren.

cellen na verduunning 1

| | cultuur 1 | cultuur 2 |
|------------|-----------|-----------|
| meting 1 | | |
| meting 2 | | |
| meting 3 | | |
| gemiddelde | #DEEL/0! | #DEEL/0! |

| getelde cellen | cultuur 1 | cultuur 2 |
|----------------|-----------|-----------|
| telling 1 | | |
| telling 2 | | |
| telling 3 | | |
| telling 4 | | |
| telling 5 | | |
| telling 6 | | |
| telling 7 | | |
| telling 8 | | |
| telling 9 | | |
| telling 10 | | |
| telling 11 | | |
| telling 12 | | |
| telling 13 | | |
| telling 14 | | |
| telling 15 | | |

Bijlage 4a: Rekenblad voor lymfocytenverduunningen (blanco).

Rekenblad voor validatie verduunning van lymfocytenculturen Vul eerst de oranje vakken in.

Maak een eerste verduunning van 0,2 mL cultuur en 0,2 mL PBS.

Meet 20 µL van deze verduunning op het toestel en vul de meetwaarden in kolom E in.

| | cultuur 1 | cultuur 2 | |
|--|-----------|-----------|-------------|
| Gemeten aantal cellen in verduunning 1 | 1.536.667 | 641.667 | cellen |
| Gemeten volume in mL of µL | 1 | 1 | mL |
| = | 1000 | 1000 | µL |
| concentratie cellen na verduunning 1 | 1.536.667 | 641.667 | cellen / mL |
| = 0,2 mL onverdunde cultuur + 0,2 mL PBS | 1.537 | 642 | cellen / µL |

Maak vanuit epje 1 een 2e voorverduunning in epje 2

| | | | |
|--|---------|---------|-------------|
| genomen volume verduunning 1 uit epje 1 | 0,20 | 0,20 | mL |
| = | 200,00 | 200,00 | µL |
| aantal cellen in genomen volume verduunning 1 | 307.333 | 128.333 | cellen |
| Leng aan met PBS tot 1 mL. Gebruik hiervoor | 800,00 | 800,00 | µL PBS. |
| Concentratie cellen in epje 2 na verduunning 2 | 307 | 128 | cellen / µL |

Maak vanuit epje 2 een 3e verduunning in een 50 mL flacon

| | | | |
|--|--------|--------|------------|
| Neem hiervoor uit epje 2 met verduunning 2: | 200,00 | 200,00 | µL |
| Hierin zitten | 61.467 | 25.667 | lymfocyten |
| Voeg PBS toe om de eindverduunning te bekomen: | 30,53 | 12,63 | mL PBS |

| | | | |
|---|------|------|-------------|
| gewenst aantal cellen per epje | 10 | 10 | cellen |
| gewenste concentratie na eindverduunning cultuur | 2 | 2 | cellen / µL |
| volume eindverduunning cultuur per epje toevoegen | 5,00 | 5,00 | µL |

+ 1 µL Trypaan Blauw per te tellen dekglaasje

Indien 3 druppels op 1 draagglaasje: 15 µL eindverduunning + 3 µL Trypaan Blauw ==> 6 µL op draagglaasje pipetteren.

Bijlage 4b: Rekenblad voor lymfocytenverduunningen (ingevuld met fictieve waarden).

cellen na verduunning 1

| | cultuur 1 | cultuur 2 |
|------------|-----------|-----------|
| meting 1 | 1,54E+06 | 6,54E+05 |
| meting 2 | 1,59E+06 | 6,23E+05 |
| meting 3 | 1,48E+06 | 6,48E+05 |
| gemiddelde | 1,537E+06 | 6,417E+05 |

fictieve waarden ter illustratie

| getelde cellen | cultuur 1 | cultuur 2 |
|----------------|-----------|-----------|
| telling 1 | | |
| telling 2 | | |
| telling 3 | | |
| telling 4 | | |
| telling 5 | | |
| telling 6 | | |
| telling 7 | | |
| telling 8 | | |
| telling 9 | | |
| telling 10 | | |
| telling 11 | | |
| telling 12 | | |
| telling 13 | | |
| telling 14 | | |
| telling 15 | | |

Bijlage 5: Primerspecificaties voor SNP panel

| Gen | SNP ID | Conc. (nmol) | T _m (°C) | Sequentie |
|------------------|------------|--------------|---------------------|---|
| TPO F | rs732609 | 25,3nmol | 70,8°C | 5' GAG TGC CTG CCC TGG 3' |
| TPO R | rs732609 | 23,1nmol | 69,1°C | 5' GGG TGT AAG GCA GGG CG 3' |
| DNAH5 F | rs3734110 | 23,3nmol | 67,7°C | 5' CAC TTA CGC CAG AAT CCA GG 3' |
| DNAH5 R | rs3734110 | 20,5nmol | 66,2°C | 5' TCA GAG CTC TTA CCT GTC GC 3' |
| OSGEP F | rs938883 | 26,0nmol | 65,9°C | 5' TCT GCT AGA TTT CTA ACG ACC C 3' |
| OSGEP R | rs938883 | 26,4nmol | 64,0°C | 5' TCT ACT ATC TAG AAC AGC ATG TGG 3' |
| CNTN6 F | rs2013828 | 21,4nmol | 67,2°C | 5' ATT ATT GCC TGG AAA GCG GC 3' |
| CNTN6 R | rs2013828 | 25,1nmol | 64,9°C | 5' TGT TAT GCC CTT TGT TTG TTG G 3' |
| MXRA5 F | rs1635234 | 25,7nmol | 67,7°C | 5' CTG TCC ACT CTG CAG ATC G 3' |
| MXRA5 R | rs1635234 | 25,9nmol | 65,8°C | 5' GTC GGA AAC TGA TTG ACT GC 3' |
| RNF233 F | rs4333796 | 22,4nmol | 66,3°C | 5' AAT TAT CAG TCA GAG GCC CG 3' |
| RNF233 R | rs4333796 | 23,1nmol | 68,1°C | 5' CTG CTC AGC CTG TGG G 3' |
| MAN2B2 F | rs2301788 | 23,2nmol | 67,0°C | 5' TGT GCA TCA GGT TGG TAT CC 3' |
| MAN2B2 R | rs2301788 | 27,6nmol | 67,1°C | 5' GGA GGA GAA ATC GGC AGG 3' |
| VWDE F | rs6460939 | 20,2nmol | 64,9°C | 5' ACA GAG GCT TAC ATA AAT CAA GC 3' |
| VWDE R | rs6460939 | 24,2nmol | 65,2°C | 5' GGC TTA ATT AGT GTT GTA AGC AGC 3' |
| DLC1 F | rs532841 | 23,6nmol | 67,8°C | 5' GCG TCT CTT CAG TTC CTT GG 3' |
| DLC1 R | rs532841 | 22,1nmol | 66,7°C | 5' GGG ATG GAT GAG GAG AAG C 3' |
| TESK1 F | rs2275422 | 27,0nmol | 68,4°C | 5' CTA CTC AGT CCC TCC GAG C 3' |
| TESK1 R | rs2275422 | 21,8nmol | 65,6°C | 5' TGG CTA TTG AGT TGA ACG GG 3' |
| GTPBP4 F | rs2306409 | 22,5nmol | 66,8°C | 5' ACT ATG AGA GGC TAG GCA AGG 3' |
| GTPBP4 R | rs2306409 | 24,8nmol | 64,2°C | 5' TGT AAG ATT ATT AGG TCT GGT TGG G 3' |
| SCGB1C1 F | rs2686894 | 22,7nmol | 68,2°C | 5' GGA GGT CTA TGG AGT CTG GG 3' |
| SCGB1C1 R | rs2686894 | 28,1nmol | 67,7°C | 5' GAG TCA CCC TGT CCT GTC C 3' |
| KCNA1 F | rs1048500 | 22,9nmol | 68,8°C | 5' CTG GAG GCC CTT AGA GTG G 3' |
| KCNA1 R | rs1048500 | 24,6nmol | 67,4°C | 5' AGG TGT GGC TGC TCT TCG 3' |
| SPATA13 F | rs1220547 | 22,0nmol | 67,9°C | 5' CAC CTC CAA TCT TGC AGA CC 3' |
| SPATA13 R | rs1220547 | 29,5nmol | 67,2°C | 5' GGA ACT GTC GCT TTC CAC C 3' |
| GABRA5 F | rs140685 | 22,2nmol | 67,9°C | 5' GTG ACA CCT GCC TGT AAT CC 3' |
| GABRA5 R | rs140685 | 24,5nmol | 67,0°C | 5' CCT TGA TCT TGG CTG CTT CC 3' |
| CAPN15 F | rs11248937 | 24,6nmol | 69,4°C | 5' CAC ACC CAA CCC ATG CC 3' |
| CAPN15 R | rs11248937 | 19,1nmol | 67,9°C | 5' CCA TGG GAA GCT GAG CC 3' |
| APCDD1 F | rs9952934 | 40,0nmol | 67,5°C | 5' TTT GCT CTT GTC ACC CAG G 3' |
| APCDD1 R | rs9952934 | 32,3nmol | 67,1°C | 5' GGC TCT TTG GTG TCT CTG C 3' |
| PLIN3 F | rs1055919 | 19,9nmol | 67,8°C | 5' CCA GAT ATG GAG GGA AGG C 3' |
| PLIN3 R | rs1055919 | 27,5nmol | 65,8°C | 5' ATG AGA TTC CAA GAT GCC CG 3' |
| FERMT1 F | rs10373 | 23,4nmol | 68,9°C | 5' GAG CAC CTG GAA CCT TGC 3' |
| FERMT1 R | rs10373 | 25,6nmol | 66,0°C | 5' CCT GGG CTA TTT CTT TCT CTC C 3' |
| LIPI F | rs7278737 | 29,0nmol | 64,6°C | 5' TCA CAT TAA TAC AAG TGA CTT CTC C 3' |
| LIPI R | rs7278737 | 26,9nmol | 65,1°C | 5' CAC AGC CAA ATG AGA TAG AAT GG 3' |
| IGL F | rs6001413 | 24,7nmol | 67,6°C | 5' TAC AGT GTC AGT GGT CCA GG 3' |
| IGL R | rs6001413 | 21,7nmol | 65,8°C | 5' GTG GTC CAG TTT AAA CAG TGC 3' |
| GMDS F | rs3734739 | 26,2nmol | 66,0°C | 5' ACA AAT AAC ACA AGT AGG GCT GG 3' |
| GMDS R | rs3734739 | 34,1nmol | 66,8°C | 5' GCA TCC ACA CCA AGA AGT TCC 3' |
| VPS53 F | rs11247553 | 36,0nmol | 67,9°C | 5' GAC ATT GAG ACC TGG CTT CC 3' |
| VPS53 R | rs11247553 | 23,4nmol | 65,3°C | 5' ATG ACA AGG GAG GTT AGA GC 3' |

Bijlage 5: Tabel met gebruikte primersequenties (F = Forward primer; R = Reverse primer). Voor de rood gemarkeerde primers werd een annealingstemperatuur van 62°C gebruikt. Bij de overige primers was dit 60°C.

Bijlage 6: Resultaten SNP panel getest op genomisch DNA en Repli-g product

| Gen | Verwacht genotype | Resultaat uit gDNA | Resultaat na repli-g | Overeenkomst? | Resultaat na 25x verdunnen | Overeenkomst? Verschil tss verdunning |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|--|---|--|---|
| APCDD1 (18) | Hetero GT | Hetero GT | 1: mislukte sequentie 2: hetero GT 3: onbruikbare seq 4: mislukte sequentie | 1/1 gelukte 1/4 totaal | 1: onbruikbare sequentie 2: homo TT 3: onbruikbare sequentie 4: onbruikbare sequentie | 0/1 gelukte 0/4 totaal Slechter dan 50x / 100x |
| CAPN15 (16) | Hetero AG | Onduidelijk | | | | |
| CNTN6 (3) | Hetero AG | Mislukte sequentie | | | | |
| DLC1 (8) | Hetero CT | Hetero CT | 1: mislukte sequentie 2: hetero CT 3: onbruikbare seq 4: mislukte sequentie | 1/1 gelukte 1/4 totaal | 1: mislukte sequentie 2: hetero CT 3: onbruikbare sequentie 4: onbruikbare sequentie | 1/1 gelukte 1/4 totaal Geen verschil |
| DNAH5 (5) | Hetero AG | Mislukte sequentie | | | | |
| FERMT1 (20) | Hetero AG | Homo CC | 1: onbruikbare seq 2: homo CC 3: homo CC 4: homo CC | 3/3 gelukte 3/4 totaal | 1: homo CC 2: homo CC 3: onbruikbare sequentie 4: onbruikbare sequentie | 2/2 gelukte 2/4 totaal Slechter dan 50x / 100x (andere stalen mislukt, + meer mislukte stalen) |
| GABRA5 (15) | Hetero CT | Hetero CT | 1: onbruikbare sequentie 2: onbruikbare seq 3: mislukte sequentie 4: mislukte sequentie | 0/4 totaal | 1: onbruikbare sequentie 2: onbruikbare sequentie 3: mislukte sequentie 4: mislukte sequentie | 0/4 totaal |
| GMDS (6) | Hetero AG | Hetero AG | 1: mislukte sequentie 2: hetero AG 3: mislukte sequentie 4: mislukte sequentie | 1/1 gelukte 1/4 totaal | 1: onbruikbare sequentie 2: hetero AG 3: onbruikbare sequentie 4: onbruikbare sequentie | 1/1 gelukte 1/4 totaal Geen verschil |
| GTPBP4 (10) | Hetero CT | Hetero CT | 1: homo TT 2: homo TT 3: homo CC 4: homo CC | 0/4 gelukte | 1: homo TT 2: homo TT 3: homo CC 4: homo CC | 0/4 gelukte Geen verschil |
| IGL (22) | Hetero AC | Hetero AC | 1: hetero AT 2: homo CC 3: mislukte sequentie 4: onbruikbare sequentie | 0/2 gelukte 0/4 totaal | 1: homo AA 2: homo CC 3: onbruikbare sequentie 4: onbruikbare sequentie | 0/2 gelukte 0/4 totaal Geen of weinig verschil |
| KCNA1 (12) | Hetero AG | Hetero AG | 1: homo GG 2: homo GG 3: mislukte sequentie 4: mislukte sequentie | 0/2 gelukte 0/4 totaal | 1: homo GG 2: homo GG 3: onbruikbare sequentie 4: onbruikbare sequentie | 0/2 gelukte 0/4 totaal Geen verschil |
| LIPI (21) | Hetero GT | Homo TT | 1: mislukte sequentie 2: homo TT 3: mislukte sequentie 4: mislukte sequentie | 1/1 gelukte 1/4 totaal | 1: onbruikbare sequentie 2: onbruikbare sequentie 3: onbruikbare sequentie 4: onbruikbare sequentie | 0/4 totaal Slechter dan 50x / 100x |
| MAN2B2 (4) | Hetero CT | Mislukte sequentie | | | | |
| MXRA (X) | Hetero GC | Mislukte sequentie | | | | |
| OSGEP (14) | Hetero AG | Mislukte sequentie | | | | |
| PLIN3 (19) | Hetero AG | Hetero AG | 1: homo GG 2: AG? 3: mislukte sequentie 4: onbruikbare sequentie | 1/2 gelukte 1/4? Totaal | 1: homo GG 2: homo GG 3: onbruikbare sequentie 4: onbruikbare sequentie | 0/2 gelukte 0/4 totaal Slechter dan 50x / 100x |
| RNF233 (1) | Hetero AG | Hetero AG | 1: mislukte sequentie 2: mislukte sequentie 3: mislukte sequentie 4: mislukte sequentie | 0/4 totaal | 1: mislukte sequentie 2: mislukte sequentie 3: mislukte sequentie 4: onbruikbare sequentie | 0/4 totaal Geen verschil |
| SCGB1C1 (11) Extra variant | Hetero AC Homo AA | Hetero AC Homo GG | 1: homo AA + hom GG 2: onbruikbare sequentie 3: homo AA + homo GG 4: mislukte sequentie | 0/2 gelukte 0/4 totaal Extra: 2/2 gelukte | 1: homo AA + homo GG 2: hetero AC + homo GG 3: onbruikbare sequentie 4: mislukte sequentie | 1/2 gelukte 1/4 totaal Extra: 2/2 gelukte Beter dan 50x / 100x |
| SPATA13 (13) | Hetero CT | Hetero CT | 1: homo CC 2: hetero CT 3: onbruikbare sequentie 4: mislukte sequentie | 1/2 gelukte 1/4? Totaal | 1: homo CC 2: hetero CT 3: onbruikbare sequentie 4: onbruikbare sequentie | 1/2 gelukte 1/4 totaal Geen verschil |
| TESK1 (9) | Hetero CT | Hetero CT | 1: homo TT 2: hetero CT 3: mislukte sequentie 4: mislukte sequentie | 1/2 gelukte 1/4 totaal | 1: homo TT / hetero CT? 2: hetero CT 3: onbruikbare sequentie 4: onbruikbare sequentie | 2/2 gelukte? 2/4 totaal? Beter dan 50x / 100x? |
| TPO (2) | Hetero ACG | Hetero AC | 1: mislukte sequentie 2: onbruikbare sequentie 3: mislukte sequentie 4: onbruikbare seq | 0/4 totaal | 1: onbruikbare sequentie 2: mislukte sequentie 3: onbruikbare sequentie 4: onbruikbare sequentie | 0/4 totaal Geen verschil |
| VP53 (17) | Hetero CT | Homo TT | 1: homo TT 2: homo TT 3: homo TT 4: mislukte sequentie | 3/3 gelukte 3/4 totaal | 1: homo TT 2: homo TT 3: homo TT 4: mislukte sequentie | 3/3 gelukte 3/4 totaal Geen verschil |
| VWDE (7) | Hetero GC | Hetero GC | 1: mislukte sequentie 2: hetero GC 3: onbruikbare sequentie 4: mislukte sequentie | 1/1 gelukte 1/4 totaal | 1: mislukte sequentie 2: hetero GC 3: onbruikbare sequentie 4: mislukte sequentie | 1/1 gelukte 1/4 totaal Geen verschil |

Bijlage 6: Overzicht van de resultaten van de Repli-G kit. Kolom 4: staal 1 en 2: 50x verdund en staal 3 en 4: 100x verdund. Pogingen voor FERMT1 en GTPBP4 om niet te verdunnen: stalen 1, 2 en 3 waren telkens onbruikbare sequenties, staal 4 telkens CC. <https://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html> werd gebruikt om de base-ambigüiteit codes om te zetten.