

Resultaten

Zowel op de LightCycler 480 als op de ABI 7500 Fast zijn reproduceerbare resultaten verkregen, aangezien de Cp-waarden (LightCycler 480) en Ct-waarden (ABI7500 Fast) die gevonden werden bij de diverse cellijnverduunningen en plasmidstandaarden een constante waarde hadden met een standaarddeviatie van maximaal 0,5 Cp/Ct, wat een verschil in hoeveelheid betekent van $2^{0.5}$. Een gevoeligheid van 10^{-4} werd gehaald voor alle fusiegenen, behalve voor PML-RAR α . De gevoeligheid van PML-RAR α ligt op ons laboratorium tussen de 10^{-3} en 10^{-4} . Dit geldt voor zowel de LightCycler 480, als voor de ABI 7500 Fast. Ook de ABI 7700, waarop wij PML-RAR α amplificeren, heeft dezelfde gevoeligheid, en PML-RAR α blijkt dus een moeilijk fusiegen te zijn om te amplificeren.

Van zowel de plasmidstandaarden als voor de cellijnenverduunningen (10^0 t/m 10^{-4}) werd een standaardcurve geanalyseerd en de PCR-efficiëntie berekend (zie tabel 2). De efficiëntie van alle fusiegenen valt binnen een gebied van $1,96 \pm 0,08$. Deze waarde valt binnen de in ons laboratorium gehanteerde acceptatiegebied van 1,85-2,10.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 208-210

Moleculaire diagnostiek als hulpmiddel bij erfelijke nierziekten

A.L.M. STRUNK¹, H. JOOSTEN², A.P. ABBES¹, J.R. BEUKHOF² en H. ENGEL¹

Inleiding

De afgelopen jaren is de kennis met betrekking tot genetische diagnostiek bij erfelijke nierziekten sterk uitgebreid (1-5). Indien er een duidelijke positieve familieanamnese is dan is het relatief eenvoudig om een genetische nierziekte te diagnostiseren. Echter, een aantal nierziekten die zich na de kinderjaren ontwikkelen, kunnen een zeer aspecifiek en weinig symptomatisch beloop hebben.

In deze zoektocht naar de oorzaak van nierfalen resulteren familieanamnese en aanvullend onderzoek niet altijd in een duidelijke diagnose. In dat geval kan genetisch onderzoek van essentiële waarde zijn in het diagnostisch traject, waarbij de beschikbare klinische gegevens van de familie gebruikt worden bij het zoeken naar een verantwoordelijk gen. Om tot een juiste diagnose te komen bij patiënten met nierfalen, is er een samenwerkingsverband in ons ziekenhuis met de pathologie, nefrologie en klinische chemie opgezet. Op basis van kenmerken van het urinesediment, klinische kenmerken en leeftijd van een patiënt met nierfalen wordt een waarschijnlijkheidsdiagnose gesteld.

Afdeling Klinische Chemie¹ en afdeling Interne Geneeskunde en Nefrologie², Isala klinieken, Zwolle

E-mail: h.engel@isala.nl

Conclusie

Het protocol voor de detectie van fusiegenen met betrekking tot leukemie blijkt eenvoudig over te zetten van de ABI 7700 naar de LightCycler 480 en ABI 7500 Fast, en is op beide apparaten een snelle en betrouwbare methode gebleken. De resultaten vallen binnen de criteria zoals deze door de MODHEM vastgesteld zijn, en een gevoeligheid van detectie van 1 afwijkende cel tussen 10.000 normale cellen kan worden gehaald.

Referenties

1. Jansen JH, et al. Moleculaire diagnostiek van myeloïde maligniteiten. Ned Tijdschr Hemat 2005; 2: 50-52.
2. Gabert J, et al, Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia- A Europe Against Cancer Program. Leukemia 2003; 17: 2318-2357.
3. Dongen JJM van, San Miguel JF. Techniques for detection of minimal residual disease in leukaemia patients. Meet the expert sessions of the second EHA. 29 May-1 June 1996, Paris France.

Aan de hand hiervan kan zeer gericht naar mutaties in één of enkele genen gezocht worden, welke de diagnose kunnen bevestigen. We onderscheiden de volgende autosomaal-dominante aandoeningen: medullaire cystenieren (MCD), 'glomerulocystic disease' (GCKD) en het Nail-Patella-syndroom. Autosomaal-recessieve ziekten als nefronofthisis, primaire oxalose en Alport's syndroom moeten echter ook in overweging worden genomen.

Methode

In ons ziekenhuis zijn zeventien patiënten uit twaalf verschillende families onderzocht met verdenking op een genetische nierziekte. Naar aanleiding van hun familieanamnese, werd uitgezocht of het ging om autosomaal-dominante of autosomaal-recessieve overerving. Vervolgens werd aan de hand van de klinische kenmerken van de patiënt, de juiste genen geselecteerd welke mogelijk betrekking hebben op de nierziekte van de patiënt (zie tabel 1). Deze genen werden onderzocht op mutaties met behulp van sequentieanalyse. Bij twee families bestaande uit 3 en 4 familieleden was er een sterke verdenking voor juvenile nefronofthisis. Bij circa 85% van de patiënten wordt de juvenile nefronofthisis veroorzaakt door een grote deletie van 290 kb in genlocus 2q13. Als gevolg hiervan is het NPHP1-gen (135 kb) gedeleteerd (5). Voor het aantonen van de deletie

Tabel 1. Overzicht van diverse nierziekten met belangrijkste kenmerken en bijbehorende genen

Ziekte	Type	Gen en locus	Overerving	Belangrijke klinische kenmerken
'Renal cysts and diabetes syndrome'		Gen : HNF1 β Locus : 17cen-q21.3	Autosomaal-dominant	Niet-diabetisch nierfalen, geen cysten bij ultrasound, proteïnurie, hematurie
'Medullary cystic disease' (MCD)	Type 1 MCD Type 2 MCD	Gen : onbekend Locus : 1q21 Gen : UMOD Locus : 16p12	Autosomaal-dominant	Polyurie en polydipsie, progressief nierfalen met 'salt wasting', geen proteïnurie, geen hematurie
Nail-Patella-syndroom		Gen : LMX1b Locus : 9q34.1	Autosomaal-dominant	Proteïnurie (deels nefrotisch syndroom), hematurie, renale hypertensie
Nefronoftisis	Type 1 Juveniel Type 2 Infantiel Type 3 Adolescent Type 4 Juveniel Type 5-8 (niet getest)	Gen : NPHP1 Locus : 2q13 Gen : NPHP2 Locus : 9q31-q31 Gen : NPHP3 Locus : 3q22.1 Gen : NPHP4 Locus : 1p36.22 Gen : NPHP5-8 Locus : 3q, 12q, 16p, 16q	Autosomaal-recessief	In de jeugd: polyurie en polydipsie, remming groei, anemie, progressief nierfalen met 'salt wasting' en acidose, geen proteïnurie, geen hematurie, geen hypertensie
Primary oxalosis	Type 1 Type 2 (niet getest)	Gen : AGXT Locus : 2q36-q37 Gen : GRHPR Locus : chromosoom 9	Autosomaal-recessief	Nefrolitiasis, nierfalen met ernstige parenchymale oxalosis, calciumoxalaatkristallen in urine/hyperoxalurie; urolithiasis, nephrocalcinosis is zeldzaam
Alport-syndroom (type 1 niet getest)	Type 1 (niet getest) Type 2 Type 3	Gen : Col4A5/Col4A6 Locus : Xq22.3 Gen : Col4A3/Col4A4 Locus : 2q35-q37 Gen : Col4A3/Col4A4 Locus : 2q35-37	X-linked Autosomaal-recessief Autosomaal-dominant	Hematurie, proteïnurie, progressief nierfalen, hypertensie

van het NPHP1-gen is gebruik gemaakt van Real Time kwantitatieve PCR. Hierbij werd het albuminegen als referentiegen gebruikt, waarbij gecorrigeerd kon worden voor verschillen in DNA-input en PCR-efficiëntie. Bij de overige 10 patiënten van verschillende families werd onderzoek gedaan naar diverse genen met betrekking tot nierziekten. De gevonden mutaties zijn bevestigd met conventionele methoden zoals 'restriction fragment length polymorphism' (RFLP) of allel-specifieke PCR.

Resultaten

De eerste indexpatiënt met nierfalen, waarvan de ouders niet aangedaan zijn, werd verdacht van een autosomaal-recessieve aandoening. Aangezien de verdenking viel richting juveniele nefronoftisis, is de patiënt onderzocht op de deletie van het NPHP1-gen. De patiënt bleek een homozygote deletie van het NPHP1-gen te hebben. Beide ouders werden heterozygoot bevonden voor dezelfde deletie.

In een tweede familie met verdenking juveniele nefronoftisis werd een heterozygote deletie van het NPHP1-gen aangetoond bij een broer en een zus. Aangezien beide patiënten specifieke ziekteverschijnselen vertoonden, en het hier om een recessieve aandoening gaat, werd onderzoek gedaan naar mutaties op het overgebleven NPHP1-gen. Op het overgebleven NPHP1-gen bleek in exon 9 een Gly342Arg-mutatie

aanwezig te zijn bij beide patiënten. De moeder van de patiënten werd heterozygoot bevonden voor de NPHP1-deletie, terwijl de vader heterozygoot bleek voor de Gly342Arg-mutatie. Beide ouders hebben nog één normaal wildtype-NPHP1-gen over.

Bij een volgende indexpatiënt uit een derde familie was er sprake van medullaire cystenieren. Hierdoor viel de verdenking op mutaties in het HNF1 β -gen en het UMOD-gen. In het HNF1 β -gen werden geen mutaties gevonden. Vervolgens werd het UMOD-gen gesequenced, en in exon 2 van het UMOD-gen werd een heterozygote Thr62Pro-mutatie aangetoond. Deze mutatie is niet beschreven in de literatuur. In een normale populatie van gezonde personen was deze Thr62Pro-mutatie niet aantoonbaar.

Bij de indexpatiënt van een vierde familie werden verschillende homozygote mutaties aangetoond in het AGXT-gen: Pro11Leu, Gly170Arg, Ile340Met en een heterozygote mutatie Val336Asp. De mutatie Val336Asp lijkt een negatief effect te hebben op pyridoxinetoediening. Met name als deze mutatie homozygoot aanwezig is, bestaat de kans op het ontwikkelen van nierinsufficiëntie. Verder blijkt uit de literatuur (3) dat het de Pro11Leu- en de Ile340Met-polymorfismen zijn die vaak voorkomen in combinatie met de Gly-170Arg-mutatie. Deze polymorfismen verminderen de katalytische activiteit van het enzym alanine: glyoxylaat-aminotransferase (AGT), maar leveren echter niet

een volledige bijdrage aan het ontstaan van primaire hyperoxalurie type 1 (PH1). Het lijkt er dus op dat de PH1 bij deze patiënt voornamelijk wordt veroorzaakt door de homozygote Gly170Arg-mutatie. In de overige acht patiënten uit acht verschillende families met nierziekten werden na sequentieanalyse geen mutaties aangetoond.

Conclusie

Moleculaire diagnostiek kan essentieel zijn om de uiteindelijke diagnose van een erfelijke nierziekte te bevestigen. In dit onderzoek was het mogelijk om bij vijf patiënten uit vier verschillende families uiteindelijk de diagnose juveniele nefronofthis (NPHP1-gen), Medullaire cystenieren (UMOD-gen) en Nail-Patella-syndroom (AGXT-gen) te stellen. Indien er eenmaal een mutatie gevonden is bij een patiënt, is het vrij eenvoudig om de hele familie te screenen op deze mutatie met behulp van RFLP of allel-specifieke PCR.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 210-211

Genoombrede benaderingen om nieuwe subtypen in acute myeloïde leukemie (AML) te identificeren

P.J.M. VALK

In de afgelopen jaren zijn een aantal nieuwe genetische afwijkingen in de maligne cellen van patiënten met acute myeloïde leukemie (bloedkanker (AML)) geïdentificeerd (1). Deze genetische abnormaliteiten spelen, samen met de reeds bekende moleculaire afwijkingen, een belangrijke rol bij de ontwikkeling van de leukemie en kunnen eveneens een belangrijke prognostische waarde hebben (1). De moleculaire analyse van leukemieën is hierdoor de belangrijkste leidraad bij de keuze van behandeling voor patiënten met AML. Enkele nieuwe prognostisch relevante markers worden momenteel geïncorporeerd in de nieuwe klinische AML-behandelingsprotocollen. Echter, een substantieel deel van de AML-patiënten heeft een normaal chromosoompatroon en geen bekende prognostisch relevante moleculaire afwijkingen, en kan hierdoor niet optimaal worden geclassificeerd. Het onderzoek van de afgelopen jaren is gericht op het verbeteren van de diagnostiek en prognostiek van AML door gebruik te maken van genoombrede moleculaire analyses. Deze nieuwe technologieën maken het mogelijk om op RNA- en DNA-niveau het gehele genoom te bestuderen en zijn reeds toegepast op verschillende hematologische maligniteiten, waaronder AML (2, 3). We hebben eerder aangetoond dat AML op basis van genoombrede genexpressieanalyses (Affymetrix U133A

Referenties

1. Hart TC, et al. Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *J Med Genet* 2002; 39: 882-892.
2. Bingham C, et al. Mutations in the Hepatocyte Nuclear Factor-1 β Gene are associated with Familial Hypoplastic Glomerulocystic Kidney Disease. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 219-224.
3. Woerden CS van, et al. Van gen naar ziekte; primaire hyperoxalurie type 1 door mutaties in het AGXT-gen *Ned Tijdschr Geneesk* 2006; 150: 1669-1672.
4. Olbrich H, et al. Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nature Genet* 2003; 34: 455-459.
5. Saunier S, et al. Characterization of the NPHP1 locus: Mutational mechanism involved in deletions in familial juvenile nephronophthisis. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 778-789.

GeneChips) kan worden ingedeeld in 16 specifieke groepen (4). Enkele van deze groepen worden gekarakteriseerd door bekende genetische afwijkingen, met prognostische waarde in AML, zoals een t(8;21), inv(16) of t(15;17), met een relatief goede prognose. Deze groepen van patiënten werden herkend door een specifiek genexpressiepatroon, dat dus tevens een prognostische waarde bevat. Er werd ook een groep van patiënten geïdentificeerd, zonder een bekende afwijking in alle patiënten, maar de patiënten in dit cluster bleken slecht te reageren op therapie. In dit geval worden patiënten met een relatief slechte prognose dus herkend door een specifiek genexpressiepatroon. In aanvulling hierop werden groepen AML-patiënten geïdentificeerd die werden gekarakteriseerd door de aanwezigheid van bepaalde genetische afwijkingen in een hoog percentage van de patiënten, echter door de kleine groepen van patiënten kon niet worden bepaald of het specifieke genexpressiepatroon prognostische waarde bevatte. De resterende groepen van patiënten bevatten geen specifieke moleculaire afwijking en de prognostische waarde van deze clusters is momenteel onbekend. De genoombrede genexpressieanalyses maken het dus mogelijk om nieuwe subtypen in AML te identificeren en geven tevens meer inzicht in bekende moleculair gedefinieerde AML-subtypen. Genexpressiepatronen die middels genoombrede genexpressieanalyses worden bepaald kunnen eveneens worden gebruikt om groepen van patiënten met prognostisch relevante afwijkingen te voorspellen. Dit