

2017 • 2018
Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis

Valideren van genpanels voor moleculaire diagnostiek

PROMOTOR :

ing. Liesbet PAULS

PROMOTOR :

prof. Dr. Gert MATTHIJS

COPROMOTOR :

PhD. Anniek CORVELEYN

PhD. Valérie RACE

Michel Put

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

Gezamenlijke opleiding UHasselt en KU Leuven



KU LEUVEN



KU LEUVEN

2017 • 2018

Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis

Valideren van genpanels voor moleculaire diagnostiek

PROMOTOR :

ing. Liesbet PAULS

PROMOTOR :

prof. Dr. Gert MATTHIJS

COPROMOTOR :

PhD. Anniek CORVELEYN

PhD. Valérie RACE

Michel Put

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie



KU LEUVEN

Woord vooraf

Deze masterproef betreft het valideren van genpanels voor moleculaire diagnostiek. De genpanels die in dit onderzoek gevalideerd zullen worden, zijn voor myopathie enerzijds en cardiomyopathie en hartritmestoornissen anderzijds.

Als student aan U Hasselt en KU Leuven volg ik de master opleiding van industrieel ingenieur in de biochemie. De masterproef binnen deze opleiding heb ik uitgevoerd in het Centrum Menselijke Erfelijkheid in het UZ Leuven waar ik drie maanden stage heb gelopen.

De eerste weken waren voornamelijk kennis maken met het onderwerp, de algoritmes en de achtergrond van het onderwerp. Dit was noodzakelijk omdat de genetica (achter dit onderzoek) en voornamelijk de gebruikte algoritmes voor mij onbekend terrein waren. Nadat de intersectie voltooid was, kon ik met de algoritmes starten. In eerste instantie ging dit moeizaam, maar na enkele analyses ging dit vlotter. Het uitschrijven van de opdrachten en scriptie van dit onderzoek heeft ook veel tijd en moeite gekost en hiervoor is veel feedback noodzakelijk geweest. Het was een zeer interessant onderwerp en ik heb tijdens deze stage veel bijgeleerd betreffende genetica.

Graag had ik mijn externe promotor Dr. Prof. Gert Matthijs willen bedanken om mij de kans te geven mijn masterproef af te leggen in het Centrum Menselijke Erfelijkheid en voor de begeleiding rond dit onderzoek. Vervolgens had ik ook mijn externe copromotoren PhD. Anniek Corveleyn en PhD. Valérie Race willen bedanken voor hun begeleiding, hun kennis en opmerkingen met mij te delen en hun inzet om mijn onderzoek tot een goed einde te brengen. Ook wil ik mijn interne promotor Ing. Liesbet Pauls bedanken voor het altijd bereid zijn om mijn vragen te beantwoorden, voor haar steun om deze masterproef te voltooien. De labomedewerkers van het CME had ik ook nog willen bedanken voor het beantwoorden van mijn vragen en voor het gezelschap tijdens het onderzoek.

Tot slot wil ik ook mijn familie bedanken voor de steun en het geduld dat ze in mij hebben gehad om deze masterproef af te leggen. Ook wil ik mijn vrienden bedanken die er altijd voor mij geweest zijn tijdens het verloop van deze masterproef. En graag wil ik ook Lars Peeters vermelden voor de hulp, het samen werken en het altijd bereid zijn om mijn vragen te beantwoorden.

Michel Put

11 juni 2018

Wijer

Inhoudstafel

Woord vooraf	1
Lijst van tabellen.....	5
Lijst van figuren	7
Verklarende woordenlijst.....	9
Abstract	11
Abstract in English	13
1 Inleiding	15
1.1 Situering	15
1.2 Probleemstelling.....	16
1.3 Vooropgestelde methode	16
2 Literatuurstudie.....	19
2.1 DNA.....	19
2.1.1 Wat is DNA/genoom?.....	19
2.1.2 Chromosomen	19
2.1.3 Genen	19
2.1.4 Soorten van erfelijke aandoeningen	21
2.1.5 Soorten van mutaties en gevolgen.....	22
2.2 Technieken voor het opsporen van mutaties	23
2.2.1 Eerste generatie sequencerings/Sanger sequencerings.....	23
2.2.2 Massieve parallelle sequencerings	24
2.3 Erfelijke aandoeningen.....	26
2.3.1 Myopathie	26
2.3.2 Cardiomyopathie	27
2.3.3 Erfelijke aritmogene hartafwijkingen.....	28
3 Doelstellingen.....	29
4 Methode.....	31
4.1 Intersectie van genlijsten	31
4.1.1 Genlijsten.....	31
4.2 Toegepaste software	31
4.2.1 Panelapp.....	32
4.2.2 Ambry Genetics	32
4.2.3 ClinGen	34
4.2.4 Vergelijking toegepaste software.....	38
5 Resultaten	39
5.1 Vergelijking genlijsten	39
5.1.1 Myopathie	39
5.1.2 Cardiomyopathie en hartritmestoornissen.....	44
5.2 Vergelijking toegepaste software.....	48

5.2.1	<i>ANOS</i>	48
5.2.2	<i>PRKAG2</i>	49
5.2.3	Conclusie toegepaste software	49
5.3	Analyse van de genen.....	50
5.3.1	Myopathie	50
5.3.2	Cardiomyopathie & hartritmestoornissen	52
5.4	Resultaten na de intersectie en analyse	54
5.5	Vergelijking met kerngenen uit Nederland	59
6	Besluit	61
	Literatuurlijst	63
	Bijlagen	67

Lijst van tabellen

Tabel 1: Het bepalen van de LOD score voor autosomaal recessieve aandoeningen	33
Tabel 2: Het bepalen van de LOD score voor autosomaal dominante of geslachtsgebonden recessieve aandoeningen.....	35
Tabel 3: Overzicht van de Belgische centra met de panelnaam en het aantal genen voor myopathie	39
Tabel 4: Overzicht van de internationale centra met de panelnaam en het aantal genen voor myopathie	39
Tabel 5: Lijst van de genen uit het genpanel van UZ Leuven die in 5 of 6 bronnen voorkomen voor myopathie	41
Tabel 6: Lijst van de genen uit het genpanel van het UZ Leuven die in 4 bronnen voorkomen voor myopathie	42
Tabel 7: lijst van de genen uit het genpanel van UZ Leuven die in 1 tot en met 3 bronnen voorkomen voor myopathie	42
Tabel 8: Overzicht van de Belgische centra met de panelnaam en het aantal genen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen	44
Tabel 9: Overzicht van de internationale centra met de panelnaam en het aantal genen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen	44
Tabel 10: Overzicht van genlijsten uit literatuur met de panelnaam en het aantal genen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen	44
Tabel 11: Lijst van de genen uit het genpanel van UZ Leuven die in 8 of 9 bronnen voorkomen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen	46
Tabel 12: Lijst van de genen uit het genpanel van UZ Leuven die in 5-6-7 bronnen voorkomen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen	47
Tabel 13: Lijst van de genen uit het genpanel van UZ Leuven die in 1 tot en met 4 bronnen voorkomen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen	47
Tabel 15: Samenvattende tabel met de resultaten na de analyse van de genen met ClinGen voor myopathie	52
Tabel 16: Samenvattende tabel met de resultaten na de analyse van de genen met ClinGen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen	54
Tabel 17: Samenvattende tabel met de resultaten na de analyse van de genen, die niet voorkomen in het genpanel van het UZ Leuven, met ClinGen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen	54
Tabel 18: Overzicht van de kerngenen voor myopathie	55
Tabel 19: Overzicht van de kerngenen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen	57
Tabel 20: Kerngenen uit Nederland voor myopathie.....	59
Tabel 21: Kerngenen uit Nederland voor cardiomyopathie.....	59

Lijst van figuren

Figuur 1: Intronen en exonen in een gen	20
Figuur 2: Transcriptie (DNA tot mRNA) en translatie (mRNA tot polypeptideketen) van een gen.....	21
Figuur 3: Vergelijking sequentie ladder met fluorescentie pieken	24
Figuur 4: Workflow MPS.....	25
Figuur 5: Types van cardiomyopathie	27
Figuur 6: Verkeerslichten systeem van Panelapp om genen te beoordelen	32
Figuur 7: Scoreblad voor de analyse van een gen-aandoening relatie van Ambry Genetics	34
Figuur 8: Matrix van het genetisch niveau van ClinGen.....	36
Figuur 9: Matrix van het experimentele niveau van ClinGen.....	37
Figuur 10: Classificatie volgens ClinGen	38
Figuur 11: Intersectie van de genlijsten van UZ Leuven met Belgische genetische centra voor myopathie	40
Figuur 12: Intersectie van de genlijsten van UZ Leuven en internationale genetische centra voor myopathie	41
Figuur 13: intersectie van de genlijsten van UZ Leuven en andere belgische genetische centra voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen	45
Figuur 14: Intersectie van de genlijsten van UZ Leuven en internationale genetische centra voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen	45
Figuur 15: Intersectie van de genlijsten van UZ Leuven met genlijsten uit literatuur voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen	46

Verklarende woordenlijst

Allel: elke uitvoering van een gen. Omdat DNA dubbelstrengs is, heeft elk individu 2 allelen.

Amyotrofie: zwakker worden van de spieren.

Congenitaal: aangeboren

Constitutionele afwijking: een verworven afwijking.

De novo mutatie: een genetische mutatie die in geen van beide ouders wordt teruggevonden.

Fenotype: de verzameling van alle waarneembare kenmerken van een individu.

Heterozygoot: een persoon met een verschillend allel op beide chromosomen.

Hemizyoot: een persoon met voor een bepaald gen slechts één allel.

Homozygoot: een persoon met identieke allelen op beide chromosomen.

Kerngen: een gen dat, indien gemuteerd, sterk gelinkt is aan een bepaalde aandoening.

Mozaïcisme: houdt in dat alle cellen in het lichaam niet hetzelfde genetisch materiaal bezitten ondanks dat deze cellen voorkomen uit dezelfde bevruchte eicel.

MPS: massieve parallelle sequencerings

Multiplexen: het toevoegen van een unieke "barcode" aan het DNA van een patiënt zodat het DNA van meerdere patiënten tegelijk gesequeneerd kan worden.

Polymorfisme: een mutatie die in meer dan 1% van de bevolking voorkomt.

Segregatie: nagaan welke allelen op chromosomen zijn overgeërfd van de ouders.

Splicing: verwijderen van intron informatie na de transcriptie met behulp van enzymen.

Variant: het bekomen van een nucleotidevolgorde na het sequencen die verschillend is van de sequentie van een referentie genoom.

Abstract

Het Centrum Menselijke Erfelijkheid (CME) in UZLeuven biedt diagnostiek aan voor zeldzame erfelijke ziekten. Voor genetisch heterogene aandoeningen worden klinische exoom analyses aangeboden waarbij panels van genen worden aangewend. Deze analyses maken gebruik van massieve parallelle sequencerende om de DNA-sequentie te achterhalen. Momenteel gebruikt ieder diagnostisch centrum eigen samengestelde genpanels. Hierdoor zijn er verschillen in de gebruikte nomenclatuur en inhoudelijke verschillen in de samengestelde genpanels wat het moeilijk maakt voor de arts om een diagnostische test aan te vragen die het best tegemoet komt aan de klinische vraag.

Het doel van dit onderzoek is het aflijnen van een genpanel, gekoppeld aan myopathie enerzijds en cardiomyopathie en hartritme stoornissen anderzijds. Er wordt gestart met een vergelijking van de bestaande genlijsten van het CME, andere genetische centra in België, enkele internationale centra en de literatuur. Om de belangrijkste genen (kerngenen) te identificeren, wordt eerst onderzocht welke genen in de meerderheid van de centra aangeboden worden (deze worden als kerngenen bestempeld) en welke genen zeer zeldzaam in de panels vervat zitten. Om vervolgens na te gaan of de overige genen als kerngenen bestempeld kunnen worden, zullen een aantal algoritmes aangewend worden, namelijk Ambry Genetics, Panelapp en ClinGen.

Deze groep van kerngenen kan vervolgens door de verschillende diagnostische centra gebruikt worden als vertrekpunt voor het samenstellen van diagnostische panels.

Abstract in English

The Centre of Human Genetics in UZLeuven offers diagnostics for rare hereditary diseases. Clinical exome analyses are offered for genetically heterogeneous disorders in which panels of genes are used. These analyses use massive parallel sequencing to identify the DNA sequence. Currently, each diagnostic center uses its own gene panels. As a result, there are differences in the nomenclature used and substantial differences regarding the content of the gene panels. This makes it very difficult for the physician to request a diagnostic test which meets best the clinical needs.

The aim of this research is to align a gene panel, linked to myopathy on the one hand and cardiomyopathy and arrhythmia on the other. As a starting point, the existing gene lists of the CME, will be compared to the gene panels of other genetic centers in Belgium, several international centers and the literature. To identify the most important genes (core genes), an intersection will be made to investigate which genes are offered in the majority of the centers (these are labeled as core genes) and which genes are very rare in the different panels. In order to check whether the remaining genes can be labeled as core genes, a number of algorithms will be used, namely Ambry Genetics, Panelapp and ClinGen.

This group of core genes can then be used by the various diagnostic centers as a starting point for the assembly of their diagnostic panels.

1 Inleiding

1.1 Situering

Het Centrum Menselijke Erfelijkheid (CME) is een dienst van het Universitair Ziekenhuis Leuven (UZ Leuven) die zorgt voor de klinische counseling van patiënten en families met erfelijke aandoeningen en voor de laboratoriumdiagnostiek van zeldzame ziekten en onco-hematologische aandoeningen. Het Laboratorium voor Moleculaire Diagnostiek biedt een groot pallet aan genetische testen voor patiënten van het CME, van de verschillende medische diensten van het UZ Leuven en van verwijzende artsen buiten het universitair centrum. De aandoeningen die in deze thesis ter sprake komen zijn: myopathie, cardiomyopathie en hartritmestoornissen. Het aanbod van testen is uiteraard veel ruimer dan dat.

Congenitale spierdystrofie en myopathie zijn een klinisch en genetisch heterogene groep van aandoeningen. Kenmerkend voor deze aandoeningen zijn een langzaam toenemende spierzwakte (dystrofie) en het vertraagd ontspannen van aangespannen spieren (myotonie). Historisch gezien wordt deze groep stoornissen onderverdeeld op basis van spierhistopathologische kenmerken. Congenitale spierdystrofieën (CMD) vormen een heterogene groep van stoornissen gekenmerkt door spierzwakte in de eerste maanden van het leven. Spierbiopsie verandert het bereik van myopathisch tot openlijk dystrofisch afhankelijk van de spierbiopsie en de leeftijd bij biopsie. Congenitale myopathieën (waaronder X-gebonden myotubulaire myopathie, centronucleaire myopathie, centrale kernaandoening en nemalinemyopathie) hebben doorgaans een normale of zo goed als normale serum-Creatinekinase(CK)-concentratie en een histologisch bewijs van spierbiopsie van ontwikkelings- en structurele spierveranderingen in plaats van dystrofische veranderingen [1] [2].

Cardiomyopathieën zijn aandoeningen van de hartspier waardoor het hart minder goed kan samentrekken of ontspannen. Het gevolg hiervan is dat het bloed minder goed rondgepompt wordt. Deze aandoeningen zijn chronische ziektes en de verschillende varianten hiervan worden, op basis van cardiografische kenmerken, opgedeeld in vier klassen van aandoeningen: hypertrofe cardiomyopathie (HCM), gedilateerde cardiomyopathie (DCM), linke ventrikel non-compactie cardiomyopathie (LVNC) en aritmogene rechterventrikel cardiomyopathie (ARVC) [3] [4] [5] [6].

Hartritmestoornissen is een verzamelnaam voor verschillende stoornissen waarbij afwijkingen in de elektrische activiteit van het hart kunnen leiden tot ritmestoornissen. De oorsprong van deze aandoeningen kan liggen in de kamer of in de voorkamer van het hart. Er zijn verschillende gradaties van ritmestoornissen gaande van een volledig onregelmatige hartslag, een te snelle of te trage hartslag tot één of enkele extra hartslagen. Hartritmestoornissen worden opgedeeld in negen klassen van aandoeningen: het lange QT-syndroom (LQTS), het Brugada-syndroom (BrS), catecholaminerge polymorfe ventriculaire tachycardie (CPVT), het korte QT-syndroom (SQTS), vroege repolarisatie syndroom (ERS), idiopathische ventriculairefibrillatie (IVF), voorkamerfibrillatie (AF), geleidingsstoornissen (CCD) en het sick sinus syndroom (SSS) [7] [8] [9].

De oorzaak van deze aandoeningen kan een genetische oorsprong hebben. In dit geval is moleculair onderzoek van het DNA nodig om mutaties op te sporen. Dit kan met behulp van Sanger-sequencing [10]. Deze ‘gouden’ standaard methode is echter arbeidsintensief, heeft een hoge kostprijs en gezien de genen sequentieel worden nagekeken, is de doorlooptijd van zulke testen aanzienlijk. Er was bijgevolg nood aan snellere en goedkopere methoden voor het opsporen van genmutaties gelinkt aan specifieke aandoeningen. De intrede van massieve parallelle sequencing (MPS) heeft ervoor gezorgd dat genen voortaan in parallel geanalyseerd worden, aan een redelijke kostprijs en binnen een werkbare tijd [11].

MPS in de diagnostiek kan aangevangen worden met behulp van een doelgerichte sequencing of met een mendelioomanalyse. Bij een doelgerichte sequencing wordt een bepaalde set van genen (genpanel) gericht gesequeneerd, bij een mendelioomanalyse worden echter alle exonen gesequeneerd die gelinkt zijn met (mono)gene aandoeningen. Ondertussen zijn ongeveer 6000 genen gelinkt aan erfelijke ziekten en omvat een mendelioomanalyse aldus minstens 6000 genen die in parallel gesequeneerd kunnen worden. Welke toepassing gebruikt wordt, is afhankelijk van de klinische vraagstelling [12].

1.2 Probleemstelling

Eenzijds wordt er gestreefd naar harmonisatie van de nomenclatuur van de genpanels tussen de diagnostische centra. Momenteel gebruikt elk diagnostisch laboratorium zijn eigen samengestelde genpanels voor verschillende aandoeningen. Deze genpanels verschillen in nomenclatuur waardoor het voor de arts moeilijk te besluiten is of een specifiek genpanel een antwoord zal bieden op de klinische vragen.

Anderzijds wordt er getracht om harmonisatie van de inhoud van de genpanels te bereiken tussen de diagnostische centra. Immers naast de verschillen in nomenclatuur, kan tevens de inhoud van deze genpanels grondig verschillen. Voor heterogene aandoeningen werd vroeger geopteerd om de ‘core’ (kern) genen sequentieel na te kijken met behulp van Sanger-sequencing. Met de evolutie van de technologie kunnen deze genen voortaan met behulp van MPS in parallel nagekeken worden en dit levert een grote tijds winst op. Dit heeft tot gevolg dat er bij de samenstelling van genpanels weinig tot geen beperkingen meer zijn. Echter, de hoeveelheid data die moet geanalyseerd worden, is één van de belangrijke parameters om te bepalen welke genen mee in een panel zullen opgenomen worden. Naast de hoeveelheid data is de relevantie belangrijk, met andere woorden wanneer een variant gevonden wordt, moet deze 100% gelinkt zijn aan het fenotype. Bijgevolg wordt er gestreefd om een minimum set van genen af te lijnen die voor diagnostische toepassingen kunnen worden bevestigd.

1.3 Vooropgestelde methode

Voor de harmonisatie van de inhoud van de genpanels voor de eerder vermelde aandoeningen wordt er vertrokken van een genlijst opgesteld door UZ Leuven. Deze genlijst wordt vergeleken met genlijsten van andere genetische centra in België, overzichtsartikelen uit de literatuur en met genlijsten van internationale centra die deze genpanels aanbieden. In eerste instantie wordt een intersectie uitgevoerd om overeenkomsten en verschillen onder deze genpanels in kaart te brengen. Vervolgens

wordt een selectie van genen die niet in elk centrum voorkomen, getest om te bepalen of ze als kerngen kunnen benoemd worden.

Om te bepalen of genen kerngenen zijn, worden drie algoritmes getest , namelijk Ambry Genetics, PanelApp en ClinGen [13] [14] [15]. Elk algoritme wordt voor één specifiek gen van elk genpanel afgetoetst. Daarna worden deze algoritmes vergeleken aan de hand van een aantal parameters: de mogelijkheid om de analyse zelf te doen, de gebruiksvriendelijkheid van het algoritme, de tijd die de analyse in beslag neemt en de objectiviteit van het algoritme. Vervolgens wordt verder gewerkt met het algoritme dat het best aan deze criteria voldoet om de kerngenen verder te definiëren.

Na de analyse kunnen de genen, aan de hand van de bekomen score, geclassificeerd worden op basis van een schema dat de genen ordent op hun sterkte of bewijs voor de aandoening.

Op deze wijze wordt voor myopathie enerzijds en voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen anderzijds getracht om te komen tot een afgelijnde set van kerngenen die minimaal in deze respectievelijke genpanels vereist zijn. Deze set kan vervolgens gebruikt worden als aanzet tot harmonisatie voor de genpanels binnen de Belgische genetische centra.

2 Literatuurstudie

2.1 DNA

2.1.1 Wat is DNA/genoom?

Desoxyribonucleicacid (DNA) bevat de erfelijke gegevens van alle organismen en zit in bijna iedere cel van levende wezens. Alle DNA-moleculen in een cel worden ook beschreven als een genoom. Het genoom wordt onderverdeeld in chromosomen en op deze chromosomen zitten DNA-segmenten, of genen, die de informatie bevatten voor de erfelijke eigenschappen [10] [11].

DNA is opgebouwd uit nucleotiden die met elkaar verbonden zijn via fosfodiësterbindingen. Een DNA-nucleotide is opgebouwd uit desoxyribose, een stikstofbase en minstens één fosfaat groep. Er zijn vier verschillende stikstofbasen, namelijk adenine(A), guanine(G), cytosine(C) en thymine(T). Door de nucleotiden met elkaar te verbinden via fosfodiëster bindingen wordt een enkelstreng bekomen. DNA is echter dubbelstrengs omdat er een tweede streng via waterstofbruggen complementair en antiparallel gebonden is aan de eerste streng. Hierbij paart A met T en C met G. Dit werd in 1953 vastgesteld door James Watson en Francis Crick in het dubbele-helix model van DNA. Een verandering in de structuur van DNA of in de nucleotidevolgorde wordt een variant genoemd en kan al dan niet een pathologisch effect hebben [10] [11].

Omdat het complete DNA van de mens meer dan zes miljoen basenparen bezit, is de volgorde van de basenparen voor ieder individu uniek. De basisstructuur zal altijd hetzelfde zijn, maar de sequentie van de basenparen is voor iedereen verschillend. Aangezien de erfelijke eigenschappen zijn vastgelegd door de opeenvolging van de vier basensoorten, beschikt ieder individu over een unieke genetische code.

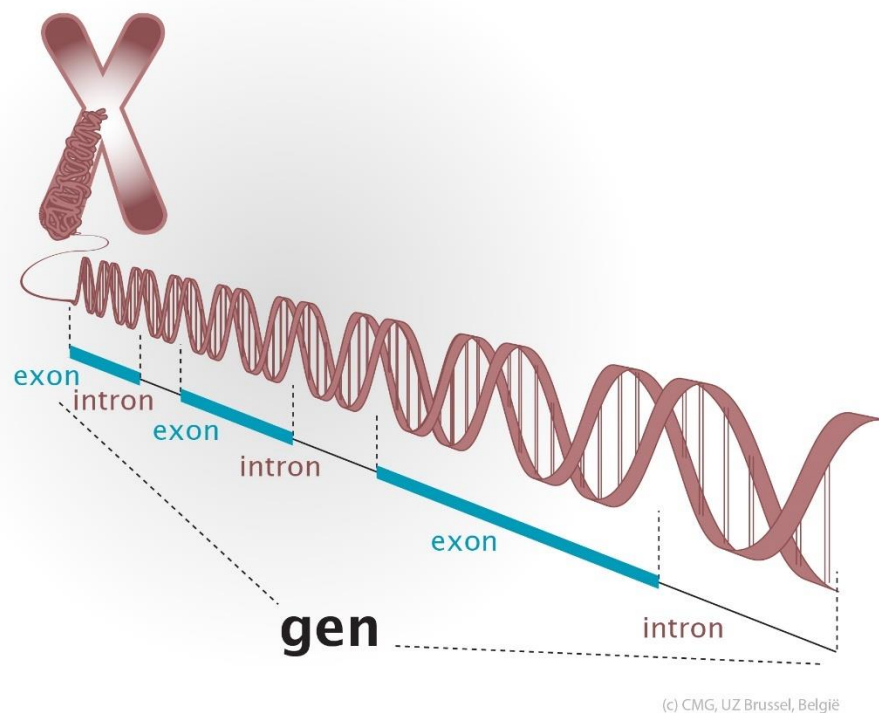
2.1.2 Chromosomen

Zoals eerder vermeld, bevindt het erfelijke materiaal bij eukaryoten zich in de celkern en meer bepaald in de chromosomen. Deze zijn enkel zichtbaar tijdens de mitose (celdeling). Iedere gezonde menselijke cel bezit 46 chromosomen, waarvan 23 afkomstig van de vader en 23 van de moeder. Chromosomen komen in paar voor en worden homologe chromosomen genoemd. Eén paar van de chromosomen zijn geslachtschromosomen, XY of XX. Deze bepalen of een individu respectievelijk een man of een vrouw is. De overige chromosomen worden aangeduid als autosomen [10] [11].

2.1.3 Genen

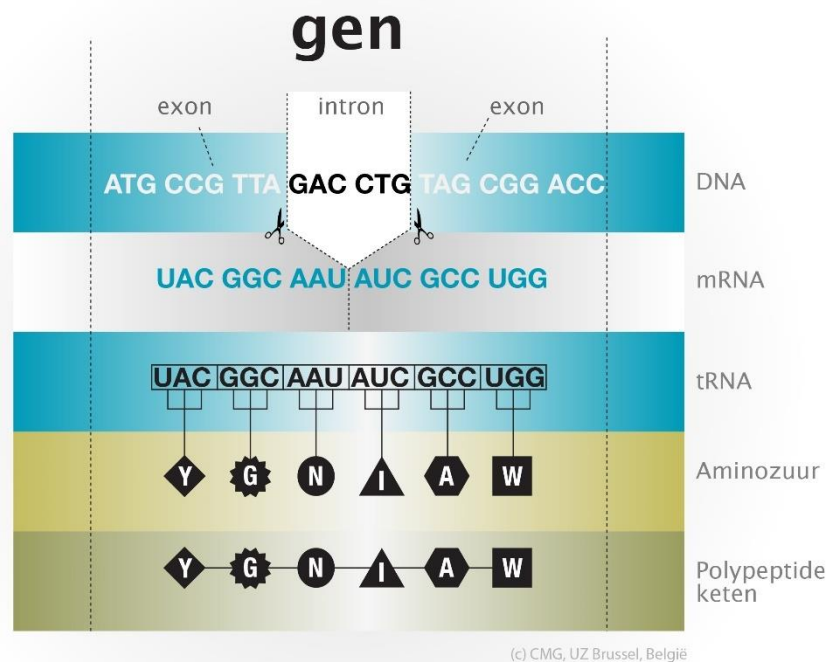
Chromosomen zijn de dragers van genen en bevatten de erfelijke eigenschappen van een individu. Een gen is een nucleotide volgorde waarvan de sequentie bekend is en die codeert voor een eiwit, transfer ribonucleicacid (tRNA) of ribosomaal nucleicacid (rRNA). Onderzoek heeft aangetoond dat slechts 1,2% van het DNA codeert en zorgt voor de productie van proteïnen, tRNA of rRNA. Door dit feit wordt het DNA in een cel onderverdeeld in coderend DNA en niet-coderend DNA. De proteïne coderende

sequenties worden exonen genoemd en de overige sequenties worden aangeduid als intronen of “junk DNA” (zie Figuur 1) [10] [11].



Figuur 1: Intronen en exonen in een gen [16]

Wanneer een gen tot expressie komt, gaat het DNA tijdens de transcriptie overgeschreven worden tot complementair messenger ribonucleicacid (mRNA). Vervolgens wordt door splicing de intron informatie verwijderd zodat enkel de exon informatie overblijft. Voor de aanmaak van een proteïne zal vervolgens de translatie starten. In deze stap zal het mRNA met behulp van tRNA overgeschreven worden tot aminozuren. Voor ieder gen zullen 3 opeenvolgende nucleotiden coderen voor een aminozuur en dit zijn de bouwstenen voor proteïnen. De drie opeenvolgende nucleotiden worden ook aangeduid als een codon. De volgorde van de nucleotiden bepalen de volgorde waarin aminozuren aan elkaar geregen worden. Deze stappen zijn ook weergegeven in Figuur 2. Om de juiste eiwitten te produceren, is het noodzakelijk dat de juiste opeenvolging van nucleotiden in het DNA aanwezig is. Indien dit niet het geval is, bestaat de mogelijkheid dat cellen incorrect functioneren [10] [11].



Figuur 2: Transcriptie (DNA tot mRNA) en translatie (mRNA tot polypeptideketen) van een gen [16]

2.1.4 Soorten van erfelijke aandoeningen

Erfelijke aandoeningen kunnen ingedeeld worden naargelang het type van de overerving. Er zijn drie mogelijke types, namelijk autosomaal dominante, autosomaal recessieve of geslachtsgebonden aandoeningen. Een gen is opgebouwd uit twee kopieën of allelen van de dubbelstreng. Wanneer twee identieke allelen voorkomen, wordt dit aangeduid als homozygoot en wanneer twee verschillende allelen voorkomen, heterozygoot. Het is ook mogelijk dat een persoon voor een bepaald gen slechts één allel heeft en dit wordt hemizyoot genoemd. Dit is het geval bij mannen die bij de XY-chromosomen hemizyoot is voor de x-gebonden genen. Een tweede mogelijkheid komt voor bij genen waar door deletie één allel verwijderd is [11] [17].

Bij een autosomaal dominante aandoening is er een gen gemuteerd, gelegen op één van de 22 autosomen. Er moet slechts één van de twee allelen gemuteerd (heterozygoot) zijn en het effect van het genproduct van het gemuteerde allel krijgt de bonvenhand waardoor het fenotype van de aandoening tot uiting komt [11] [17].

Bij een autosomaal recessieve aandoening moeten beide allelen drager zijn van een mutatie, gelegen op één van de 22 autosomen. Hier komt het fenotype slechts tot uiting indien beide allelen gemuteerd zijn. Dit kan gaan om dezelfde mutatie (homozygoot), maar het is ook mogelijk dat twee verschillende mutaties op de twee allelen voorkomen wat samengesteld heterozygoot wordt genoemd. Indien slechts één van de twee allelen de mutatie bezit, komt het effect van het gezonde allel tot uiting [11] [17].

Een laatste type is een geslachtsgebonden aandoening waar de mutatie gelegen is op de geslachtschromosomen. Ook hier komt de aandoening voor als recessief of dominant. Omdat mannen een X- en een Y-chromosoom hebben en vrouwen twee X-chromosomen, resulteert een mutatie op het X-chromosoom die niet overlapt wordt door het Y chromosoom bij mannen altijd in het fenotype van de aandoening (hemizygoot) [11] [17].

Vervolgens moet ook vermeld worden dat niet alle erfelijke aandoeningen overgeërfd zijn. Het is ook mogelijk dat de genetische afwijkingen spontaan ontstaan, wat aangeduid wordt als *de novo* mutaties. In dit geval hebben de ouders de genetische aandoening niet terwijl de nakomeling wel een genetische mutatie heeft en deze mutatie dan ook doorgeeft aan verdere generaties [17].

Tot slot wordt ook een verschil gemaakt tussen een constitutionele afwijking en mozaïcisme. Bij een constitutionele afwijking gaan alle cellen in het lichaam de mutatie bezitten in een bepaald gen. Bij mozaïcisme gaan niet alle cellen in het lichaam hetzelfde genetisch materiaal bezitten ondanks dat deze cellen voorkomen uit dezelfde bevruchte eicel. Dit komt bijvoorbeeld voor bij kanker [11].

2.1.5 Soorten van mutaties en gevolgen

Mutaties komen voor op verschillende niveaus, namelijk op chromosomaal niveau of op DNA-niveau.

Op chromosomaal niveau treden mutaties op die de structuur van een chromosoom veranderen. Dit kan onder andere door grote deleties of inserties die meer dan één gen omvatten. Een andere mogelijkheid is dat een stuk van het chromosoom een inversie, translocatie of duplicatie ondergaat. Bij een translocatie wordt DNA uitgewisseld tussen chromosomen onderling en bij een duplicatie wordt DNA dubbel ingebouwd in een chromosoom. Duplicatie van het volledige chromosoom is ook mogelijk, een bekend voorbeeld is trisomie 21 waarbij een duplicatie van chromosoom 21 voorkomt en dit leidt tot het syndroom van Down [18].

Op DNA-niveau treedt er een fout op binnen één gen. Het kan gaan om een puntmutatie waarbij één nucleotide vervangen is door één andere. Een tweede mogelijkheid is het voorkomen van een kleine deletie, duplicatie of insertie. Bij een deletie worden één of enkele basenparen verwijderd uit het gen. Bij een insertie worden één of enkele basenparen toegevoegd. In het geval van een duplicatie wordt één tot enkele nucleotiden gedupliceerd. Tot slot wordt ook gesproken van herhalingen. Deze herhalingen zitten vaak vervat in intronen, maar ze bevinden zich ook in genen. De lengte van deze herhalingen kan een impact hebben op de eiwitfunctie en dus kunnen mutaties binnen deze herhalingen negatieve gevolgen hebben [18].

Het gevolg van mutaties kan variëren van de soort mutatie en de plaats waar de mutatie voorkomt. Indien een mutatie voorkomt in intronen hebben deze meestal weinig gevolgen omdat intronen (nog) geen duidelijke functie hebben. Het genotype verandert, maar het fenotype niet (polymorfisme). Indien mutaties voorkomen in +/- 20 basenparen voor of na exonen (met andere woorden in het intron), kunnen er wel

nadelige gevolgen zijn omdat het mRNA wordt aangepast en als gevolg de structuur van het eiwit mogelijk verandert [18]. Dit soort mutaties wordt ook aangeduid als splice mutaties.

Puntmutaties hebben als gevolg dat een codon wordt aangepast wat resulteert in of een “stille” mutatie, of een missense mutatie of een nonsense mutatie. Bij een “stille” mutatie resulteert het codon in hetzelfde aminozuur met als gevolg dat hetzelfde eiwit geproduceerd wordt zonder nadelige gevolgen. Een missense mutatie is een mutatie waarbij het gen codeert in een ander aminozuur. In het geval van een nonsense mutatie codeert het nieuwe codon voor een stopcodon. Hierdoor wordt het eiwit ingekort en verliest het mogelijk zijn functie [18].

Deleties en inserties hebben als gevolg dat er nucleotiden of aminozuren toegevoegd of verwijderd worden waardoor de mogelijkheid op een frameshift mutatie ontstaat. In dat geval zal de plaats (reading frame) waar het gen afgelezen wordt, veranderen. De eigenschappen van het al dan niet ontstane eiwit, verandert al dan niet volledig [18].

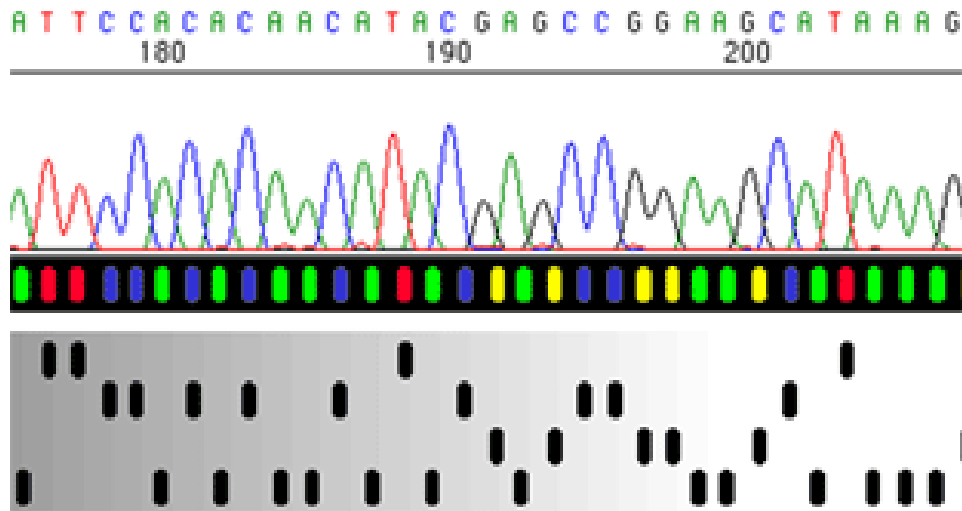
2.2 Technieken voor het opsporen van mutaties

2.2.1 Eerste generatie sequencer/Sanger sequencer

Om mutaties in het DNA op te sporen, moet de nucleotide-volgorde achterhaald worden. Eén van de eerste technieken hiervoor is de dideoxy-methode van Sanger [11].

In het principe van Sanger wordt gebruik gemaakt van selectieve incorporatie van terminatorende dideoxynucleotiden. De binding van het volgende nucleotide in de sequentie is niet mogelijk omdat op de 3'-plaats een H staat waardoor geen fosfoesterbinding kan gevormd worden. Het verlengen van de keten wordt bij het toevoegen van dit nucleotide steeds afgebroken [6].

In Figuur 3 is een voorbeeld van DNA-opheldering na de methode van Sanger weergegeven. Er wordt steeds gestart vanaf enkelstrengs DNA en hier worden geschikte primers, deoxynucleotiden, DNA-polymerase en fluorescent gemerkt terminatorende dideoxynucleotiden aan toegevoegd. De reactie kan vervolgens opgaan en er worden DNA-sequenties gevormd van verschillende lengtes omdat het fluorescent gemerkte nucleotide op verschillende plaatsen wordt ingebouwd en dus op verschillende plaatsen de sequentie beëindigd wordt. Met behulp van capillaire gelelektroforese worden de enkelstrengs sequenties gescheiden omdat ze verschillen van lengte. De fluorescerende nucleotiden worden gemeten en op deze manier kan de DNA-sequentie afgelezen worden [6].



Figuur 3: Vergelijking sequentie ladder met fluorescentie pieken [19]

2.2.2 Massieve parallelle sequencer

Door de nood aan snellere en goedkopere technieken voor het bepalen van de DNA-sequentie, werden alternatieve technieken uitprobeerd. Er was niets dat de methode van Sanger kon overtreffen tot de introductie van massieve parallelle sequencer (MPS). Aan de hand van deze methode konden massief gegevens in parallel worden geproduceerd aan een redelijke prijs en binnen een korter tijdsbestek. Er zijn verscheidene technieken van MPS, maar ze volgen allemaal hetzelfde principe: bereiding van een template, sequencer met beeldvorming en tot slot de alineering aan het genoom of de assemblage van de bekomen sequenties [6].

2.2.2.1 *Principe van MPS*

De techniek van MPS die in een diagnostiek labo in UZ Leuven wordt toegepast is de Illumina sequencerings techniek voor het sequenceren van DNA aan de hand van genpanels. De workflow van MPS is geïllustreerd in Figuur 4.

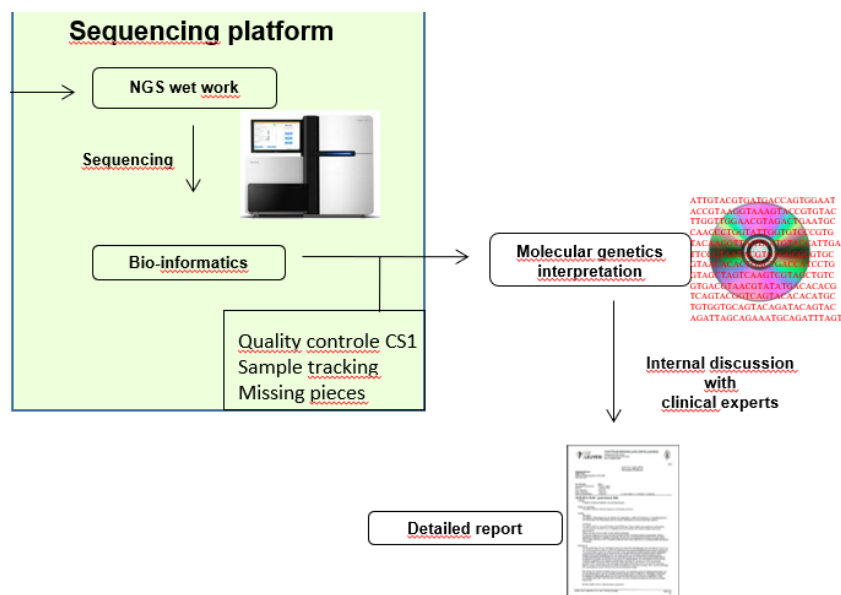
In eerste instantie wordt een DNA-bibliotheek aangemaakt. Nadat het DNA geïsoleerd is, wordt de bereiding van de template uitgevoerd (“NGS wet work” (= next generation sequencing wet work) in Figuur 4). Het DNA van de patiënt wordt gefragmenteerd door middel van sonicatie in DNA-fragmenten met een gemiddelde lengte van 300 basenparen. Adapters worden aan de DNA-fragmenten toegevoegd. Daarnaast worden ook unieke barcodes toegevoegd aan alle DNA-fragmenten van een patiënt. Deze zijn verschillend per patiënt. De unieke barcodes zijn sequenties die gebruikt worden om de DNA-fragmenten van verschillende patiënten te identificeren en op deze manier kunnen meerdere stalen tegelijk gesequencerd worden. Deze toepassing wordt ook multiplexen genoemd. Deze templates kunnen clonaal geamplificeerd worden waardoor clusters van dezelfde templates bekomen worden [6].

In het geval van clonale amplificatie wordt in de tweede stap overgegaan tot de sequencer en beeldvorming. Deze stap illustreert “sequencer” op het toestel Hiseq 2500 in Figuur 4. Aan de hand van fluorescentie kunnen de toegevoegde nucleotiden aan alle templates afgelezen en gevisualiseerd worden [6].

In de derde stap gebeurt de assemblage van de bekomen sequenties. Er worden miljoenen clusters op éénzelfde moment gesequeneerd, ook wel ‘reads’ genoemd worden. Via mapping worden deze ‘reads’ vergeleken met een referentie-genoom. Door overlappings van de ‘reads’ met het referentie-genoom, is het mogelijk om de DNA sequenties van de te onderzoeken genen te achterhalen. Om de gigantische hoeveelheid aan informatie die vrijkomt te onderzoeken en te interpreteren, zijn bio-informatica hulpmiddelen noodzakelijk. Dit gebeurt in de stap “Bio-informatics” in Figuur 4 [6] [20].

Indien sequenties voorkomen die een andere sequentie hebben dan het referentie-genoom, worden deze bestempeld als een variant. De varianten worden vervolgens aan de hand van software, zoals bijvoorbeeld Cartagenia, geanalyseerd worden (“Molecular genetics interpretation” in Figuur 4). [20]

In de laatste stappen “internal discussion with clinical experts” en “Detailed report” in Figuur 4 worden de resultaten van de varianten na de analyse in overleg met klinische experts voor de specifieke aandoeningen overlopen [20].



Figuur 4: Workflow MPS [20]

2.2.2.2 Verschil met Sanger Sequencing

Het verschil met Sanger sequencing is dat het de mogelijkheid biedt om meerdere genen in parallel te sequencen. Dit is voornamelijk gunstig bij heterogene aandoeningen, dat wil zeggen aandoeningen die veroorzaakt kunnen worden door mutaties in verschillende genen. Daarbij kan nog aangevuld worden dat niet alleen DNA van één patiënt, maar DNA van meerdere patiënten tegelijk gesequeneerd kan worden. Dit wordt mogelijk gemaakt door unieke barcodes toe te voegen aan het DNA van elke patiënt. Dit principe wordt ook ‘multiplexen’ genoemd [6].

Een ander verschil is dat bij Sanger sequencing het aflezen van de sequentie pas op het einde gebeurt door de via gelelektroforese bekomen strengen te rangschikken aan

de hand van hun lengte. In het geval van MPS wordt na elke cyclus voor iedere template de toegevoegde base afgelezen [6].

2.2.2.3 Toepassingen van MPS

MPS in de diagnostiek kan aangevangen worden met behulp van een doelgerichte sequencer of met een mendeloom analyse. Bij een doelgerichte sequencer wordt een bepaalde set van genen (genpanel) gericht gecapteerd uit het genomisch materiaal van de patiënt en nadien gesequeneerd. Bij een mendeloom analyse (dit wordt ook klinisch exoom genoemd) worden alle exonen gesequeneerd die gelinkt zijn met (mono)gene aandoeningen. Ondertussen zijn er ongeveer 6000 genen gelinkt aan erfelijke ziekten, deze zijn vervat in het huidige mendeloom dat aangewend wordt op het CME. Welke toepassing gebruikt wordt, is afhankelijk van de complexiteit en heterogeniteit van de klinische vraagstelling [12].

Andere toepassingen zijn volledige exoom-sequencer of zelf volledige genoom-sequencer. Bij een volledige exoom-sequencer worden alle exonen gesequeneerd (>20 000 genen) en bij een volledige genoom-sequencer wordt het volledige genoom gesequeneerd wat voornamelijk voorlopig zijn toepassing kent in het onderzoek [12].

2.3 Erfelijke aandoeningen

In de volgende paragrafen worden de erfelijke ziekten besproken die in dit onderzoek zullen behandeld worden, namelijk myopathie, cardiomyopathie en erfelijke aritmogene hartafwijkingen.

2.3.1 Myopathie

2.3.1.1 *Wat is myopathie?*

Congenitale spierdystrofie en myopathie zijn een klinisch en genetisch heterogene groep van aandoeningen. Kenmerkend aan deze aandoeningen zijn een langzaam toenemende spierzwakte (dystrofie) en het vertraagd ontspannen van aangespannen spieren (myotonie). Historisch gezien wordt deze groep stoornissen onderverdeeld op basis van spierhistopathologische kenmerken. Congenitale spierdystrofie (CMD) is een heterogene groep van stoornissen gekenmerkt door spierzwakte in de eerste maanden van het leven. Spierbiopsie verandert het bereik van myopatisch tot openlijk dystrofisch afhankelijk van de spierbiopsie en de leeftijd bij biopsie. Congenitale myopathie (waaronder X-gebonden myotubulaire myopathie, centronucleaire myopathie, centrale kernaandoening en nemalinemyopathie) heeft doorgaans een normale of zo goed als normale serum-CK-concentratie en histologisch bewijs van spierbiopsie van ontwikkelings- en structurele spierveranderingen in plaats van dystrofische veranderingen [1] [2].

2.3.1.2 *Oorzaak*

De ziekte kan van genetische oorsprong zijn waardoor het een erfelijke ziekte wordt. Deze oorsprong van myopathie wordt ook primaire myopathie genoemd en het kan doorgegeven worden van generatie tot generatie. Bij primaire myopathie is er een mutatie in een bepaald gen waardoor de ziekte ontstaat. Deze mutatie kan autosomaal dominant, autosomaal recessief of geslachtsgebonden zijn. De overige mogelijkheden worden benoemd tot secundaire myopathie [2].

2.3.1.3 Symptomen

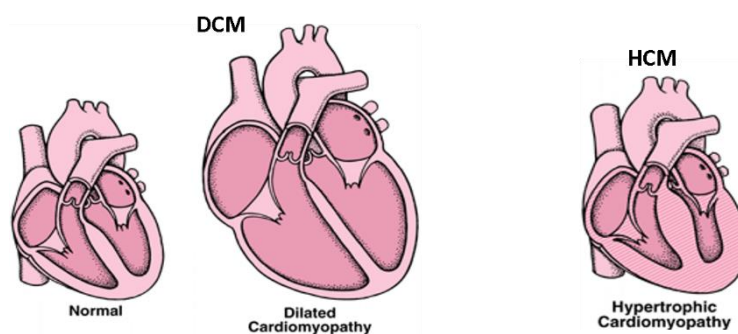
De klinische symptomen verschillen afhankelijk van patiënt tot patiënt. Ook bij eenzelfde patiënt kunnen de symptomen verschillend zijn van spiergroep tot spiergroep. De eerste symptomen die vastgesteld worden zijn het geleidelijk aan verminderen van de spierkracht bij de betreffende spier. Vervolgens smelten de aangetaste spieren weg, dit fenomeen wordt ook amyotrofie genoemd en heeft een negatief effect op de spierfunctie [2].

2.3.2 Cardiomyopathie

2.3.2.1 Wat is cardiomyopathie?

Cardiomyopathie omvat aandoeningen van de hartspier waardoor het hart minder goed kan samentrekken of ontspannen. Het gevolg hiervan is dat het bloed minder goed rondgepompt wordt wat vaak resulteert in hartfalen. Deze aandoeningen zijn chronische ziektes en de verschillende varianten hiervan kunnen, op basis van cardiografische kenmerken, worden opgedeeld in vier klassen van aandoeningen: hypertrofe cardiomyopathie (HCM), gedilateerde cardiomyopathie (DCM), linkerventrikel non-compactie cardiomyopathie (LVNC) en aritmogene rechterventrikel cardiomyopathie (ARVC) [3] [4] [5] [6].

In het geval van DCM verslapt het hart waardoor de hartspier wijder wordt. Het bloed wordt minder rondgepompt dan normaal, voornamelijk tijdens inspanningen. Omdat de hartkleppen slechter openen en sluiten, ontstaat de kans dat de kleppen lekken [5]. Bij HCM is de hartholte kleiner omdat een deel van de hartspier verdikt is. Per hartslag wordt minder bloed rondgepompt dan normaal. De hartspier trekt minder goed samen en verliest aan elasticiteit als gevolg van de verdikte hartspier [5]. In Figuur 5 zijn enkele types van cardiomyopathie weergegeven. Hieruit is duidelijk af te leiden dat bij DCM de hartspier veel dunner is en bij HCM de hartspier veel dikker [3] [4] [21].



Figuur 5: Types van cardiomyopathie: van links naar rechts is respectievelijk een normaal hart, DCM en HCM weergegeven [21]

2.3.2.2 Oorzaak

De oorzaak van cardiomyopathie is afhankelijk van het type. Het kan vanaf de geboorte al aanwezig zijn en het is dan een erfelijke afwijking als gevolg van mutaties in bepaalde genen. Een andere mogelijkheid is dat de hartspierziekte ontstaat indien het hart langdurig achter elkaar wordt belast. Dit wordt bijvoorbeeld veroorzaakt door alcoholmisbruik, drugs, vernauwde kransslagaders, diabetes, hartklepziekte, zware

metalen, virusinfecties, kanker-behandelingen en extreme emotionele of fysieke stress [5] [22].

2.3.2.3 *Symptomen*

De symptomen verschillen van persoon tot persoon en de klachten zijn periode afhankelijk. Veel voorkomende klachten zijn: benauwdheid en kortademig zijn, vocht vasthouden, zich moe en futloos voelen, 's nachts vaak plassen, onregelmatige of te snelle hartslag hebben, pijn op de borst voelen en licht in het hoofd zijn, duizeligheid of flauwvallen [5].

2.3.3 Erfelijke aritmogene hartafwijkingen

2.3.3.1 *Wat zijn erfelijke aritmogene hartafwijkingen of hartritmestoornissen?*

Hartritmestoornissen is een verzamelnaam voor verschillende stoornissen van de hartslag die een breed gamma van al dan niet ernstige aandoeningen weergeeft. De oorsprong van deze aandoeningen ligt ofwel in de kamer ofwel in de voorkamer van het hart. Er zijn verschillende mogelijkheden van ritmestoornissen bestaande uit een volledig onregelmatige hartslag, een te snelle of te trage hartslag of één of enkele extra hartslagen. Hartritmestoornissen worden opgedeeld in negen klassen van aandoeningen: het lange QT-syndroom (LQTS), het Brugada syndroom (BrS), catecholaminerge polymorfe ventriculaire tachycardie (CPVT), het korte QT-syndroom (SQTS), vroege repolarisatie syndroom (ERS), idiopathische ventriculaire fibrillatie (IVF), voorkamerfibrillatie (AF), geleidingsstoornissen (CCD) en het sick sinus syndroom (SSS) [7] [8] [9] [23] [24].

2.3.3.2 *Oorzaak*

Hartritmestoornissen komen vaker voor op oudere leeftijd omdat de prikkelgeleiding van het hart ook verouderd met de leeftijd. Ritmestoornissen kunnen ontwikkeld worden door diverse hartziekten zoals hartfalen, een aangeboren hartaandoening, hartklepafwijkingen, een hartspierziekte of vernauwde kransslagaders. Ook andere ziektes kunnen verantwoordelijk zijn zoals een schildklier te snel die of te traag werkt of een longziekte die een tekort aan zuurstof in het bloed veroorzaakt. Het gebruik van bepaalde medicijnen, cafeïne, alcohol en drugs kunnen leiden tot hartritmestoornissen. De aandoeningen kunnen ook overgeërfd worden van de ouders. Tot slot kan de oorzaak onduidelijk zijn en kan er geen directe oorzaak worden vastgelegd van de hartritmestoornis [25] [26].

2.3.3.3 *Symptomen*

Veel voorkomende klachten zijn hartkloppingen, pijn op de borst, druk of benauwdheid, hyperventilatie, transpireren, misselijkheid, kortademigheid, (bijna) flauwvallen en 'zwart' voor de ogen zien. Dit kan het gevolg zijn van specifieke triggers die afhankelijk zijn van het type van de aandoening. Deze klachten kunnen van korte en lange duur zijn, gaande van enkele minuten tot uren. Het is ook mogelijk dat een individu met hartritmestoornissen geen klachten ondervindt [25] [26].

3 Doelstellingen

Het doel van dit onderzoek is het aflijnen van een genpanel met een minimale hoeveelheid aan genen, met andere woorden de kerngenen, gekoppeld aan myopathie enerzijds en cardiomyopathie en hartritmestoornissen anderzijds.

Om te oordelen of een kandidaat-gen al dan niet als een kerngen bestempeld kan worden, zal beschikbare software geëvalueerd worden. Zo zal er getracht worden een groep van kerngenen af te lijnen die vervolgens door de verschillende diagnostische centra als vertrekpunt voor hun diagnostische panels kan gebruikt worden.

4 Methode

Om kerngenen voor een bepaald genpanel te kunnen identificeren, wordt gebruikt gemaakt van algoritmes die later besproken worden in paragraaf 4.2. In eerste instantie wordt een intersectie gemaakt van bestaande genlijsten: hiervoor worden de genpanels van UZ Leuven voor de betreffende aandoeningen vergeleken met genlijsten uit andere instellingen en met de huidige literatuur.

4.1 Intersectie van genlijsten

De intersectie van genlijsten gebeurt met Microsoft Excel. De genlijst van UZ Leuven wordt uitgezet en vergeleken met andere bronnen. Wanneer genen voorkomen uit de nieuwe bron en afwezig zijn in het genpanel van het UZ Leuven, worden deze afzonderlijk uitgezet. Uiteindelijk wordt het voorkomen van elk gen gesommeerd zodat een totaal voorkomen van ieder gen in de verschillende bronnen bekomen wordt. In dit onderzoek worden twee intersecties gemaakt, voor myopathie enerzijds en voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen anderzijds.

4.1.1 Genlijsten

De genlijst van myopathie wordt vergeleken met genlijsten uit instellingen van België, Nederland en Duitsland. Voor België wordt een vergelijking gemaakt met genlijsten uit het Erasmus Ziekenhuis in Anderlecht (ULB), het Universitair Ziekenhuis Gent (UZ Gent) en het Centrum van Medische Genetica van het Universitair Ziekenhuis Brussel (CMG-UZB). Voor de instelling uit Nederland werd de vergelijking gemaakt met de genlijst van het centrum voor genetica in Nijmegen en voor Duitsland met het bedrijf Centogene.

De genlijst van cardiomyopathie en hartritmestoornissen wordt ook vergeleken met genlijsten uit instellingen van België, Nederland en Duitsland. Voor België wordt een vergelijking gemaakt met genlijsten uit het Centrum van Medische Genetica van het Universitair Ziekenhuis Antwerpen (CMG-Antwerpen), UZ Gent en CMG-UZB. Voor de instelling uit Nederland werd de vergelijking gemaakt met de genlijst van het centrum voor genetica uit Nijmegen en voor Duitsland met het bedrijf Centogene. Verder werd de genlijst aangevuld met drie wetenschappelijke publicaties, namelijk Forleo *et al.* (2017) [4], Broendberg *et al.* (2018) [27] en Care *et al.* (2017) [28].

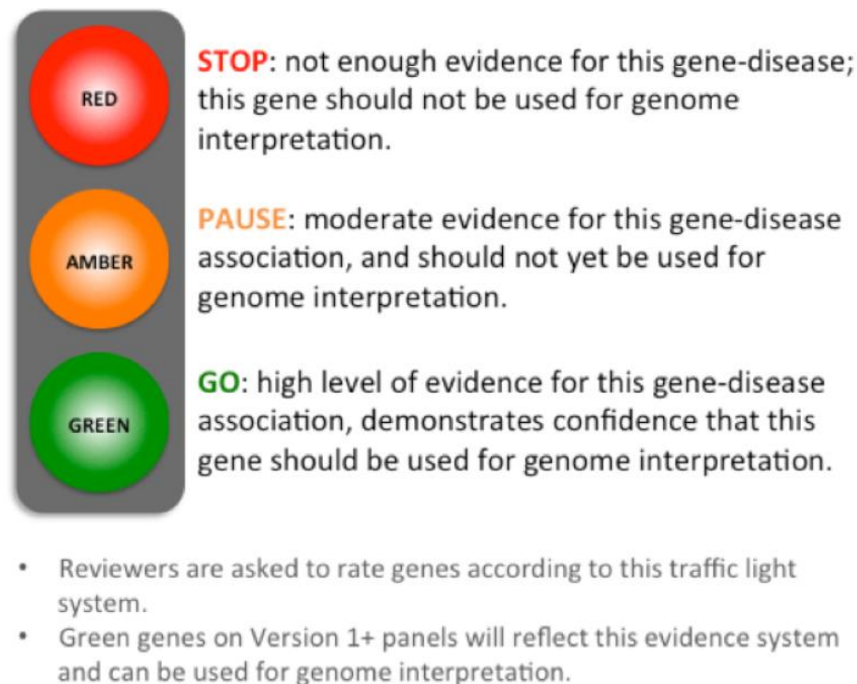
4.2 Toegepaste software

Nadat de intersectie van de genlijsten is afgerond, worden een aantal algoritmes aangewend om te analyseren welke genen bestempeld kunnen worden tot kerngenen. Hiervoor worden drie algoritmes vergeleken met elkaar, namelijk Panelapp, Ambry Genetics en ClinGen. Voor één specifiek gen van zowel myopathie als cardiomyopathie en hartritmestoornissen worden alle algoritmes afgetoetst aan de hand van de volgende parameters: de mogelijkheid om de analyse zelf te doen, de gebruiksvriendelijkheid van het algoritme, de tijd die de analyse in beslag neemt en de objectiviteit van het algoritme.

Vervolgens wordt de analyse uitgevoerd met het algoritme dat het best aan deze criteria voldoet om de kerngenen te definiëren.

4.2.1 Panelapp

Panelapp is een applicatie van Genomics England. De website van Genomics England Panelapp bevat een databank van bestaande genen en genpanels [29]. De genen uit de genlijsten kunnen via deze databank opgespoord worden, maar niet verder onderzocht worden. De genen zijn gecensureerd door een expert groep die vervolgens een review maken. Als gebruiker kan de analyse niet zelf uitgevoerd worden en kan er aan de reviews van de expert groep niets toegevoegd worden. Er kan enkel voortgegaan worden op de expertise en besluitvorming van de expertgroep omdat de reviews alleen gelezen kunnen worden. Afhankelijk van het gen zijn al dan niet reviews beschikbaar waarin een gen geanalyseerd werd voor een specifieke aandoening. Panelapp gebruikt een systeem met verkeerslichten waarbij een gen een rode, amber of groene kleur krijgt als beoordeling voor een specifieke aandoening zoals getoond in Figuur 6. Enkel groen duidt aan dat er voldoende bewijs is voor een gen-aandoening relatie, maar dat kritisch moet omgegaan worden met het interpreteren van deze reviews. De reviews moeten eerst gecontroleerd worden door beheerders van Genomics England. Na deze controle krijgt de review een versie 1.0 indien het goedgekeurd is en mag deze gebruikt worden voor interpretatie [13].



Figuur 6: Verkeerslichten systeem van Panelapp om genen te beoordelen: de rode kleur betekent dat er te weinig bewijs is, amber middelmatig bewijs en groen sterk bewijs voor een gen-aandoening relatie [29]

4.2.2 Ambry Genetics

Ambry Genetics is een Amerikaans bedrijf dat werkt rond MPS. Het heeft een puntensysteem ontwikkeld voor het bepalen van een gen-aandoening relatie. Over het algemeen worden punten gegeven op basis van een literatuurstudie. Dit omvat naast wetenschappelijke artikelen ook publieke mutatie databanken. De gevonden informatie moet deskundig beoordeeld worden op kwaliteit en er moet vermeden worden om informatie te halen uit artikelen die handelen over dezelfde patiënten of families om foutieve scores te voorkomen. Ambry Genetics gebruikt een systeem waarbij het gen geanalyseerd wordt op genetisch niveau en op experimenteel niveau.

Dit wordt vervolgens in een matrix gegoten en scores kunnen gegeven worden aan de hand van informatie die teruggevonden wordt uit de literatuurstudie [14].

Onder genetisch bewijs worden punten toegekend aan het aantal gerapporteerde, niet-gerelateerde patiënten. Wanneer meer dan 25 patiënten gerapporteerd worden zonder tegenstrijdend bewijs, leidt dit tot een “definitieve” score. Vervolgens kan ook een punt verdiend worden wanneer er sterk statistisch genetisch bewijs is voor gen-aandoening relatie en criteria afhankelijk van erfelijkheid. In het geval van een autosomale dominante aandoening kan een punt gegeven worden voor de identificatie van significante overmaat aan *de novo* wijzigingen in een exon- of genoom-onderzoek van grote populaties. Voor autosomaal recessieve aandoeningen kan een punt gegeven worden wanneer een “logaritme of the odds” (LOD score) van minstens 3.0 bekomen wordt. De LOD score is een kwantificatie van genetisch verwantschap en kan berekend worden uit grote families waarvan voldoende cosegregatie data (genetische data van familie gerelateerde personen) beschikbaar is. [14] Deze informatie kan toegepast worden in Tabel 1 **Error! Reference source not found.** [15].

Tabel 1: Het bepalen van de LOD score voor autosomaal recessieve aandoeningen [15]

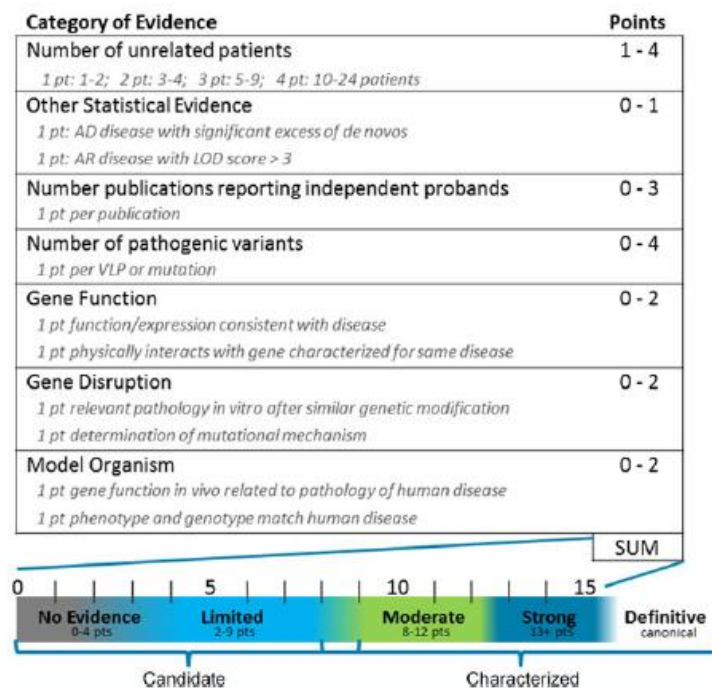
		Unaffecteds										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Affecteds	3	1.20	1.32	1.45	1.50	1.70	1.82	1.95	2.07	2.20	2.33	2.45
	4	1.81	1.93	2.06	2.18	2.31	2.43	2.56	2.68	2.81	2.93	3.06
	5	2.41	2.53	2.66	2.78	2.91	3.03	3.16	3.28	3.41	3.53	3.66
	6	3.01	3.14	3.26	3.39	3.51	3.63	3.76	3.88	4.01	4.13	4.26
	7	3.61	3.74	3.86	3.99	4.11	4.24	4.36	4.49	4.61	4.74	4.86
	8	4.21	4.34	4.46	4.59	4.71	4.84	4.96	5.09	5.21	5.34	5.46
	9	4.82	4.94	5.07	5.19	5.32	5.44	5.57	5.69	5.82	5.94	6.07
	10	5.42	5.54	5.67	5.79	5.92	6.04	6.17	6.29	6.42	6.54	6.67

Drie punten kunnen gegeven worden aan het aantal gevonden publicaties over onafhankelijke proefpersonen met hetzelfde fenotype. Er kan één punt gegeven worden per publicatie met een maximum van drie punten. Belangrijk hierbij is dat kritisch moet omgegaan worden met de publicaties zodat er geen overlapping is van publicaties die over dezelfde proefpersonen gaan. Tot slot kunnen nog vier punten gegeven worden aan het aantal pathogene varianten in hetzelfde gen die leiden tot hetzelfde fenotype. Er kan één punt gegeven worden per variant met een maximum van vier punten [14].

Onder experimenteel bewijs worden ook zes punten toegekend. Twee punten zijn beschikbaar voor genfunctie waarbij één punt gegeven kan worden aan biochemische experimenten die aantonen dat de genfunctie of genexpressie consequent samen gaan met het fenotype van de aandoening. Een ander punt wordt toegekend indien het genproduct fysisch interactie vertoont met of dezelfde biochemische functie heeft als een ander genproduct dat betrokken is met de betreffende aandoening. Twee andere punten zijn beschikbaar voor gen-onderbreking waarbij één punt gegeven wordt aan in vitro experimenten die aantonen dat dezelfde aandoening bekomen wordt bij gelijkaardige genetische modificaties. Het tweede punt wordt gegeven wanneer experimenten het mechanisme van de mutatie hebben aangetoond. De laatste twee punten worden gegeven aan het model van het organisme waarbij één punt wordt toegekend aan experimenten die aantonen dat de genfunctie in vivo gerelateerd is aan de pathologie van de menselijke aandoening. Het tweede punt

wordt gegeven aan experimenten die aantonen dat het fenotype en het genotype van het model hetzelfde zijn als deze van de aandoening bij mensen [14].

Voor de uiteindelijke beoordeling van het gen worden de gescoorde punten opgeteld en omgezet in een maat van bewijs voor de gen-aandoening relatie zoals getoond in Figuur 7. Wanneer 0-4 punten gescoord worden, is er geen bewijs. Bij een score van 2-9 punten is er matig bewijs en tussen 8-12 punten is er middelmatig bewijs. Bij een score van meer dan 13 punten, is er sterk bewijs dat een mutatie in het geanalyseerde gen resulteert in de betreffende aandoening. Er moet steeds rekening gehouden worden met het feit dat wanneer meer dan 25 verschillende patiënten geïdentificeerd zijn voor een positieve gen-aandoening relatie, er een definitief bewijs is [14].



Figuur 7: Scoreblad voor de analyse van een gen-aandoening relatie van Ambry Genetics [14]

4.2.3 ClinGen

ClinGen tot slot gebruikt een gelijkaardig puntensysteem als Ambry Genetics. Het heeft echter een online matrix beschikbaar waar veel meer informatie toegevoegd kan worden. In tegenstelling tot Ambry Genetics wordt bij de online matrix van ClinGen controle uitgevoerd op de informatie. Iedere stap kan enkel gevalideerd worden indien de correcte nomenclatuur¹ van de informatie gebruikt wordt en alle verplichte velden ingevuld zijn. Na het toevoegen van gegevens voor een specifieke parameter, gebeurt de quotatie automatisch [15].

Het nadeel van de online versie van ClinGen is echter dat er enkel met de demo versie kan gewerkt worden. Bij deze versie worden de geanalyseerde genen slechts tijdelijk opgeslagen en na een bepaalde tijd verwijderd. Om dit te voorkomen is een registratie

¹ Bijvoorbeeld: Limb Girdle spierdystrofie kan enkel gevalideerd worden met de benaming MONDO_0016971.

nodig en hiervoor zijn vereisten noodzakelijk. Een registratie is in deze masterproef niet uitgevoerd wegens tijdsgebrek en omdat bepaalde verwachtingen zullen gecreëerd worden waar op dit moment geen engagement voor is. Door de matrix van de online versie te verwerken in Excel kan offline alsnog gewerkt worden met ClinGen. Hier wordt ook een systeem gebruikt waarbij het gen geanalyseerd wordt op genetisch niveau en op experimenteel niveau. Scores worden gegeven aan de hand van informatie die teruggevonden wordt uit de literatuurstudie [15].

Het genetisch niveau wordt onderverdeeld in case-level data en case-control data waarbij case-level data informatie nodig is over varianten en case-control data informatie over het voorkomen van de variant binnen een gezonde populatie. Het case-level wordt vervolgens onderverdeeld in het type variant en de mogelijkheid om segregatie te doen.

Voor een autosomaal dominante of geslachtsgebonden aandoening kan voor iedere familie met een *de novo* variant twee punten gegeven worden met een maximum van twaalf punten. Bij iedere niet-gerelateerde proefpersoon waar een variant wordt gevonden met een puntmutatie, kleine deletie, kleine insertie,... wordt een half punt gegeven met een maximum van zeven punten. Voor iedere niet-gerelateerde proefpersoon kan anderhalf punt gegeven worden met een maximum van tien punten indien een variant wordt gevonden met nonsense, een frameshift, multi-exon deletie of enkelvoudige deletie, volledige gen deletie,...

Voor autosomaal recessieve aandoeningen wordt bij iedere niet-gerelateerde proefpersoon waar een variant wordt gevonden met een puntmutatie, kleine deletie, kleine insertie,... een punt gegeven. Voor alle overige varianten worden twee punten gegeven. Het maximaal aantal punten dat voor autosomaal recessieve aandoeningen gegeven kan worden, is twaalf.

De berekening voor de analyse van de segregatie gebeurt aan de hand van de LOD score zoals bij Ambry Genetics. Voor recessieve aandoeningen mogen enkel punten toegekend worden indien er drie of meer individuen in een familie de bepaalde aandoening hebben. Vervolgens kan de LOD score berekend worden door het aantal aangetaste individuen en niet aangetaste individuen van de familie toe te passen op de tabel in Tabel 1. Voor dominante of geslachtsgebonden aandoeningen mogen enkel punten toegekend worden bij families waar meer dan drie segregaties zijn uitgevoerd. Hierbij mogen de aangetaste individuen in dezelfde generatie zitten. De LOD score kan vervolgens berekend worden aan de hand van Tabel 2. Afhankelijk van de gebruikte sequenceringsmethode wordt tot maximaal drie punten toegekend zoals weergegeven is in Figuur 8. Via de online matrix van ClinGen gebeurt deze berekening automatisch.

Tabel 2: Het bepalen van de LOD score voor autosomaal dominante of geslachtsgebonden recessieve aandoeningen [15]

Dominant Segregations	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4
Estimated LOD	4.5	4.2	3.9	3.6	3.3	3.0	2.7	2.4	2.1	1.8	1.5	1.2

Twaalf punten kunnen gegeven worden aan case-control data. Hier wordt een onderverdeling gemaakt in enkelvoudige variant-analyse (controle op één variant) en gezamenlijke variant-analyse (controle op meerdere varianten tegelijk) en voor beide kan een maximum van zes punten toegekend worden. De criteria die geëvalueerd worden, zijn de variant detectiemethode, het effect en de versturende factoren, de statistische significantie en de sterkte.

Het maximum aantal punten dat toegekend kan worden aan het genetisch niveau is twaalf. Het overzicht van het genetisch niveau is weergegeven op Figuur 8.

GENETIC EVIDENCE SUMMARY						
	Evidence Type	Case Information	Suggested Points/Case		Points Given	Max Score
			Default	Range		
Case-Level Data	Autosomal Dominant OR X-Linked Disorder A	Variant is <i>de novo</i>	C 2	0-3	H	M 12
		Proband with predicted or proven null variant	D 1.5	0-2	I	N 10
		Proband with other variant type with some evidence of gene impact	E 0.5	0-1.5	J	O 7
	Autosomal Recessive Disorder B	Two variants in <i>trans</i> and at least one <i>de novo</i> or a predicted/proven null variant	F 2	0-3	K	P 12
		Two variants (not predicted/proven null) with some evidence of gene impact in <i>trans</i>	G 1	0-1.5	L	
Segregation Evidence	Evidence of segregation in one or more families	Sequencing Method		0-3	Q	R 3
	Total LOD Score	Candidate Gene Sequencing	Exome/ Genome or all genes sequenced in linkage region			
	2-2.99	0.5	1			
	3-4.99	1	2			
	≥5	1.5	3			
Case-Control Data	Case-Control Study Type	Case-Control Quality Criteria	Suggested Points/Study		Points Given	Max Score
	Single Variant Analysis	<ul style="list-style-type: none"> • Variant Detection Methodology • Power • Bias and Confounding Factors • Statistical Significance 	0-6			
	Aggregate Variant Analysis		0-6		S	T 12

Figuur 8: Matrix van het genetisch niveau van ClinGen [15]

Het experimenteel niveau wordt onderverdeeld in bewijs voor de genfunctie, functionele wijziging, het model en herstel van het fenotype. Voor de biochemische functie wordt een maximum van twee punten gegeven waarbij telkens een half punt kan wordt toegekend aan bewijs voor de biochemische functie, proteïne interactie en expressie van het gen met betrekking tot de aandoening. Vervolgens kan voor de functionele wijziging ook een maximum van twee punten gegeven worden. In dit geval wordt een punt gegeven aan bewijs van functionele wijzigingen in patiënten cellen en een half punt aan bewijs van functionele wijzigingen in niet-patiënten cellen. Tot slot kan voor het model en de herstel van de aandoening een maximale score van vier punten gegeven worden. In het geval van het model kunnen twee punten toegekend worden aan een niet-menselijk organisme (bijvoorbeeld een muis) dat een gewijzigde kopie van het gen bezit en hetzelfde fenotype als het aangetaste individu vertoont.

Eén punt kan gegeven worden indien een cel cultuur een gewijzigde kopie van het gen bezit en hetzelfde fenotype als het aangetaste individu vertoont. In het geval van herstel van het gene kunnen twee punten toegekend worden aan genezing in een mens en in niet-menselijke organismen. Eén punt wordt toegekend aan herstel van het gen in een celcultuur en in patiënten cellen.

Het maximum aantal punten dat toegekend kan worden aan het experimenteel niveau is zes. Het overzicht van het genetisch niveau is weergegeven op Figuur 9.

EXPERIMENTAL EVIDENCE SUMMARY					
Evidence Category	Evidence Type	Suggested Points/		Points Given	Max Score
		Default	Range		
Function	Biochemical Function	A 0.5	0-2	L	W 2
	Protein Interaction	B 0.5	0-2	M	
	Expression	C 0.5	0-2	N	
Functional Alteration	Patient cells	D 1	0-2	O	X 2
	Non-patient cells	E 0.5	0-1	P	
Models	Non-human model organism	F 2	0-4	Q	Y 4
	Cell culture model	G 1	0-2	R	
Rescue	Rescue in human	H 2	0-4	S	
	Rescue in non-human model organism	I 2	0-4	T	
	Rescue in cell culture model	J 1	0-2	U	
	Rescue in patient cells	K 1	0-2	V	
Total Allowable Points for Experimental Evidence					Z 6

Figuur 9: Matrix van het experimentele niveau van ClinGen [15]

Het aantal punten dat gegeven wordt in de bovenstaande methode van ClinGen is de standaard-quotatie. Deze kan echter voor de meeste parameters aangepast worden, maar in dit onderzoek wordt de standaard-quotatie gebruikt.

Tot slot worden de punten omgezet in de aard van het bewijs voor de aandoening. Wanneer nul tot en met zes punten behaald zijn is er gelimiteerd bewijs. Bij een score van zeven tot en met elf punten is er middelmatig bewijs. Bij een score van twaalf tot en met achttien punten is er sterk bewijs en bij dezelfde score als sterk bewijs en wanneer deze doorheen de tijd herhaald is, is er definitief bewijs. Deze omzetting is weergegeven in Figuur 10.

GENE/DISEASE PAIR:				
Assertion criteria	Genetic Evidence (0-12 points)	Experimental Evidence (0-6 points)	Total Points (0-18)	Replication Over Time (Y/N)
Description	Case-level, family segregation, or case-control data that support the gene-disease association	Gene-level experimental evidence that support the gene-disease association	Sum of Genetic & Experimental Evidence	> 2 pubs w/ convincing evidence over time (>3 yrs)
Assigned Points	A	B	C	D
CALCULATED CLASSIFICATION		LIMITED	1-6	
		MODERATE	7-11	
		STRONG	12-18	
		DEFINITIVE	12-18 & Replicated Over Time	

Figuur 10: Classificatie volgens ClinGen [15]

4.2.4 Vergelijking toegepaste software

De vergelijking van de algoritmes wordt voor myopathie toegepast op het gen *ANO5* en voor cardiomyopathie en hartritmestornissen op het gen *PRKAG2*.

De parameters die gecontroleerd worden zijn de mogelijkheid om de analyse zelf uit te voeren, de gebruiksvriendelijkheid van het algoritme, de tijd die de analyse in beslag neemt en de objectiviteit van het algoritme.

5 Resultaten

5.1 Vergelijking genlijsten

De resultaten van de intersectie zijn beschikbaar in bijlage 1 en 2 voor myopathie en bijlage 3 en 4 voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen. De bespreking van de resultaten gebeurt in de volgende paragrafen.

5.1.1 Myopathie

Voor myopathie worden zes bronnen gebruikt. De genlijst van UZ Leuven wordt vergeleken met enkele andere genlijsten van Belgische genetische centra (zie Tabel 3) en enkele internationale lijsten (zie Tabel 4).

Tabel 3: Overzicht van de Belgische centra met de panelnaam en het aantal genen voor myopathie

Belgische centra	Panelnaam	Genen
UZ Leuven	Spierdystrofie en congenitale myopathie	162
UZ Gent	Limb Girdle spierdystrofie (LGMD)	127
CMG-UZB	Neurologische ontwikkelingsstoornissen ²	165
ULB	Spierdystrofie en myopathie	17

Tabel 4: Overzicht van de internationale centra met de panelnaam en het aantal genen voor myopathie

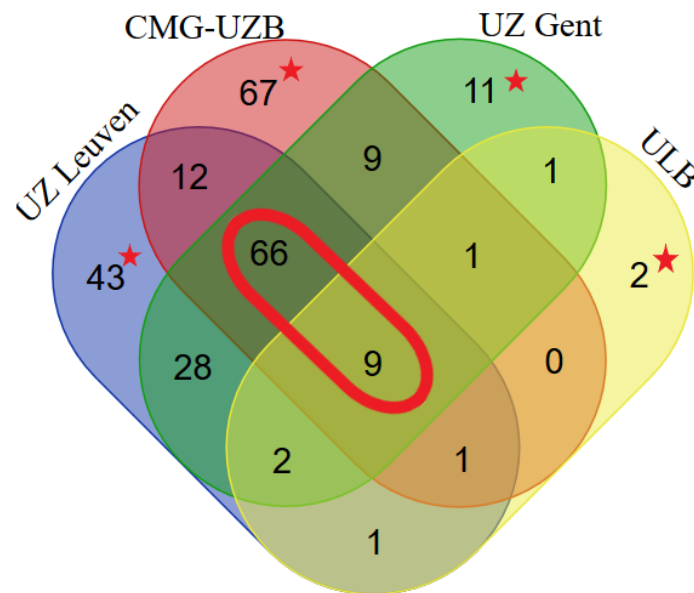
Internationale centra	Panelnaam	Genen
Centogene (Duitsland)	som van 9 panels ³	123
Rabdoudum (Nijmegen, Nederland)	Spieraandoeningen	153

In Figuur 11 is de intersectie weergegeven van de genlijsten van UZ Leuven en andere Belgische genetische centra. Omdat de genlijst van ULB zodanig klein is, zijn er slechts negen genen die in iedere bron voorkomen. Deze genen zouden bestempeld kunnen worden als kerngen omdat ze door iedere bron belangrijk worden geacht voor myopathie. Indien verder gekeken wordt naar de overlappende genen van de bronnen buiten ULB, wordt een aantal van 66 genen bekomen. Deze genen kunnen ook belangrijk zijn omdat in deze bronnen veel meer genen aanwezig zijn in vergelijking

² Neuromusculaire aandoeningen: (Alfa-dystroglycanopathie, Artogryposis (distaal), Congenitaal myasthenia syndroom, Congenitale spierdystrofie, LGMD, Motor neuron aandoeningen, Myopathie (congenitaal), Myopathie (distaal), Myopathie met fractures, Myopathie met stijve wervelkolom)

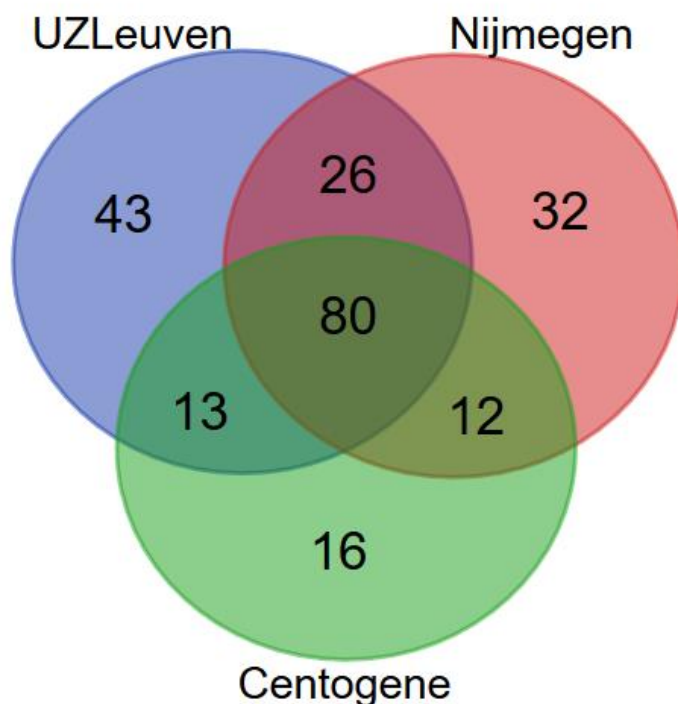
³ Bethlem myopathie panel + Congenitaal myasthenisch syndroom + Congenitale myopathie+ spierdystrofie + Spierdystrofie-dystroglycanopathie type A+ Myofibrillaire myopathie + Myopathie-rhabdomyolysis syndroom + Nemaleine myopathie panel + Non-dystrofisch myotonia panel

met ULB en hier in wordt teruggevonden. De genen die na de intersectie belangrijk worden geacht, zijn aangeduid binnen de rode lijn. Er worden voor UZ Leuven, CMG-UZB en UZ Gent respectievelijk 43, 67 en 11 genen enkel in de bron zelf teruggevonden en zijn aangeduid met een ster. Deze genen die geïsoleerd opgenomen worden in een panel van een bepaald centrum zijn het gevolg van de verschillen in de nomenclatuur en wijzen op de nood aan harmonisatie van de inhoud van de panels van de verschillende centra. Zo zit een verschil in de naam van het panel van CMG-UZB en dit panel bevat meer genen.



Figuur 11: Intersectie van de genlijsten van UZ Leuven met Belgische genetische centra voor myopathie

In Figuur 12 is de intersectie weergegeven van de genlijsten van UZ Leuven en internationale genetische centra. Hierin worden 80 genen teruggevonden die in elke lijst voorkomen. Er worden voor UZ Leuven, Nijmegen en Centogene respectievelijk 43, 32 en 16 genen enkel in de bron zelf teruggevonden.



Figuur 12: Intersectie van de genlijsten van UZ Leuven en internationale genetische centra voor myopathie

Door een volledige intersectie uit te voeren van zowel de Belgische genetische centra (4) als de internationale genetische centra (2) worden negen genen terug gevonden in alle bronnen. Deze genen worden bestempeld als kerngenen. Omdat de genlijst van het ULB zodanig klein is, worden genen die in vijf bronnen teruggevonden ook bestempeld als kerngenen en dit zijn er 52. In totaal zijn er 61 kerngenen aangeduid en deze zijn terug te vinden in Tabel 5. De genen die in 6 bronnen voorkomen zijn in het groen gemarkeerd.

Tabel 5: Lijst van de genen uit het genpanel van UZ Leuven die in 5 of 6 bronnen voorkomen voor myopathie

<i>ACTA1</i>	<i>CHRND</i>	<i>DOK7</i>	<i>KLHL40</i>	<i>POMK</i>	<i>VCP</i>
<i>AGRN</i>	<i>CHRNE</i>	<i>DYSF</i>	<i>LAMA2</i>	<i>POMT1</i>	
<i>ANO5</i>	<i>COL6A1</i>	<i>EMD</i>	<i>LDB3</i>	<i>POMT2</i>	
<i>B3GALNT2</i>	<i>COL6A2</i>	<i>FHL1</i>	<i>LMNA</i>	<i>RAPSN</i>	
<i>BAG3</i>	<i>COL6A3</i>	<i>FKRP</i>	<i>MTM1</i>	<i>RYR1</i>	
<i>BIN1</i>	<i>COLQ</i>	<i>FKTN</i>	<i>MUSK</i>	<i>SCN4A</i>	
<i>CAPN3</i>	<i>CRYAB</i>	<i>FLNC</i>	<i>MYH7</i>	<i>SGCA</i>	
<i>CAV3</i>	<i>DAG1</i>	<i>GAA</i>	<i>MYOT</i>	<i>TNNT1</i>	
<i>CFL2</i>	<i>DES</i>	<i>GFPT1</i>	<i>NEB</i>	<i>TNPO3</i>	
<i>CHAT</i>	<i>DMD</i>	<i>GMPPB</i>	<i>PLEC</i>	<i>TPM2</i>	
<i>CHRNA1</i>	<i>DNAJB6</i>	<i>GNE</i>	<i>POMGNT1</i>	<i>TPM3</i>	
<i>CHRN1</i>	<i>DNM2</i>	<i>ISPD</i>	<i>POMGNT2</i>	<i>TTN</i>	

Voor genen uit het genpanel van UZ Leuven die in vier bronnen terug te vinden zijn, wordt beslist dat deze geanalyseerd moeten worden met de beschikbare algoritmes

om te achterhalen of deze als een kerngen bestempeld mogen worden. Er zijn 25 genen die hieraan voldoen en deze zijn weergegeven in Tabel 6.

Tabel 6: Lijst van de genen uit het genpanel van het UZ Leuven die in 4 bronnen voorkomen voor myopathie

<i>CHKB</i>	<i>DPM1</i>	<i>KLHL41</i>	<i>POLG</i>	<i>SMCHD1</i>
<i>CHRNA1</i>	<i>DPM2</i>	<i>KLHL9</i>	<i>SEPN1</i>	<i>TCAP</i>
<i>CNTN1</i>	<i>DPM3</i>	<i>LAMB2</i>	<i>SGCB</i>	<i>TMEM5</i>
<i>COL12A1</i>	<i>ISCU</i>	<i>LMOD3</i>	<i>SGCD</i>	<i>TRAPPC11</i>
<i>DPAGT1</i>	<i>KBTBD13</i>	<i>MEGF10</i>	<i>SGCG</i>	<i>TRIM32</i>

De genen die in één tot en met drie bronnen voorkomen worden (voorlopig) niet bestempeld als kerngen en worden nu niet geanalyseerd met de beschikbare algoritmes. Dit zijn 76 genen en zijn weergegeven in Tabel 7. In het totaal komen 25 genen voor in drie bronnen, 27 genen in twee bronnen en 24 genen in één bron.

Tabel 7: lijst van de genen uit het genpanel van UZ Leuven die in 1 tot en met 3 bronnen voorkomen voor myopathie

gen	som	UZ Leuven	UZ Gent	CMG-UZB	ULB	Nijmegen	Centogene
<i>ALG14</i>	3	1	1	1			
<i>ALG2</i>	3	1	1	1			
<i>B4GAT1</i>	3	1		1			1
<i>C10orf2</i>	3	1			1		1
<i>CACNA1S</i>	3	1				1	1
<i>CCDC78</i>	3	1				1	1
<i>HNRNPDL</i>	3	1	1				1
<i>ITGA7</i>	3	1	1			1	
<i>LAMP2</i>	3	1	1			1	
<i>LARGE</i>	3	1				1	1
<i>LIMS2</i>	3	1	1				1
<i>MATR3</i>	3	1	1	1			
<i>MSTN</i>	3	1	1			1	
<i>MYBPC3</i>	3	1	1	1			
<i>MYF6</i>	3	1				1	1
<i>OPA1</i>	3	1				1	1
<i>PABPN1</i>	3	1	1			1	
<i>PTRF</i>	3	1	1			1	
<i>RRM2B</i>	3	1				1	1
<i>SPEG</i>	3	1	1			1	
<i>STIM1</i>	3	1	1			1	
<i>SYNE1</i>	3	1	1				1
<i>SYNE2</i>	3	1	1				1
<i>TIA1</i>	3	1	1	1			
<i>TK2</i>	3	1	1				1
<i>ACVR1</i>	2	1				1	
<i>ALG13</i>	2	1	1				
<i>B3GNT</i>	2	1				1	
<i>CASQ1</i>	2	1				1	

gen	som	UZ Leuven	UZ Gent	CMG- UZB	ULB	Nijmegen	Centogene
<i>CHCHD10</i>	2	1				1	
<i>COL13A1</i>	2	1				1	
<i>DNA2</i>	2	1				1	
<i>FKBP14</i>	2	1				1	
<i>HNRNPA1</i>	2	1		1			
<i>HNRNPA2B1</i>	2	1		1			
<i>LRP4</i>	2	1		1			
<i>MTMR14</i>	2	1					1
<i>MYH14</i>	2	1		1			
<i>MYH2</i>	2	1				1	
<i>ORAI1</i>	2	1				1	
<i>POLG2</i>	2	1					1
<i>PREPL</i>	2	1		1			
<i>SIL1</i>	2	1		1			
<i>SNAP25</i>	2	1		1			
<i>STAC3</i>	2	1	1				
<i>SUCLA2</i>	2	1					1
<i>SYT2</i>	2	1		1			
<i>TMEM43</i>	2	1	1				
<i>TOR1AIP1</i>	2	1	1				
<i>TRIM63</i>	2	1	1				
<i>VMA21</i>	2	1				1	
<i>SQSTM1</i>	2	1		1			
<i>CLN3</i>	1	1					
<i>COL4A1</i>	1	1					
<i>COL6A6</i>	1	1					
<i>DNMT3B</i>	1	1					
<i>DUX4</i>	1	1					
<i>GTDC2</i>	1	1					
<i>MYO18B</i>	1	1					
<i>PIGY</i>	1	1					
<i>PTPLA</i>	1	1					
<i>PUS1</i>	1	1					
<i>TRIM54</i>	1	1					
<i>YARS2</i>	1	1					
<i>SPTBN4</i>	1	1					
<i>ADSSL1</i>	1	1					
<i>CHD7</i>	1	1					
<i>DCST2</i>	1	1					
<i>INPP5K</i>	1	1					
<i>KY</i>	1	1					
<i>MAP3K20</i>	1	1					
<i>MYPN</i>	1	1					
<i>P4HA1</i>	1	1					
<i>POGLUT1</i>	1	1					
<i>POPDC1</i>	1	1					
<i>TRDN</i>	1	1					

Dat de genen die niet voorkomen in het genpanel het UZ Leuven, maar wel in andere bronnen, worden (voorlopig) niet geanalyseerd. Dit zijn 85 genen en zijn weergegeven in bijlage 2. Van de 85 genen zijn 60 genen aanwezig in CMG-UZB. In totaal komt één gen voor in drie bronnen, 13 genen in twee bronnen en 71 genen in één bron.

5.1.2 Cardiomyopathie en hartritmestoornissen

Voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen werden negen bronnen gebruikt. De genlijst van UZ Leuven wordt vergeleken met enkele andere genlijsten van Belgische genetische centra (zie Tabel 8), enkele internationale lijsten (zie Tabel 9) en uit literatuur (zie Tabel 10).

Tabel 8: Overzicht van de Belgische centra met de panelnaam en het aantal genen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen

Belgische centra	Panelnaam	Genen
UZ Leuven	Cardiomyopathie en hartritmestoornissen	92
UZ Gent	Cardiopathie	167
CMG-UZB	Cardiomyopathie en primaire hartritmestoornissen	126
CMG-Antwerpen	Cardiomyopathie en primaire elektrische aandoeningen	87

Tabel 9: Overzicht van de internationale centra met de panelnaam en het aantal genen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen

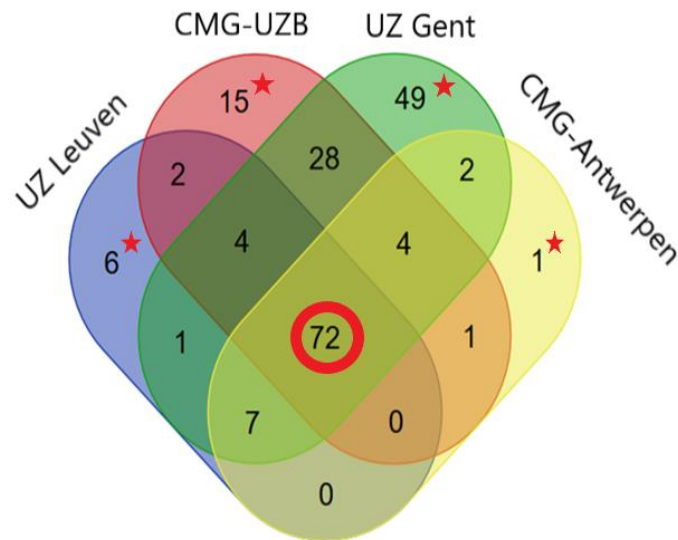
Internationale centra	Panelnaam	Genen
Centogene (Duitsland)	Cardiomyopathy: HCM, DCM & ARVC	81
Rabdoudum (Nijmegen, Nederland)	Cardiomyopathie en aritmiën	68

Tabel 10: Overzicht van genlijsten uit literatuur met de panelnaam en het aantal genen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen

Literatuur	Panelnaam	Genen
Forleo et al. (2017)	Cardiomyopathie	115
Broendberg et al. (2018)	Hartritmestoornissen	111
Care et al. (2017)	Cardiomyopathie en hartritmestoornissen	97

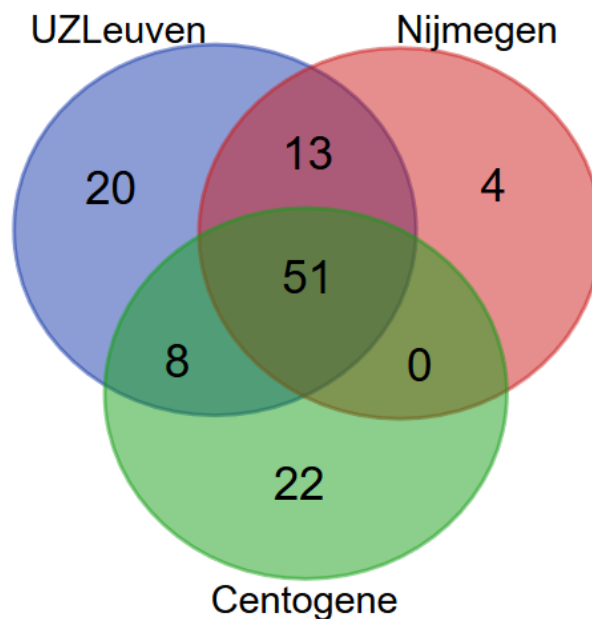
Uit Figuur 13 kan afgeleid worden dat er een grote overeenkomst is onder de Belgische centra. 72 genen komen in elke bron terug (omcirkeld in het rood) en

slechts enkele genen hebben een onvolledige overlapping (aangeduid met een rode ster). Voor CMG-UZB en voornamelijk UZ Gent komen een groter aantal genen voor die apart of in beide bronnen zitten. Ook hier zijn de genen die geïsoleerd opgenomen worden in een panel van een bepaald centrum het gevolg van de verschillen in de nomenclatuur en wijzen op de nood aan harmonisatie van de inhoud van de panels (zie Tabel 8).



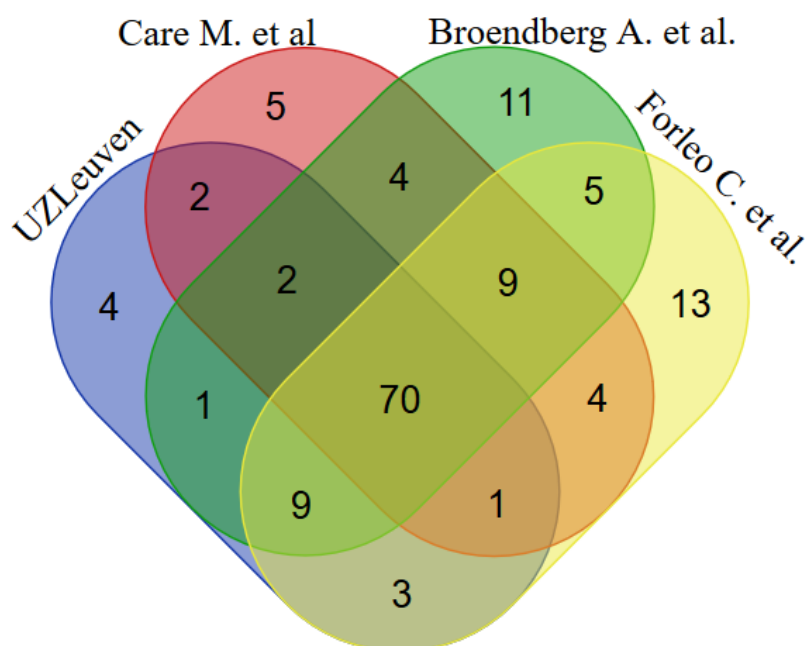
Figuur 13: intersectie van de genlijsten van UZ Leuven en andere Belgische genetische centra voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen

De intersectie van de genlijsten van UZ Leuven en de internationale genetische centra geeft een overlapping van 51 genen zoals weergegeven in Figuur 14. Zowel UZ Leuven als Centogene hebben 20-tal genen die enkel in de bron zelf voorkomen.



Figuur 14: Intersectie van de genlijsten van UZ Leuven en internationale genetische centra voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen

Uit Figuur 15 wordt afgeleid dat de intersectie van UZ Leuven met de literatuur groter is dan bij de vergelijking met internationale centra. Er worden 70 genen terug gevonden in alle bronnen en slechts enkele genen hebben geen of een onvolledige overlapping. 66 van de 70 genen worden ook teruggevonden in alle Belgische centra.



Figuur 15: Intersectie van de genlijsten van UZ Leuven met genlijsten uit literatuur voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen

Door een volledige intersectie uit te voeren, worden 49 genen teruggevonden in iedere bron en worden automatisch bestempeld als kerngenen. Indien enkel literatuur en Belgische centra gebruikt worden voor de intersectie worden 66 genen teruggevonden in deze bronnen. De genen die in acht van de negen bronnen worden teruggevonden, zijn bijna allemaal ontbrekend in de genlijst van Centogene. Dit panel omvat dan ook enkel HCM, DCM en ARVC en verder geen aandoeningen van cardiomyopathie en hartritmestoornissen waardoor een minder goede intersectie ontstaat. Omwille van deze reden worden genen in acht bronnen ook tot kerngenen benoemd waardoor na de intersectie in het totaal 64 kerngenen worden teruggevonden en deze zijn weergegeven in Tabel 11. In deze tabel is tussen haakjes weergegeven in hoeveel bronnen de genen voorkomen.

Tabel 11: Lijst van de genen uit het genpanel van UZ Leuven die in 8 of 9 bronnen voorkomen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen

<i>ABCC9</i> (9)	<i>CAV3</i> (9)	<i>KCNE2</i> (9)	<i>MYL2</i> (9)	<i>SCN5A</i> (9)
<i>ACTC1</i> (9)	<i>CRYAB</i> (8)	<i>KCNE3</i> (8)	<i>MYL3</i> (9)	<i>SGCD</i> (8)
<i>ACTN2</i> (9)	<i>CSRP3</i> (9)	<i>KCNH2</i> (9)	<i>MYOZ2</i> (9)	<i>SNTA1</i> (8)
<i>AKAP9</i> (9)	<i>DES</i> (9)	<i>KCNJ2</i> (9)	<i>MYPN</i> (8)	<i>TAZ</i> (9)
<i>ANK2</i> (9)	<i>DSC2</i> (9)	<i>KCNJ8</i> (8)	<i>NEXN</i> (9)	<i>TCAP</i> (9)
<i>ANKRD1</i> (8)	<i>DSG2</i> (9)	<i>KCNQ1</i> (9)	<i>PKP2</i> (9)	<i>TMEM43</i> (9)
<i>BAG3</i> (9)	<i>DSP</i> (9)	<i>LAMA4</i> (8)	<i>PLN</i> (9)	<i>TNNC1</i> (9)

<i>CACNA1C</i> (9)	<i>GLA</i> (9)	<i>LAMP2</i> (9)	<i>PRKAG2</i> (8)	<i>TNNI3</i> (9)
<i>CACNA2D1</i> (8)	<i>GPD1L</i> (9)	<i>LDB3</i> (9)	<i>RBM20</i> (9)	<i>TNNT2</i> (9)
<i>CACNB2</i> (9)	<i>HCN4</i> (8)	<i>LMNA</i> (9)	<i>RYR2</i> (9)	<i>TPM1</i> (9)
<i>CALM1</i> (8)	<i>JPH2</i> (9)	<i>MYBPC3</i> (9)	<i>SCN1B</i> (9)	<i>TTR</i> (9)
<i>CALR3</i> (8)	<i>JUP</i> (9)	<i>MYH6</i> (9)	<i>SCN3B</i> (9)	<i>VCL</i> (9)
<i>CASQ2</i> (9)	<i>KCNE1</i> (8)	<i>MYH7</i> (9)	<i>SCN4B</i> (8)	

Voor genen uit het genpanel van UZ Leuven die in vijf, zes of zeven bronnen terug te vinden zijn, wordt beslist dat deze geanalyseerd zullen worden met de beschikbare algoritmes om te achterhalen of deze alsnog als kerngen geïdentificeerd worden. Er zijn 18 genen die hier aan voldoen en deze zijn weergegeven in Tabel 12. Ook hier is tussen haakjes weergegeven in hoeveel bronnen elk gen voorkomt.

Tabel 12: Lijst van de genen uit het genpanel van UZ Leuven die in 5-6-7 bronnen voorkomen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen

<i>CALM2</i> (5)	<i>KCNA5</i> (6)	<i>MYLK2</i> (6)	<i>TMPO</i> (7)
<i>CTNNA3</i> (7)	<i>KCND3</i> (7)	<i>NKX2-5</i> (5)	<i>TRDN</i> (7)
<i>DTNA</i> (5)	<i>KCNE5</i> (7)	<i>NPPA</i> (7)	<i>TRPM4</i> (7)
<i>FHL1</i> (5)	<i>KCNJ5</i> (7)	<i>SCN2B</i> (6)	
<i>GJA5</i> (5)	<i>MIB1</i> (5)	<i>TGFB3</i> (7)	

De genen die slechts in één tot en met vier bronnen voorkomen worden voorlopig niet opgenomen als kerngen en dus ook niet geanalyseerd met het beschikbare algoritme. In totaal zijn dit tien genen en het voorkomen is maximaal slechts vier keer (Tabel 13). Van deze groep zou een verdere opdeling gemaakt kunnen worden, maar wegens werd dit niet uitgevoerd.

Tabel 13: Lijst van de genen uit het genpanel van UZ Leuven die in 1 tot en met 4 bronnen voorkomen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen

gen	som	UZ Leuven	UZ Gent	CMG-UZB	CMG-Antwerpen	Nijmegen	Centogene	Care Melanie	Broendberg Anders	Forleo Cinzia
<i>NOS1AP</i>	4	1	1		1					1
<i>SCN10A</i>	4	1		1				1	1	
<i>TXNRD2</i>	4	1	1	1						1
<i>CALM3</i>	2	1							1	
<i>FLNC</i>	2	1						1		
<i>KCND2</i>	2	1		1						
<i>NUP155</i>	2	1								1
<i>SEMA3A</i>	2	1						1		
<i>CACNA1D</i>	1	1								
<i>PITX2</i>	1	1								

Tot slot worden nog twee genen geanalyseerd die niet in het oorspronkelijke genpanel van UZ Leuven zitten, maar wel in zeven overige bronnen aanwezig zijn (Zie bijlage 4). Dit zijn de genen *EMD* en *TNN*.

5.2 Vergelijking toegepaste software

Voor één specifiek gen van zowel myopathie als cardiomyopathie en hartritmestoornissen worden alle algoritmes vergeleken aan de hand van de volgende parameters: de mogelijkheid om de analyse zelf te doen, de gebruiksvriendelijkheid van het algoritme, de tijd die de analyse in beslag neemt en de objectiviteit van het algoritme. Voor myopathie wordt *ANO5* getest omdat dit gen voorkomt in elke bron. Volgens de intersectie zou dit een kerngen zijn en moet het resultaat sterk of definitief bewijs zijn. Voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen wordt *PRKAG2* getest omdat dit gen niet voorkomt in de genlijst van CMG-UZB, maar wel in alle overige bronnen. Ook hier zou sterk of definitief bewijs het resultaat moeten zijn. Tot slot worden de vaststellingen samengevat en wordt een conclusie gemaakt.

5.2.1 *ANO5*

Voor het gen *ANO5* zijn verschillende mutaties teruggevonden die leiden tot verschillende pathologieën. Volgens de site van OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) is *ANO5* gelinkt aan 3 aandoeningen, namelijk Gnathodiaphyseal dysplasia (OMIM 166260, autosomaal dominant), Miyoshi muscular dystrophy 3 (OMIM, 613319, autosomaal recessieve) en Muscular dystrophy, limb-girdle, type 2L (OMIM 611307, autosomaal recessieve). Voor het testen van de algoritmes werd als pathologie Limb Girdle spierdystrofie gebruikt. In Pubmed, zijn er 41 publicaties met terminologie " *ANO5* en limb girdle dystrophy".

Volgens Panelapp heeft *ANO5* "groen licht" gekregen voor Limb Girdle spierdystrofie waardoor volgens Panelapp voldoende bewijs is voor de aandoening Limb Girdle spierdystrofie. Dit is gebaseerd op één review die goedgekeurd is door een Gene Advisor. De review heeft een versie 1.8 en dit wil zeggen dat deze gebruikt mag worden voor interpretatie. (zie bijlage 5)

Volgens de analyse van Ambry Genetics heeft *ANO5* een definitief bewijs voor de aandoening Limb Girdle spierdystrofie (zie bijlage 5). Voor de parameter van het aantal niet-gerelateerde patiënten met deze aandoening als gevolg van een mutatie van *ANO5*, werd definitief bewijs gevonden omdat er meer dan 25 patiënten zijn. Ondanks dat er al definitief bewijs is gevonden, is nog verder onderzoek gedaan voor enkele parameters. Er zijn meer dan drie publicaties gevonden waardoor drie punten gegeven worden. Ook zijn er meer dan vier verschillende varianten gevonden waardoor nog eens vier punten gegeven worden. Tot slot is er schade teruggevonden in spieren van patiënten met *ANO5* mutaties.

Voor de overige parameters is geen of geen verder onderzoek gedaan omdat er al definitief bewijs bereikt was.

Voor de analyse met ClinGen is sterk bewijs het resultaat (zie bijlage 5). Twaalf punten zijn gegeven aan het vinden van meer dan twaalf varianten. Hierdoor is de maximale score voor genetisch bewijs bereikt. Overigens is een half punt toegekend aan een wijziging in het sarcolemma dat de aandoening veroorzaakt en cDNA analyse in de spieren van een patiënt waaruit bleek dat het skippen van exon 13 in *ANO5* ook tot de aandoening resulteert.

5.2.2 PRKAG2

Voor het gen *PRKAG2* zijn verschillende mutaties teruggevonden die gekoppeld zijn aan cardiomyopathie. Volgens OMIM is *PRKAG2* gelinkt aan 3 aandoeningen, namelijk in hoofdzaak met HCM (OMIM 600858, autosomaal dominant) en in mindere mate met de glycogeen-opslag van het hart (OMIM 261740, autosomaal dominant) en Wolff-Parkinson-white syndroom (OMIM 194200, autosomaal dominant). In de vergelijking van de algoritmes is bijgevolg HCM gekozen als aandoening, wat ook de insteek van ons panel is. In Pubmed, zijn er 21 publicaties met terminologie " *PRKAG2* en HCM".

Bij Panelapp heeft *PRKAG2* voor HCM versie 1.20 en krijgt het de groene kleur. Dit wijst volgens Panelapp op een positieve gen-aandoening relatie. Er zijn twee reviews terug te vinden waarvan één van een Genomics England Curator en een tweede van Oxford Medical Genetics Laboratory. (zie bijlage 6)

Voor Ambry Genetics is definitief bewijs teruggevonden voor *PRKAG2*. Voor de parameter van het aantal niet-gerelateerde patiënten met deze aandoening als gevolg van een mutatie van *PRKAG2*, werd definitief bewijs gevonden omdat er meer dan 25 patiënten zijn. Ondanks dat er al definitief bewijs is gevonden, is er nog verder onderzoek gedaan voor enkele parameters. Er zijn meer dan drie publicaties gevonden waardoor drie punten gegeven worden. Ook zijn er meer dan vier verschillende varianten gevonden waardoor nog eens vier punten gegeven worden. Tot slot zijn er nog vier punten gegeven waarvan één punt aan biochemische experimenten die aantonen dat de genfunctie of genexpressie consequent samengaan met het fenotype van de aandoening. Een ander punt wordt gegeven aan experimenten die het mechanisme van de mutatie hebben aangetoond. De laatste twee punten worden gegeven aan het model van het organisme waarbij één punt wordt toegekend aan experimenten die aantonen dat de genfunctie in vivo gerelateerd is aan de pathologie van de menselijke aandoening. Het tweede punt wordt gegeven aan experimenten die aantonen dat het fenotype en het genotype van het model hetzelfde zijn als deze van de aandoening bij mensen. In het totaal werden 15 punten gevonden (zie bijlage 6).

Voor de analyse met ClinGen is er sterk bewijs gevonden van *PRKAG2* voor de aandoening HCM. Er zijn meer dan 14 varianten met een missense mutatie gevonden waar zeven punten voor gegeven worden. Eén *de novo* mutatie is gevonden wat twee punten oplevert. Vervolgens is op experimenteel niveau de gen-aandoening relatie bewezen op menselijke organismen wat twee punten oplevert en herstel in menselijke cellen bewezen wat ook twee punten oplevert. Dit maakt in het totaal 13 punten die vertaald worden naar sterk bewijs voor de aandoening (zie bijlage 6).

5.2.3 Conclusie toegepaste software

Na het analyseren van de genen *ANO5* en *PRKAG2* was de conclusie dat Panelapp niet geschikt is voor gebruik binnen dit onderzoek. Zoals eerder vermeld wordt de analyse door een expert groep uitgevoerd en is er niet de mogelijkheid om de analyse zelf uit te voeren. Dit in tegenstelling tot ClinGen en Ambry Genetics waar wel de mogelijkheid is om zelf de analyse uit te voeren. Om deze reden werd er geopteerd om niet verder te werken met Panelapp.

Een ander bijkomend voordeel van ClinGen ten opzichte van Ambry Genetics is de objectiviteit en dit omwille van de volgende redenen. Er zijn een aantal verschillen in

de gebruikte parameters voor quotatie en zo krijgt een gen bijvoorbeeld volgens Ambry Genetics definitief bewijs voor een bepaalde aandoening wanneer 25 of meer niet-gerelateerde patiënten zijn. Bij ClinGen wordt ten eerste een onderscheid gemaakt tussen autosomaal recessieve aandoeningen en autosomaal dominante of geslachtsgebonden recessieve aandoeningen voor het quoteren van varianten. Vervolgens worden afhankelijk van de soort variant punten toegekend waarbij slechts een maximum van twaalf punten gegeven kan worden. Dit limiteert enigszins het aantal publicaties dat kan gebruikt worden om tot een maximaal en dus sterk bewijs te komen. Dit verschil werd duidelijk gemaakt bij de test voor zowel *ANO5* als *PRKAG2*. Voor Ambry Genetics werd definitief bewijs gevonden terwijl voor ClinGen sterk bewijs geleverd werd.

Ambry Genetics en ClinGen gebruiken beide een puntensysteem dat omgezet wordt naar de sterkte van bewijs, maar er moet kritisch omgegaan worden met de parameters waarbij beide algoritmes werken. Een voordeel van ClinGen is dat een online matrix beschikbaar is. Bij deze online versie is er de mogelijkheid om een grote hoeveelheid aan informatie toe te voegen en wordt controle uitgevoerd.

Wat betreft de gebruiksvriendelijkheid krijgt Ambry Genetics de bovenhand omdat het een snellere verwerking en minder te onderzoeken parameters heeft dan de online matrix van ClinGen.

Op basis van bovenstaande bevindingen wordt er gekozen om met de matrix van ClinGen te werken. De sterkere mate van objectiviteit overtreffen het gebruik van Ambry Genetics. Uit de test met *ANO5* was het resultaat van ClinGen ook sterk bewijs en dit werd ook verwacht na het uitvoeren van de intersectie.

5.3 Analyse van de genen

5.3.1 Myopathie

Zoals eerder vermeld, zijn 25 genen getest met ClinGen en in bijlage 7 zijn als voorbeeld de analyse van de genen *CHKB* en *CHRNG* weergegeven en deze worden in onderstaande paragrafen uitgelegd. De duur van deze analyses was ongeveer één dag en de overige analyses werden uitgevoerd op dezelfde wijze. Het resultaat van *CHKB* is sterk bewijs en voor *CHRNG* is gelimiteerd bewijs.

Voor het gen *CHKB* is de analyse uitgevoerd voor de aandoening spierdystrofie, mentale retardatie en vergrote mitochondria en dit is een autosomaal recessieve aandoening. Aan de hand van een literatuurstudie wordt onderzoek gedaan naar informatie over deze aandoening als gevolg van een mutatie in het gen *CHKB*. In het artikel van Mitsuhashi *et al.* (2011) werden zes nonsense mutaties teruggevonden met spierdystrofie, mentale retardatie en vergrote mitochondria als gevolg [30]. Deze mutaties zijn voor autosomaal recessieve aandoeningen twee punten waard en dit resulteert in het maximum van twaalf punten voor het genetisch niveau. Vervolgens is verder onderzoek gedaan op het experimentele niveau. In hetzelfde artikel waarin de nonsense mutaties zijn teruggevonden, is onderzoek gedaan naar spiercellen van de patiënten. In deze cellen werd geen *CHKB* activiteit gemeten waardoor één punt gegeven wordt aan functionele wijziging [30]. In het artikel van Sher *et al.* (2006) werd

een autosomaal recessieve spierdystrofie teruggevonden in een muismodel [31]. Deze aandoening was het gevolg van een mutatie in het gen *CHKB* waardoor één punt gegeven wordt aan niet-menselijk model en dit is twee punten waard voor het experimenteel niveau. In het totaal zijn drie punten voor experimenteel niveau gegeven en samen met de 12 punten van het genetisch niveau werd een totaal van 15 punten bekomen. Dit resulteert in sterk bewijs van het gen *CHKB* voor de aandoening spierdystrofie, mentale retardatie en vergrote mitochondria.

De analyse van het gen *CHRNA* is uitgevoerd voor de aandoening congenitaal myasthenisch syndroom en dit is een autosomaal recessieve aandoening. Enkel in het artikel Natera-de Benito *et al.* (2017) werd een missense en kleine deletie teruggevonden die resulteerde in het congenitaal myasthenisch syndroom [32]. Hiervoor werden twee punten gegeven, maar verder werd geen informatie teruggevonden over deze aandoening als gevolg van een mutatie in het gen *CHRNA* wat resulteert in gelimiteerd bewijs.

De resultaten van alle geanalyseerde genen zijn weergegeven in de samenvattende Tabel 14.

Tabel 14: Samenvattende tabel met de resultaten na de analyse van de genen met ClinGen voor myopathie: in de eerste kolom is het gen weergegeven, in de tweede kolom de aandoening en in de derde kolom het resultaat

Gen	Aandoening	Resultaat
<i>CHKB</i>	Spierdystrofie, mentale retardatie en vergrote mitochondria	Sterk
<i>CHRNG</i>	Congenitaal myasthenisch syndroom	Gelimiteerd
<i>CNTN1</i>	Myopathie	Gelimiteerd
<i>COL12A1</i>	Spierdystrofie	Gelimiteerd
<i>DPAGT1</i>	Myasthenia & myopathie	Gelimiteerd
<i>DPM1</i>	Myopathie	Gelimiteerd
<i>DPM2</i>	Myopathie	Gelimiteerd
<i>DPM3</i>	Dystroglycanopathies	Gelimiteerd
<i>ISCU</i>	Autosomaal Dominante mitochondriale myopathie	Gelimiteerd
<i>KBTBD13</i>	Nemaline myopathie type 6	Gelimiteerd
<i>KLHL41</i>	Nemaline myopathie 9	Sterk
<i>KLHL9</i>	Distale myopathie	Gelimiteerd
<i>LAMB2</i>	Congenitaal myasthenisch syndrome	Middelmatig
<i>LMOD3</i>	Nemaline myopathie	Sterk
<i>MEGF10</i>	Myopathie, areflexia, ademhalingsproblemen en dysfagie (EMARDD)	Sterk
<i>POLG</i>	POLG deficientie	Sterk
<i>SEPN1</i>	Congenitale myopathie	Gelimiteerd
<i>SGCB</i>	Spierdystrofie, limb-girdle, type 2E	Sterk
<i>SGCD</i>	Spierdystrofie, limb-girdle, type 2F	Sterk
<i>SGCG</i>	Spierdystrofie, limb-girdle, type 2C	Sterk
<i>SMCHD1</i>	Facioscapulohumerale spierdystrofie 2	Sterk
<i>TCAP</i>	Spierdystrofie, limb-girdle, type 2C	Sterk
<i>TMEM5</i>	Spierdystrofie-dystroglycanopathie (aangeboren met afwijkingen van hersenen en ogen), type A, 10	Sterk
<i>TRAPPC11</i>	Spierdystrofie, limb-girdle, type 2S	Gelimiteerd
<i>TRIM32</i>	Spierdystrofie, limb-girdle, type 2H	Sterk

Na de analyse met ClinGen zijn 12 van de 25 genen met sterk bewijs voor de onderzochte aandoening teruggevonden, namelijk *CHKB*, *KLHL41*, *LMOD3*, *MEGF10*, *POLG*, *SGCB*, *SGCD*, *SGCG*, *SMCHD1*, *TCAP*, *TMEM5* en *TRIM32*. Deze genen worden ook bestempeld als kerngen. Eén gen is teruggevonden met middelmatig bewijs en de overige 12 genen hebben gelimiteerd bewijs.

5.3.2 Cardiomyopathie & hartritmestoornissen

Voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen zijn 18 genen geanalyseerd en twee genen die niet in het genpanel van het UZ Leuven voorkomen maar wel in zeven andere bronnen. In bijlage 8 zijn als voorbeeld de analyse van *CALM2* en *CTNNA3* weergegeven en deze worden in onderstaande paragrafen uitgelegd. Er werd voor deze genen gekozen om een voorbeeld te geven van sterk en middelmatig bewijs als resultaat. De duur van deze analyses was ongeveer één dag en de overige analyses

werden uitgevoerd op dezelfde wijze. *CALM2* resulteert in sterk bewijs en *CTNNA3* in middelmatig bewijs.

De analyse van het gen *CALM2* is uitgevoerd voor de aandoening LQT en dit is een autosomaal dominante aandoening. In het artikel van Boczek *et al.* (2016) werd één missense en één *de novo* mutatie teruggevonden die resulteren in respectievelijk een half en twee punten [33]. In de artikels Makita *et al.* (2014), Pipilas *et al.* (2016) en Crotti *et al.* (2013) werden respectievelijk drie mutaties, één en één *de novo* mutaties teruggevonden [34] [35] [36]. Hierdoor is voor het genetisch bewijs het maximum van twaalf punten behaald omdat iedere *de novo* mutatie twee punten waard is. Voor het experimenteel bewijs werd in het artikel van Yamamoto *et al.* (2017) teruggevonden dat het gen codeert voor het Ca²⁺ sensor moduline en mutaties in dit gen leiden tot LQT [37]. Hiervoor werd één punt gegeven aan de biochemische functie en dit is een half punt waard voor experimenteel bewijs. In hetzelfde artikel werd ook herstel in patiënten cellen beschreven en hiervoor wordt één punt gegeven [37]. In het totaal werden 13,5 punten gegeven wat resulteert in sterk bewijs voor LQT als het gevolg van een mutatie in het gen *CALM2*.

Voor het gen *CTNNA3* is de analyse uitgevoerd voor de aandoening ARVC en dit is een autosomaal dominante aandoening. In het artikel van Van Hengel *et al.* (2013) werd één missense en één *de novo* mutatie teruggevonden [38]. Dit resulteert in twee en een half punt voor het genetisch niveau. Van Hengel beschreef ook dat alfa-T-catenine de cel-cel adhesie in contractie cardiomyocyten versterkt en dat er proteïne interactie is tussen de plakophilines en met zijn binding proteïnes [38]. Dit levert één en een half punt aan biochemisch bewijs. Vervolgens heeft Van Hengel ook aangetoond dat de aandoening terug te vinden is in modellen zoals gisten en HEK293T cellen wat twee punten oplevert [38]. Tot slot heeft Li *et al.* (2012) knock-out muizen gemaakt wat twee punten opbrengt als niet-menselijk model en heeft in deze muizen een verhoogde mate aan ventriculaire arrhytmieën teruggevonden waardoor een extra half punt gegeven wordt als functionele wijziging in niet patiënten cellen [39]. In het totaal worden zes punten gegeven op experimenteel niveau waardoor samen met het genetisch niveau een totaal van 8,5 wordt gekomen. Dit wijst op middelmatig bewijs.

De resultaten van de analyses zijn weergegeven in de samenvattende Tabel 15 en voor de twee extra genen in Tabel 16.

Tabel 15: Samenvattende tabel met de resultaten na de analyse van de genen met ClinGen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen: in de eerste kolom is het gen weergegeven, in de tweede kolom de aandoening, in de derde kolom het resultaat en in de vierde kolom het aantal bronnen

Gen	Aandoening	Resultaat	Aantal bronnen
<i>CALM2</i>	LQT	Sterk	5
<i>CTNNA3</i>	ARVC	Middelmatig	7
<i>DTNA</i>	LVNC	Gelimiteerd	5
<i>FHL1</i>	HCM	Sterk	5
<i>GJA5</i>	AF	Sterk	5
<i>KCNA5</i>	AF	Sterk	6
<i>KCND3</i>	BrS	Gelimiteerd	7
<i>KCNE5</i>	IVF	Gelimiteerd	7
<i>KCNJ5</i>	LQT	Gelimiteerd	7
<i>MIB1</i>	LVNC	Middelmatig	5
<i>MYLK2</i>	HCM	Gelimiteerd	6
<i>NKX2-5</i>	CCD/atrial septal defect	Sterk	5
<i>NPPA</i>	AF	Gelimiteerd	7
<i>SCN2B</i>	AF	Gelimiteerd	6
<i>TGFB3</i>	ARVC	Gelimiteerd	7
<i>TMPO</i>	DCM	Gelimiteerd	7
<i>TRDN</i>	CPVT	Middelmatig	7
<i>TRPM4</i>	BrS	Middelmatig	7

Tabel 16: Samenvattende tabel met de resultaten na de analyse van de genen, die niet voorkomen in het genpanel van het UZ Leuven, met ClinGen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen: in de eerste kolom is het gen weergegeven, in de tweede kolom de aandoening en in de derde kolom het resultaat

Gen (niet in leuven)	Aandoening	Resultaat
<i>EMD</i>	DCM	Middelmatig
<i>TTN</i>	DCM	Sterk

Na de analyse met ClinGen werden zes van de 20 genen met sterk bewijs voor de onderzochte aandoening teruggevonden, namelijk *CALM2*, *FHL1*, *GJA5*, *KCNA5*, *NKX2-5* en *TTN*. Deze genen worden ook bestempeld als kerngen. Er zijn vijf genen teruggevonden met middelmatig bewijs en negen genen met gelimiteerd bewijs.

5.4 Resultaten na de intersectie en analyse

Na de intersectie werden voor myopathie 61 kerngenen teruggevonden en na de analyse 12 kerngenen waardoor dit in het totaal 73 kerngenen zijn. Voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen waren dit respectievelijk 64 en 6 kerngenen waardoor dit in het totaal 70 kerngenen zijn.

In Tabel 17 is een overzicht weergegeven van alle kerngenen voor myopathie en in Tabel 18 is een overzicht weergegeven van alle kerngenen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen.

Tabel 17: Overzicht van de kerngenen voor myopathie

gen	som	UZ Leuven	UZ Gent	CMG- UZB	ULB	Nijmegen	Centogene
<i>ACTA1</i>	5	1	1	1		1	1
<i>AGRN</i>	5	1	1	1		1	1
<i>ANO5</i>	6	1	1	1	1	1	1
<i>B3GALNT2</i>	5	1	1	1		1	1
<i>BAG3</i>	5	1	1	1		1	1
<i>BIN1</i>	5	1	1	1		1	1
<i>CAPN3</i>	5	1	1		1	1	1
<i>CAV3</i>	5	1	1	1		1	1
<i>CFL2</i>	5	1	1	1		1	1
<i>CHAT</i>	5	1	1	1		1	1
<i>CHKB</i>	4	1	1	1		1	0
<i>CHRNA1</i>	5	1	1	1		1	1
<i>CHRNB1</i>	5	1	1	1		1	1
<i>CHRND</i>	5	1	1	1		1	1
<i>CHRNE</i>	5	1	1	1		1	1
<i>COL6A1</i>	5	1	1	1		1	1
<i>COL6A2</i>	6	1	1	1	1	1	1
<i>COL6A3</i>	6	1	1	1	1	1	1
<i>COLQ</i>	5	1	1	1		1	1
<i>CRYAB</i>	5	1	1	1		1	1
<i>DAG1</i>	5	1	1	1		1	1
<i>DES</i>	5	1	1	1		1	1
<i>DMD</i>	6	1	1	1	1	1	1
<i>DNAJB6</i>	5	1	1	1		1	1
<i>DNM2</i>	5	1	1	1		1	1
<i>DOK7</i>	5	1	1	1		1	1
<i>DYSF</i>	6	1	1	1	1	1	1
<i>EMD</i>	5	1	1	1		1	1
<i>FHL1</i>	5	1	1	1		1	1
<i>FKRP</i>	5	1	1	1		1	1
<i>FKTN</i>	5	1	1	1		1	1
<i>FLNC</i>	5	1	1	1		1	1
<i>GAA</i>	6	1	1	1	1	1	1
<i>GFPT1</i>	5	1	1	1		1	1
<i>GMPPB</i>	5	1	1	1		1	1
<i>GNE</i>	5	1	1	1		1	1
<i>ISPD</i>	5	1	1	1		1	1
<i>KLHL40</i>	5	1	1	1		1	1
<i>KLHL41</i>	4	1	1			1	1
<i>LAMA2</i>	5	1	1	1		1	1
<i>LDB3</i>	5	1	1	1		1	1

gen	som	UZ Leuven	UZ Gent	CMG- UZB	ULB	Nijmegen	Centogene
<i>LMNA</i>	5	1	1	1		1	1
<i>LMOD3</i>	4	1	1			1	1
<i>MEGF10</i>	4	1	1	1		1	0
<i>MTM1</i>	5	1	1	1		1	1
<i>MUSK</i>	5	1	1	1		1	1
<i>MYH7</i>	5	1	1	1		1	1
<i>MYOT</i>	5	1	1	1		1	1
<i>NEB</i>	5	1	1	1		1	1
<i>PLEC</i>	5	1	1	1		1	1
<i>POLG</i>	4	1		1	1		1
<i>POMGNT1</i>	5	1	1	1		1	1
<i>POMGNT2</i>	5	1	1	1		1	1
<i>POMK</i>	5	1	1	1		1	1
<i>POMT1</i>	5	1	1	1		1	1
<i>POMT2</i>	6	1	1	1	1	1	1
<i>RAPSN</i>	5	1	1	1		1	1
<i>RYR1</i>	6	1	1	1	1	1	1
<i>SCN4A</i>	5	1	1	1		1	1
<i>SGCA</i>	5	1	1		1	1	1
<i>SGCB</i>	4	1	1			1	1
<i>SGCD</i>	4	1	1			1	1
<i>SGCG</i>	4	1	1			1	1
<i>SMCHD1</i>	4	1	1			1	1
<i>TCAP</i>	4	1	1			1	1
<i>TMEM5</i>	4	1		1		1	1
<i>TNNT1</i>	5	1	1	1		1	1
<i>TNPO3</i>	5	1	1	1		1	1
<i>TPM2</i>	5	1	1	1		1	1
<i>TPM3</i>	5	1	1	1		1	1
<i>TRIM32</i>	4	1	1			1	1
<i>TTN</i>	6	1	1	1	1	1	1
<i>VCP</i>	5	1	1	1		1	1

Tabel 18: Overzicht van de kerngenen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen

gen	som	UZ Leuven	UZ Gent	CMG- UZB	CMG- Antwerpen	Nijmegen	Centogene	Care Melanie	Broendberg Anders	Forleo Cinzia
ABCC9	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ACTC1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ACTN2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AKAP9	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ANK2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ANKRD1	8	1	1	1	1	1		1	1	1
BAG3	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CACNA1C	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CACNA2D1	8	1	1	1	1	1		1	1	1
CACNB2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CALM1	8	1	1	1	1	1		1	1	1
CALM2	5	1	1					1	1	1
CALR3	8	1	1	1	1	1	1	1		1
CASQ2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CAV3	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CRYAB	8	1	1	1	1	1		1	1	1
CSRP3	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DES	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DSC2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DSG2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DSP	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FHL1	5	1	1		1				1	1
GJA5	5	1	1		1				1	1
GLA	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GPD1L	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HCN4	8	1	1	1	1	1		1	1	1
JPH2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
JUP	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
KCNA5	6	1	1		1		1		1	1
KCNE1	8	1	1	1	1		1	1	1	1
KCNE2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
KCNE3	8	1	1	1	1	1		1	1	1
KCNH2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
KCNJ2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
KCNJ8	8	1	1	1	1	1		1	1	1
KCNQ1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LAMA4	8	1	1	1	1	1		1	1	1
LAMP2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LDB3	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LMNA	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MYBPC3	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MYH6	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MYH7	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MYL2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1

gen	som	UZ Leuven	UZ Gent	CMG- UZB	CMG- Antwerpen	Nijmegen	Centogene	Care Melanie	Broendberg Anders	Forleo Cinzia
<i>MYL3</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>MYOZ2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>MYPN</i>	8	1	1	1	1	1		1	1	1
<i>NEXN</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>NKX2-5</i>	5	1	1		1			1	1	
<i>PKP2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>PLN</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>PRKAG2</i>	8	1	1		1	1	1	1	1	1
<i>RBM20</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>RYR2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>SCN1B</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>SCN3B</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>SCN4B</i>	8	1	1	1	1		1	1	1	1
<i>SCN5A</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>SGCD</i>	8	1	1	1	1		1	1	1	1
<i>SNTA1</i>	8	1	1	1	1	1		1	1	1
<i>TAZ</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TCAP</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TMEM43</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TNNC1</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TNNI3</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TNNT2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TPM1</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TTN</i>	7		1	1	1		1	1	1	1
<i>TTR</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>VCL</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Om na te gaan of de analyse haalbaar is en een eerste stap in de juiste richting, wordt een terugkoppeling uitgevoerd naar de intersecties die initieel gemaakt werden. Van de genen die na de analyse als kerngenen bestempeld zijn, wordt onderzocht in welke lijsten deze afwezig waren en, in het geval van cardiomyopathie en hartritmestoornissen, in hoeveel bronnen deze worden teruggevonden.

Voor myopathie zijn acht van de twaalf kerngenen afwezig in de genlijst van CMG-UZB.

Voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen is het opvallend dat de genen *CALM2*, *FHL1*, *GJA5* en *NKX2-5* ieder in vijf bronnen worden teruggevonden en niet aanwezig zijn in CMG-UZB en de internationale genetische centra. *KCNA5* kwam in zes bronnen terug en was ook afwezig in de genlijst van CMG-UZB.

Hieruit wordt afgeleid dat het resultaat van de te analyseren genen sterk afhankelijk is van de genpanels waaruit de bronnen initieel zijn samengesteld. Bij het gebruik van bronnen met een kleiner panel of andere naam, worden kerngenen te weinig belicht na een eerste intersectie waardoor deze initieel gemist worden. Zo kunnen niet kerngenen meer voorkomen dan kerngenen na de intersectie, wat een vertekend beeld

geeft van het landschap. Om deze alsnog toe te kunnen voegen aan de lijst met kerngenen, blijft een verdere analyse zeker aangewezen van de overige genen die in een kleiner aantal gepresenteerd voorkomen.

5.5 Vergelijking met kerngenen uit Nederland

Tot slot wordt in dit onderzoek ook een vergelijking gemaakt van de resultaten met de kerngenen uit Nederland. Voor myopathie zijn in Nederland 17 kerngenen gelinkt en deze zijn weergegeven in Tabel 19. Voor cardiomyopathie zijn in Nederland 45 kerngenen gelinkt en deze zijn weergegeven in Tabel 20. Voor hartritmestoornissen is geen lijst van kerngenen uit Nederland teruggevonden.

Tabel 19: Kerngenen uit Nederland voor myopathie [40]

<i>ANO5</i>	<i>EMD</i>	<i>SGCA</i>	<i>TCAP</i>
<i>CAPN3</i>	<i>FKRP</i>	<i>SGCB</i>	<i>TRIM32</i>
<i>CAV3</i>	<i>LMNA</i>	<i>SGCD</i>	
<i>DMD</i>	<i>MICU1</i>	<i>SGCG</i>	
<i>DYSF</i>	<i>MYOT</i>	<i>SMCHD1</i>	

In het geval van myopathie zijn de 17 kerngenen van Nederland buiten *MICU1* allemaal bestempeld als kerngen na de intersectie en analyse met algoritme. *ANO5*, *CAPN3*, *CAV4*, *DMD*, *DYSF*, *EMD*, *FKRP*, *LMNA*, *MYOT* en *SGCA* werden na de intersectie teruggevonden als kerngen en *SGCB*, *SGCD*, *SGCG*, *SMCHD1*, *TCAP* en *TRIM32* werden na de analyse met ClinGen bestempeld als kerngen. Het gen *MICU1* is enkel terug te vinden in de genlijst van Nijmegen en wordt in dit onderzoek niet bestempeld als kerngen.

Tabel 20: Kerngenen uit Nederland voor cardiomyopathie [41]

<i>ACTC1</i>	<i>CAV3</i>	<i>DSC2</i>	<i>GLA</i>	<i>LDB3</i>	<i>MYH7</i>	<i>NEXN</i>	<i>SCN5A</i>	<i>TNNT3</i>
<i>ACTN2</i>	<i>CRYAB</i>	<i>DSG2</i>	<i>JPH2</i>	<i>LMNA</i>	<i>MYL2</i>	<i>PKP2</i>	<i>TAZ</i>	<i>TNNT2</i>
<i>ANKRD1</i>	<i>CSRP3</i>	<i>DSP</i>	<i>JUP</i>	<i>MIB1</i>	<i>MYL3</i>	<i>PLN</i>	<i>TCAP</i>	<i>TPM1</i>
<i>BAG3</i>	<i>CTNNA3</i>	<i>EMD</i>	<i>LAMA4</i>	<i>MYBPC3</i>	<i>MYOZ2</i>	<i>PRKAG2</i>	<i>TMEM43</i>	<i>TTR</i>
<i>CALR3</i>	<i>DES</i>	<i>FHL1</i>	<i>LAMP2</i>	<i>MYH6</i>	<i>MYPN</i>	<i>RBM20</i>	<i>TNNC1</i>	<i>VCL</i>

Uit de lijst van kerngenen van Nederland zijn in totaal 45 genen opgenomen, maar deze lijst houdt enkel cardiomyopathie in. Indien de geïdentificeerde kerngenen in dit onderzoek vergeleken worden met de genlijst van cardiomyopathie van UZ Leuven, worden 47 kerngenen teruggevonden in dit onderzoek voor cardiomyopathie. Wanneer de 45 kerngenen uit Nederland vergeleken worden met de 47 kerngenen voor cardiomyopathie uit dit onderzoek worden 42 genen in beide genlijsten teruggevonden. Enkel *CTNNA3*, *EMD* en *MIB1* zijn uit de lijst van Nederland ook bestempeld als kerngen, maar in dit onderzoek niet. Na intersectie werden ze niet bevonden als kerngen, maar wel geanalyseerd met ClinGen. Het resultaat na de analyse was voor elk gen middelmatig waardoor het aanleunt als kerngen, maar net niet genoeg bewijs gevonden werd om als kerngen bestempeld te worden. Uit de genlijst van het UZ Leuven werden *RYR2*, *CASQ2*, *HCN4*, *SGCD* en *ABCC9* geïdentificeerd als kerngen terwijl deze niet voorkomen in de genlijst uit Nederland.

6 Besluit

Na een initiële intersectie werden voor myopathie en voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen respectievelijk 61 en 64 kerngenen teruggevonden. Uit deze intersectie werd tevens besloten om voor myopathie 25 genen en voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen 20 genen te analyseren met specifieke algoritmes om te bepalen of deze genen al dan geïdentificeerd kunnen worden als kerngenen.

Drie algoritmes werden met elkaar vergeleken, namelijk Panelapp, Ambry Genetics en ClinGen. Aan de hand van de opgelegde parameters werd beslist om ClinGen te gebruiken voor de verdere analyses.

De resultaten van de analyses met ClinGen leverden voor myopathie en voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen respectievelijk 12 en 6 kerngenen. In het totaal werden voor myopathie 73 kerngenen geïdentificeerd en voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen 70 kerngenen. Een overzicht van deze genen is weergegeven in 5.4.

Deze groep van kerngenen kunnen vervolgens door de verschillende diagnostische centra gebruikt worden als vertrekpunt voor het samenstellen van hun diagnostische genpanels voor deze aandoeningen en indien gewenst, kunnen er nog extra genen aan toegevoegd worden.

Dit onderzoek verduidelijkt dat voor harmonisatie van genpanels voor andere aandoeningen, er rekening moet gehouden worden met de complexiteit van dit onderzoek. Het is niet altijd evident om een gen te linken aan één bepaalde aandoening wanneer mutaties in een gen kunnen resulteren in meerdere aandoeningen. Dit is echter een vereiste voor het analyseren met ClinGen. Het tijdsbestek per analyse met ClinGen is tijdrovend en is een nadeel ten opzichte van de veel snellere en gemakkelijkere intersectie. Ook vereist het werken met ClinGen veel ervaring en behoort het tot het takenpakket van experts.

Uit bovengenoemde argumenten kan worden beslist dat de intersectie alvast een start kan zijn en dat er vervolgens verder gewerkt kan worden met ClinGen. Er kan enerzijds gewerkt worden met ClinGen zoals in dit onderzoek, waardoor er meer tijd in beslag wordt genomen. Anderzijds is het makkelijker en sneller om enkel met de intersectie te werken, maar dan moeten de bronnen zeer goed uitgekozen worden.

Wat betreft de genen die voorlopig niet geanalyseerd of bestempeld zijn als kerngenen, zou een analyse uitgevoerd kunnen worden of er toch nog kerngenen in deze groep zitten om zo eventueel gemiste kerngenen alsnog te identificeren.

Literatuurlijst

- [1] R. Curley, „Muscular dystrophy,” *Encyclopaedia Britannica*, p. 1, 2007.
- [2] S. Coulomb, „Alles over myopathie,” 9 Februari 2011. [Online]. Available: <http://www.e-gezondheid.be/alles-over-myopathie/gids/370>. [Geopend 8 maart 2018].
- [3] A. Biswas, V. R. Rao, S. Seth en S. K. Maulik, „Next generation sequencing in cardiomyopathy: towards personalized genomics and medicine.,” *Molecular Biology Reports*, vol. 41, nr. 8, pp. 4881-4888, 2014.
- [4] C. Forleo, A. M. D'erchia, S. Sorrentino, C. Manzari, M. Chiara, M. Lacoveillo, A. I. Guaricci, D. De Santis, R. L. Musci, A. La Spada, V. Marangelli, G. Pesole en S. Favale, „Targeted next-generation sequencing detects novel gene–phenotype associations and expands the mutational spectrum in cardiomyopathies,” *Plos One*, vol. 12, nr. 7, pp. 1-22, 2017.
- [5] „Hartstichting,” [Online]. Available: [https://www.hartstichting.nl/hart-en-vaatziekten/cardiomyopathie-\(hartspierziekte\)](https://www.hartstichting.nl/hart-en-vaatziekten/cardiomyopathie-(hartspierziekte)). [Geopend 4 mei 2018].
- [6] D. Charlotte, „De plaats van 'Next Generation Sequencing' - technieken bij de diagnostiek van genetische, niet-syndroomgebonden cardiomyopathieën,” Universiteit Gent, Gent, 2014.
- [7] R. Walsh en S. Cook, „ Issues and Challenges in Diagnostic Sequencing for Inherited Cardiac Conditions,” *Clinical Chemistry*, vol. 63, nr. 13, pp. 116-128, 2017.
- [8] Y. D. Wijeyeratne en E. R. Behr, „Sudden death and cardiac arrest without phenotype: the utility of genetic testing,” *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 27, nr. 7, pp. 207-213, 2017.
- [9] „gezondhedenwetenschap,” 29 mei 2015. [Online]. Available: <https://www.gezondhedenwetenschap.be/richtlijnen/hartritmestoornissen-symptomen-en-onderzoek>. [Geopend 19 april 2018].
- [10] M. Meyers, *Moleculaire biologie*, U Hasselt.
- [11] T. Strachan, J. Goodship en P. Chinnery, *Genetics and genomics in medicine*, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2015.
- [12] K. Devriendt, „KU Leuven,” [Online]. Available: <https://med.kuleuven.be/nl/vesaliusonline/documenten/therapiedag-oktober-2016-koen-devriendt.pdf>. [Geopend 18 april 2018].
- [13] G. Engeland, *PanelApp Handbook version 5.7*, 2017.
- [14] E. D. Smith, K. Radtke, M. Rossi, D. N. Shinde, S. Darabi, D. El-Khechen, Z. Powis, K. Helbig, K. Waller, D. K. Grange, S. Tang en K. D. Farwell Hagman, „Classification of Genes: Standardized Clinical Validity Assessment of Gene–Disease Associations Aids Diagnostic Exome Analysis and Reclassifications,” *Human Mutation*, vol. 38, nr. 9, pp. 600-608, 2017.
- [15] *Gene clinical validity curation process version 5*, 2017.
- [16] „Centrum voor Medische Genetica,” 29 juni 2017. [Online]. Available: <http://www.brusselsgenetics.be/genen>. [Geopend 31 mei 2018].

- [17] „Centrum voor Medische Genetica UZ Brussel,” [Online]. Available: <http://www.brusselsgenetics.be/chromosomen>. [Geopend 4 mei 2018].
- [18] „Centrum voor Medische Genetica UZ Brussel,” [Online]. Available: <http://www.brusselsgenetics.be/genetische-varianties>. [Geopend 4 mei 2018].
- [19] K. Devriendt, „Genomics Core UZ-KU Leuven,” 13 maart 2014. [Online]. Available: <https://gc.uzleuven.be/content/abi-sanger-sequencing-now-available>. [Geopend 4 mei 2018].
- [20] „Mendeliom NGS-Workflow,” UZ Leuven, Leuven, 2017.
- [21] „Szczesna-Cordary Lab,” [Online]. Available: <http://lab.szczesna-cordary.miami/research/>. [Geopend 4 mei 2018].
- [22] J. B. Young, „Cardiomyopathy,” 2018. [Online]. Available: <https://academic.elsevier.com/levels/collegiate/article/cardiomyopathy/389965>. [Geopend 2018 maart 8].
- [23] R. Walsh en S. Cook, „Issues and Challenges in Diagnostic Sequencing for Inherited Cardiac Conditions,” *Clinical Chemistry*, vol. 63, nr. 1, pp. 116-128, 2017.
- [24] Y. D. Wijeyeratne en E. R. Behr, „Sudden death and cardiac arrest without phenotype: the utility of genetic testing,” *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 27, nr. 3, pp. 207-213, 2017.
- [25] B.-M. Beckmann, A. Pfeufer en S. Kääh, „Inherited cardiac arrhythmias: diagnosis, treatment, and prevention,” *Deutsches Arzteblatt international*, vol. 108, nr. 37, pp. 623-633, 2011.
- [26] „Hartstichting,” [Online]. Available: <https://www.hartstichting.nl/hart-en-vaatziekten/hartritmestoornissen/gids-hartritme/wat-is-een-ritmestoornis?tab=3>. [Geopend 4 mei 2018].
- [27] C. M. N. J. P. L. J. H. Broendberg AK, „Targeted next generation sequencing in a young population with suspected inherited malignant cardiac arrhythmias,” *Eur J Hum Genet.*, vol. 26, nr. 3, pp. 303-313, 2018.
- [28] C. V. S. D. Care M, „Genetic Testing in Inherited Heart Diseases: Practical Considerations for Clinicians,” *Curr Cardiol Rep.*, vol. 19, nr. 9, p. 88, 2017.
- [29] „Genomics England Panelapp,” Genomics England, [Online]. Available: <https://panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/genes/>. [Geopend 3 april 2018].
- [30] O. A. T. B. K. M. K. T. A. C. K. M. Q. R. S. C. M. H. G. K. K. B. K. G. I. K. T. R. N. S. H. Y. N. I. S. R. S. H. N. Y. C. G. T. H. N. Mitsuhashi S, „A congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis,” *Am J Hum Genet.*, vol. 88, nr. 6, pp. 845-851, 2011.
- [31] A. C. H. K. J. S. K. J. Y. Y. F. W. H. C. W. P. V. D. C. G. Sher RB, „A rostrocaudal muscular dystrophy caused by a defect in choline kinase beta, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis,” *J Biol Chem.*, vol. 281, nr. 8, pp. 4938-48, 2006.
- [32] T. A. V. J. G.-Q. L. D.-C. J. D.-M. J. O. C. B. M. G. P. D. M. A. A. M. J. S. J. G.-R. A. M. N. E. T. A. Y. M. G. P. M. A. R. Natera-de Benito D, „Molecular characterization of congenital myasthenic syndromes in Spain,” *Neuromuscul Disord.*, vol. 27, nr. 12, pp. 1087-1098, 2017.
- [33] G.-H. N. Y. D. C. M. T. D. K. D. H. H. J. C. C. W. L. C. S. M. P. A. L. Y. K. R. K. B. A. M. Boczek NJ, „Spectrum and Prevalence of CALM1-, CALM2-, and CALM3-Encoded Calmodulin Variants in

Long QT Syndrome and Functional Characterization of a Novel Long QT Syndrome-Associated Calmodulin Missense Variant, E141G," *Circ Cardiovasc Genet.*, vol. 9, nr. 2, pp. 136-146, 2016.

- [34] Y. N. C. L. J. C. B. B. R. M. S. D. L. P. I. T. A. T. H. T. B. E. K. D. D. I. M. E. T. D. T. T. S. W. T. T. N. H. T. Y. T. T. Y. H. M. Makita N, „Novel calmodulin mutations associated with congenital arrhythmia susceptibility," *Circ Cardiovasc Genet.*, vol. 7, nr. 4, pp. 466-74., 2014.
- [35] J. C. W. G. S. J. F. F. S. N. W. L. O. K. C. D. C. W. C. L. B. Z. G. A. J. Pipilas DC, „Novel calmodulin mutations associated with congenital long QT syndrome affect calcium current in human cardiomyocytes," *Heart Rhythm.*, vol. 13, nr. 10, pp. 2012-9., 2016.
- [36] J. C. G. E. D. F. G. C. B. O. M. P. J. F. M. R. S. K. J. P. M. W. T. L. P. B. B. C. T. S. C. B. D. K. S. M. T. S. T. C. W. S. P. G. Crotti L, „Calmodulin mutations associated with recurrent cardiac arrest in infants," *Circulation.*, vol. 127, nr. 9, pp. 1009-17, 2013.
- [37] M. T. H. T. S. K. W. Y. H. M. N. S. K. H. H. S. C. J. Y. F. I. T. O. S. C. K. M. H. Y. Y. H. M. M. N. K. T. Yamamoto Y, „Allele-specific ablation rescues electrophysiological abnormalities in a human iPS cell model of long-QT syndrome with a CALM2 mutation," *Hum Mol Genet.*, vol. 26, nr. 9, pp. 1670-1677, 2017.
- [38] C. M. B. B. D. E. M. E. D. B. M. L. A. L. M. I. B. G. R. I. V. M. T. K. H. P. v. H. E. Z. T. C. D. B. C. T. G. D. L. N. A. v. R. F. R. A. van Hengel J, „Mutations in the area composita protein α T-catenin are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy," *Eur Heart J.*, vol. 34, nr. 3, pp. 201-10., 2013.
- [39] G. S. v. H. J. G. E. C. L. T. K. S. X. D. R. R. v. R. F. R. G. Li J, „Loss of α T-catenin alters the hybrid adhering junctions in the heart and leads to dilated cardiomyopathy and ventricular arrhythmia following acute ischemia," *J Cell Sci.*, vol. 125, nr. 4, pp. 1058-67, 2012.
- [40] „DNA-diagnostiek," 24 november 2015. [Online]. Available: <http://www.dnadiagnostiek.nl/core-genen/8-core-gene-list/60-core-list-spierdystrofieen-myopathieen-2015-11-24>. [Geopend 30 mei 2018].
- [41] „DNA-diagnostiek," 27 februari 2015. [Online]. Available: <http://www.dnadiagnostiek.nl/core-genen/8-core-gene-list/4-cardiomyopathie>. [Geopend 30 mei 2018].

Bijlagen

Bijlage 1: Intersectie van de genlijsten voor myopathie.

gen	som		UZ Leuven	UZ Gent	CMG-UZB	ULB		Nijmegen	Centogene
<i>ACTA1</i>	5		1	1	1			1	1
<i>ACVR1</i>	2		1					1	
<i>AGRN</i>	5		1	1	1			1	1
<i>ALG13</i>	2		1	1					
<i>ALG14</i>	3		1	1	1				
<i>ALG2</i>	3		1	1	1				
<i>ANO5</i>	6		1	1	1	1		1	1
<i>B3GALNT2</i>	5		1	1	1			1	1
<i>B3GNT</i>	2		1					1	
<i>B4GAT1</i>	3		1		1				1
<i>BAG3</i>	5		1	1	1			1	1
<i>BIN1</i>	5		1	1	1			1	1
<i>C10orf2</i>	3		1			1			1
<i>CACNA1S</i>	3		1					1	1
<i>CAPN3</i>	5		1	1		1		1	1
<i>CASQ1</i>	2		1					1	
<i>CAV3</i>	5		1	1	1			1	1
<i>CCDC78</i>	3		1					1	1
<i>CFL2</i>	5		1	1	1			1	1
<i>CHAT</i>	5		1	1	1			1	1
<i>CHCHD10</i>	2		1					1	
<i>CHKB</i>	4		1	1	1			1	

gen	som		UZ Leuven	UZ Gent	CMG-UZB	ULB		Nijmegen	Centogene
<i>CHRNA1</i>	5		1	1	1			1	1
<i>CHRNB1</i>	5		1	1	1			1	1
<i>CHRND</i>	5		1	1	1			1	1
<i>CHRNE</i>	5		1	1	1			1	1
<i>CHRNG</i>	4		1	1	1				1
<i>CLN3</i>	1		1						
<i>CNTN1</i>	4		1	1				1	1
<i>COL12A1</i>	4		1	1				1	1
<i>COL13A1</i>	2		1					1	
<i>COL4A1</i>	1		1						
<i>COL6A1</i>	5		1	1	1			1	1
<i>COL6A2</i>	6		1	1	1	1		1	1
<i>COL6A3</i>	6		1	1	1	1		1	1
<i>COL6A6</i>	1		1						
<i>COLQ</i>	5		1	1	1			1	1
<i>CRYAB</i>	5		1	1	1			1	1
<i>DAG1</i>	5		1	1	1			1	1
<i>DES</i>	5		1	1	1			1	1
<i>DMD</i>	6		1	1	1	1		1	1
<i>DNA2</i>	2		1					1	
<i>DNAJB6</i>	5		1	1	1			1	1
<i>DNM2</i>	5		1	1	1			1	1
<i>DNMT3B</i>	1		1						
<i>DOK7</i>	5		1	1	1			1	1
<i>DPAGT1</i>	4		1	1	1			1	

gen	som		UZ Leuven	UZ Gent	CMG-UZB	ULB		Nijmegen	Centogene
<i>DPM1</i>	4		1	1	1			1	
<i>DPM2</i>	4		1	1	1			1	
<i>DPM3</i>	4		1	1	1			1	
<i>DUX4</i>	1		1						
<i>DYSF</i>	6		1	1	1	1		1	1
<i>EMD</i>	5		1	1	1			1	1
<i>FHL1</i>	5		1	1	1			1	1
<i>FKBP14</i>	2		1					1	
<i>FKRP</i>	5		1	1	1			1	1
<i>FKTN</i>	5		1	1	1			1	1
<i>FLNC</i>	5		1	1	1			1	1
<i>GAA</i>	6		1	1	1	1		1	1
<i>GFPT1</i>	5		1	1	1			1	1
<i>GMPPB</i>	5		1	1	1			1	1
<i>GNE</i>	5		1	1	1			1	1
<i>GTDC2</i>	1		1						
<i>HNRNPA1</i>	2		1		1				
<i>HNRNPA2B1</i>	2		1		1				
<i>HNRNPD1</i>	3		1	1					1
<i>ISCU</i>	4		1	1	1			1	
<i>ISPD</i>	5		1	1	1			1	1
<i>ITGA7</i>	3		1	1				1	
<i>KBTBD13</i>	4		1		1			1	1
<i>KLHL40</i>	5		1	1	1			1	1
<i>KLHL41</i>	4		1	1				1	1

gen	som		UZ Leuven	UZ Gent	CMG-UZB	ULB		Nijmegen	Centogene
<i>KLHL9</i>	4		1	1	1			1	
<i>LAMA2</i>	5		1	1	1			1	1
<i>LAMB2</i>	4		1	1	1				1
<i>LAMP2</i>	3		1	1				1	
<i>LARGE</i>	3		1					1	1
<i>LDB3</i>	5		1	1	1			1	1
<i>LIMS2</i>	3		1	1					1
<i>LMNA</i>	5		1	1	1			1	1
<i>LMOD3</i>	4		1	1				1	1
<i>LRP4</i>	2		1		1				
<i>MATR3</i>	3		1	1	1				
<i>MEGF10</i>	4		1	1	1			1	
<i>MSTN</i>	3		1	1				1	
<i>MTM1</i>	5		1	1	1			1	1
<i>MTMR14</i>	2		1						1
<i>MUSK</i>	5		1	1	1			1	1
<i>MYBPC3</i>	3		1	1	1				
<i>MYF6</i>	3		1					1	1
<i>MYH14</i>	2		1		1				
<i>MYH2</i>	2		1					1	
<i>MYH7</i>	5		1	1	1			1	1
<i>MYO18B</i>	1		1						
<i>MYOT</i>	5		1	1	1			1	1
<i>NEB</i>	5		1	1	1			1	1
<i>OPA1</i>	3		1					1	1

gen	som		UZ Leuven	UZ Gent	CMG-UZB	ULB		Nijmegen	Centogene
<i>ORAI1</i>	2		1					1	
<i>PABPN1</i>	3		1	1				1	
<i>PIGY</i>	1		1						
<i>PLEC</i>	5		1	1	1			1	1
<i>POLG</i>	4		1		1	1			1
<i>POLG2</i>	2		1						1
<i>POMGNT1</i>	5		1	1	1			1	1
<i>POMGNT2</i>	5		1	1	1			1	1
<i>POMK</i>	5		1	1	1			1	1
<i>POMT1</i>	5		1	1	1			1	1
<i>POMT2</i>	6		1	1	1	1		1	1
<i>PREPL</i>	2		1		1				
<i>PTPLA</i>	1		1						
<i>PTRF</i>	3		1	1				1	
<i>PUS1</i>	1		1						
<i>RAPSN</i>	5		1	1	1			1	1
<i>RRM2B</i>	3		1					1	1
<i>RYR1</i>	6		1	1	1	1		1	1
<i>SCN4A</i>	5		1	1	1			1	1
<i>SEPNI</i>	4		1	1	1			1	
<i>SGCA</i>	5		1	1		1		1	1
<i>SGCB</i>	4		1	1				1	1
<i>SGCD</i>	4		1	1				1	1
<i>SGCG</i>	4		1	1				1	1
<i>SIL1</i>	2		1		1				

gen	som		UZ Leuven	UZ Gent	CMG-UZB	ULB		Nijmegen	Centogene
<i>SMCHD1</i>	4		1	1				1	1
<i>SNAP25</i>	2		1		1				
<i>SPEG</i>	3		1	1				1	
<i>STAC3</i>	2		1	1					
<i>STIM1</i>	3		1	1				1	
<i>SUCLA2</i>	2		1						1
<i>SYNE1</i>	3		1	1					1
<i>SYNE2</i>	3		1	1					1
<i>SYT2</i>	2		1		1				
<i>TCAP</i>	4		1	1				1	1
<i>TIA1</i>	3		1	1	1				
<i>TK2</i>	3		1	1					1
<i>TMEM43</i>	2		1	1					
<i>TMEM5</i>	4		1		1			1	1
<i>TNNT1</i>	5		1	1	1			1	1
<i>TNPO3</i>	5		1	1	1			1	1
<i>TOR1AIP1</i>	2		1	1					
<i>TPM2</i>	5		1	1	1			1	1
<i>TPM3</i>	5		1	1	1			1	1
<i>TRAPPC11</i>	4		1	1				1	1
<i>TRIM32</i>	4		1	1				1	1
<i>TRIM54</i>	1		1						
<i>TRIM63</i>	2		1	1					
<i>TTN</i>	6		1	1	1	1		1	1
<i>VCP</i>	5		1	1	1			1	1

gen	som		UZ Leuven	UZ Gent	CMG-UZB	ULB		Nijmegen	Centogene
<i>VMA21</i>	2		1					1	
<i>YARS2</i>	1		1						
<i>SPTBN4</i>	1		1						
<i>ADSSL1</i>	1		1						
<i>CHD7</i>	1		1						
<i>DCST2</i>	1		1						
<i>INPP5K</i>	1		1						
<i>KY</i>	1		1						
<i>MAP3K20</i>	1		1						
<i>MYPN</i>	1		1						
<i>P4HA1</i>	1		1						
<i>POGLUT1</i>	1		1						
<i>POPDC1</i>	1		1						
<i>SQSTM1</i>	2		1		1				
<i>TRDN</i>	1		1						

Bijlage 2: Intersectie van de genlijsten voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen (Genen niet aanwezig in het genpanel van UZ Leuven).

gen	som		UZ Gent	CMG- UZB	ULB		Nijmegen	Centogene
<i>ECEL1</i>	3		1	1			1	
<i>ATP7A</i>	2			1			1	
<i>BICD2</i>	2			1			1	
<i>DOLK</i>	2		1	1				
<i>DYNC1H1</i>	2			1			1	
<i>IGHMBP2</i>	2			1			1	
<i>MYH3</i>	2			1			1	
<i>SGCE</i>	2		1					1
<i>SLC52A2</i>	2			1			1	
<i>SLC52A3</i>	2			1			1	
<i>TRPV4</i>	2			1			1	
<i>UBA1</i>	2			1				
<i>VAPB</i>	2		1	1				
<i>VRK1</i>	2			1			1	
<i>ALDOA</i>	1			1				
<i>ALS2</i>	1			1				
<i>ANG</i>	1			1				
<i>ASAH1</i>	1			1				
<i>ATXN2</i>	1			1				
<i>BSCL2</i>	1			1				
<i>BVES</i>	1		1					
<i>C9orf72</i>	1			1				
<i>DAO</i>	1			1				

gen	som		UZ Gent	CMG- UZB	ULB		Nijmegen	Centogene
<i>DCTN1</i>	1			1				
<i>DGUOK</i>	1			1				
<i>DNAJB2</i>	1			1				
<i>ERBB3</i>	1						1	
<i>EXOSC3</i>	1			1				
<i>EXOSC8</i>	1						1	
<i>FAM111B</i>	1						1	
<i>FBLN5</i>	1			1				
<i>FBXO38</i>	1			1				
<i>FDX2</i>	1			1				
<i>FUS</i>	1			1				
<i>GARS</i>	1			1				
<i>GLE1</i>	1			1				
<i>GRN</i>	1			1				
<i>HARS</i>	1			1				
<i>HCNJ2</i>	1						1	
<i>HEXB</i>	1			1				
<i>HSPB1</i>	1			1				
<i>HSPB3</i>	1			1				
<i>HSPB8</i>	1			1				
<i>IKBKAP</i>	1				1			
<i>KPIN1</i>	1							1
<i>LARGE1</i>	1			1				
<i>LAS1L</i>	1			1				
<i>MAMLD1</i>	1							1

gen	som		UZ Gent	CMG- UZB	ULB		Nijmegen	Centogene
<i>MB</i>	1						1	
<i>MICU1</i>	1						1	
<i>MYH8</i>	1			1				
<i>NEFH</i>	1			1				
<i>OBSCN</i>	1		1					
<i>OPA3</i>	1							1
<i>OPTN</i>	1			1				
<i>PDE9A</i>	1		1					
<i>PFN1</i>	1			1				
<i>PIP5K1C</i>	1						1	
<i>PLEKHG5</i>	1			1				
<i>PRPS1</i>	1						1	
<i>QDPR</i>	1			1				
<i>REEP1</i>	1			1				
<i>SELENON</i>	1							1
<i>SETX</i>	1			1				
<i>SIGMAR1</i>	1			1				
<i>SLC18A3</i>	1			1				
<i>SLC25A4</i>	1				1			
<i>SLC5A7</i>	1			1				
<i>SMN1</i>	1			1				
<i>SOD1</i>	1			1				
<i>TAF15</i>	1			1				
<i>TANGO2</i>	1						1	
<i>TARDBP</i>	1			1				

gen	som		UZ Gent	CMG- UZB	ULB		Nijmegen	Centogene
<i>TFG</i>	1			1				
<i>TNNI2</i>	1			1				
<i>TNNT3</i>	1			1				
<i>TSEN54</i>	1			1				
<i>TTC19</i>	1						1	
<i>TYMP</i>	1							1
<i>UBQLN2</i>	1						1	
<i>UNC13A</i>	1			1				
<i>VEGFA</i>	1			1				
<i>VIPAS39</i>	1						1	
<i>XK</i>	1						1	
<i>ZC4H2</i>	1						1	

Bijlage 3: Intersectie van de genlijsten voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen.

Gen	som	UZ Leuven	UZ Gent	CMG- UZB	CMG- Antwerpen	Nijmegen	Centogene	Care Melanie	Broendberg Anders	Forleo Cinzia
<i>ABCC9</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>ACTC1</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>ACTN2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>AKAP9</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>ANK2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>ANKRD1</i>	8	1	1	1	1	1		1	1	1
<i>BAG3</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>CACNA1C</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>CACNA1D</i>	1	1								
<i>CACNA2D1</i>	8	1	1	1	1	1		1	1	1
<i>CACNB2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>CALM1</i>	8	1	1	1	1	1		1	1	1
<i>CALM2</i>	5	1	1					1	1	1
<i>CALM3</i>	2	1							1	
<i>CALR3</i>	8	1	1	1	1	1	1	1		1
<i>CASQ2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>CAV3</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>CRYAB</i>	8	1	1	1	1	1		1	1	1
<i>CSRP3</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>CTNNA3</i>	7	1	1	1	1	1			1	1
<i>DES</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>DSC2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>DSG2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>DSP</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Gen	som	UZ Leuven	UZ Gent	CMG- UZB	CMG- Antwerpen	Nijmegen	Centogene	Care Melanie	Broendberg Anders	Forleo Cinzia
<i>DTNA</i>	5	1	1	1					1	1
<i>FHL1</i>	5	1	1		1				1	1
<i>FLNC</i>	2	1						1		
<i>GJA5</i>	5	1	1		1				1	1
<i>GLA</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>GPD1L</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>HCN4</i>	8	1	1	1	1	1		1	1	1
<i>JPH2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>JUP</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>KCNA5</i>	6	1	1		1		1		1	1
<i>KCND2</i>	2	1		1						
<i>KCND3</i>	7	1	1	1	1			1	1	1
<i>KCNE1</i>	8	1	1	1	1		1	1	1	1
<i>KCNE2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>KCNE3</i>	8	1	1	1	1	1		1	1	1
<i>KCNE5</i>	7	1	1	1	1			1	1	1
<i>KCNH2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>KCNJ2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>KCNJ5</i>	7	1	1	1	1			1	1	1
<i>KCNJ8</i>	8	1	1	1	1	1		1	1	1
<i>KCNQ1</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>LAMA4</i>	8	1	1	1	1	1		1	1	1
<i>LAMP2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>LDB3</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>LMNA</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Gen	som	UZ Leuven	UZ Gent	CMG- UZB	CMG- Antwerpen	Nijmegen	Centogene	Care Melanie	Broendberg Anders	Forleo Cinzia
<i>MIB1</i>	5	1	1	1	1	1				
<i>MYBPC3</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>MYH6</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>MYH7</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>MYL2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>MYL3</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>MYLK2</i>	6	1	1	1			1		1	1
<i>MYOZ2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>MYPN</i>	8	1	1	1	1	1		1	1	1
<i>NEXN</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>NKX2-5</i>	5	1	1		1			1	1	
<i>NOS1AP</i>	4	1	1		1					1
<i>NPPA</i>	7	1	1	1	1		1		1	1
<i>NUP155</i>	2	1								1
<i>PITX2</i>	1	1								
<i>PKP2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>PLN</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>PRKAG2</i>	8	1	1		1	1	1	1	1	1
<i>RBM20</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>RYR2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>SCN10A</i>	4	1		1				1	1	
<i>SCN1B</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>SCN2B</i>	6	1	1	1	1				1	1
<i>SCN3B</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>SCN4B</i>	8	1	1	1	1		1	1	1	1

Gen	som	UZ Leuven	UZ Gent	CMG- UZB	CMG- Antwerpen	Nijmegen	Centogene	Care Melanie	Broendberg Anders	Forleo Cinzia
<i>SCN5A</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>SEMA3A</i>	2	1						1		
<i>SGCD</i>	8	1	1	1	1		1	1	1	1
<i>SNTA1</i>	8	1	1	1	1	1		1	1	1
<i>TAZ</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TCAP</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TGFB3</i>	7	1	1	1	1		1		1	1
<i>TMEM43</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TMPO</i>	7	1	1	1			1	1	1	1
<i>TNNC1</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TNNI3</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TNNT2</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TPM1</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TRDN</i>	7	1	1		1	1		1	1	1
<i>TRPM4</i>	7	1	1	1	1			1	1	1
<i>TTR</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>TXNRD2</i>	4	1	1	1						1
<i>VCL</i>	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Bijlage 4: Intersectie van de genlijsten voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen (Genen niet aanwezig in het genpanel van UZ Leuven).

gen	aantal	UZ Gent	CMG- UZB	CMG- Antwerpen	Nijmegen	Centogene	Care Melanie	Broendberg Anders	Forleo Cinzia
<i>ACADVL</i>	2	1	1						
<i>ACT1</i>	1								1
<i>ACTA2</i>	1	1							
<i>AGL</i>	1	1							
<i>AKAP10</i>	1	1							
<i>ALG10</i>	1	1							
<i>ALPK3</i>	1			1					
<i>APOB</i>	1							1	
<i>ATP5E</i>	1	1							
<i>BRAF</i>	1	1							
<i>CBL</i>	1	1							
<i>CFC1</i>	1	1							
<i>CHRM2</i>	2		1						1
<i>CITED2</i>	1	1							
<i>COA5</i>	1	1							
<i>COX15</i>	2		1						1
<i>CRELD1</i>	1	1							
<i>CTF1</i>	4	1	1					1	
<i>CTNNA1</i>	1	1							
<i>DCHS1</i>	1	1							
<i>DLG1</i>	1								1
<i>DMD</i>	6	1	1			1	1	1	1
<i>DMPK</i>	1	1							

gen	aantal	UZ Gent	CMG- UZB	CMG- Antwerpen	Nijmegen	Centogene	Care Melanie	Broendberg Anders	Forleo Cinzia
<i>DNAJC19</i>	2		1					1	
<i>DNM1L</i>	2	1	1						
<i>DOLK</i>	4	1	1				1		1
<i>DPP6</i>	5	1	1		1		1	1	
<i>ELN</i>	1	1							
<i>EMD</i>	7	1	1	1	1		1	1	1
<i>EYA4</i>	6	1	1			1	1	1	1
<i>FBN1</i>	1	1							
<i>FBXO32</i>	1	1							
<i>FGF12</i>	1						1		
<i>FHL2</i>	4	1	1					1	1
<i>FKRP</i>	4	1	1				1		1
<i>FKTN</i>	6	1	1			1	1	1	1
<i>FLH1</i>	1				1				
<i>FOXD4</i>	1		1						
<i>FOXRED1</i>	1	1							
<i>FXN</i>	4	1	1					1	1
<i>GAA</i>	3	1	1					1	
<i>GATA4</i>	3	1					1	1	
<i>GATA5</i>	2	1							1
<i>GATA6</i>	1	1							
<i>GATAD1</i>	5	1	1			1	1		1
<i>GDF1</i>	1	1							
<i>GJA1</i>	3	1		1					1
<i>GLA</i>	1								1

gen	aantal	UZ Gent	CMG- UZB	CMG- Antwerpen	Nijmegen	Centogene	Care Melanie	Broendberg Anders	Forleo Cinzia
<i>GLB1</i>	1	1							
<i>GUSB</i>	1	1							
<i>HACD1</i>	1		1						
<i>HAND1</i>	1	1							
<i>HCN1</i>	1							1	
<i>HFE</i>	1	1							
<i>HRAS</i>	2	1	1						
<i>ILK</i>	3	1	1						1
<i>IRX3</i>	1						1		
<i>JAG1</i>	1	1							
<i>KCND2</i>	1	1							
<i>KCNE4</i>	1							1	
<i>KCNIP2</i>	1	1							
<i>KCNK17</i>	1						1		
<i>KHL2</i>	1						1		
<i>KRAS</i>	1	1							
<i>LDLR</i>	1							1	
<i>MAP2K1</i>	1	1							
<i>MAP2K2</i>	1	1							
<i>MED13L</i>	1	1							
<i>MRPL3</i>	1	1							
<i>MT-ND1</i>	1					1			
<i>MT-ND5</i>	1					1			
<i>MT-ND6</i>	1					1			
<i>MT-TD</i>	1					1			

gen	aantal	UZ Gent	CMG- UZB	CMG- Antwerpen	Nijmegen	Centogene	Care Melanie	Broendberg Anders	Forleo Cinzia
<i>MT-TH</i>	1					1			
<i>MT-TI</i>	1					1			
<i>MT-TK</i>	1					1			
<i>MT-TL1</i>	1					1			
<i>MT-TL2</i>	1					1			
<i>MT-TM</i>	1					1			
<i>MT-TQ</i>	1					1			
<i>MT-TS1</i>	1					1			
<i>MT-TS2</i>	1					1			
<i>MURC</i>	2		1						1
<i>MYOM1</i>	3	1	1					1	
<i>MYOZ1</i>	2	1	1						
<i>NDUFV2</i>	1								1
<i>NEBL</i>	4	1	1					1	1
<i>NKX2-6</i>	1	1							
<i>NRAS</i>	1	1							
<i>OBSCN</i>	1								1
<i>PCSK9</i>	1							1	
<i>PDLIM3</i>	5	1	1				1	1	1
<i>PRDM16</i>	4		1	1	1			1	
<i>PSEN1</i>	6	1	1			1	1	1	1
<i>PSEN2</i>	6	1	1			1	1	1	1
<i>PTPN11</i>	4	1	1				1	1	
<i>RAF</i>	1						1		
<i>RAF1</i>	4	1	1					1	1

gen	aantal	UZ Gent	CMG- UZB	CMG- Antwerpen	Nijmegen	Centogene	Care Melanie	Broendberg Anders	Forleo Cinzia
<i>RANGRF</i>	6	1	1	1			1	1	1
<i>RPSA</i>	1		1						
<i>S100A1</i>	1		1						
<i>SCN7A</i>	1		1						
<i>SCO2</i>	1	1							
<i>SDHA</i>	4	1	1			1			1
<i>SGK1</i>	1		1						
<i>SHOC2</i>	1	1							
<i>SLC12A1</i>	1		1						
<i>SLC22A5</i>	2						1	1	
<i>SLC25A3</i>	1	1							
<i>SLC25A4</i>	3		1			1			1
<i>SLC8A1</i>	1							1	
<i>SLMAP</i>	5	1	1	1			1		1
<i>SMAD3</i>	1	1							
<i>SOD2</i>	2	1	1						
<i>SOS1</i>	2	1	1						
<i>SPRED1</i>	1	1							
<i>SYNE1</i>	3	1	1						1
<i>SYNE2</i>	2	1	1						
<i>TBX1</i>	1	1							
<i>TBX20</i>	1	1							
<i>TBX5</i>	1							1	
<i>TGFB2</i>	1	1							
<i>TGFBR1</i>	1	1							

gen	aantal	UZ Gent	CMG- UZB	CMG- Antwerpen	Nijmegen	Centogene	Care Melanie	Broendberg Anders	Forleo Cinzia
<i>TGFBR2</i>	1	1							
<i>TLL1</i>	1	1							
<i>TMEM70</i>	1	1							
<i>TNNI1</i>	1		1						
<i>TNNT3</i>	1		1						
<i>TRIM63</i>	2	1	1						
<i>TSFM</i>	1	1							
<i>TTN</i>	7	1	1	1		1	1	1	1
<i>XK</i>	1	1							
<i>ZFPM2</i>	1	1							

Bijlage 5: resultaten van de vergelijking van de algoritmes voor ANO5.

Panelapp:

Limb girdle muscular dystrophy

Gene: ANO5

Green List (high evidence)

ANO5 (anoctamin 5)

EnsemblGenelds (GRCh38): ENSG00000171714

EnsemblGenelds (GRCh37): ENSG00000171714

OMIM: 608662, Gene2Phenotype

ANO5 is in 8 panels

Reviews (1)

Details

History

1 review

Sarah Leigh (Genomics England Curator)

Green List (high evidence)

Listed as associated with Limb Girdle Muscular Dystrophy by Gene Advisor (June 2016), Steve Abbs

27 Jul 2016, 9:20 a.m.

Amrygenetics		GEN = ANO5				Beschrijving/bevestiging literatuur
			Answer	Points		
Number of unrelated patiënts			28	4	Papers: Bolduc et al. (2010) en Penttila et al. (2012)	
Other statistical evidence						
AD disease with significant excess of de novos				0		
AR: disease with LOD score > 3				0		
Number of publications reporting independent probands			3	3	Papers: Bolduc et al. (2010) en Penttila et al. (2012) en Little et al. (2013)	
Number of pathogenic variants			4	4	Zie Human Genome Mutation Database	
Gene function						
Function/expression consistent with disease			ja	1	Dulboc: EM shows lesion in muscle from patients with ANO5 mutation	
physically interacts with gene characterized for same disease			neen	0		
Gene disruption						
Relevant pathology in vitro after genetic modification			neen	0		
Determination of mutational mechanism			neen	0		
Model organism						
Gene function in vivo related to pathology of human disease			neen	0		
Phenotype and genotype match human disease			neen	0		
			Totaal =	12		
				12		
Moderate						
Opmerking			Maximale score van definitief bewijs omdat er meer dan 25 "unrelated patiënts" zijn en dus altijd definitief als score wordt bekomen			

Clingen		GEN =			Beschrijving/bevestiging literatuur						
Evidence Type					Count	Total Points	Points Counted				
Genetic Evidence	Case-Level	Variant	Autosomal Dominant OR X-linked Disorder	Proband with other variant type with some evidence of gene impact		0	0				
				Proband with predicted or proven null variant		0	0				
				Variant is <i>de novo</i>		0	0				
		Autosomal Recessive Disorder	Two variants (not predicted/proven null) with some evidence of gene impact in <i>trans</i>	28	28						
			Two variants in <i>trans</i> and at least one <i>de novo</i> or a predicted/proven null variant		0	12	Papers: Bolduc et al. (2010) en Penttila et al. (2012)				
			Segregation		0	0					
	Case-Control						0	0			
	Genetic Evidence Total							12			
	Experimental Evidence	Functional	Biochemical Functions		1	0,5	Bolduc et al. (2010): Disruption in sarcolemma in muscle causes muscle dystrophy				
			Protein Interactions			0	1				
Expression			1	0,5	cDNA analysis in muscle from patiënts showed skipping of exon 13 in patients homozygous for c.1295C>G						
Functional Alteration		Patient cells			0	0					
		Non-patient cells			0	0					
Models		Non-human model organism			0						
		Cell culture model			0						
Rescue		Rescue in human			0	0					
		Rescue in non-human model organism			0	0					
		Rescue in cell culture model			0	0					
	Rescue in patient cells			0	0						
Experimental Evidence Total							1				
Total Points							13				

Bijlage 6: Resultaten van de vergelijking van de algoritmes voor *PRKAG2*.

Cardiomyopathy / *PRKAG2*

Hypertrophic Cardiomyopathy

Gene: **PRKAG2**

Green List (high evidence)

PRKAG2 (protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 2)

EnsemblGenelds (GRCh38): [ENSG00000106617](#)

EnsemblGenelds (GRCh37): [ENSG00000106617](#)

[OMIM: 602743](#), [Gene2Phenotype](#)

PRKAG2 is in [6 panels](#)

Reviews (2)

[Details](#)

[History](#)

2 reviews

Caroline Wright (Genomics England Curator)

Comment when marking as ready: On Manchester diagnostic panel

11 Feb 2016, 3:10 p.m.

Amrygenetics		GEN = PRKAG2		Beschrijving/bevestiging literatuur	
	Answer	Points			
Number of unrelated patiënts	15	4			Blair E et al. 2001; Laforêt p et al. 2006; Thevenon J et al. 2017; Kelly BP et al. 2009; Pöyhönen P et al. 2015; Alfares AA et al. 201; Arad M et al. 2002; Walsh et al. 2017
Other statistical evidence					
AD disease with significant excess of de novos		0			
AR: disease with LOD score > 3		0			
Number of publications reporting independent probands	3	3			Blair E et al. 2001; Laforêt p et al. 2006; Thevenon J et al. 2017
Number of pathogenic variants	11	4			HGMD
Gene function					
Function/expression consistent with disease	ja	1			Zie discussie Blair E et al. 2001
physically interacts with gene characterized for same disease		0			
Gene disruption					
Relevant pathology in vitro after genetic modification		0			
Determination of mutational mechanism	Ja	1			Ben Jehuda R et al. 2018
Model organism					
Gene function in vivo related to pathology of human disease	ja	1			Xie et al. 2016
Phenotype and genotype match human disease	ja	1			Xie et al. 2016
	Totaal =	15			
Strong					
Opmerkingen:					
Meer dan 25 cases gevonden --> DEFINITIVE EVIDENCE					
Maar uit andere bronnen is in het totaal ook strong evidence terug te vinden					

Clingen		GEN = PRKAG2		Beschrijving/bevestiging literatuur					
Evidence Type		Count	Total Points	Points Counted					
Genetic Evidence	Case-Level	Variant	Autosomal Dominant OR X-linked Disorder	15	7,5	7	Blair et al. (2001): 2 families met e Lafôret et al. (2006); Thevenon et al. (2017) Arad et al. (2002): 3x Pöyhönen et al. (2015) Kelly et al. (2009): c.1516G>C		
			Proband with other variant type with some evidence of gene impact						
			Proband with predicted or proven null variant		0	0			
	Case-Level	Variant	Autosomal Recessive Disorder	Variant is <i>de novo</i>	1	2		2	Thevenon et al. (2017): c.905G>A de novo mutatie
				Two variants (not predicted/proven null) with some evidence of gene impact in <i>trans</i>		0		0	
			Two variants in <i>trans</i> and at least one <i>de novo</i> or a predicted/proven null variant		0	0			
			Segregation		0	0			
	Case-Control			0	0				
	Genetic Evidence Total				9				
	Experimental Evidence	Functional	Biochemical Functions		0	0			
Protein Interactions				0	0				
Expression				0	0				
Functional Alteration		Patient cells		0	0				
		Non-patient cells		0	0				
Models		Non-human model organism	1	2	2	Xie et al. (2016): We show that models recapitulate humzn symptoms including cardiac hypertrophy and glycogen storage, confirming that the H530R mutation is causally related to PRKAG2 cardiac syndrome			
		Cell culture model		0	0				
Rescue		Rescue in human	1	2	2	Together, our work suggests that in vivo CRISPR/cas9 genome editing is an effective tool in the treatment of PRKAG2 cardiac syndrome and other dominant inherited cardiac diseases by selectively disrupting disease-causing mutations.			
		Rescue in non-human model organism		0	0				
		Rescue in cell culture model		0	0				
	Rescue in patient cells		0	0					
Experimental Evidence Total				4					
Total Points				13					

Bijlage 7: Resultaten van de analyses met ClinGen voor myopathie

ClinGen		GEN = CHKB		Beschrijving/bevestiging literatuur		
Evidence Type						
			Count	Total Points	Points Counted	
Genetic Evidence	Case-Level	Variant	Autosomal Dominant OR X-linked Disorder	Proband with other variant type with some evidence of gene impact	0	0
				Proband with predicted or proven null variant	0	0
				Variant is <i>de novo</i>	0	0
	Autosomal Recessive Disorder	Two variants (not predicted/proven null) with some evidence of gene impact in <i>trans</i>	0	12		
		Two variants in <i>trans</i> and at least one <i>de novo</i> or a predicted/proven null variant	6	12		
	Segregation				0	0
	Case-Control				0	0
	Genetic Evidence Total					12
	Experimental Evidence	Functional	Biochemical Functions		0	
			Protein Interactions		0	
Expression				0		
Functional Alteration		Patient cells	1	1		
		Non-patient cells		0		
Models		Non-human model organism	1	2		
		Cell culture model		0		
Rescue		Rescue in human		0		
		Rescue in non-human model organism		0		
		Rescue in cell culture model		0		
	Rescue in patient cells		0			
Experimental Evidence Total					3	
Total Points					15	

Mitsuhashi et al. (2011): The six nonsense mutations, c.116C>A (p.Ser39X), c.458dup (p.Leu153PhefsX57), c.611_612insC (p.Thr205AsnfsX5), c.810T>A (p.Tyr270X), c.852_859del (p.Trp284X), and c.922C>T (p.Gln308X), were predicted to truncate the protein and eliminate highly conserved domains of CHK.

Mitsuhashi et al. (2011): We therefore measured CHK activity in biopsied muscle. Similar to muscles of rmd mice, 1 muscles from individuals 2, 3, and 4, who carried homozygous or compound heterozygous nonsense mutations, did not have any detectable CHK activity

Sher et al. (2006) reported a spontaneous autosomal recessive mouse model of rostrocaudal muscular dystrophy (rmd) characterized by early-onset of progressive muscle wasting and hindlimb weakness and an outward rotation of the forelimbs associated with defective bone morphology. Western blot analysis confirmed complete loss of the Chkb protein, and there was decreased enzymatic activity of choline kinase and decreased levels of phosphatidylcholine.

Clingen		GEN = CHRNG		Beschrijving/bevestiging literatuur			
Evidence Type		Count	Total Points	Points Counted			
Genetic Evidence	Case-Level	Variant	Autosomal Dominant OR X-linked Disorder	Proband with other variant type with some evidence of gene impact	0	0	
			Proband with predicted or proven null variant	0	0		
			Variant is <i>de novo</i>	0	0		
		Autosomal Recessive Disorder	Two variants (not predicted/proven null) with some evidence of gene impact in <i>trans</i>	2	2	Natera-de Benito et al. (2017): 1x missense c.299T>G + 1x small deletion c.687_688delGA	
		Two variants in <i>trans</i> and at least one <i>de novo</i> or a predicted/proven null variant	0	0			
		Segregation	0	0			
	Case-Control	0	0				
	Genetic Evidence Total				2		
	Experimental Evidence	Functional	Biochemical Functions	0	0		
			Protein Interactions	0	0		
Expression			0	0			
Functional Alteration		Patient cells	0	0			
		Non-patient cells	0	0			
Models		Non-human model organism	0	0			
		Cell culture model	0	0			
Rescue		Rescue in human	0	0			
		Rescue in non-human model organism	0	0			
		Rescue in cell culture model	0	0			
Rescue in patient cells	0	0					
Experimental Evidence Total				0			
Total Points				2			

Bijlage 8: Resultaten van de analyses met ClinGen voor cardiomyopathie en hartritmestoornissen

ClinGen		GEN = CALM2		Beschrijving/bevestiging literatuur				
Evidence Type		Count	Total Points	Points Counted				
Genetic Evidence	Case-Level	Variant	Autosomal Dominant OR X-linked Disorder	Proband with other variant type with some evidence of gene impact	1	0,5	0,5	Boczek et al. (2016): indian patient
			Proband with predicted or proven null variant		0	0		
			Variant is <i>de novo</i>	6	12	12	Boczek et al. (2016): p.D130V variant in white male Pipilas et al. (2016): infant with p.D132H mutation Crotti et al. (2013): D96V mutation in hispanic girl Makita et al. (2014): 17 month old english boy with CALM2-p.N98I mutation + 6 year old japanese girl with CALM2-p.D134H mutation + 29-year-old German woman with perinatal bradycardia and neonatal long QT syndrome with D132E mutation	
		Autosomal Recessive Disorder	Two variants (not predicted/proven null) with some evidence of gene impact in <i>trans</i>		0	0		
			Two variants in <i>trans</i> and at least one <i>de novo</i> or a predicted/proven null variant		0	0		
	Segregation		0	0				
	Case-Control		0	0				
	Genetic Evidence Total				12			
	Experimental Evidence	Functional	Biochemical Functions		1	0,5	0,5	Yamamoto Y et al. (2017): Recently, mutations in <i>CALM</i> genes, which encode the ubiquitous Ca ²⁺ sensor calmodulin (CaM), have been reported to be associated with severe early onset LQTS (LQT14 and -15) (5,6), catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) (7), and familial idiopathic ventricular fibrillation (8). Three distinct genes (<i>CALM1</i> , <i>CALM2</i> , and <i>CALM3</i>) encode an identical CaM protein in humans. CaM modulates various proteins including several ion channels (9–12), sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor/Ca ²⁺ release channels (RyR2) (13,14), and Ca ²⁺ /CaM-dependent protein kinase (CaMKII) (15). Particularly during the regulation of L-type Ca ²⁺ channels (LTCCs), the complex of Ca ²⁺ -CaM promotes inactivation of LTCC currents (I _{CaL})
				Protein Interactions		0		
Expression					0			
Functional Alteration		Patient cells		0	0			
		Non-patient cells		0				
Models		Non-human model organism		0				
		Cell culture model		0				
Rescue		Rescue in human		0	1			
		Rescue in non-human model organism		0				
		Rescue in cell culture model		0				
Rescue in patient cells	1	1	1	Yamamoto Y et al. (2017): In this study, we established a hiPSC model from a patient with LQTS carrying a heterozygous <i>CALM2</i> -N98S mutation and successfully recapitulated the disease phenotypes. In addition, we conducted genome editing of LQT15-hiPSCs using the CRISPR-Cas9 system and rescued the observed electrophysiological abnormalities.				
Experimental Evidence Total				1,5				
Total Points				13,5				

Clingen		GEN = CTNNA3		Beschrijving/bevestiging literatuur				
Evidence Type				Count	Total Points	Points Counted		
Genetic Evidence	Case-Level	Variant	Autosomal Dominant OR X-linked Disorder	Proband with other variant type with some evidence of gene impact	1	0,5	0,5	Van Hengel et al. (2013): 1 Italiaanse familie
			Proband with predicted or proven null variant		0	0		
			Variant is <i>de novo</i>	1	2	2	Van Hengel et al. (2013): 1 de novo Italiaanse man	
		Autosomal Recessive Disorder	Two variants (not predicted/proven null) with some evidence of gene impact in <i>trans</i>		0	0		
			Two variants in <i>trans</i> and at least one <i>de novo</i> or a predicted/proven null variant		0	0		
	Segregation				0	0		
	Case-Control				0	0		
	Genetic Evidence Total						2,5	
	Experimental Evidence	Functional	Biochemical Functions		1	0,5	1,5	Van Hengel et al. (2013): Alpha-T-catenin binds plakophilins and this binding contributes to the formation of the area composita, which strengthens cell–cell adhesion in contractile cardiomyocytes.
			Protein Interactions		2	1		
Expression				0				
Functional Alteration		Patient cells		1	0	0,5	Li et al. (2012): α T-catenin-knockout mice exhibited progressive cardiomyopathy and increased incidence of ventricular arrhythmias, including fatal arrhythmias, after acute ischemia	
		Non-patient cells		1	0,5			
Models		Non-human model organism		1	2	4	Li et al. (2012): αT-catenin-knockout mice	
		Cell culture model		2	2			
Rescue		Rescue in human			0	6	Van Hengel et al. (2013): Yeast two-hybrid and cell transfection studies showed that the interaction between the p.V94D mutant protein and β -catenin was affected, whereas the p.del765L mutant protein showed a much stronger dimerization potential and formed aggresomes in HEK293T cells.	
		Rescue in non-human model organism			0			
		Rescue in cell culture model			0			
	Rescue in patient cells			0				
Experimental Evidence Total						6		
Total Points						8,5		