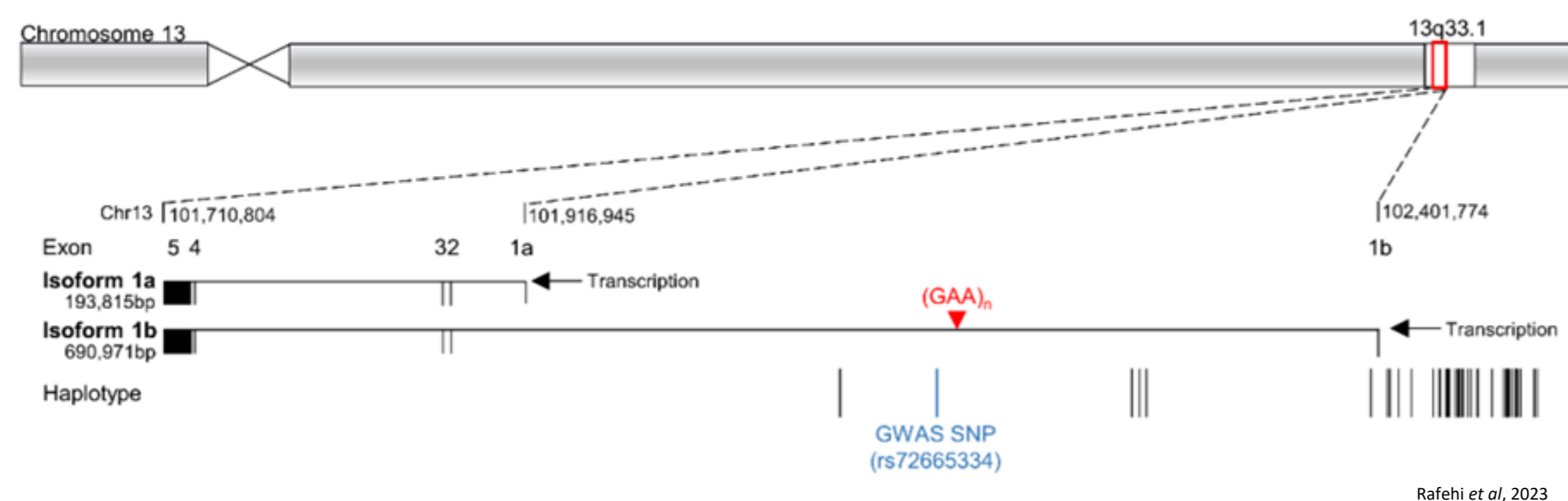


# Optimalisatie en validatie van de GAA-FGF14 ataxie test

L. Peeters, A. Van Eesbeek, S. Smekens, V. Race

## Introductie



GAA-FGF14 ataxie ofwel spinocerebellaire ataxie type 27B (SCA27B) is een autosomaal dominante overerfbare ziekte. Veroorzaakt door de GAA-repeats in intron 1 van het FGF14-gen die expanderen. Een expansie van >250 zuivere GAA-repeats wordt als pathoog beschouwd.

Het is een degeneratieve ziekte van het zenuwstelsel, waarbij het cerebellum wordt aangetast. De ziekte komt in episodes, maar naarmate de tijd vordert, worden de episodes frequenter totdat de symptomen continu aanwezig zijn.

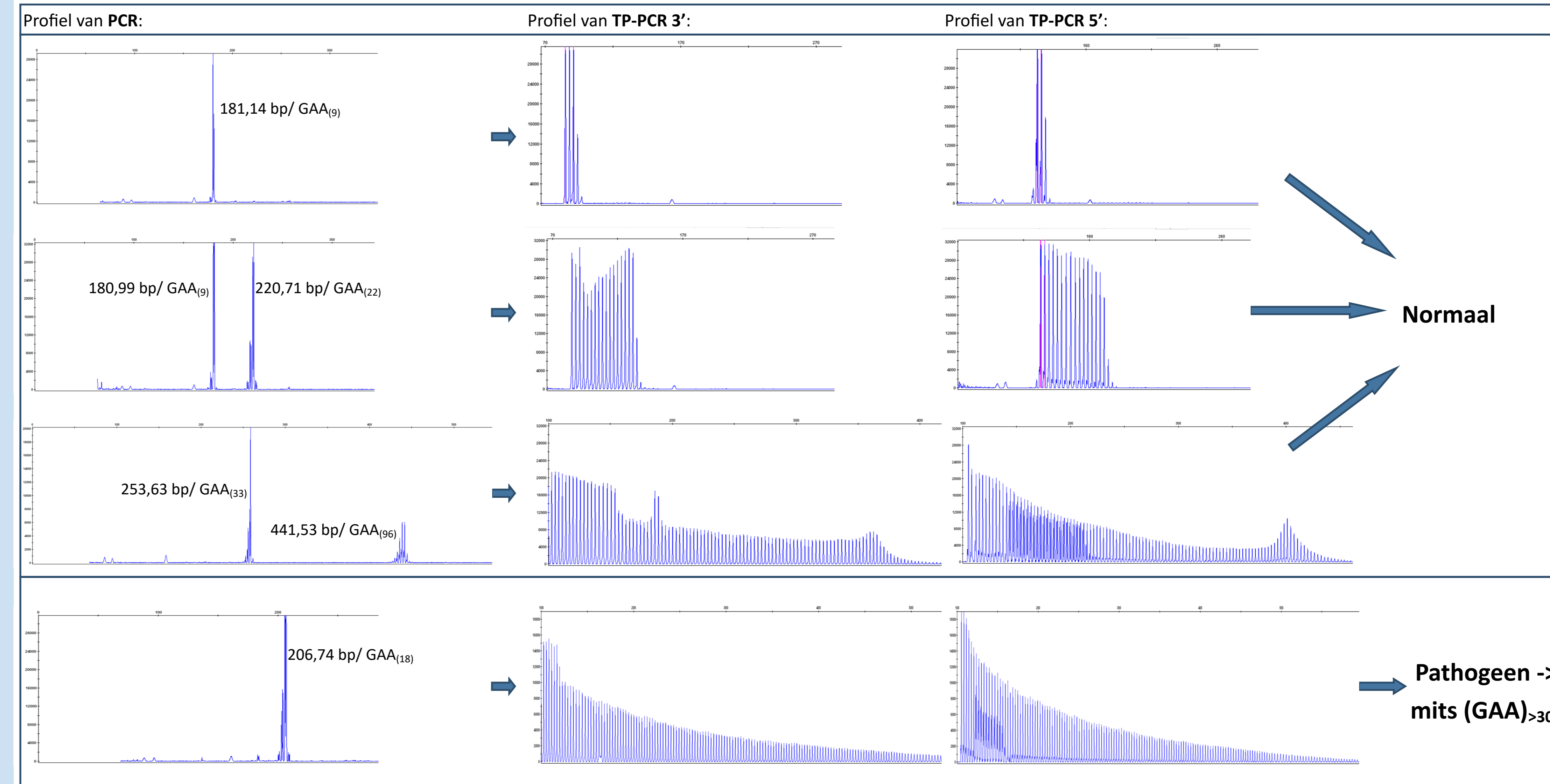
**Symptomen:** balansstoornissen, trage progressieve cerebellaire ataxie, downbeat nystagmus, diplopie, wazig zicht en vertigo.

SCA27B is een veelvoorkomende oorzaak van late-onset cerebellaire ataxie (LOCA).

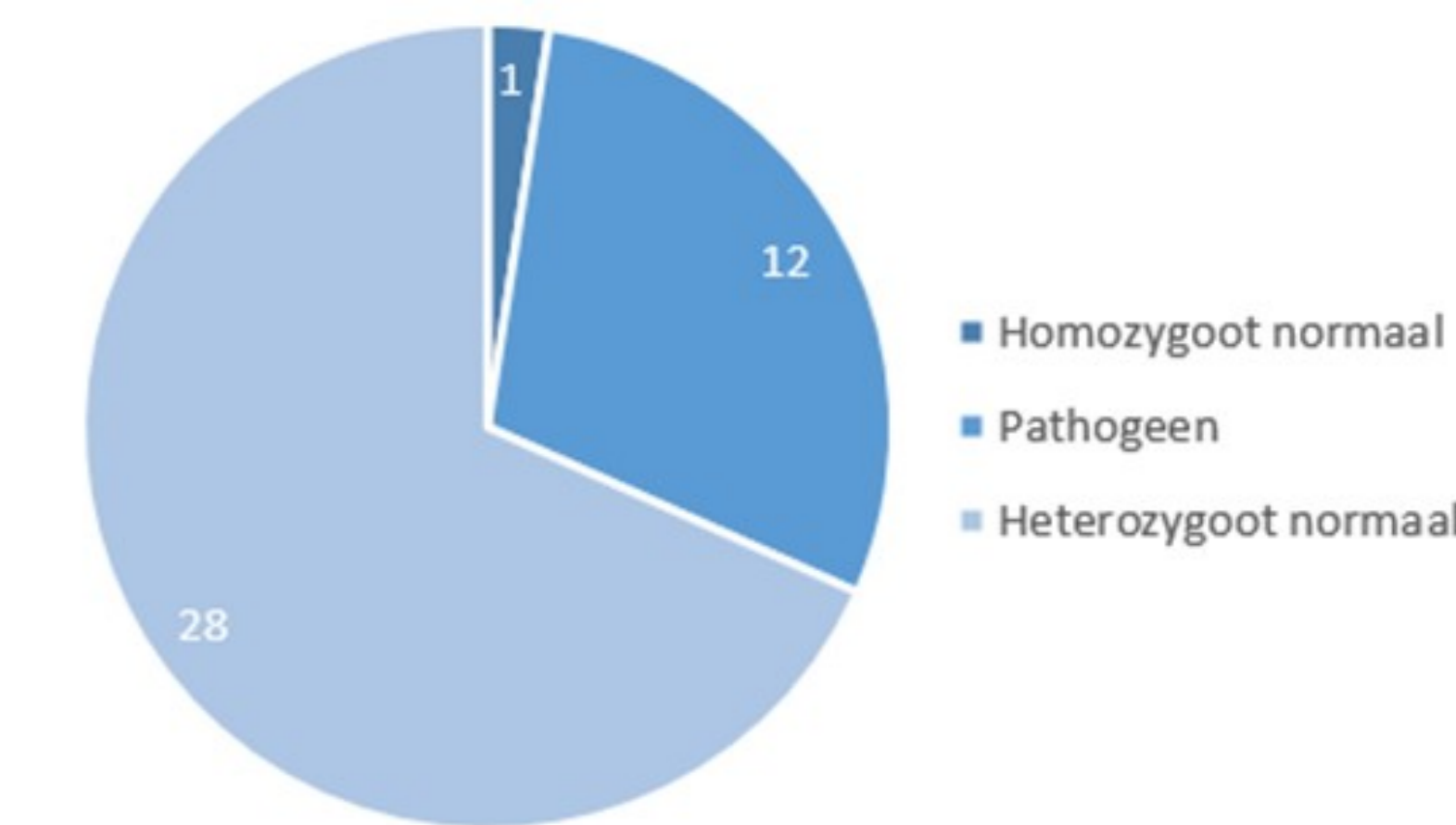
**Doel:** het introduceren van een diagnostische test, bestaande uit een combinatie van PCR en TP-PCR, voor de opsporing van GAA-FGF14 ataxie in het CME diagnostisch neurogenetica labo UZL.

## Resultaten

### Overzicht ABI resultaten



### Overzicht resultaten



### Validatie

- Herhaalbaarheid**
  - overeenstemming resultaten dezelfde methode en dezelfde omstandigheden
  - **Intra-run variatie** -> 1 positief staal + 1 negatief staal 3 keer in eenzelfde run
- Reproduceerbaarheid**
  - overeenstemming resultaten dezelfde methode en verschillende omstandigheden
  - **Inter-run variatie** -> 1 positief staal + 1 negatief staal in 3 verschillende runs
- Detectielimiet**
  - uiterste waarden die betrouwbaar gedetecteerd kunnen worden
  - **DNA concentratie** -> van 3 stalen een concentratie van 10ng-750ng meten
  - **Repeats** -> (GAA)<sub>7</sub>-(GAA)<sub>181</sub>, dit komt overeen met 181 basenparen-638 basenparen
- Robuustheid**
  - mate van ongevoeligheid van methode voor variaties in omstandigheden
  - **DNA extractie methode**
  - **Type PCR toestel**

## Methode

### Selectie

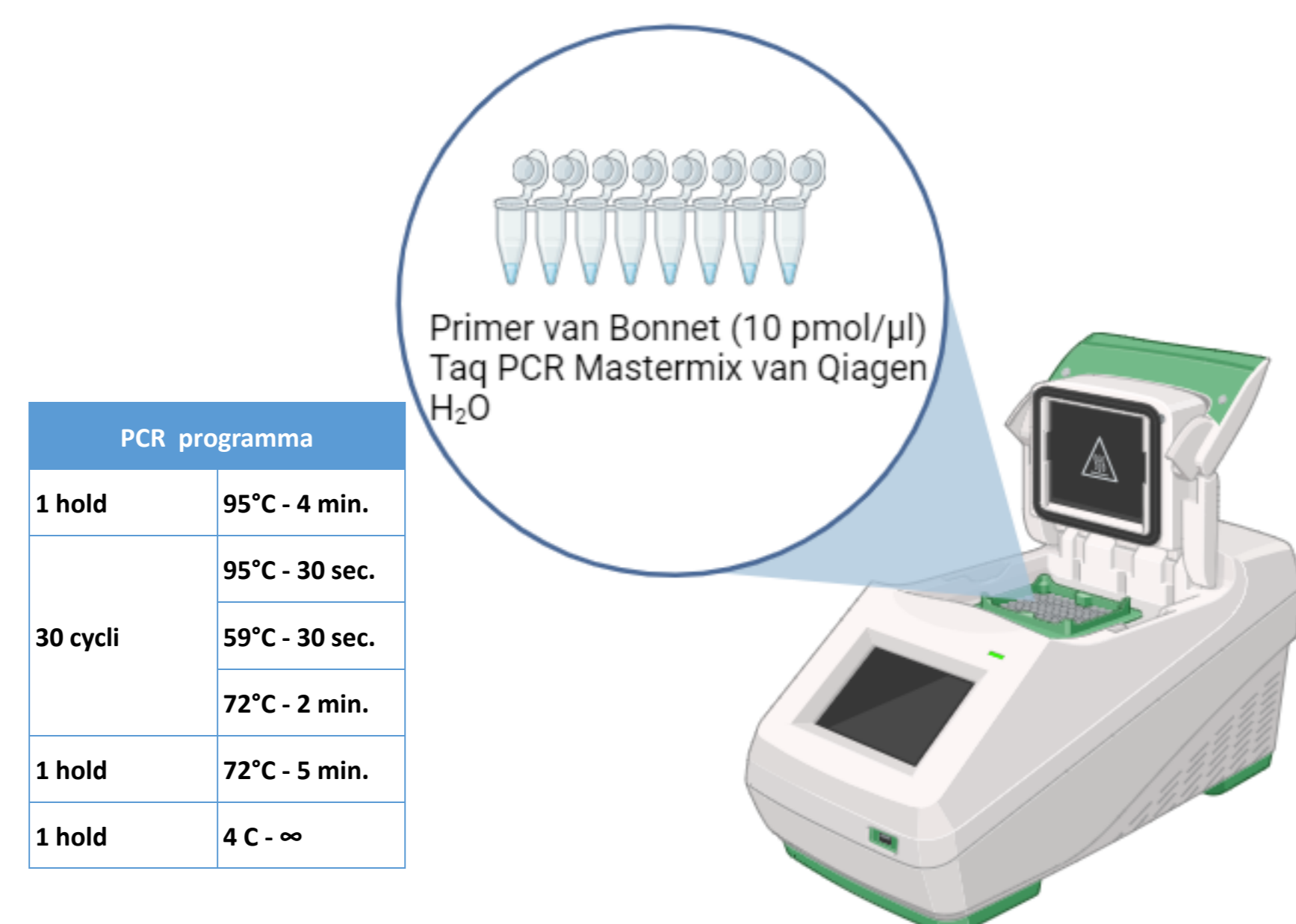
In totaal werden er 41 patiënten geselecteerd op basis van vier verschillende criteria:

- 10 patiënten hadden een specifieke aanvraag naar GAA-FGF14 ataxie;
- 20 patiënten testten negatief voor cerebellar ataxia with neuropathy and vestibular areflexion syndrome (CANVAS);
- 6 patiënten testten negatief voor een panel van SCA genen;
- en 5 patiënten testten negatief voor zowel CANVAS als het SCA-genpanel.

### Optimalisatie

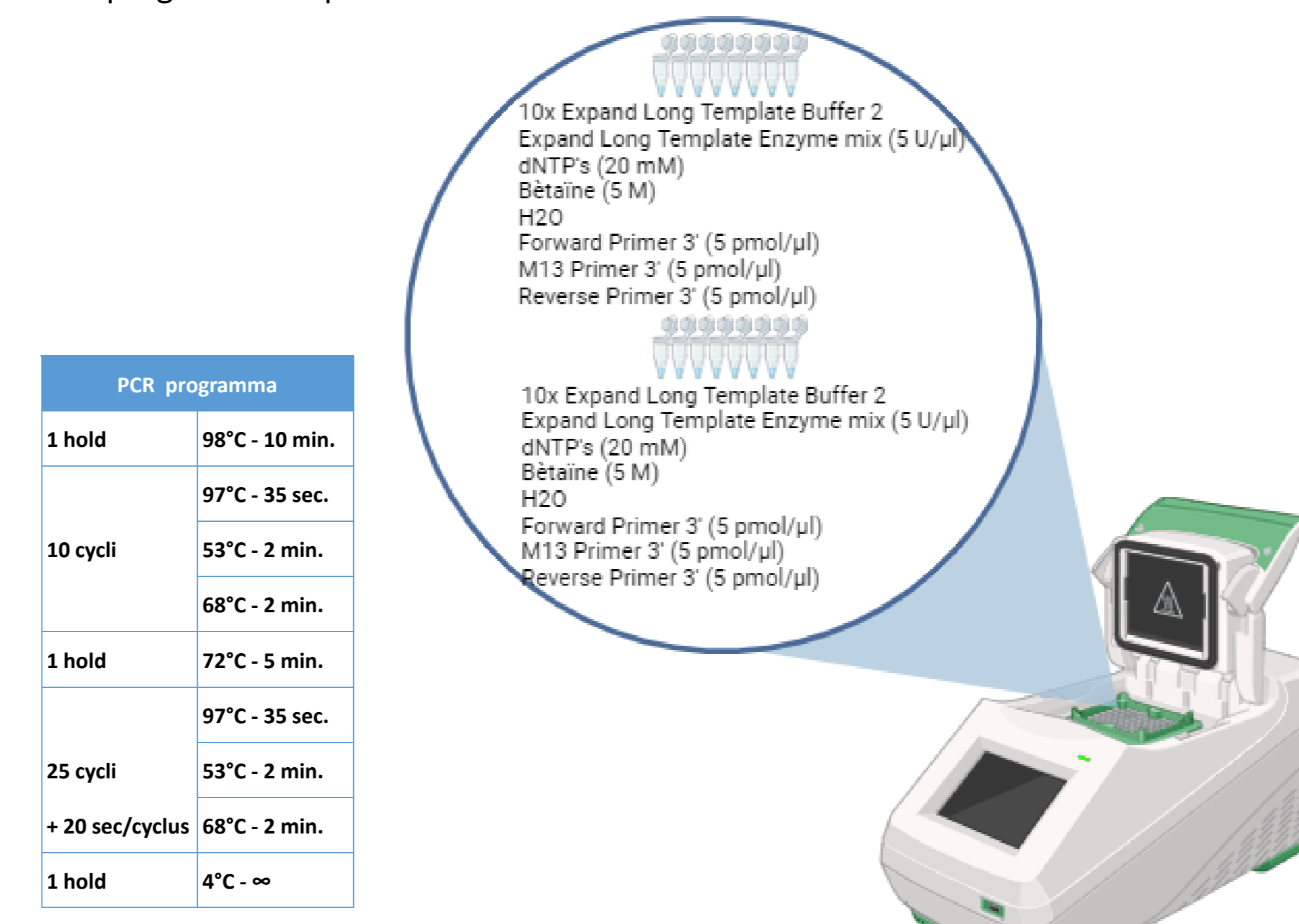
#### 1. PCR

In eerste instantie werden twee verschillende primers getest, namelijk deze van Bonnet *et al* en Rafehi *et al*. Voor het enzym werden zowel de enzymmix van Qiagen als die van Roche getest. Tot slot werden de PCR-condities op punt gesteld door het PCR-programma te bepalen.



#### 2. TP-PCR

Ook hier werden twee primers getest, ook deze van Bonnet *et al* (bidirectioneel) en Rafehi *et al* (unidirectioneel). Tot slot werd ook hier het PCR-programma bepaald.



## Conclusie

- De resultaten van dit onderzoek bevestigen dat deze methode werkt voor de opsporing van intronische GAA-repeats in het FGF14 gen.
- De validatie toonde een hoge mate van reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid + we hebben een detectielimiet vastgesteld en onze test is consistent ongeacht variaties PCR-toestel of extractiemethode.
- Daarnaast werd ontdekt dat bij hoge aantallen repeats soms een onderbreking optreedt, wat erop wijst dat er geen sprake is van een zuivere GAA-repeat expansie, maar dat er ook andere conformaties aanwezig zijn. De pathogeniteit van deze sequenties moet nog verder worden onderzocht. Dit onderzoek zal voortgezet worden na afloop van mijn stage.
- Deze studie leidt tot een verbeterde identificatie en behandeling van ataxiepatiënten.

## Dankwoord

Ik wil graag Valérie Race, Amélie Van Eesbeek en Steve Smekens bedanken. Jullie waren altijd bereid om mijn vragen te beantwoorden en stonden altijd voor me klaar wanneer ik dit nodig had. Jullie steun gedurende deze hele stage van 9 weken apprecieer ik enorm. Dankzij jullie begeleiding heb ik me altijd gesteund gevoeld en ik waardeer de tijd en moeite die jullie hebben gestoken in het begeleiden van mijn leerproces. De interessante opdracht waaraan ik mocht werken, heeft me enorm veel geleerd en mijn kennis en vaardigheden vergroot.

References:  
Albuquerque Created with BioRender.com  
S. Mouton, N. De, H. Yaguchi, et al. Complete run-length repeat sequencing of SCA27B (GAA-FGF14 ataxia) in humans. *Neural Neurogenetics*. 2024; 0: 1-8.  
C. Bonnet, O. Pflieger, V. Roth, et al. Optimized testing strategy for the diagnosis of GAA-FGF14 ataxia/spinocerebellar ataxia 27B. *Nature portfolio*. 2023; 13: 9737.  
H. Rafehi, J. Reed, D. J. Somtowicz, et al. An intronic GAA repeat expansion in FGF14 causes the autosomal dominant adult-onset ataxia SCA27B/ATX-FGF14. *The American Journal of Human Genetics*. 2021; 110: 105-119.

Alle stalen op het ABI instrument en enkel het PCR staal ook op het QIAxcel toestel

