

UNIVERSITAIRE INSTELLING ANTWERPEN  
DEPARTEMENT BIOCHEMIE

**ONDERZOEK NAAR DE MOGELIJKHEID VAN PRENATALE DIAGNOSE VAN  
SPINALE MUSCULAIRE ATROFIE TYPE I  
BIJ MIDDEL VAN DNA ONDERZOEK**

Van Osta Peter

Promotor: Dr. P. Willems  
Copromotor: Dr. E. Dams

Proefschrift voor de bijzondere licentie biotechnologie

Akademiejaar 1992 - 1993

## DANKWOORD

Graag wil ik de volgende mensen bedanken wiens bereidwillige medewerking dit eindwerk heeft mogelijk gemaakt.

De heer Dr. P. Willems, als promotor van deze studie,

Mevrouw Dr. E. Dams, als copromotor en praktische begeleider,

De heer Prof. Dr. J. Dumon omdat ik mijn burgerdienst mocht doen in het laboratorium voor Medisch Genetica van de U.I.A.,

Verder nog alle personeel van de dienst Medische genetica voor hun praktische hulp.

Tenslotte wil ik mijn familie en in het bijzonder mijn echtgenote danken voor de morele steun en praktische hulp die ze mij steeds hebben gegeven.

## **DOELSTELLING**

Onderzoek naar de mogelijkheid van prenatale diagnose van Spinale Musculaire Atrofie type I of ziekte van Werdnig Hoffmann in vier families door gebruik te maken van sterk gekoppelde flankerende DNA-merkers, meer bepaald restrictie fragment lengte polymorfismen en CA-repeats.

## ALFABETISCHE LIJST VAN DE GEBRUIKTE AFKORTINGEN

A	adenine
AD	aqua destilata, gedestilleerd water
$\gamma$ - <sup>32</sup> P	ATP adenosine-5'-trifosfaat met <sup>32</sup> P gemerkt op de $\gamma$ -fosfaatgroep
bp	basepaar
C	cytosine
CA <sub>n</sub>	CA-repeat
cM	centimorgan
dATP	deoxyadenosine-5'-trifosfaat
dCTP	deoxycytidine-5'-trifosfaat
$\alpha$ - <sup>32</sup> P dCTP	deoxycytidine-5'-trifosfaat met <sup>32</sup> P gemerkt op de $\alpha$ -fosfaatgroep
dGTP	deoxyguanosine-5'-trifosfaat
DNA	deoxyribonucleïnezuur
dTTP	deoxythymidine-5'-trifosfaat
EDTA	ethyleen diamine tetra-acetaat
EtBr	ethidiumbromide
G	guanine
g	gram
H	heterozygositeitsindex
kb	kilobaseparen (1000 baseparen)
LOD	"log of the odds"
M	molair
mA	milli ampere
MG	moleculair gewicht
ml	milliliter
mM	millimolair
mmol	millimol
nm	nanometer (10 <sup>-9</sup> meter)
OD	optische densiteit
<sup>32</sup> P	fosfaatgroep gemerkt met fosfor-32
PAGE	polyacrylamidegel elektroforese
PIC	"polymorphism information content"
PBS	"phosphate buffered saline"
PCR	"polymerase chain reaction"
pmol	picomol (10 <sup>-12</sup> mol)
RE	restrictie enzyme
RFLP	restrictie fragment lengte polymorfisme
SDS	natrium dodecylsulfaat
SMA	spinale musculaire atrofie
SSC	"sodium-sodium citrate"

TAE	tris-acetaat EDTA
TBE	tris-boraat EDTA
TE <sup>-4</sup>	tris-EDTA
T	thymine
tpm	toeren per minuut
Tris	$\alpha,\alpha,\alpha$ -tris-(hydroxymethyl)aminomethaan
U	units
UV	ultraviolet
V	volt
VNTR	"variable number of tandem repeats"
W	watt
$\mu\text{g}$	microgram ( $10^{-6}$ gram)
$\mu\text{l}$	microliter ( $10^{-6}$ liter)

## INHOUDSOPGAVE

<b>1 Inleiding</b> .....	1
1.1 Kliniek .....	1
1.2 Genetica .....	2
1.2.1 Beschikbare genetische merkers voor SMA .....	2
1.2.2 Genetische merkers .....	6
1.2.2.1 Restrictie Fragment Lengte Polymorfisme analyse .....	6
1.2.2.2 Microsatellieten .....	8
<b>2. Materialen</b> .....	11
2.1 Enzymes .....	11
2.2 Probes .....	11
2.3 Produkten en buffers .....	11
2.4 Toestellen .....	15
<b>3. Methoden</b> .....	16
3.1 Klinische stalen .....	16
3.2 DNA-isolatie .....	16
3.3 DNA-concentratie bepaling .....	16
3.4 DNA-technologisch onderzoek .....	17
3.4.1 RFLP-analyse .....	17
3.4.2 CA-repeat analyse .....	19
<b>4. Resultaten</b> .....	22

<b>5. Bespreking en besluit</b> .....	<b>30</b>
<b>6. Referenties</b> .....	<b>31</b>

## 1 Inleiding

### 1.1 Kliniek

Spinale Musculaire Atrofie (SMA) type I maakt deel uit van een groep erfelijke aandoeningen die alle gekenmerkt zijn door een progressieve degeneratie van de motorneuronen gelegen in de voorste hoornen van het ruggemerg. Men onderscheidt drie types : type I of ziekte van Werdnig Hoffmann, type II of intermediair type en type III of Kugelberg-Welander ziekte. Deze indeling is grotendeels gebaseerd op de leeftijd waarop de eerste symptomen zich voordoen en het klinisch verloop van de ziekte. Het type I is de ernstigste vorm, het aangetaste kind is nooit in staat om zelfstandig rechtop te zitten en overlijdt meestal voor de leeftijd van vier jaar.

Types II en III vertonen klinisch een grotere heterogeniteit, waarbij de eerste symptomen van de ziekte kunnen voorkomen op een leeftijd variërend van 6 maanden tot 17 jaar voor type II. Het klinische spectrum varieert van individuen die nooit in staat zijn om te gaan en die overlijden op adolescentenleeftijd tot slechts een milde spierzwakte. Voor type III manifesteren de eerste symptomen zich op een leeftijd die varieert van 17 tot 55 jaar. De ziekte verloopt vaak milder in deze laatste vorm.

Om de diagnose Spinale Musculaire Atrofie klinisch te kunnen stellen moet de ziekte voldoen aan de volgende criteria<sup>1</sup>:

1. Proximale, symmetrische lidmaat en romp spierzwakte.
2. Spieratrofie zonder faciale of extraoculaire aantasting.
3. Afwezigheid van spasticiteit, gevoelsverlies of hyperreflexie.
4. Het Electromyogram (EMG) vertoont tekens van akute of chronische denervatie en een normale of groter dan normale amplitude van de actiepotentiaal met normale of matig vertraagde ( $> 80\%$  normaal) zenuwgeleidingssnelheid.
5. De spierbiopsie toont tekens van denervatie en geen tekens van stapeling van materiaal of andere structurele afwijkingen.

Het is dus mogelijk om de ziekte van Werdnig Hoffmann klinisch met zekerheid te diagnosticeren, maar momenteel is er geen enkele therapie voor deze ernstige ziekte en is de afloop dus onherroepelijk fataal. Een klinische zekerheidsdiagnose is echter van groot belang om tijdens een volgende zwangerschap een betrouwbare prenatale diagnose op basis van DNA-onderzoek te kunnen stellen.



## 1.2 Genetica

Spinale Musculaire Atrofie type I is een autosomaal recessieve ziekte die voorkomt met een incidentie van 1 / 20.000 levend geboren kinderen. Het aantal dragers wordt geschat op 1 / 60 tot 1 / 80<sup>2</sup>.

Het onderliggende biochemische defekt is momenteel nog niet gekend. Het gen dat verantwoordelijk is voor de ziekte is eveneens tot hiertoe onbekend, zodat een rechtstreekse analyse van de mutatie nog niet mogelijk is. Men is dan aangewezen op indirecte technieken om op DNA-niveau een diagnose te kunnen stellen.

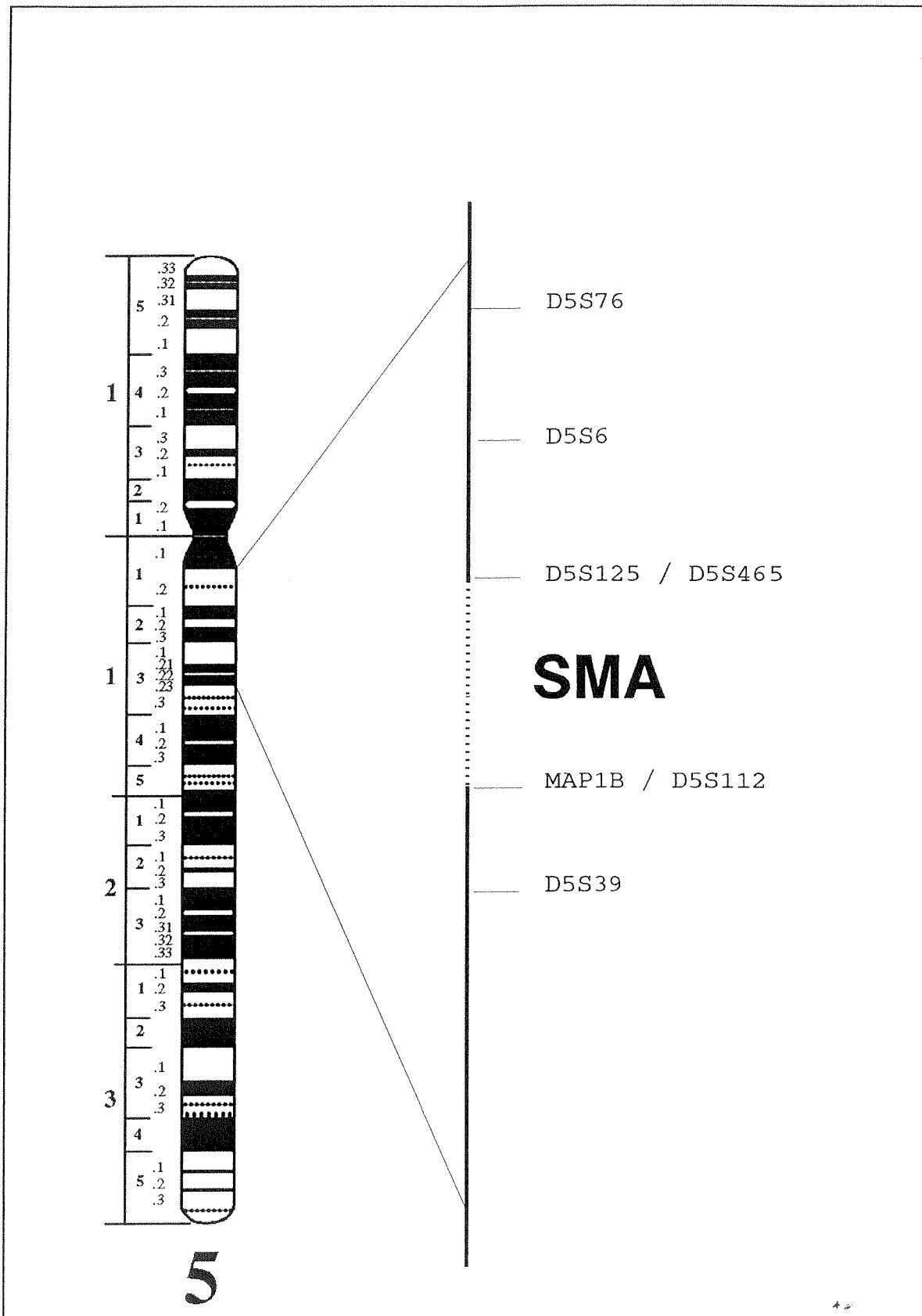
Bij een diagnose op DNA-niveau baseert men zich op genetische merkers die gekoppeld zijn met de ziekte. Door middel van koppelingsanalyse heeft men het gen dat verantwoordelijk is voor Spinale Musculaire Atrofie kunnen lokaliseren op de lange arm van chromosoom 5 in de regio 5q11.2-q13.2<sup>3,4,5</sup>. Het is dan mogelijk om door gebruik te maken van DNA-polymorfismen in deze regio, in families met tenminste één aangetast kind een diagnose te stellen.

De twee technieken die in deze studie zijn gebruikt zijn Restrictie Fragment Lengte Polymorfismen (RFLP's) en Microsatelliet polymorfismen (CA-repeats)<sup>6</sup>. De waarde van deze methoden is afhankelijk van de koppeling van het gevonden polymorfisme met de ziekte<sup>7</sup>.

### 1.2.1 Beschikbare genetische merkers voor SMA<sup>8</sup>

Met behulp van koppelingsanalyse is men er in geslaagd het gebied waarin het SMA-gen gelegen is af te bakenen tot een gebied van 4 cM<sup>9</sup>. Men beschikt nu over verschillende flankerende merkers die kunnen gebruikt worden bij een prenatale diagnose.

Het gebied waarin het SMA-gen zich bevindt, wordt aan de centromeer-zijde begrensd door de merkers AFM114ye7 (locus: D5S465) en EF5.15 (locus: D5S125) en aan de telomere zijde door MAP1B en JK53 (locus: D5S112). De proximale merkers (AFM114ye7 / EF5.15) liggen op een afstand van 2.4 cM, de distale merkers (MAP1B / JK53) liggen op een afstand van 1.7 cM. (figuur 1, tabel 1)



**Figuur 1** Chromosoom 5 met DNA markeringen en het SMA-gen gelegen tussen de markeringen D5S125/D5S465 en MAP1B/D5S112

Tabel 1 geeft een overzicht van de beschikbare merkers in de regio rond het SMA-gen, de volgorde is van proximaal naar distaal (centromeer naar telomeer).

tabel 1: overzicht van de beschikbare DNA-merkers rond SMA

Locus	Probe	Polymorfisme	RE	Allelen	Frekwentie	Heterozygotie	Afstand tot SMA
D5S76	L599H-a	RFLP	Taq I	17/14/10 kb	0,32/0,16/0,52	0,52	7,8 cM
				CA <sub>n</sub>	97 - 109 bp	0,76	
D5S6	M4	RFLP	Bam HI	11/9,6/7,6 kb	0,40/0,49/0,11	0,52	4,4 cM
D5S125	EF5.15	RFLP	Taq I	12/9,5 kb	0,66/0,34	0,45	2,4 cM
				CA <sub>n</sub>	143 - 147 bp	0,50	
D5S465		CA <sub>n</sub>		+/- 200 bp		(0,47)	2,4 cM
<b>SMA</b>							
5'MAP1B		CA <sub>n</sub>		129 - 139 bp		0,61	1,7 cM
3'MAP1B		CA <sub>n</sub>		212 - 226 bp		0,65	1,7 cM
D5S112	JK53	RFLP	Pvu II	18/4,9 kb	0,44/0,56	0,37	1,7 cM
				konstante 3,5 kb			
		CA <sub>n</sub>		98 - 120 bp		0,77	
D5S39	p105-153A	RFLP	Msp I	8,7/5,8 kb	0,33/0,67	0,44	3,7 cM
				konst. 2/0,7/0,3 kb			

De technische aspecten van RFLP's en CA-repeats worden later behandeld. Hier volstaat het te vermelden dat het in beide gevallen gaat om variaties in lengte van DNA-fragmenten tussen individuen en tussen de homologe chromosomen van een individu. Door deze lengtevariaties te onderzoeken is het mogelijk om de chromosomen van een individu van elkaar te onderscheiden, zodat men kan onderzoeken welk van beide chromosomen 5 in een gezin verantwoordelijk is voor SMA.

Door gebruik te maken van verschillende flankerende DNA-merkers die aan weerszijden van het gen gelegen zijn, bepaalt men het haplotype van de verschillende DNA-merkers van een individu.

Identificatie van het chromosoom dat verantwoordelijk is voor de overdracht van de ziekte, gebeurt door het haplotype van beide ouders te vergelijken met dat van hun aangetaste kind. Voor een betrouwbare diagnose is het nodig om voldoende informatieve merkers langs beide zijden van de ziektelocus te hebben om een eventuele recombinatie door crossing over uit te sluiten. De kans dat er een dubbele crossing over gebeurt tussen twee flankerende merkers is kleiner naarmate ze allebei dichterbij de ziektelocus gelegen zijn.

vb. Voor de SMA-allelen gebruiken we de notatie Ss, waarbij S duidt op het dominante gezonde allel en s op het recessieve mutante allel. Iemand is ziek indien hij of zij homozygoot is voor ss en een gezonde drager is heterozygoot Ss. Voor de flankerende merkers gebruiken we de notatie Aa en Bb, die aan weerskanten van de SMA-locus gelegen zijn.

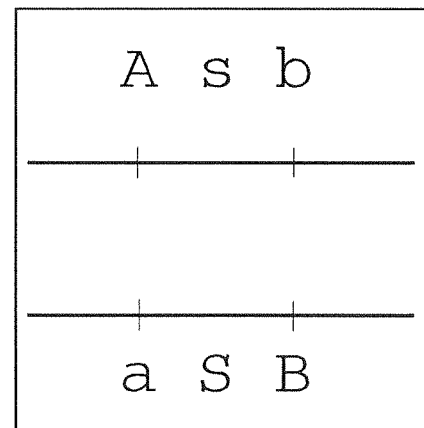
In het bestudeerde gezin zijn beide ouders obligate dragers omdat ze reeds een kind hebben met SMA, dus beide zijn heterozygoot Ss. Door RFLP-en microsatellietanalyse kunnen we de haplotypes van beide ouders bepalen en van het zieke kind. (zie figuur 2 en 3)

paternale grootvader : Asb / aSB  
 paternale grootmoeder: aSB / aSB

maternale grootvader : aSB / aSB  
 maternale grootmoeder: Asb / aSB

vader : Asb / aSB  
 moeder: Asb / aSB

patiënt: Asb / Asb



**Figuur 2:** Schematische voorstelling van twee flankerende merkers en de ziektelocus.

De kans op een dubbele recombinant kan men uitrekenen op basis van de afstand in cM die men heeft bepaald tussen elke merker en de ziektelocus. Indien de eerste merker op 2 cM van de ziektelocus ligt en de andere op 3 cM dan is de kans op een dubbele crossover:  $0.02 \times 0.03 = 0.0006$  of 0.06 % . De betrouwbaarheid van de DNA-analyse is in dat geval 99,94 % .

De waarde van een bepaalde DNA-merker is afhankelijk van de informativiteit van deze merker. Indien beide ouders homozygoot zijn voor een bepaalde merker dan heeft die merker geen waarde voor de diagnose in dat gezin.

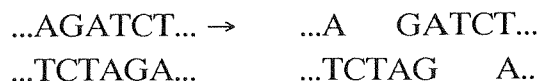
Omdat het best mogelijk is dat iemand voor de ene merker homozygoot is en voor de andere niet, is het voor het onderzoek van belang om voor elke familie verschillende merkers te testen.

## 1.2.2 Genetische merkers

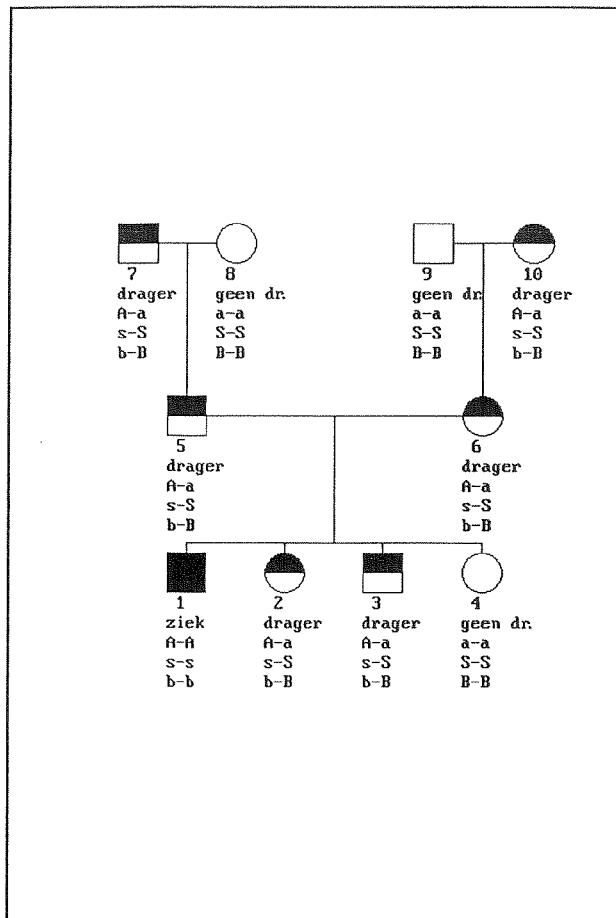
### 1.2.2.1 Restrictie Fragment Lengte Polymorfisme analyse<sup>10</sup>

RFLP's zijn gebaseerd op de eigenschappen van Restrictie Enzymes (RE) om DNA te knippen op specifieke plaatsen. De plaats waar het RE het DNA zal knippen wordt bepaald door de herkenningssekwenties in het DNA, waarvan de lengte varieert van vier tot acht baseparen.

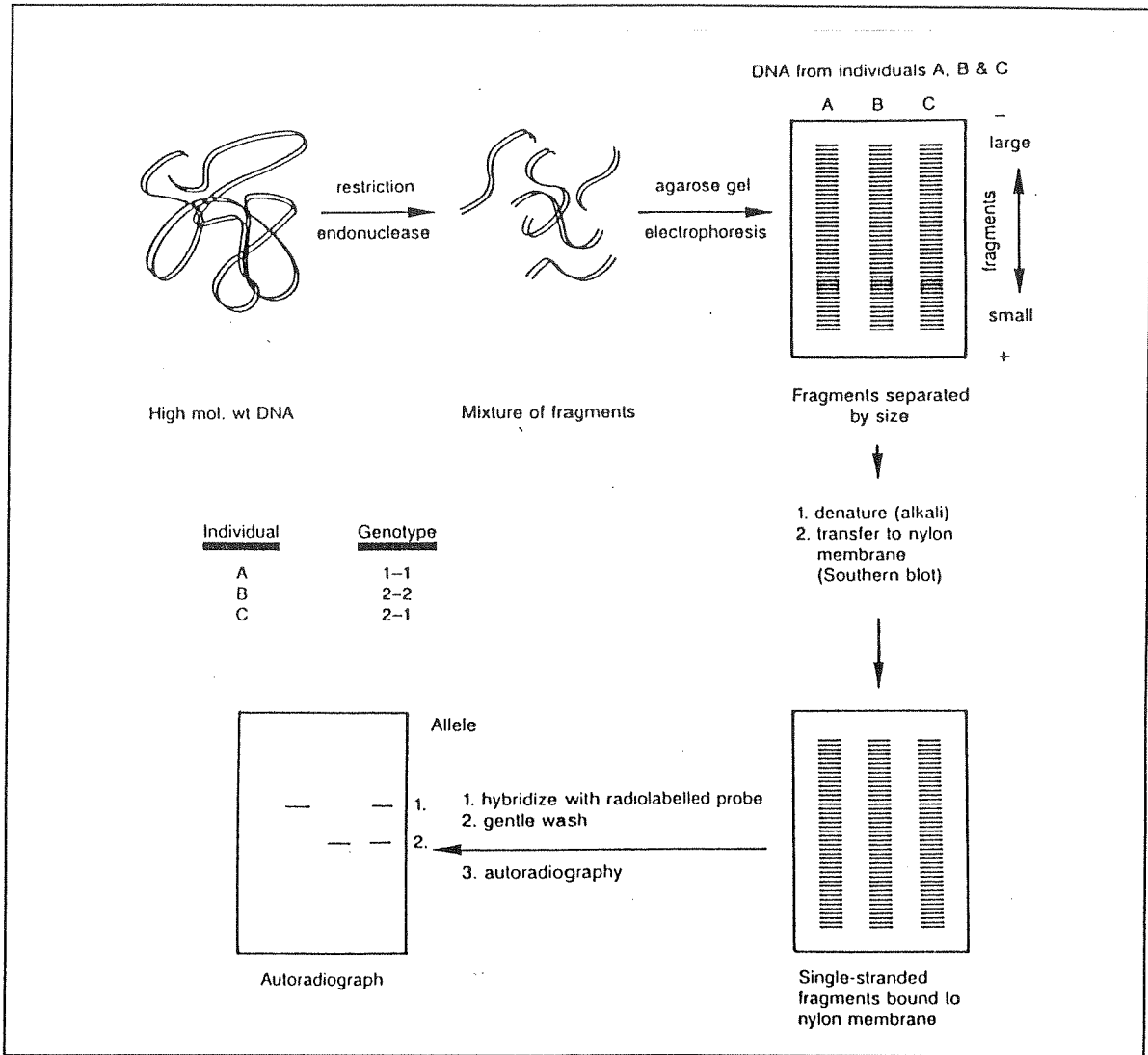
vb.: Het RE Bgl I knipt DNA thv. de sekwentie AGATCT, het resultaat is hieronder schematisch weergegeven.



Overall in het menselijk genoom waar deze herkenningssekwentie voorkomt zal het RE het DNA knippen. Verandert de basesamenstelling ter hoogte van een herkenningssekwentie dan wordt het DNA op die plaats niet meer geknipt door het RE en ontstaat een langer fragment. Een deletie of een insertie in een restrictiefragment veroorzaakt eveneens een variatie in lengte. De verschillende fragmenten worden na de digestie door agarosegelelektroforese gescheiden volgens lengte. Vervolgens wordt het DNA uit de gel overgebracht op een nylonmembraan door Southern-blotting, een techniek die in 1975 door Ed Southern werd ontwikkeld<sup>11</sup>. Deze nylonmembraan is gemakkelijker te manipuleren dan de agarosegel en is ook langer houdbaar. Een radioactief (<sup>32</sup>P) gemerkte probe (een stukje DNA dat afkomstig is uit de nabijheid van het ziektegen) wordt gehybridiseerd met het DNA dat op de nylonmembraan is gebonden. De probe wordt zo gekozen dat ze slechts hybridiseert met een welbepaald fragment. Na voorzichtig wegwassen



**Figuur 3:** Voorbeeld van een stamboom met haplotypen



**Figuur 4:** Principe van een RFLP-onderzoek.

van de specifieke radioactiviteit wordt de plaats waar de probe zich heeft gebonden zichtbaar gemaakt door autoradiografie. De variatie in lengte van de gemerkte fragmenten kan vervolgens worden geïnterpreteerd (zie figuur 4).

### 1.2.2.2 Microsatellieten

#### CA-repeats

De meest recent ontdekte genetische merkers zijn de zogenaamde microsatellieten. Microsatellieten bestaan uit de variabele herhaling van een nucleotide sequentie<sup>12</sup> met een lengte van een tot vier bp. De meest voorkomende microsatelliet is een herhaling van het dinucleotide CA (GT). Dergelijke CA-repeats komen naar schatting om de 30 tot 60 kb voor in het menselijk genoom. Het aantal herhalingen van de meeste microsatellieten varieert van ongeveer 10 tot ongeveer 60. De detectie van dergelijke microsatellieten is gebaseerd op een amplificatie van het DNA-segment via de Polymerase Chain Reaction (PCR) en een scheiding van de fragmenten door polyacrylamidegelelektroforese (PAGE)<sup>13</sup>.

#### De Polymerase Chain Reaction

Het menselijk genoom bevat ongeveer  $6 \times 10^9$  baseparen verspreid over 46 chromosomen. Het opsporen van een CA-repeat van enkele ( $\pm 100$ ) baseparen is een enorme opgave indien we niet konden gebruik maken van de Polymerase Chain Reaction (PCR)<sup>14</sup>. De PCR werd in 1985 in de USA ontwikkeld en maakt het mogelijk om een welbepaald segment van het genoom exponentieel te vermenigvuldigen. De PCR kan een bepaalde sequentie selectief meer dan honderdduizend maal vermenigvuldigen.

De specificiteit van de PCR is voornamelijk afhankelijk van de keuze van de juiste primers: synthetische enkelstrengige oligonucleotiden die zodanig worden gekozen dat ze zich hechten op de complementaire strengen ter hoogte van de sequentie die moet geamplificeerd worden. Om de gevoeligheid van de PCR nog te vergroten gebruikt men radioactief gemerkte primers. Telkens wordt een van de twee primers radioactief gemerkt met <sup>32</sup>P. Op deze manier kan het PCR-product na PAGE door autoradiografie worden gelokaliseerd.

De PCR bestaat uit een opeenvolging van drie stappen die 20 tot 40 maal worden herhaald, vandaar de naam kettingreactie.

#### Denaturatiestap

Het dubbelstrengig (genomisch) DNA wordt gedenateerd door het reaktiemengsel te verhitten tot  $\pm 94^\circ \text{C}$ . waardoor de complementaire DNA-strengen uiteenwijken en als enkelstrengig DNA in oplossing blijven.

## Annealingstap

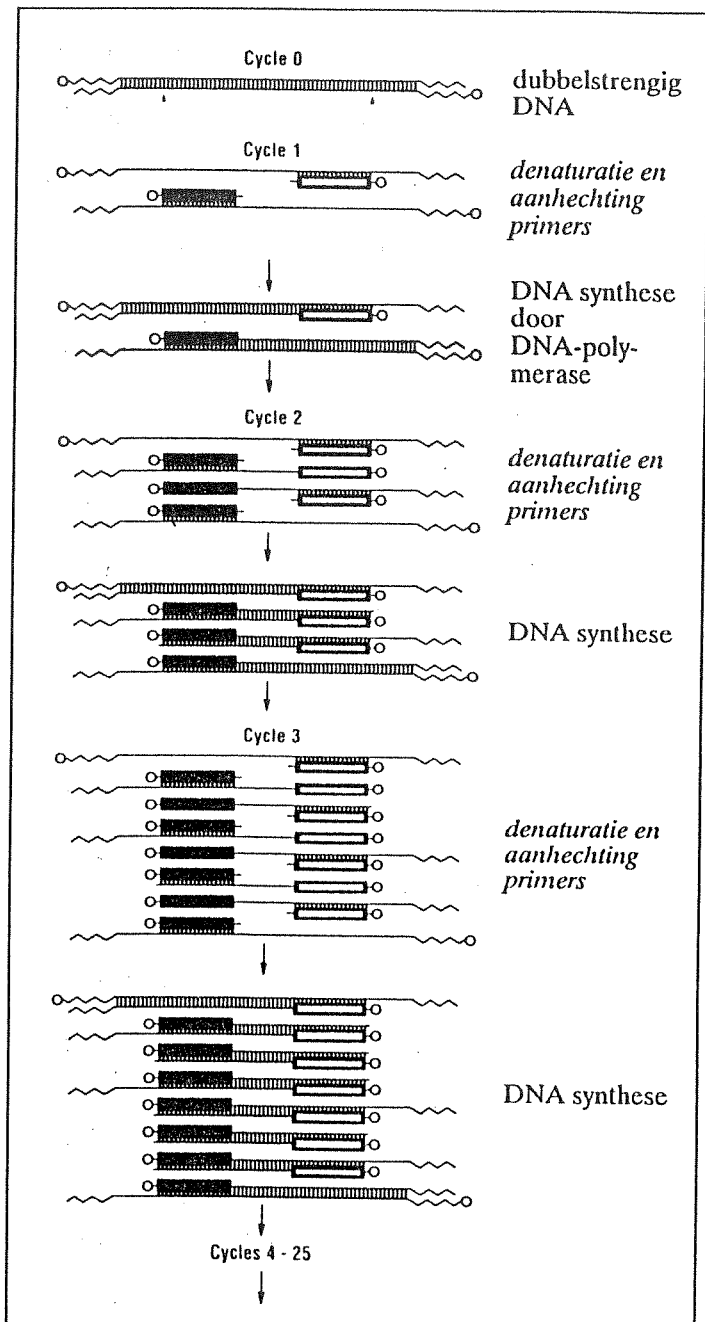
Na de de denaturatie, laat men het reactiemengsel afkoelen tot de gewenste annealingtemperatuur, zodat de primers kunnen binden op hun complementaire strengen van het enkelstrengig DNA. De annealingtemperatuur wordt zodanig gekozen dat enkel fragmenten die zeer sterk homologe basesequenties vertonen, aan elkaar hechten.

## Synthesestap

Na de annealing wordt het reactiemengsel op 70-75° C. gebracht, wat de optimale temperatuur is voor het *Taq-polymerase* dat, vertrekkend van het 3'-uiteinde van de aangehechte primers en met het DNA als template, een complementaire DNA-streng zal synthetiseren in de 5'→3' richting. Deze fase moet men lang genoeg laten duren zodat het *Taq-polymerase* voldoende tijd heeft om minstens de volledige regio tussen de beide primers te synthetiseren.

## Resultaat

Na de synthesestap wordt de hele cyclus herhaald vanaf de eerste stap, en dit in totaal 20 tot 40 maal, al naargelang noodzakelijk is. De DNA-regio tussen de beide primers verdubbelt na elke cyclus, zodat  $n$  cycli een  $2^n$  vermenigvuldiging van de geamplificeerde sequentie geven<sup>15</sup>. Dit is echter wel een theoretisch maximum.



Figuur 5: De PCR-cyclus



## PAGE

De geamplificeerde DNA-fragmenten worden vervolgens gescheiden volgens hun lengte op een polyacrylamidegel. Het scheidend vermogen van Polyacrylamidegels is vele malen groter dan dat van agarosegels, zodat CA-repeats met een lengte van  $\pm$  100 bp en telkens een (minimaal) verschil van twee bp van elkaar kunnen worden gescheiden.

Na PAGE en drogen van de gel worden de DNA-fragmenten door autoradiografie zichtbaar gemaakt en kunnen de resultaten worden geïnterpreteerd.

## 2. Materialen

### 2.1 Enzymes

tabel 2: Gebruikte restrictie-endonucleasen

Naam	Organisme	Knipplaats	Concentratie	Firma
Bam HI	Bacillus amyloliquefaciens	G ↓ GATCC	10 U/μl	Amersham
Msp I	Moraxella species	C ↓ CGG	10 U/μl	Amersham
Pvu II	Proteus vulgaris	CAG ↓ CTG	12 U/μl	Amersham
Taq I	Thermus aquaticus	T ↓ CGA	20 U/μl	Biolabs

tabel 3: Gebruikte polymerasen

Naam	Organisme	Firma
Taq-polymerase	Thermus aquaticus	HT Biotechnology Ltd.
T7-polymerase	T7 faag	Pharmacia

### 2.2 Probes

tabel 4: overzicht van de gebruikte probes

Naam	Locus	Vector	Cloning Site	Insert
L599H-a	D5S76	pUC 8	HindIII	4,9 kb
M4	D5S6	pUC 18	BamH1	8,2 kb
JK53	D5S112	pUC 18	EcoR1	4,6 kb
p105-153A	D5S39	pUC 8	EcoR1	4 kb

### 2.3 Produkten en buffers

acrylamide 2 x Research Grade (Serva, Polylab)

agarose (Gibco BRL): Ultra pure, catnr. 540-5510 UB

ammoniumpersulfaat Ultra Pure, Electrophoresis Grade, Gibco BRL; catnr. 5523UA

10 % (g/v) APS (ammoniumpersulfaat)

1 g APS in 10 ml H<sub>2</sub>O

$\gamma$ -ATP: 7000 Ci/mmole; catnr. 3502005 (ICN Radiochemicals)

broomfenolblauw (Merck Art. 8122), MG 669,9

broomfenolblauw oplossing

0,25 % (g/v) broomfenolblauw

40 % (g/v) sucrose

in water

broomfenolblauw-xyleencyanol oplossing

0,25 % (g/v) broomfenolblauw

0,25 % (g/v) xyleencyanol

40 % (g/v) sucrose

in water

buffers voor restrictie-endonucleasen (10x geconcentreerd)

Bam HI: E6 (Amersham)

Msp I: E9 (Amersham)

PvuII: PvuII (Amersham)

Taq I: NEB 4 (NEB)

buffer voor Taq-polymerase

10x buffer (HT Biotechnology Ltd.)

CHURCH-buffer

0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

1 mM  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  /  $\text{Na}_3\text{H EDTA}$

7% (g/V) SDS

denaturatie-oplossing

1,5 M NaCl

0,5 M NaOH

2'-deoxyadenosine-5'-trifosfaat (dATP)

2'-deoxycytidine-5'-trifosfaat (dCTP)

2'-deoxyguanosine-5'-trifosfaat (dGTP)

2'-deoxythymidine-5'-trifosfaat (dTTP)

$\alpha$ - $^{32}\text{P}$  dCTP: 3000 Ci/mol; catnr. PB 10205 (Amersham International)

10 mg/ml ethidiumbromide (stockoplossing)

50 mg EtBr

5 ml  $\text{H}_2\text{O}$

fixator: Perfix (May and Baker)

folie: Saran-wrap (DOW-chemicals)

kernlysisbuffer

10 mM Tris

400 mM NaCl

2 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$

lysisbuffer

3,1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
200 mM  $\text{KHCO}_3$   
20 mM EDTA  
pH 7,48

0,4 M NaOH-oplossing  
160 g in 10 l water

N,N'-methyleenbisacrylamide Ultra Pure, Electrophoresis Grade; BRL; catnr. 5516UB  
neutralisatie-oplossing

1,5 M NaCl  
0,5 M Tris  
0,001 M EDTA  
pH 7,2

ontwikkelaar: Polycon (Champion)

paraffine-olie (apotheek)

PBS 8,0 g NaCl  
0,2 g KCl  
1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
2,48 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
2,0 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
in 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
pH = 7,2

40 % Acrylamide/bisacrylamide (19:1) (stockoplossing)

193,33 g acrylamide  
6,67 g bisacrylamide  
in 500 ml  $\text{H}_2\text{O}$

6% Polyacrylamidegel (19 acr./ 1 bisacr.)

40 % acrylamide stock	15 ml
ureum	50 g
10x TBE	10 ml
$\text{H}_2\text{O}$	35 ml

1 ml 10 % (g/v) APS  
20 ml TEMED

20 x SSC (stockoplossing)

1753 g NaCl  
882,5 g Natriumcitraat  
in 10 l  $\text{H}_2\text{O}$   
pH 7

sodium dodecyl sulphate (SDS, Janssen Chimica): catnr. 23 042 53

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyleendiamine), Electrophoresis Grade, BRL

SSC: 20 x stockoplossing

175,3 g NaCl

88,2 g Natriumcitraat

in 1000 ml H<sub>2</sub>O

pH 7,0

tris-acetaat-EDTA (TAE): 50 x stockoplossing

2 M Tris

1 M natriumacetaat

100 mM EDTA

pH 7,8

tris-boraat-EDTA buffer (TBE)

89 mM Tris

89 mM boraat

20 mM EDTA

pH 8,3

tris-EDTA (TE<sup>4</sup>):

10 mM tris-HCL

0,1 mM EDTA

pH 7,4

tabel 5: PCR-primers (Eurogentec)

Naam	Sekwentie
D5S76-F	5' - ATT CAG TAC TGC TGA AGG - 3'
D5S76-B	5' - CCA TTC CTA CTT TGC CTT - 3'
AFM114ye7-F	5' - GAG GCA AGC AGT GAC AAT AC -3'
AFM114ye7-B	5' - AAG CAA GTG TTT TTG ACC AG -3'
MAP1B-5'-F	5' - TTC CTT CTT CCA AAA CCA GGG TGA AGC CTC - 3'
MAP1B-5'-B	5' - AAA TTT CTA GGA TGC TTG CGG GAT CTC TTC - 3'
MAP1B-3'-F	5' - CAG TCT GTG CTC CTT AAC ATA TGC TGA TCC - 3'
MAP1B-3'-B	5' - CCA CAT CGT GAT GGG GGC TCC TAA AAT TC - 3'
JK53CA-1	5' - TGT TCT TGG CAT CAC TGC - 3'
JK53CA-2	5' - TTT GAA GCC CTG GAA TAT - 3'

## 2.4 Toestellen

Agarose gelelektroforese toestel: model op maat gemaakt (Plexilabo)

Agarose gelelektroforese stroombron: GPS 200/400 (Pharmacia)

Centrifuge: Biofuge A (Heraeus Christ)

Blockheater: Multi-Blok heater (Lab-Line)

Film fotoestel: Kodak Technical Pan

Film-cassette: Kodak X-Omatic Regular; catnr. 69065-A (Kodak)

Geigerteller: series 900 mini-monitor (Mini-instruments Ltd.)

PCR-toestel: DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer Cetus)

pH-meter: WTW pH 530

Polyacrylamide gelelektroforese toestel: BRL model S2

Polyacrylamide gelelektroforese stroombron: ECPS 3000/150 (New Brunswick Scientific)

Sonicator: Branson, sonifier B-12

Spectrofotometer: UVIKON 810 (Kontron Instruments)

Warmwaterbad: GFL (Vel)

### 3. Methoden

#### 3.1 Klinische stalen

Het bloed is afkomstig van 41 personen uit 4 Belgische families. Het bloed werd verzameld over een periode van  $\pm 3$  jaar. In elke familie zijn een of meerdere kinderen met Spinale Musculaire Atrofie type I of ziekte van Werdnig Hoffmann, die voldoen aan de klinische en pathologische criteria.

#### 3.2 DNA-isolatie

De methode gebruikt voor de DNA-isolatie is de NaCl-precipitatie methode<sup>16</sup>. Eerst werden de rode bloedcellen (Rbc) gelyseerd mbv. lysisbuffer en de witte bloedcellen (Wbc) afgezonderd door centrifugatie bij 1500 tpm.. De pellet werd gespoeld met PBS. De kernen van de Wbc werden vervolgens gelyseerd met kernlysisbuffer. Hierna werd 200  $\mu$ l Pronase (20 mg/ml=4mg) (een eiwitplitsend enzyme) toegevoegd en het geheel gemengd. Tenslotte werd 300  $\mu$ l SDS (20 %) toegevoegd en alles overnacht geïncubeerd bij 37° C. De volgende dag werden de eiwitten neergeslagen door middel van dehydratatie en precipitatie met een verzadigde NaCl-oplossing.

Eén ml. van een verzadigde NaCl-oplossing werd toegevoegd en gedurende 45 seconden heftig geschud. Vervolgens werd 15 minuten gecentrifugeerd bij 2500 tpm en het supernatans werd overgepipetteerd naar een andere tube. De vloeistof werd na 15" schudden een tweede keer gecentrifugeerd (15 min. bij 2500 tpm.) en het supernatans werd tenslotte terug overgepipetteerd.

In deze vloeistof (eiwitvrij) werd het DNA uitgevlokt door 2 volumes absolute ethanol toe te voegen. Het uitgevlokte DNA werd gewassen in 70 % ethanol en vervolgens gedroogd, waarna het opgelost werd in TE-buffer.

#### 3.3 DNA-concentratie bepaling

Het geïsoleerde DNA wordt 100x verdund in TE-buffer. Vervolgens wordt de concentratie fotometrisch bepaald. De absorptie bij 260 nm kan worden omgerekend naar de concentratie aan DNA in  $\mu$ g/ml. Tegelijkertijd kan de zuiverheid van het DNA-staal worden bepaald.

De zuiverheid van het DNA wordt als volgt bepaald :

$$1,70 < ( OD^{260} / OD^{280} ) < 1,80$$

Een verhouding groter dan 1,80, duidt op contaminatie met RNA.

Een verhouding kleiner dan 1,70 duidt op fenol of andere onzuiverheden.

Berekening van de concentratie van het genomisch DNA :

$$1 \text{ OD}^{260} = 50 \mu\text{g/ml DNA}$$

$$\begin{aligned} \text{conc. DNA-staal} &= \text{OD}^{260} \times \text{Dilutiefactor} \times 50 \mu\text{g}/1000 \text{ ul} \\ &= \text{OD}^{260} \times 100 \times 50/1000 \\ &= \text{OD}^{260} \times 5 \end{aligned}$$

### 3.4 DNA-technologisch onderzoek

#### 3.4.1 RFLP-analyse

We vertrekken van 6  $\mu\text{g}$  DNA en 4 Units restrictie-enzyme per  $\mu\text{g}$  DNA. de reactie gebeurt in een volume van 20  $\mu\text{l}$ .

Het reactiemengsel voor de DNA-digestie is als volgt samengesteld:

steriel  $\text{H}_2\text{O}$ , aanvullen tot 20  $\mu\text{l}$

2  $\mu\text{l}$  10x buffer

6  $\mu\text{g}$  DNA

1  $\mu\text{l}$  Spermidine [50 mM].

Nadat het geheel gedurende 15' op ijs is gezet worden 24 U RE toegevoegd, het benodigde volume RE is afhankelijk van de enzymeconcentratie (zie tabel 2). Vervolgens wordt het geheel gedurende min. 3 uur geïncubeerd bij de optimale temperatuur, voor BamH I, Pvu II en MspI bij 37° en voor Taq I bij 65°.

Tenslotte 3  $\mu\text{l}$  BFB-oplossing toevoegen aan het reactiemengsel.

#### Agarosegel-elektroforese

De RE-digesten worden op een 0,8 % (g/v) agarosegel gebracht in 1 x TAE-buffer. De scheiding van de DNA-fragmenten gebeurt overnacht bij 30 V. Een 1 kb ladder wordt als lengtemerker gebruikt.

#### Southern-blotting

##### Alkali-blotting

De volgens ketenlengte gescheiden DNA-fragmenten worden op een Hybond N+ membraan overgebracht via alkaliblotting. Hiertoe wordt de agarosegel eerst 2 x 15' gespoeld in 0,4 M NaOH waarna het DNA geblot wordt gedurende maximum 3 uur. Vervolgens wordt de membraan max. 1' gespoeld in 2 x SSC, waarna de membraan oppervlakkig wordt gedroogd.



### SSC-blotting

Deze techniek wordt gebruikt indien de fragmentlengte groter is dan  $\pm 12$  Kb.

De agarosegel 2 x 30' spoelen in 1 x denaturatie-oplossing. Vervolgens de gel 2 x 30' spoelen met neutralisatiebuffer. Het DNA wordt vervolgens overnacht geblot in 10 x SSC.

De Hybond N+ membraan wordt nadien 15' gefixeerd in 0,4 M NaOH en vervolgens 1' gespoeld in 5x SSC. Tenslotte de membraan oppervlakkig laten drogen.

### Hybridisatie van de probe

#### Oligolabeling van de probe

Voor de labeling van de probes wordt de <sup>32</sup>P QuickPrime Kit van Pharmacia gebruikt.

Voor 50  $\mu$ l reactiemengsel is de samenstelling als volgt:

6  $\mu$ l probe [5ng/ $\mu$ l]

30  $\mu$ l steriel H<sub>2</sub>O

Het geheel 10' denatureren bij 95°.

10  $\mu$ l Reagent Mix

1  $\mu$ l T7 DNA polymerase

3  $\mu$ l [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP

Het geheel wordt gedurende 1 u geïncubeerd bij 37°.

De reactie wordt gestopt door 50  $\mu$ l stopmix aan het reactiemengsel toe te voegen.

### Hybridisatie

De membranen worden gehybridiseerd in CHURCH-buffer. Eerst worden ze gedurende 15 minuten geprehybridiseerd bij 65°. Vervolgens wordt de radioactieve probe toegevoegd samen met 1 mg gesoniceerd placenta DNA en overnacht gehybridiseerd bij 65°. Het placenta DNA dient om de aspecifieke binding te verminderen. De overtollige radioactiviteit wordt de volgende morgen in opeenvolgende stappen weggewassen (zie tabel 6).

tabel 6: overzicht van de wasprocedure per probe

Probe	Wasprocedure
L599Ha	2xSSC, ged. 15''
	2xSSC + 0,1 % SDS, ged. 20'
	1xSSC + 0,1 % SDS, ged. 15'
M4	2xSSC, ged. 15''
	2xSSC + 0,1 % SDS, ged. 20'
	1xSSC + 0,1 % SDS, ged. 10'
JK53	2xSSC, ged. 15''
	2xSSC + 0,1 % SDS, ged. 20'
	1xSSC + 0,1 % SDS, ged. 10'
p105-153A	2xSSC, ged. 15''
	2xSSC + 0,1 % SDS, ged. 20'
	1xSSC + 0,1 % SDS, ged. 20'
	0,5xSSC + 0,1 % SDS, ged. 20'
	0,1xSSC + 0,1 % SDS, ged. 10'

### Autoradiografie

De membranen worden samen met een film gedurende minstens 48 uur in een kassette met versterkingsscherm bij -80° bewaard.

Nadien wordt de film ontwikkeld en gefixeerd.

Het verkregen bandenpatroon kan vervolgens worden geïnterpreteerd.

### 3.4.2 CA-repeat analyse

Als uitgangsmateriaal wordt vertrokken van genomisch DNA, de procedure voor de isolatie van DNA is hiervoor reeds beschreven.

### Radioactief labelen van een primer

Het merken van de primer gebeurt door endlabelling: slechts 1 primer wordt radioactief gelabeld.

De samenstelling voor 10  $\mu$ l reactiemengsel is als volgt:

- 6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 1  $\mu$ l buffer one-for-all plus
- 1  $\mu$ l primer A ( concentratie: 100 pmol )
- 1  $\mu$ l kinase ( 10 U )
- 1  $\mu$ l  $\gamma$ -dATP <sup>32</sup>P

Het geheel wordt gedurende 30' bij 37° geïncubeerd. De reactie wordt stopgezet door 10' bij 65° te verwarmen.

De primer wordt vervolgens 10 x verdund door 90  $\mu$ l Tris (10 mM) toe te voegen.

### De Polymerase Chain Reaction

De samenstelling voor een reactievolume van 20  $\mu$ l is als volgt:

- 7,8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 2  $\mu$ l 10x buffer PCR
- 4  $\mu$ l primer B, 100x verdund (1  $\mu$ l in 99  $\mu$ l 10 mM Tris)
- 0,2  $\mu$ l dNTP-mix
- 1  $\mu$ l van 30 x verdund Taq-polymerase ( conc. 5 U/ $\mu$ l)  
( 1  $\mu$ l Taq-polymerase in 29  $\mu$ l 1x buffer )
- 1  $\mu$ l genomisch DNA
- 4  $\mu$ l radioactieve primer-oplossing

Een overzicht van de gebruikte primers is reeds gegeven in tabel 5.

Vervolgens kan de eigenlijke reactie worden gestart, de duur en de temperatuur van elke stap zijn voornamelijk afhankelijk van de annealingtemperatuur van elke primer en de lengte van het te amplificeren DNA-fragment.

Elke reactie gebeurt op een Perkin Elmer PCR-toestel (zie tabel 7).

tabel 7: overzicht van de PCR-cycli

Locus	Denaturatie bij 93°	Annealing tijd - temperatuur	Elongatie bij 72°	Aantal cycli
D5S76	1'	30'' - 47°	30''	25
D5S465	1'	1' - 56°	1'30''	25
MAP1B-5'	1'	1' - 60°	1'30''	23
MAP1B-3'	1'	30'' - 62°	2'	23
D5S112	1'	1' - 55°	1'	25

Elk PCR-programma wordt voorafgegaan door een denaturatiestap bij 94° gedurende 3' en wordt gevolgd door een laatste elongatiestap van 3' .

Vervolgens worden de PCR-fragmenten van elkaar gescheiden door PAGE.

#### Polyacrylamidegel elektroforese

De PAGE gebeurt in een 6% Polyacrylamidegel, in 1 x TBE buffer

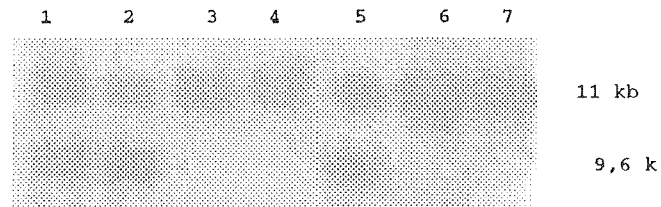
De elektroforese gebeurt bij een constant vermogen van 64 W. De gel wordt vervolgens gedroogd op een papieren onderlaag.

#### Autoradiografie

De gedroogde gel wordt samen met een film gedurende enkele uren in een kassette met versterkingsscherm bij -80° bewaard. Nadien wordt de film ontwikkeld en gefixeerd.

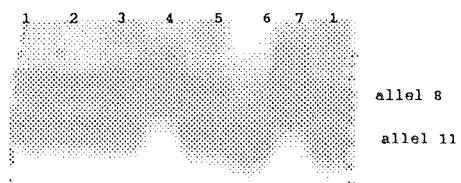
Het verkregen bandenpatroon kan vervolgens worden geïnterpreteerd.

## 4. Resultaten



**Figuur 6:** Voorbeeld van een RFLP zoals werd bekomen na digestie met het restrictie enzyme BamHI en hybridisatie met de probe M4.

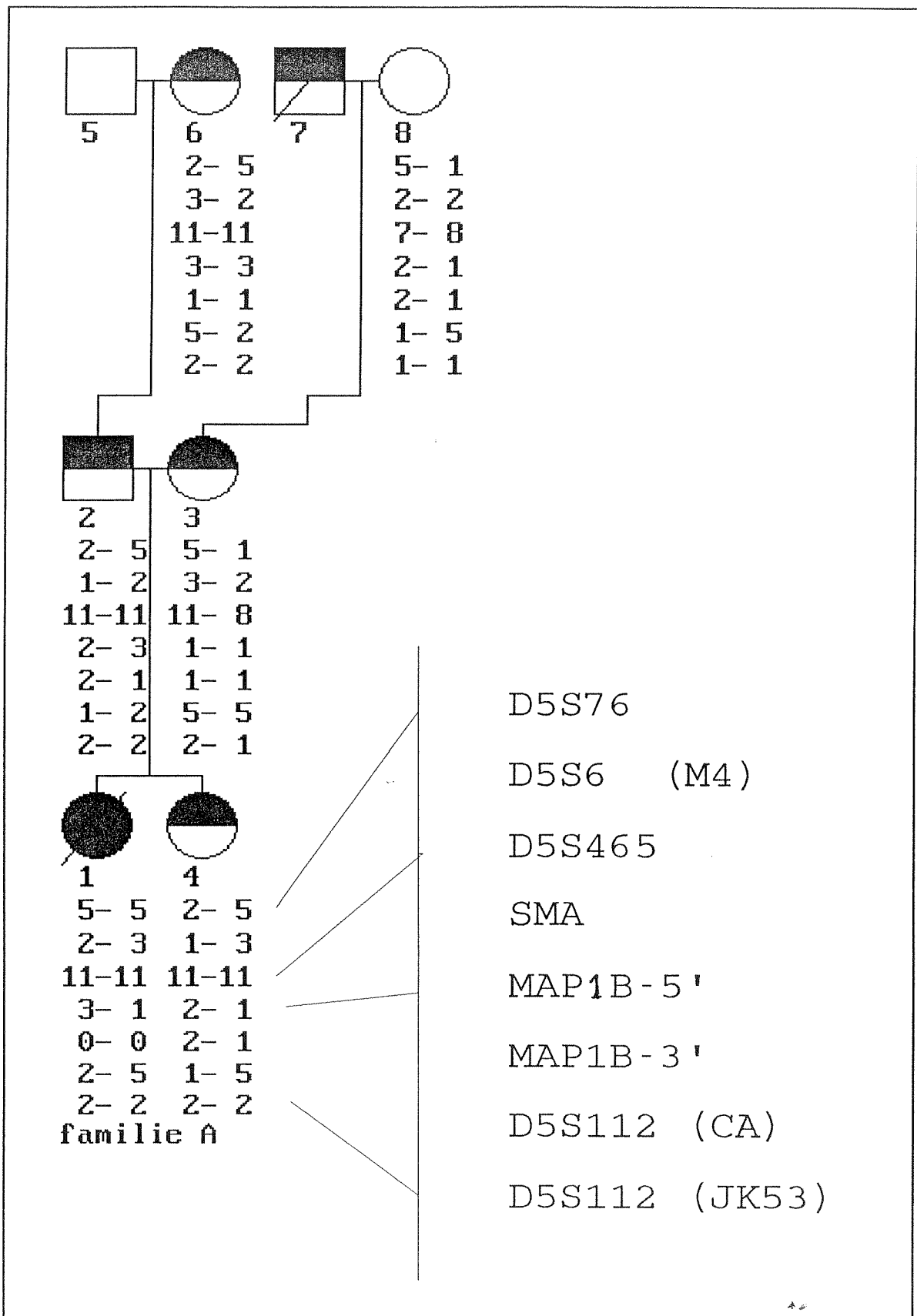
vlnr. 1 = patiënt, 2 = vader, 3 = moeder, 4 = paternale grootvader, 5 = paternale grootmoeder, 6 = maternale grootvader, 7 = maternale grootmoeder



**Figuur 7:** Voorbeeld van een CA-repeat (locus D5S465). De nummering van de lanen is analoog aan figuur 6.

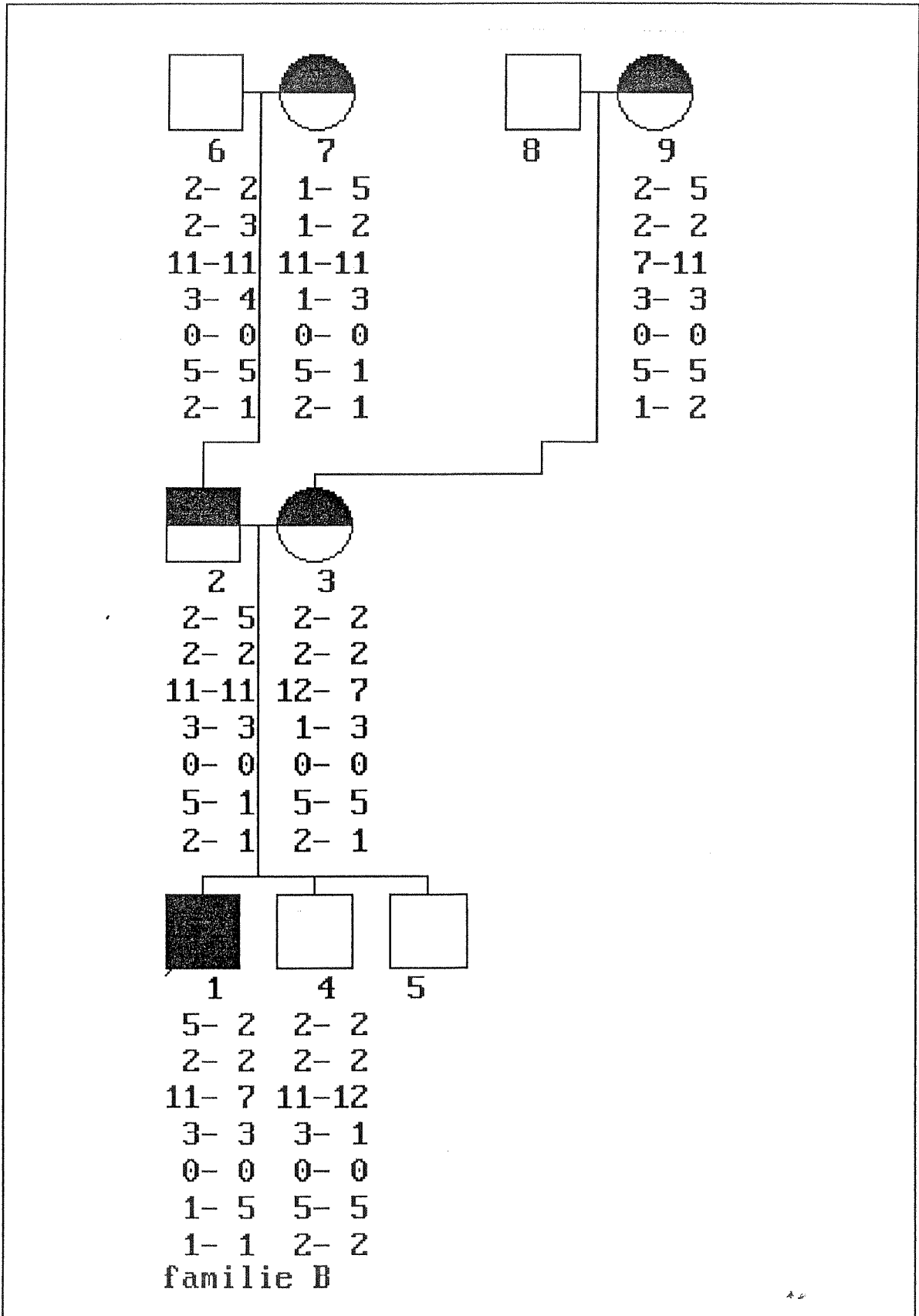
De resultaten van het onderzoek in de vier families is in vier stambomen weergegeven op de volgende bladzijden. De volgorde van de gebruikte DNA-merkers wordt hieronder in een overzicht weergegeven. Alleen de gebruikte merkers die in minstens een familie informatief waren zijn vermeld, de probes L599H-a (locus D5S76) en p105-153A (locus D5S39) waren niet-informatief in elk van de vier families. In de figuren wordt een niet geanalyseerde merker voorgesteld door het haplotype 0-0. De volgorde van de merkers staat in figuur 8 onderaan, deze geldt voor alle figuren. Het eerste nummer onder de symbolen is telkens het identificatienummer van het individu.

\* \*

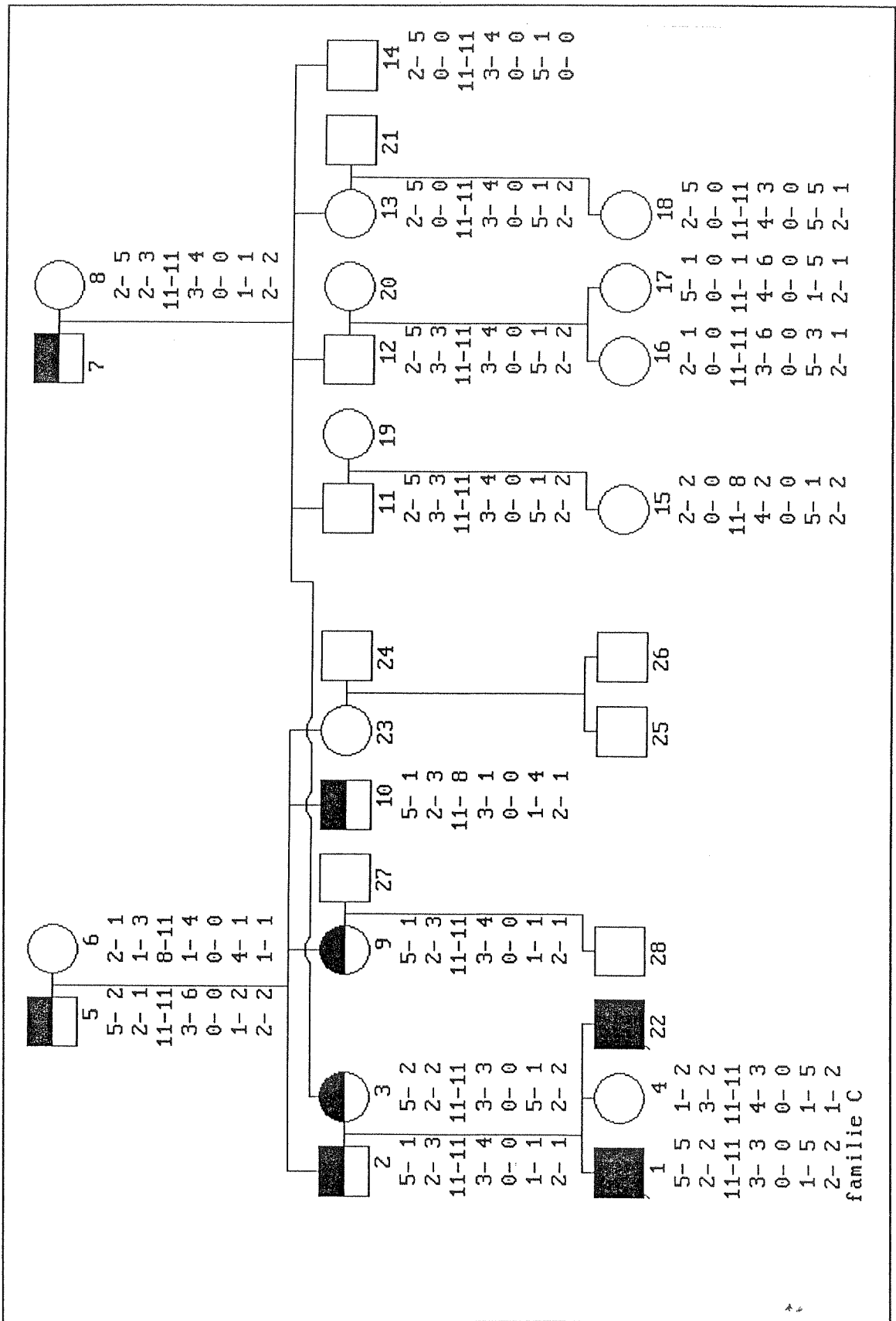


Figuur 8: Stamboom van de familie A

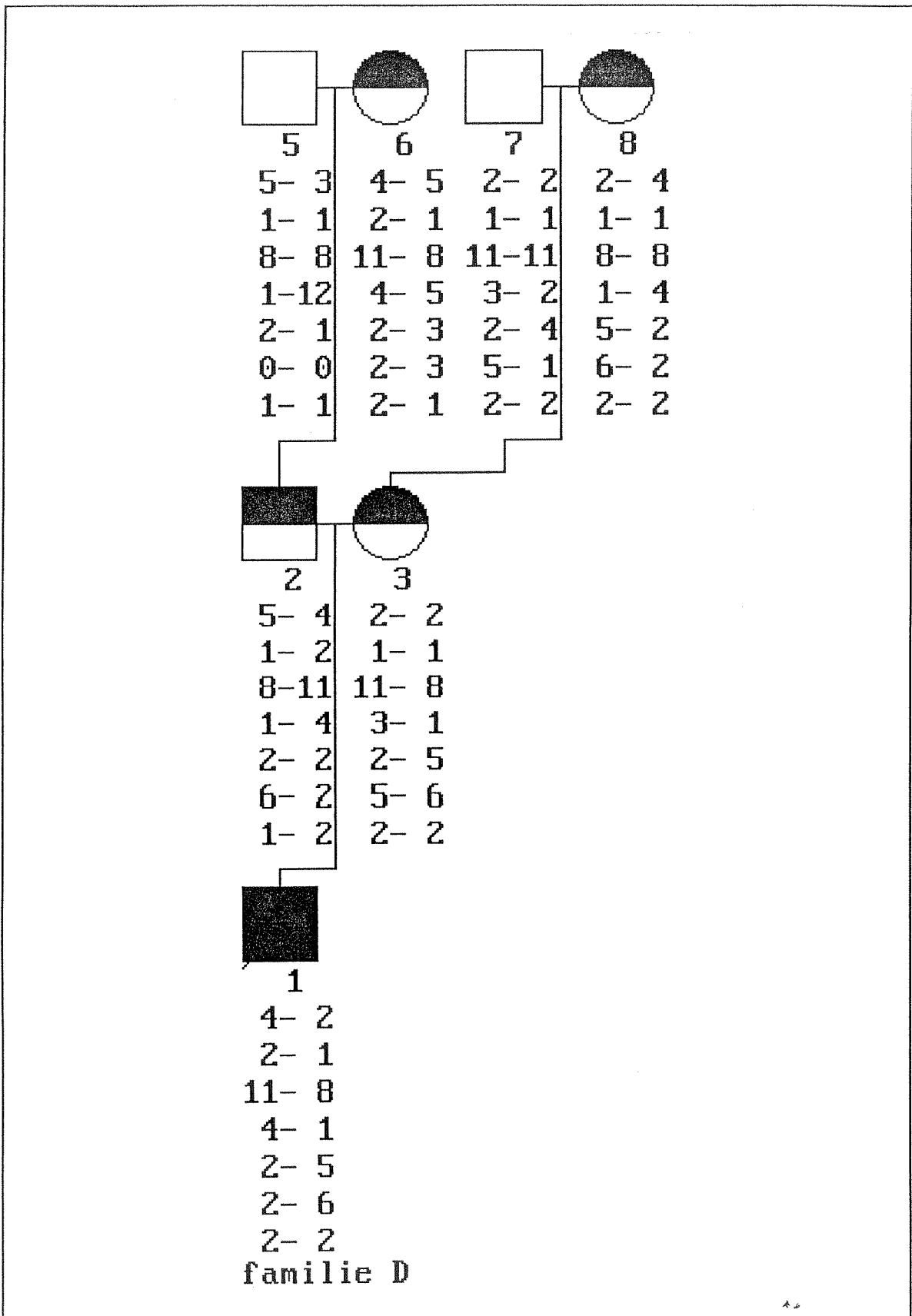




Figuur 9: Stamboom van de familie B



Figuur 10: Stamboom van de familie C



Figuur 11: Stamboom van de familie D

Tabel 8 geeft een overzicht van de vier families, met voor elke familie de betrouwbaarheid van de DNA-diagnose.

De berekening gebeurt op basis van de afstand van de dichtstbijgelegen informatieve merker(s) tot het SMA-gen. Het resultaat van de berekening geeft de resterende kans op een recombinatie tussen SMA en de merker(s); omgerekend geeft dit de resulterende betrouwbaarheid van de diagnose op basis van DNA-onderzoek.

Kans op recombinatie = [afst. prox. merker tot SMA] x [afst. dist. merker tot SMA] x 100

Betrouwbaarheid = 100 % - kans op recombinatie

Indien er proximaal of distaal geen informatieve merker is, dan is de kans op recombinatie afhankelijk van de afstand van de ene informatieve merker tot het SMA-gen.

tabel 8: overzicht van de betrouwbaarheid van de DNA-diagnose per familie

Familie	Vader / Moeder	Proximaal	Distaal	Betrouwbaarheid
A	vader	D5S6	MAP1B-5'	0,05 x 0,017 → > 99 %
	moeder	D5S6	D5S112	0,024 x 0,017 → > 99 %
B	vader	D5S76	D5S112	0,13 x 0,017 → > 99 %
	moeder	D5S465	MAP1B-5'	0,024 x 0,017 → > 99 %
C	vader	D5S6	MAP1B-5'	0,05 x 0,017 → > 99 %
	moeder	D5S76	D5S112	0,05 x 0,017 → > 99 %
D	vader	D5S465	MAP1B-5'	0,024 x 0,017 → > 99 %
	moeder	D5S465	MAP1B-5'	0,024 x 0,017 → > 99 %

## 5. Bespreking en besluit

Afhankelijk van de informativiteit en de lokalisatie van de DNA-merkers in een familie varieert de betrouwbaarheid van de diagnose die met deze merkers kan worden gesteld.

Indien er flankerende informatieve merkers beschikbaar zijn kan een diagnose met grote betrouwbaarheid worden gesteld. De zekerheid is dan afhankelijk van de nabijheid van beide merkers tot de lokalisatie van het SMA-gen. De dichtstbijgelegen merkers liggen proximaal op een afstand van 2,4 cM en distaal op 1,7 cM: indien beide informatief zijn dan is de betrouwbaarheid groter dan 99 %. Een bijkomende reden waarom flankerende merkers van belang zijn is het uitsluiten van crossing over tussen een merker en het SMA-gen. Een dubbele crossing over tussen twee flankerende merkers en het SMA-gen is zeer onwaarschijnlijk indien beide merkers dicht bij het SMA-gen gelegen zijn.

To slot dient nog eens te worden benadrukt dat een diagnose met behulp van DNA-merkers alleen betrouwbaar is indien we kunnen beschikken over DNA van een kind dat reeds door de ziekte is aangetast omdat dit als referentie dient voor de identificatie van het chromosoom(gebied) dat bij beide ouders verantwoordelijk is voor de ziekte. De diagnose van SMA dient dan ook klinisch en anatomo-pathologisch vast te staan, zoniet kan een DNA-diagnose niet betrouwbaar worden uitgevoerd.

Wanneer in de toekomst de mutatie in het SMA-gen, die verantwoordelijk is voor de ziekte, rechtstreeks kan worden gediagnosticeerd, kan de zekerheidsdiagnose via rechtstreeks mutatie onderzoek gebeuren. Momenteel biedt de indirecte methode in de vier SMA-families, zeker een voldoende grote zekerheid om een vrij betrouwbare prenatale diagnose te stellen.

## 6. Referenties

1. Mackenzie A., Roy N., Besner A., Mettler G., Jacob P., Korneluk R., Surh L.  
Genetic linkage analysis of Canadian spinal muscular atrophy kindreds using flanking microsatellite 5q13 polymorphisms.  
Hum. Genet. 90: 501-504 (1993)
2. Brzustowicz L.M., Lehner T., Castilla L.H., Penchaszadeh G.K., Wilhelmsen K.C., Daniels R., Davies K.E., Leppert M., Ziter F., Wood D., Dubowitz V., Zerres K., Hausmanowa-Petrusewicz I., Ott J., Munsat T.L. and Gilliam T.C.  
Genetic Mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3  
Nature 344: 540-541 (1990)
3. Melki J., Sheth P., Abdelhak S., Burlet P., Bachelot M.F., Lathrop M.G., Frezal J., Munnich A.  
Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14.  
Lancet 336: 271-273 (1990)
4. Morrison K.E., Daniels R.J., Suthers G.K., Flynn G.A., Francis M.J., Buckle V.J. and Davies K.E.  
High-resolution genetic map around the spinal muscular atrophy (SMA) Locus on chromosome 5  
Am. J Hum. Genet. 50: 520-527 (1992)
5. Wirth B., Voosen B., Röhrig D., Knapp M., Piechaczek B., Rudnik-Schöneborn S. and Zerres K.  
Fine mapping and narrowing of the genetic interval of the spinal muscular atrophy region by linkage studies.  
Genomics 15: 113-118 (1993)
6. Daniels R.J., Suthers G.K., Morrison K.E., Thomas N.H., Francis M.J., Mathew C.G., Loughlin S., Heiberg A., Wood D., Dubowitz V., et al.  
Prenatal prediction of spinal muscular atrophy.  
J. Med. Genet., 29: 165-170 (1992)
7. Daniels R.J., Thomas N.H., MacKinnon R.N., Lehner T., Ott J., Flint T.J., Dubowitz V., Ignatius J., Donner M., Zerres K., et al.  
Linkage analysis of spinal muscular atrophy.  
Genomics, 12: 335-339 (1992)
8. Ott J., Analysis of human genetic linkage  
Second edition (1988)  
The Johns Hopkins University Press
9. Melki J., Burlet P., Clermont O., Pascal F., Abdelhak S., Sherrington R., Gurling H., Nakamura Y., Weissenbach J., Lathrop M., and Munnich A. <sup>\*,\*</sup>  
Refined Linkage Map of Chromosome 5 in the Region of the Spinal Muscular

- Atrophy Gene  
Genomics 15: 521-524 (1993)
10. Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M.  
Recombinant DNA, pp 519-521  
Second Edition (1992)  
Scientific American Books  
W.H. Freeman and company
11. Southern E.M.  
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.  
J. Mol. Biol. 98: 503-517 (1975)
12. Weber J.L., May P.E.  
An abundant new class of human DNA polymorphisms  
Am. J. Hum. Genet. (supplement) 43: A161 (1988)
13. Weber J.L. and May P.E.  
Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction  
Am. J. Hum. Genet. 44: 388 (1989)
14. Cassiman J.J., The polymerase chain reaction. A revolution in clinical diagnostic procedures.  
Acta Clinica Belgica 45: 71-77 (1990)
15. Erlich H.A., Gelfand D.H., Saiki R.K., Specific DNA amplification  
Nature 331: 461-462 (1988)
16. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F., A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells  
Nucleic Acids Research 16: 1521 (1988)