**Samenvatting**

Met mutatie analyse kan er een variatie in één van de kandidaatgenen gevonden worden die de ziekte veroorzaakt. Wanneer hier niets uitkomt kan er gebruik gemaakt worden van (targeted) exome sequencing: filteren op pathogene varianten en verificatie van de pathogene variant. Patiënte P heeft aangegeven last te hebben van bepaalde symptomen. Door haar klinische verschijnselen te analyseren én een stamboomanalyse, kunnen we een diagnose stellen. Hierna kunnen we met mutatie analyse een variatie zoeken die verantwoordelijk is voor haar ziekte. Door het overervingspatroon; autosomaal dominant en de steekwoorden: (night blindness) AND tunnel vision, in de OMIM database op te zoeken is een diagnose vastgesteld. Een van de 111 mogelijke kandidaatgenen wordt gebruikt voor de mutatie analyse. PCR primers zijn ontworpen met behulp van Primer3Plus. Excel is gebruikt voor het filteren op pathogene varianten om later de overgebleven varianten met PCR en gelelektroforese te verifiëren. De 111 RP genen werden met targeted exome sequencing onderzocht op pathogene variaties. Mochten daar geen resultaten uit komen zal er verder gezocht worden met exome sequencing. Met behulp van de OMIM database is de ziekte Retinitis pigmentosa vastgesteld. Het SNRNP200 gen heeft geen gemuteerde varianten opgeleverd met de mutatie analyse. Met targeted exome sequencing zijn er geen pathogene varianten gevonden in de 111 RP genen. Omdat bij exome sequencing een variant naar voren kwam die bij targeted exome sequencing niet gevonden werd, kan er niet met zekerheid gezegd worden wat waar of onwaar is. Er kan een PCR-fout gemaakt zijn, de mutatie kan heterozygoot zijn of de mutatie ligt niet op één van de 111 RP genen. Wanneer er één fout gemaakt wordt aan het begin van de PCR-cyclus is de kans groot dat deze fout 30 cyclussen lang steeds opnieuw gekopieerd wordt waardoor het niet meer herkend zal worden als een PCR-fout. Een vervolgonderzoeksvraag zou kunnen zijn: Kunnen we het aantal PCR-fouten verminderen door betere/preciezere apparatuur te gebruiken?

**Aantal woorden: 315**

**Materiaal en Methode**

Stamboomanalyse

Tijdens genetic counseling zijn de symptomen vastgesteld en stamboomgegevens verzameld van patiënte P. Aan de hand van de stamboomgegevens zal een mendeliaans overervingspatroon van haar ziekte worden vastgesteld. Een stamboomanalyse is één van de methoden om genetisch onderzoek te doen. Wanneer er geen pathogene mutaties gevonden worden met mutatie analyse kan er met segregatie analyse (G.P.Jarvik, 1998) nog gekeken worden naar de stamboomgegevens en eventueel familie uitgenodigd worden voor een gesprek.

Diagnose stellen

Door het ziektebeeld en het overervingspatroon te analyseren is er een diagnose gesteld met behulp de OMIM database (McKusick, 1995). Door in de OMIM database de symptomen van patiënte P als steekwoorden te gebruiken: (night blindness) AND tunnel visioin, is Retinitis pigmentosa vastgesteld. Uit de potentiële kandidaatgenen is voor de mutatie analyse het kandidaatgen: SNRNP200 met accessiecode: 601664 gebruikt.

Mutatie analyse

Er is geanalyseerd of er een mutatie kan worden gevonden in het SNRN2000 gen, accessiecode 601664 uit de OMIM database, om zo te kunnen zeggen wat de ziekte van patiënte P veroorzaakt. De primers zijn ontworpen met Primer3Plus (Nijveen, 2006) op basis van de volgende parameters: lengte van 20 nt; Tm tussen de 55 en 62 graden; Tm verschil van max 4 graden én een GC% dat tussen de 30 en 60 % ligt. Forward primer; range: 1-133 en sequentie: ‘GAGGCGTGGTGGTCTGAA’. Reverse primer; range: 6543-7201 en sequenctie: ‘GATCTTTTTGGCCGTGCCC’. Aan de hand van het labprotocol van Nikki Olde-loohuis (Olde-loohuis, 2017) is er PCR en gelelektroforese uitgevoerd om zo de lengte van een DNA fragment te kunnen bepalen en om te controleren of het juiste DNA fragment is gekopieerd. Met Sanger sequensen (Schoales, 2015) wordt de stikstofbase volgorde bepaald van het DNA fragment waarna via RefSeq gecontroleerd wordt of er een variatie voorkomt die de ziekte van patiënte P kan veroorzaken.

Exoom sequencing

Omdat de targeted exome sequencing (illumina, Targeted exome sequencen, sd) van de 111 RP genen geen resultaten opleverde was de volgende stap exome sequencing (illumina, Exome sequencing, sd). Hiermee is een variant gevonden die niet met targeted exome sequencing gevonden is. De targeted exome sequencing data is geannoteerd aan de hand van de hg18 versie van het humane genoom. De exome sequencing data aan de hand van hg 19. Om de 2 data sets met elkaar te kunnen vergelijken is de hg19 positie van de variant uit de exome data geconverteerd naar hg18 om te kijken hoe de sequenties van de reads er uit zien bij de targeted exome sequencing data. De gemiddelde coverage van elk exon was 26x, er waren maar 15 exonen die een coverage van minder dan 5x hadden. Van alle basen had 89% een minimale coverage van 10x. Patiënte P had 1461 gevonden variaties in de 111 RP genen.

Filteren op pathogene varianten

Er zijn twee Excel files gebruikt om te filteren op pathogene varianten. De data in het eerste Excelbestand zijn de resultaten uit het targeted exome sequencing experiment. In allebei de bestanden is gefilterd op alleen kwalitatief goede varianten door alleen varianten te nemen die minstens 5 variant reads hadden en minimaal 20% variation reads en varianten die geen waarde hebben in de kolom SNP state. Verder zijn in het eerste Excelbestand nog niet bekende non-synonymous varianten en nog niet bekende splice-site varianten weg gefilterd. Er blijven 14 varianten over. Het tweede Excelbestand bevat de resultaten van het exome sequencing experiment. In dit bestand is onder andere nog gefilterd op alle genen die Retinitis pigmentosa kunnen veroorzaken. De variaties die in intronen voorkomen zijn ook weg gefilterd. Er blijven 3 varianten over waarvan 1 niet gevonden werd met targeted exome sequencing.

Verificatie pathogene variant

Scores van evolutionaire conservering van nucleotiden kunnen een indicatie geven van hoe pathogeen een variant zou kunnen zijn. De scores van de tool PhyloP die onder de 1 komen worden beschouwd als benigne. Scores boven de 2,5 worden beschouwd als pathogeen. In het onderzoek is naast PhyloP ook gebruik gemaakt van de tools: SIFT (Agnes Chan, sd) en PolyPhen-2 (Adzhubei IA, 2010), om zo van 2 mutaties in het USH2A gen de pathogeniciteit te voorspellen. Met segregatie analyse zijn de 3 varianten in de CACNA1F, SEMA4A en USH2A genen gecontroleerd op aanwezigheid bij familieleden van patiënte P.

# **Verwijzingen**

Adzhubei IA, S. S.-2. (2010). *PolyPhen-2 human nsSNPs*. Opgehaald van PolyPhen-2: http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/

Agnes Chan, P. (sd). Opgehaald van SIFT: sift.jcvi.org/

G.P.Jarvik. (1998, Oktober). *Segregation analyses.* Opgehaald van NCBI: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1377507/

illumina. (sd). *Exome sequencing*. Opgehaald van illumina: https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/exome-sequencing.html

illumina. (sd). *Targeted exome sequencen*. Opgehaald van illumina: https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/targeted-panels.html

illumina. (sd). *Targeted resequencing*. Opgehaald van illumina: https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/targeted-panels.html

McKusick, D. V. (1995). *https://omim.org/entry/601664.* Opgehaald van https://omim.org/ .

Nijveen, A. U. (2006). *Primer3Plus*. Opgehaald van Primer3Plus: www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi

Olde-loohuis, N. (2017). *Genetische Mutaties. Course 2.* Nijmegen: HAN.

Schoales, J. (2015, 06 17). *How does Sanger sequencing work?* Opgehaald van ThermoFisher SCIENTIFIC: https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/how-does-sanger-sequencing-work/