

HAPLOTYPE-ANALISE VAN DIE FENIELALANIENHIDROKSILASE-LOKUS
IN
FAMILIES MET FENIELKETONURIE

IRMA MÖHR
B.Sc., B.Sc. Honns (Biochemie)

Verhandeling voorgelê as gedeeltelike
nakoming van die vereistes vir die
graad Magister Scientiae in Biochemie
in die Fakulteit Natuurwetenskappe van
die Potchefstroomse Universiteit vir
Christelike Hoër Onderwys.

Studieleier: Prof. dr. W.J. de Wet

Potchefstroom
Januarie 1989

690/0974

"Uit Hom en deur Hom
en tot Hom is alle dinge"

Romeine 11:36

Aan my ouers.

ABSTRACT

Haplotype analysis of the phenylalanine hydroxylase locus in families with phenylketonuria (Original title: Haplotipe-analise van die fenielalanienhidroksilase-lokus in families met fenielketonurie).

Cloning of a full-length human cDNA for phenylalanine hydroxylase (PAH) has led to major advances in the application of recombinant DNA techniques to the study of classical phenylketonuria (PKU), a common autosomal recessive inborn error of amino acid metabolism (Ledley et al, 1985b). In order to assess the possible application of RFLP analysis for the identification of carriers of the trait among South African Caucasians, the frequencies of eight restriction site polymorphisms in a panel of random Caucasians were determined using a human PAH cDNA clone (obtained from S.L.C. Woo). The frequencies of the minor alleles exceed 0,12 for all of the restriction endonucleases, confirming the existence of a very high degree of polymorphism at the human PAH locus. Moreover, in the panel of random Caucasian individuals, 35 out of 36 are RFLP heterozygotes, which yielded an observed heterozygosity of 97%. The data, therefore, suggest that a large percentage of South African Caucasian PKU families may be successfully analysed with RFLP haplotype analysis.

In all of the families thus far studied digestion by a battery of eight selected restriction endonucleases yielded RFLP patterns which were informative for either the detection of homozygotes for the defective PAH alleles or the identification of carriers of the PKU trait. Of particular interest is the finding that none of the observed eight haplotypes associated with defective PAH alleles show a predominant distribution. This may indicate that the various PKU alleles do not have a common origin, or that the PAH gene is especially prone to recombination events. In fact, we have observed a meiotic crossing-over event between two PAH alleles in a large family.

Various facets of my work have been presented at international and local scientific meetings:

Möhr, I., Marais, C.H., Op't Hof, J & de Wet W.J.

"Haplotype analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in families with phenylketonuric children"

XVI th International Congress of Genetics: Toronto Canada (August 1989).

Mienie, L.J., Ueckermann, J.H., Möhr, I., Marais, C.H., Op't Hof, J. & de Wet, W.J.

"Amino acid and haplotype analysis for the detection of phenylketonuria"
26th SSIEM Annual Symposium: Glasgow (September 1988).

Möhr, I., Kleynhans, E., Glynn, J., Op't Hof, J. & de Wet, W.J.

"Haplotype analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in families with phenylketonuric children"

The First Joint Congress of the South African Biochemical Society, the South African Genetics Society and the South African Society for Microbiology: Johannesburg (June 1986).

Möhr, I., Marais, C.H., Op't Hof, J. & de Wet, W.J. "Haplotype analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in families with phenylketonuric children"

Ninth Congress of the South African Biochemical Society: Wilderness (March 1988).

Ueckermann, J.H., Möhr, I., Marais, C.H., Mienie, L.J, Op't Hof, J. & de Wet, W.J.

"Amino acid and haplotype analysis are complementary techniques for the detection of carriers of the phenylketonuria trait"

Ninth Congress of the South African Biochemical Society: Wilderness (March 1988).

OPSOMMING

HAPLOTIPE-ANALISE VAN DIE FENIELALANIENHIDROKSILASE-LOKUS IN FAMILIES MET FENIELKETONURIE

Die klonering van 'n vollengte mens-cDNA teenoor fenielalanienhidroksilase (PAH) het tot grootskaalse vooruitgang van die toepassing van rekombinante DNA-tegnieke vir die bestudering van klassieke fenielketonurie (PKU), 'n algemene outosomaal resessiewe aangebore siektetoestand van aminosuurmetabolisme, gelei (Lidsky et al., 1985b). Om die moontlike toepassing van RFLP-analise vir die identifisering van draers van die PKU-eienskap in Suid-Afrikaanse Kaukasoïede vas te stel, is die frekwensie van agt polimorf-restriksiepunte in 'n paneel Kaukasoïede bepaal. Hiervoor is van 'n mens-PAHcDNA-kloon (ontvang van S.L.C. Woo) gebruik gemaak. Die frekwensies van die minder algemene alleles oorskry 0,12 vir al die restriksie-endonukleases, wat die bestaan van hoogs polimorf-restriksiepunte in die PAH-lokus bevestig. In die paneel Kaukasoïede is 35 van die 36 individue RFLP-heterosigote, wat 'n waargenome heterosigositeit van 97% gee. Die data veronderstel dus dat 'n groot persentasie Suid-Afrikaanse Kaukasoïede PKU-families met behulp van RFLP-analise suksesvol geanaliseer kan word.

In al die families wat bestudeer is, gee vertering met 'n battery van agt restriksie-endonukleases RFLP-patrone wat informatief is vir òf die deteksie van homosigote vir defektiewe PAH-alleles, òf die identifisering van draers van die PKU-eienskap. Van groot belang is die waarneming dat geen van die waargenome agt haplotipes wat met defektiewe PAH-alleles assosieer oorheersend voorkom nie. Dit mag aantoon dat die verskeie PKU-alleles nie 'n gemene ontstaan het nie, of dat die PAH-geen besonder vatbaar vir rekombinasiegebeure is. Trouens, daar is 'n meiotiese oorkruisingsgebeure tussen twee PAH-alleles in 'n groot familie waargeneem.

Resultate van hierdie studie is by internasionale en nasionale kongresse aangebied:

Möhr, I., Marais, C.H., Op't Hof, J & de Wet W.J.

"Haplotype analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in families with phenylketonuric children"

XVI th International Congress of Genetics: Toronto Canada (August 1989).

Mienie, L.J., Ueckermann, J.H., Möhr, I., Marais, C.H., Op't Hof, J. & de Wet, W.J.

"Amino acid and haplotype analysis for the detection of phenylketonuria"
26th SSIEM Annual Symposium: Glasgow (September 1988).

Möhr, I., Kleynhans, E., Glynn, J., Op't Hof, J. & de Wet, W.J.

"Haplotype analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in families with phenylketonuric children"

Die Eerste Gekombineerde Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemiese Vereniging, die Suid-Afrikaanse Genetiese Vereniging en die Suid-Afrikaanse Vereniging vir Mikrobiologie: Johannesburg (Junie 1986).

Möhr, I., Marais, C.H., Op't Hof, J. & de Wet, W.J. "Haplotype analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in families with phenylketonuric children"

Negende Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemiese Vereniging: Wil-dernis (Maart 1988)

Ueckermann, J.H., Möhr, I., Marais, C.H., Mienie, L.J, Op't Hof, J. & de Wet, W.J.

"Amino acid and haplotype analysis are complementary techniques for the detection of carriers of the phenylketonura trait"

Negende Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemiese Vereniging: Wil-dernis (Maart 1988).

INHOUDSOPGAWE

HOOFSTUK 1	1
INLEIDING	1
HOOFSTUK 2	3
LITERATUUROORSIG	3
2.1 FENIELKETONURIE EN AANVERWANTE SIEKTETOESTANDE	3
2.1.1 Inleiding	3
2.1.2 Defekte wat direk met PAH in verband staan	3
2.1.3 Ander aanverwante siektetoestande	10
2.1.4 Tipe X-hiperfenielalanienemie: Maternale PKU	13
2.2 GENETIESE-ANALISE VAN AANGEBORE SIEKTETOESTANDE	14
2.2.1 Indirekte analise van gemuteerde gene	14
2.2.2 Direkte analise van gemuteerde gene	19
2.3 KLONERING EN KARAKTERISTIEKE VAN DIE PAH-GEENSISTEEM	21
2.4 PROBLEEMSTELLING EN BENADERINGSWYSE	22
HOOFSTUK 3	25
RFLP's IN DIE PAH-LOKUS VAN SUID-AFRIKAANSE KAUKASOÏEDE	25
3.1 INLEIDING	25
3.2 RFLP-ANALISE: METODEDES EN MATERIALE	25
3.2.1 Inleiding	25
3.2.2 Isolering van genomiese DNA	26
3.2.3 Voorbereiding en radioaktiewe merking van die PAH-cDNA-peiler	26
3.2.4 Southern-analise	30
3.3 FREKWENSIE VAN RFLP's IN DIE PAH-LOKUS	31
3.4 SAMEVATTING	50
HOOFSTUK 4	51
HAPLOTIPE-ANALISE VAN SUID-AFRIKAANSE PKU-FAMILIES	51
4.1 INLEIDING	51
4.2 FAMILIE A	52

4.3	FAMILIE B	60
4.4	FAMILIE C	68
4.5	FAMILIE D	73
4.6	FAMILIE E	77
4.7	FAMILIE F	80
4.8	FAMILIE G	83
4.9	FAMILIE H	86
4.10	SAMEVATTING	102
HOOFSTUK 5		103
BESPREKING		103
5.1	SAMEVATTENDE DATA VAN HAPLOTIPE- EN AMINOSUURANALISE VAN DIE PKU-FAMILIES	103
5.2	HAPLOTIPEVERSPREIDING IN DIE PKU-FAMILIES	107
5.3	'N VOORBEELD VAN MEIOTIESE OORKRUISING	112
5.4	SLOTSOM	117
AFKORTINGSLYS		119
BIBLIOGRAFIE		121
BEDANKINGS		130

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Hiperfenielalanienemie word gekenmerk deur hoë fenielalanien-konsentrasies in die serum, terwyl die kliniese beeld kan wissel van verstandelike vertraging tot chroniese leweraandoenings. Onlangse gewens toon dat hierdie groep aangebore siektetoestande in ten minste 10 subtypes klassifiseerbaar is.

Die biochemiese basis van die verskillende subtypes wissel van die afwesige (Tipe I), verlaagde (Tipe II) of vertraagde (Tipe III) uitdrukking van fenielalanienhidroksilase; abnormale metabolisme van die kofaktore dihidrobiopterien (Tipe IV en V), asook defekte in die aktiwiteite van die volgende ensieme: 4-hidroksifenielpiruvaatoksidasie (Tipe VII), fumarielasetoasetaathidrolase en maleïelasetoasetaathidrolase (Tipe VIII) of sitoplasmiese tirosienaminotransferase (Tipe IX). Hiervolgens is die bekende aangebore toestand, fenielketonurie (PKU), as Tipe I-hiperfenielalanienemie klassifiseerbaar. Terselfdertyd was dit duidelik dat die fenielalanienhidroksilase-gekoppelde hiperfenielalanienemieë, Tipe I-III, heterogeen met betrekking tot die kliniese manifestasie en die omvang van die defek in die ensiemaktiwiteit is. Tot onlangs is die aangebore defekte in Tipe I-III op ensiemvlak bestudeer, terwyl die identifisering van hierdie toestande tot die kwantifisering van die fenielalanienmetaboliete, soos fenielpiruvaat, in urien- of plasmamonsters beperk was. Hierdeur is die identifisering van vry algemene toestande, soos PKU, beperk tot die postnatale fase, terwyl prenatale diagnose nie moontlik was nie. cDNA-klone teenoor mens fenielalanienhidroksilase-mRNA is onlangs geïsoleer en gekarakteriseer (Woo et al., 1983; Lidsky et al., 1985b; Kwok et al., 1985). Na hierdie deurbraak, is dit moontlik om die aangebore fenielalanienhidroksilase-gekoppelde toestande met behulp van geenanalise te ondersoek.

Sedert 1978 is restriksiefragmentpolimorfismes (RFLP's - restriction fragment length polymorphisms) benut vir die onderskeid tussen normale en mutante mensglobiengene en toegepas vir prenatale diagnose deur middel van haplotipe-analise (Kan en Dozy, 1978b; Kazazian et al., 1984;

Orkin et al., 1982). Deur die gebruik van die vollengte mensfenielalanienhidroksilase-cDNA-kloon (PAH-cDNA-kloon) as die hibridiseringspeiler, is 'n totaal van agt RFLP's in die mens-PAH-lokus bepaal om met 'n besondere hoë frekwensie voor te kom (Woo et al., 1983; Lidsky et al., 1985c). Met die toepassing van RFLP-analise om die oorerwing van die PAH-gene in PKU-families na te gaan, is getoon dat daar 'n ooreenstemming in skeiding tussen die RFLP-haplotipe van die PAH-lokus en die PKU-eienskap in die onderskeie PKU-families bestaan (Woo et al., 1983; Daiger et al., 1986). Hierdie waarnemings het draerdiagnose van PKU moontlik gemaak. Die doel van hierdie studie was dan ook om draers van die PKU-eienskap in Suid-Afrika te identifiseer. Aangesien haplotipe-analise berus op die benutting van RFLP-patrone, was dit noodsaaklik om eers die frekwensie van die RFLP's in die Suid-Afrikaanse Kaukasoïede populasie te bepaal (Hoofstuk 3). Vervolgens is haplotipe-analise op 'n aantal Suid-Afrikaanse Kaukasoïede PKU-families uitgevoer ter identifisering van draers van die PKU-eienskap (Hoofstuk 4). Die betekenis en verklaring van die resultate word in Hoofstuk 5 bespreek.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

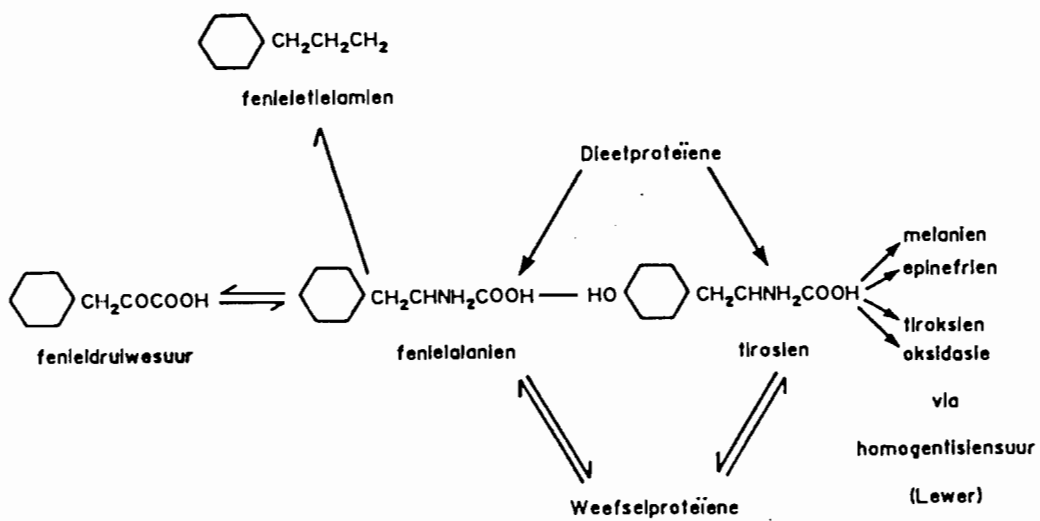
2.1 FENIELKETONURIE EN AANVERWANTE SIEKTETOESTANDE

2.1.1 Inleiding

Fenielalanien is 'n essensiële aminosuur vir proteïensintese. Die belangrikste kataboliese weg van fenielalanien is deur hidrosilering na tirosien (Moss et al., 1940). Tirosien word nie slegs vir proteïensintese gebruik nie, maar word ook in 'n kataboliese proses omgeskakel na lewensbelangrike verbindings soos melanien, epinefrien, tiroksien en homogentisiensuur (Figuur 2.1). Hiperfenielalanienemieë is 'n groep aangebore defekte in die metabolisme van fenielalanien wat die gemeenskaplike eienskap van verlaagde fenielalanienoksidase met gevolglike verhoogde fenielalanienvlakke in die weefsel en serum, deel. Die primêre ensiemdefek kan die gevolg wees van die afwesigheid of onaktiwiteit van fenielalanienhidrosilase (PAH), dihidropterienreduktase of dihidrobiopteriensintetase (Tourian & Sidbury, 1983). Die klassifikasie van die tien onderskeie hiperfenielalanienemieë word in Tabel 2.1 saamgevat.

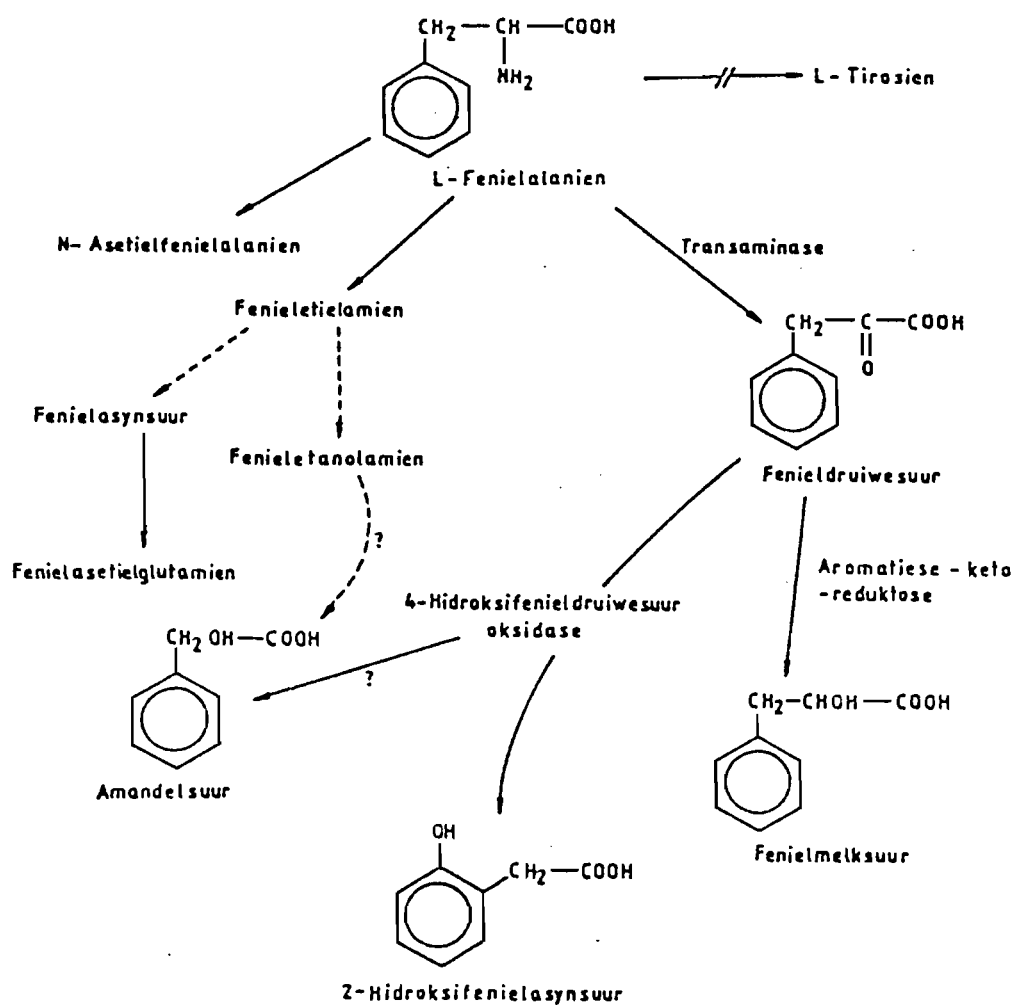
2.1.2 Defekte wat direk met PAH in verband staan

Die oorsaak van Tipe I-hiperfenielalanienemie is die afwesigheid of onaktiwiteit van PAH (Jervis, 1953; Kaufman, 1976). Die minimum fenielalanienvlakke in die serum is $0,12 \mu\text{mol}/\text{m}\ell$, terwyl normale fenielalanienvlakke tussen $0,037$ en $0,061 \mu\text{mol}/\text{m}\ell$ wissel. Tirosienvlakke in die serum kan normaal ($0,04$ - $0,08 \mu\text{mol}/\text{m}\ell$) of verlaag wees (Tabel 2.1). Die blokkering van die hoofkataboliese weg van fenielalanien veroorsaak dat verskeie alternatiewe metaboliese weë in werking gestel word (Figuur 2.2).



FIGUUR 2.1 DIE METABOLISME VAN FENIELALANIEN EN TIROSIEN
(Tourian & Sidbury, 1983)

Tipe	Toestand	Kliniese aspekte	Defek	Bloed-PHE	Bloed-TYR	Urine	Behandeling
		Normaal ¹	-	0,037-0,06 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	0,04,0,08 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	-	-
I	Fenielketonurie	Verstandelike vertraging en verwante simptome indien nie behandel nie	PAH afwesig	0,12 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	Normaal-laag	Verhoging van Phe-metaboliëte	Lae phe-dieet
II	Konstante hiperfenielalanienemie	Normaal, ernstiger gevalle mag verstandelik vertraag wees indien nie behandel nie	Verlaagde uitdrukking van PAH	Aanvanklik dieselfde as PKU; later 0,024-0,12 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ op gewone dieet	Normaal-laag	Normaal of verhoogde phe-metaboliëte	Geen of tydelike dieetbehandeling
III	Oorganklike hiperfenielalanienemie	Normaal	Vertraagde uitdrukking van PAH	Aanvanklik dieselfde as PKU; progressiewe vermindering na normaal	Normaal-laag	Dieselfde as tipe II	Dieselfde as tipe II
IV	Dihidropteridienreduktase defek	Aanvanklik normaal; siekte aanvalle, abnormale ontwikkeling merkbaar gedurende eerste levensjaar	Defekte of afwesigheid van dihidropteridienreduktase	Veranderlik - kan moontlik dieselfde as tipe I wees	Normaal	Veranderlik; afhanklik van ouderdom en phe-konsentrasie in bloed	Dopa, 5-hidroksitriptofaan, karbidopa
V	Abnormale dihidrobiopterien funksie	Skokspiersametrekking, ongekontroleerde bewegings, olierige vel	Defekte sintese van dihidrobiopterien	Kan 0,12 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ wees	Normaal	Abnormale biopterien metaboliëte	Dopa, 5-hidroksitriptofaan, karbidopa
VI	Neonatale hiperfenielalanienemie en tirosienemie	Verlaagde motoriese aktiwiteit, geelsug	Defekte 4-hidroksifenielpiruvaatoksidasie	0,024-0,073 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	0,028-0,28 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	Metaboliëte van tirosien	Lae tirosieninnam
VII	Oorgangs tirosienemie	Normaal	Onderontwikkelde lewerensiem	-	Verhoog	Verhoogde tirosien	Vitamiën C
VIII	Tirosienemie Tipe I	Vertraagde groei, vomering, diarree	Fumarielasetoasetaahtidrolase en maleielasetoasetaat-hidrolase defek	0,012-0,048 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	0,022 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	Fumariel asetoasetaat, malielasetoasetaat, 4-hidroksifenieldruivesuur, 4-hidroksifenielaktaat	Lae tirosien, fenielalanien, metionien
IX	Tirosienemie Tipe II	Oogletsels, velletsels, verstandelike vertraging	Tirosienamino-transferase is defek	0,012-0,048 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	0,022 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	N-asetieltirosien, 4-tiriamien, 4-hidroksifenieldruivesuur, 4-hidroksifenielaktaat	Lae tirosien en fenielalanien
X	Maternale PKU	Dieselfde as by Tipe I	Fenielalanien transport oor plasenta	0,097 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	-	Verhoging van phe-metaboliëte	Moeder - lae phe-dieet



FIGUUR 2.2 DIE METABOLIESE WEË BETROKKE BY FENIELKETONURIE (Aangepas uit Koch et al., 1974).

Organiesesure wat in die urine van PKU-pasiënte uitgeskei word, is (Tabel 2.2): fenielasynsuur (46 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), fenielpropioonsuur (0,05-0,63 mg/24 h), 2-feniel-1,2-etaandiol (48 \pm 35 $\mu\text{g}/24$ h), amandelsuur (19 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), 2-hidroksifenielasynsuur (65 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), feniellaktaat (531 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), 4-hidroksifenielasynsuur (60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), fenieldruiwesuur (371 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), 4-hidroksi-3-metoksifenielasynsuur (8,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), 4-hidroksi-3-metoksi-amandelsuur (29 \pm 7 mg/24 h), 4-hidroksi-amandelsuur (8,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), 4-hidroksifeniellaktaat (21 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien) en 4-hidroksifenielpiruviensuur (39 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien).

Die belangrikste kliniese eienskap wat by onbehandelde PKU-pasiënte voorkom, is ernstige verstandelike gestremdheid. In die eerste lewensjaar daal die pasiënt se intelligensiekwosiënt met 50 punte (Koch et al., 1974). Verdere kliniese simptome wat op PKU dui, is 'n afname in die pigmentering van die vel, hare en oë, ekseem, onvermoë om te kan loop en te kan praat, hiperaktiwiteit, aggressiewe gedrag, mikrocefalie, 'n prominente maksilla, dekalsifisering van langbene, spierhipertonisiteit, vertraagde psigometriese ontwikkeling en 'n afname in groeisnelheid (Koch, 1974; Tourian & Sidbury, 1983). Vroeë postnatale behandeling kan die normale homeostase van fenielalanienmetabolisme herstel en die kliniese simptome verlig. Aangesien die kliniese simptome 'n direkte of indirekte gevolg van verhoogde fenielalanienvlakke is, word pasiënte met 'n beperkte fenielalaniendieet behandel (Armstrong & Tyler, 1955). Die verstandelike ontwikkeling van pasiënte met PKU is afhanklik van die ouderdom waarop daar met dieetbehandeling begin is (Koch et al., 1974; Shear et al., 1974). Daar is gevind dat die intelligensiekwosiënt laer is in laat behandelde en onbehandelde pasiënte, alhoewel uitsonderings wel voorkom waar klassieke PKU-pasiënte nie verstandelike gestremdheid toon nie (Hsia, 1970). Vir die effektiewe behandeling van PKU, behoort daar met dieetbehandeling binne twee maande na geboorte begin te word (Scriver en Clow, 1980). Aangesien te lae fenielalanienvlakke geassosieer word met 'n verlies in liggaamsmassa asook vertraagde groei (Knox, 1972), moet die konsentrasie van die aminosuur binne noue perke gereguleer word. Die voorgestelde konsentrasie serumfenielalanien wissel van 3 tot 10 mg/ml (Koch et al., 1974). Daar bestaan nog geen uitsluitel omtrent die ouderdom waarop

TABEL 2.2 NORMAALKONSENTRASIES EN KONSENTRASIES VAN DIE METABOLIE TE WAT BETROKKE IS BY FENIELKETONURIE

Verbinding	Normaal	Tipe I	Tipe II
1 Fenielasynsuur	kreat 0,1 µg/mg	46 µg/mg kreat	NBN
2 Suksiensuur	2-12 µg/24h		
3 Feniellpropioonsuur	0,01-0,21 mg/24h	0,05-0,63 mg/24h	
4 1-Feniell-1,2-etaandiol	42 ± 37 µg/24h	48 ± 35 µg/24h	
5 Amandelsuur	1,1 µg/mg kreat	19 µg/mg kreat	1-4,2 µg/mg kreat
6 2-hidroksifeniellasyne= suur	1,3 µg/mg kreat	65 µg/mg kreat	1-2,2 µg/mg kreat
7 Feniellaktaat	1,8 µg/mg kreat	531 µg/mg kreat	1-3,4 µg/mg kreat
8 4-hidroksifeniellasyne= suur	60 µg/mg kreat	60 µg/mg kreat	36-51 µg/mg kreat
9 Feniell druwesuur	0,3 µg/mg kreat	371 µg/mg kreat	NBN
10 4-hidroksi-3-metoksi-feniellasyne= suur	17 µg/mg kreat	8,2 µg/mg kreat	5,9-12 µg/mg kreat
11 4-hidroksi-amandelsuur		29 ± 7 mg/24h	
12 Hippuursuur	1000-2500 mg/24h		
13 4-hidroksi-3-metoksi-amandelsuur	8,9 µg/mg kreat	8,0 µg/mg kreat	7,4-22 µg/mg kreat
14 4-hidroksifeniellak= taat	24 µg/mg kreat	21 µg/mg kreat	1,1-14 µg/mg kreat
15 4-hidroksifeniell= piruviensuur	15 µg/mg kreat	39 µg/mg kreat	
16 5-hidroksi-3-indool= asynsuur	187 ± 64 µg/ml kreat		1,5-7,4 µg/mg kreat
17 Feniell etielamien	6,8 ± 2,9 µg/24h	93 ± 43 µg/a kreat	
18 Konjugate (Feniell= asetielglutamien)	250-500 mg/24h	53 mg/100 ml	

Tabel saamgestel na aanleiding van Kruger (1985)

dieetbehandeling getermineer behoort te word nie, aangesien die effek van dieetterminering individueel varieer. Volgens Holtzmann *et al.* (1986) behoort dieetbehandeling nie voor die ouderdom van agt jaar getermineer te word nie. 'n Verdere verlenging van dieetbehandeling word voorgestaan deur Koch *et al.* (1987) en Schmidt *et al.* (1987) as gevolg van die voorkoms van verstandelike gestremdheid in die kinders van onbehandelde PKU-moeders (Afdeling 2.1.4). Om die negatiewe effek van die hoë fenielalanienkonsentrasie op die fetus te beperk, behoort vroulike PKU-pasiënte onder dieetbehandeling te wees tot na die reprodktiewe tydperk, veral aangesien gevind is dat pasiënte 'n lae fenielalaniendieet moeilik hervat na dat dit reeds gestaak is (Michals *et al.*, 1985).

PAH-afwesigheid, onafhanklik van die fenotipiese variasies, word oorgeërf as 'n outosomaal resessiewe eienskap (Jervis, 1953). Die saamgestelde voorkomingsfrekwensie van PKU in agt Wes-Europese lande en Amerika is ongeveer 1:10 000 (Tourian & Sidbury, 1983).

Tipe II-hiperfenielalanienemie word veroorsaak deur 'n verminderde hoeveelheid of 'n verlaging van die aktiwiteit van PAH. Die fenielalanienvlakke in die serum wissel van 0,024 tot 0,12 $\mu\text{mol}/\text{m}\ell$, terwyl die tirosienvlakke normaal tot verlaag kan wees (Tabel 2.1). Die volgende organiesesure word in die urine uitgeskei (Tabel 2.2): fenielasynsuur, amandelsuur (1-4,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), 2-hidroksifenielasynsuur (1-2,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), fenielaktaat (1-3,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), 4-hidroksifenielasynsuur (36-51 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), fenieldruiwesuur, 4-hidroksi-3-metoksi-fenielasynsuur (5,9-12 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), 4-hidroksi-3-metoksi-amandelsuur (7,4-22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien), 4-hidroksifenielaktaat (1,1-14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien) en 5-hidroksi-3-idoolasynsuur (1,5-7,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ kreatinien). Oor die algemeen vertoon pasiënte 'n normale kliniese beeld. In ernstige gevalle mag verstandelike gestremdheid wel voorkom. Die aktiwiteit van PAH wissel van 1,5% tot 34,5% van die normale aktiwiteit (Tourian & Sidbury, 1983). Aangesien hierdie siektetoestand in sommige gevalle moeilik van PKU onderskei kan word, behoort 'n fenielalanientoleransietoets asook die kliniese beeld, gebruik te word as 'n basis vir klassifikasie (Güttler, 1980). Normaalweg is geen behan-

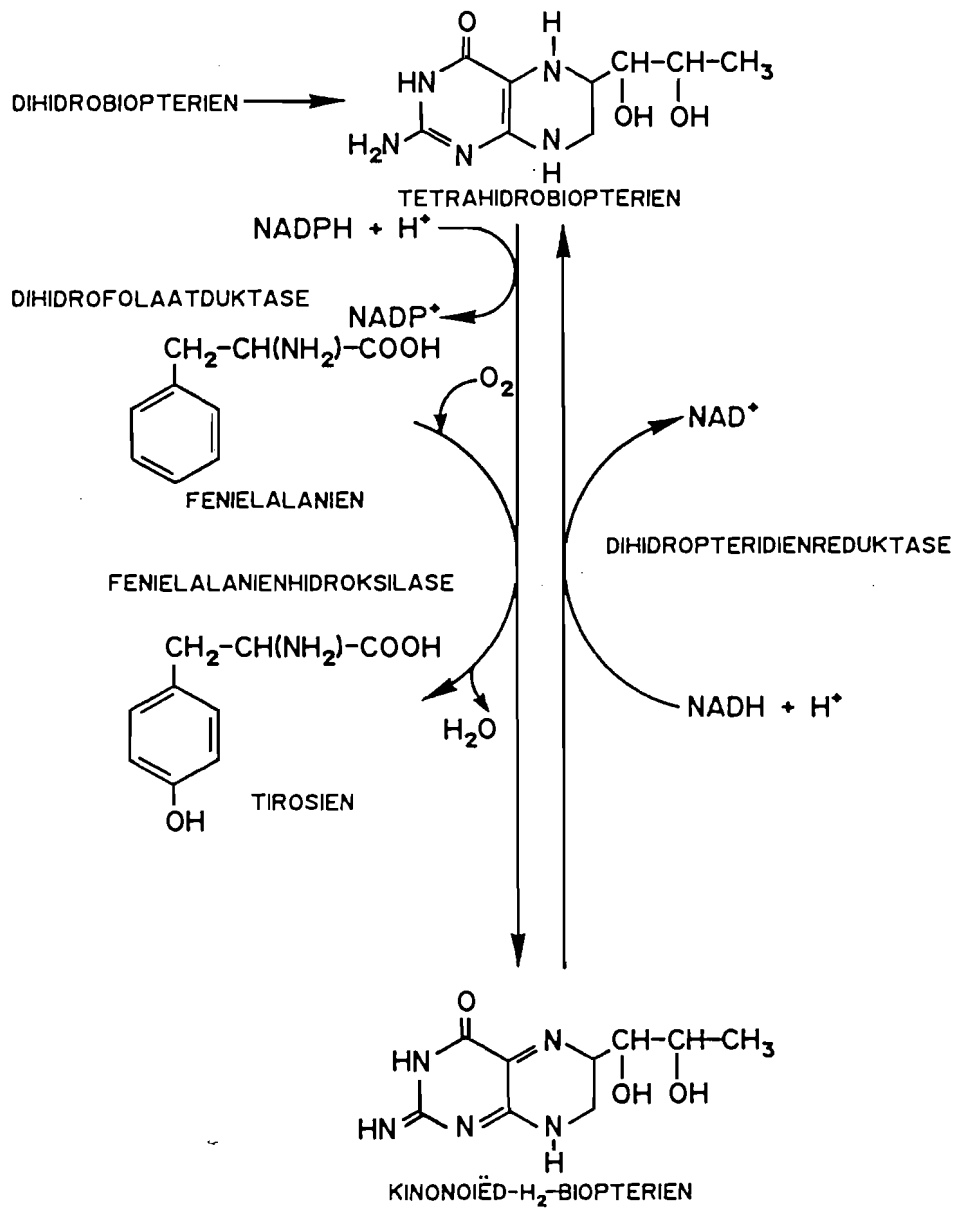
deling nodig nie. Ernstige gevalle van Tipe II-hiperfenielalanienemie behoort wel 'n beperkte fenielalaniendiët te volg.

Tipe III-hiperfenielalanienemie word van Tipe II-hiperfenielalanienemie onderskei deur die verskil in die oorsaak wat die toestand tot gevolg het. Tipe III-hiperfenielalanienemie word veroorsaak deur vertraagde uitdrukking van PAH, soos meestal by vroeggebore babas aangetref word. Die fenielalanienvlakke in die serum is aanvanklik soos vir PKU, maar normaliseer later. Dieselfde geld vir die tirosienvlakke in die serum (Tabel 2.1). Die metaboliete wat in die urine uitgeskei word, is dieselfde as dié waargeneem vir Tipe II-hiperfenielalanienemie. Hierdie pasiënte vertoon 'n normale kliniese beeld en 'n lae fenielalaniendiët kan toegepas word totdat die biochemiese parameters normaliseer.

2.1.3 Ander aanverwante siektetoestande

Tipe IV-hiperfenielalanienemie is die gevolg van 'n dihidropteridienreduktasedefek (Kaufman et al., 1978). Hierdie ensiem kataliseer die reduksie van kinonoïed- H_2 biopterien na tetrabiopterien (Figuur 2.3) en fenielalanien word derhalwe nie gehidroksileer wanneer dihidropteridienreduktase defek of afwesig is nie (Scriver & Clow, 1980). Die fenielalanienvlakke in die serum is veranderlik en kan in sommige gevalle dieselfde as PKU wees. Die tirosienvlakke in die serum is normaal (Tabel 2.1). Die organiesesure wat in die urine uitgeskei word, is ook veranderlik en afhanklik van die ouderdom van die pasiënt en die fenielalanienvlakke. Die kliniese simptome is aanvanklik normaal, maar gedurende die eerste lewensjaar is abnormale ontwikkeling merkbaar en siekte-aanvalle kom ook voor. Pasiënte kan behandel word met Dopa, 5-hidroksitriptofaan en karbidopa.

Tipe V-hiperfenielalanienemie kan veroorsaak word deur defekte van verskeie ensieme wat betrokke is in die sintese van tetrahydrobiopterien (Figuur 2.3). Die ensiem wat in die eerste stap die biosintese van tetrahydrobiopterien kataliseer, naamlik GTP-siklohidrolase, kan defek wees (Niederweiser et al., 1984). Hierdie toestand kan ook die gevolg wees van 'n defek in dihidrobiopteriensintetase (Kaufman et al., 1978). Bogenoemde defek veroorsaak indirek dat tirosien nie gevorm word nie.



FIGUUR 2.3 FENIELALANIENHIDROKSILASIE
(Aangepas uit Scriver & Clow, 1980)

Die fenielalanienvlakke in die serum kan tot 0,12 $\mu\text{mol}/\text{m}\ell$ wees. Die tirosienvlakke in die serum is normaal (0,04-0,08 $\mu\text{mol}/\text{m}\ell$). Abnormale biopterienmetaboliete word in die urine uitgeskei. Kliniese simptome wat voorkom, is skokspiersametrekking, ongekontroleerde bewegings, olierige vel, herhaaldelike hipertermie en tetraplegia (Tourian & Sidbury, 1983). Die pasiënte kan behandel word met Dopa, 5-hidroksitriptofaan en karbidopa.

Die ensiem 4-hidroksifenieldruiwesuuksidase kataliseer die reaksie tussen 4-hidroksifenieldruiwesuur en homogentisiensuur. In Tipe VI-hiperfenielalanienemie is bogenoemde ensiem defektief, wat verhoogde fenielalanien- en tirosienvlakke in die serum tot gevolg het (La Du & Gjessing, 1978; Tourian & Sidbury, 1983). Fenieletielamien, amandelsuur en 4-hidroksi-amandelsuur word in die urine uitgeskei. Pasiënte vertoon vertraagde motoriese aktiwiteit en geelsug (Goldsmith, 1983) en word met 'n beperkte tirosiendieet behandel.

Tipe VII-hiperfenielalanienemie is die gevolg van onderontwikkelde lewerensieme en word geassosieer met pasgebore babas (Goldsmith, 1983). Verhoogde tirosienvlakke word in die serum waargeneem en tirosienmetaboliete is in die urine waarneembaar. Die kliniese beeld van hierdie pasiënte is normaal en die biochemiese parameters normaliseer na 'n paar weke. Vitamien C kan aangewend word vir die behandeling van hierdie siektetoestand (Tourian & Sidbury, 1983).

Tipe VIII-hiperfenielalanienemie is waarskynlik die gevolg van 'n tekort aan fumarielasetoasetaat, met verlaagde maleïelasetoasetaat. Fenielalanien- en tirosienvlakke in die serum is verhoog. Fumarielasetoasetaat, maleïelasetoasetaat, 4-hidroksifenieldruiwesuur en 4-hidroksifenieellaktaat word in die urine uitgeskei. Die akute vorm word met nierversaking, vertraagde groei, vomering, diarree, koors en 'n koolagtige reuk geassosieer. Die pasiënte sterf gewoonlik na ses tot agt maande. In die chroniese vorm is dieselfde kliniese eienskappe waarneembaar, maar in 'n minder ernstige graad. Hierdie pasiënte sterf gewoonlik binne die eerste tien jaar (Goldsmith, 1983). Pasiënte word met 'n beperkte tirosien- en fenielalaniendieet en metionien behandel.

'n Verlaagde of afwesige aktiwiteit van tirosienaminotransferase veroorsaak Tipe IX-hiperfenielalanienemie. Die fenielalanienvlakke in die serum is normaal, terwyl die tirosienvlakke verhoog is. In die urine is 4-hidroksifeniieldruiwesuur, 4-hidroksifeniellaktaat, n-asetieltirosien en 4-tiramien waarneembaar. Oog- en velletsels is waarneembaar en verstandelike vertraging kan by sommige individue voorkom (Goldsmith, 1983). 'n Beperkte fenielalanien- en tirosiendieet word vir behandeling aangewend.

2.1.4 Tipe X-hiperfenielalanienemie: Maternale PKU

Die meeste kinders van onbehandelde moeders met PKU vertoon verstandelike gestremdheid en ander kliniese simptome van PKU, alhoewel die kinders nie PKU het nie (Tourian & Sidbury, 1983). Volgens Hsia (1970) is die kliniese beeld van die kinders die gevolg van twee veranderlikes, naamlik vertraagde groei van die fetale brein en die effek van hoë konsentrasies fenielalanien of fenielalanienmetaboliete op die brein. Dit blyk dat indien die konsentrasie van fenielalanien van die moeder 'n kritiese hoë vlak oorskry, transport van fenielalanien deur die plasenta plaasvind. Die normale groei van die fetus word versteur, met gevolglike vertraagde groei, mikrocefalie en verstandelike gestremdheid. Fetale breinbeskadiging is dus 'n funksie van die moeder se fenielalanienvlakke in die bloed (Tourian & Sidbury, 1983). Hierdie kliniese simptome kan verhoed word deur behandeling van die moeder met 'n beperkte fenielalaniendieet.

Dit is duidelik dat die PAH-gekoppelde hiperfenielalanienemieë, Tipe I-III, heterogeen met betrekking tot die kliniese manifestasie en die omvang van die defek in die ensiemaktiwiteit is. Tot onlangs is die aangebore defekte in Tipe I-III op ensiemvlak bestudeer, terwyl die identifisering van hierdie toestande tot die kwantifisering van fenielalanien, tirosien en fenielalanienmetaboliete in plasma- of urienmonsters beperk was. Aangesien PAH lewerspesifiek is en nie in serum of fibroblaste teenwoordig is nie, is die identifisering van vry algemene toestande, soos PKU, beperk tot die postnatale fase, terwyl prenatale diagnose deur ensiemanalise van amnionselle nie moontlik is nie.

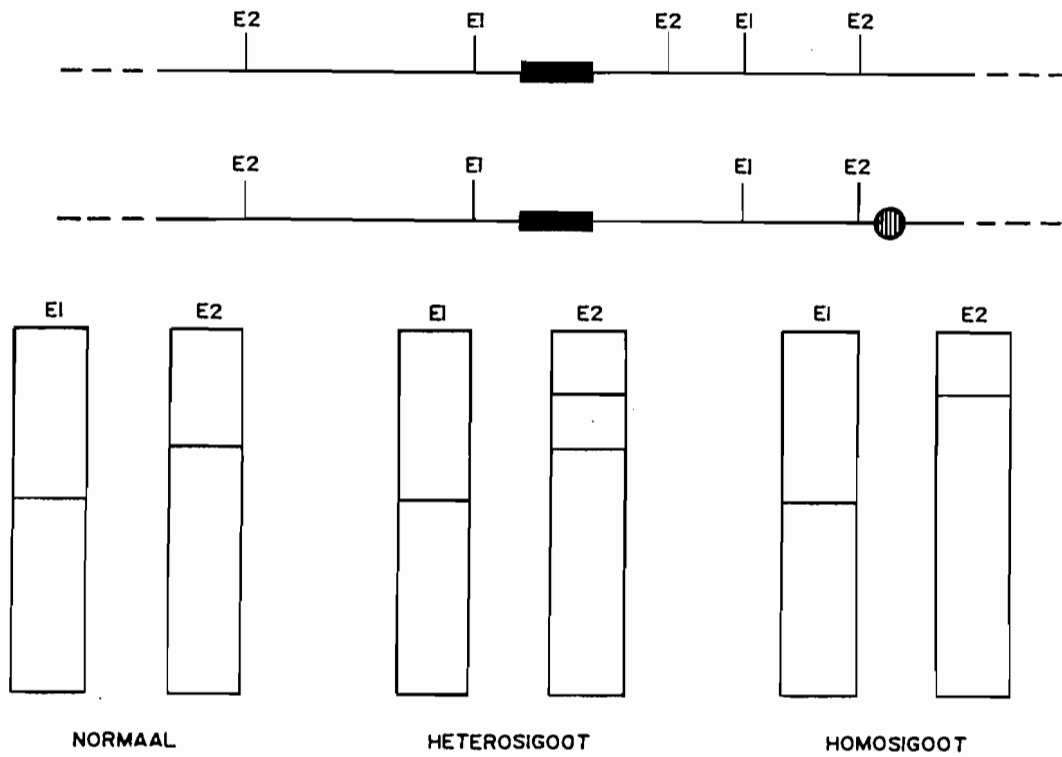
2.2 GENETIESE-ANALISE VAN AANGEBORE SIEKTETOESTANDE

2.2.1 Indirekte analise van gemuteerde gene

Na die aanvanklike waarneming deur Kan en Dozy (1978a) dat daar 'n Hpa I polimorfe-restriksiepunt in die 3'-aangrensende gebied van die β -globiengene is wat aangewend kan word vir die diagnose van sekelselanemie, is restriksiefragmentpolimorfismes en ooreenstemmende haplotipes tot 'n metode vir die analise van genetiese siektetoestande ontwikkel. Ter illustrering van hierdie indirekte analise van gemuteerde gene word 'n skematiese voorstelling van 'n paar homoloë chromosome met herkenningspunte vir twee ensieme, naamlik E1 en E2, naby 'n defektiewe lokus in Figuur 2.4 weergegee (Davies, 1981). Waar twee normale chromosome voorkom, sal een E1-fragment en een E2-fragment waargeneem word. Indien die een chromosoom 'n gevarieerde volgorde bevat sodat 'n herkenningspunt vir E2 verwyder word, sal een E1-fragment en twee E2-fragmente waargeneem word vir heterosigote ten opsigte van die normale en die gemuteerde chromosoom. Vir homosigote ten opsigte van die gemuteerde chromosoom, word een E1-fragment én een E2-fragment waargeneem. Die grootte van die E2-fragment verskil egter van dié waargeneem vir die normale genotipe. E2 is gevolglik polimorfies ten opsigte van genoemde defektiewe lokus.

Soortgelyk is 'n aantal restriksie-endonukleases gevind om polimorfepatrone in die PAH-lokus op te wek, sodat tien polimorfe-restriksiepunte in die PAH-lokus identifiseerbaar was (Woo et al., 1983; Lidsky et al., 1985c). Die aard van die bekende polimorfe-restriksiepunte in die PAH-lokus word vervolgens kortliks saamgevat:

- Met die restriksie-ensiem Msp I, is twee polimorfe-restriksiepunte waargeneem. Restriksiepunt Msp Ia vertoon fragmente van 23 Kb of 19 Kb. Vir restriksiepunt Msp Ib word fragmente van 4 Kb of 2,2 Kb en 1,8 Kb waargeneem.
- Die bestaan van 'n twee-alleliese sisteem is met behulp van Sph I geïdentifiseer, met polimorfe-restriksiefragmente van 9,7 Kb en 7,0 Kb.



FIGUUR 2.4 SOUTHERN-ANALISE VIR DIE WAARNEMING VAN 'N RESTRIKSIEFRAGMENTPOLIMORFISME

- - defekte lokus
 - - enkelkopie DNA-peiler
 - E1 & E2 - restriksie-endonukleases
- (Davies, 1981)

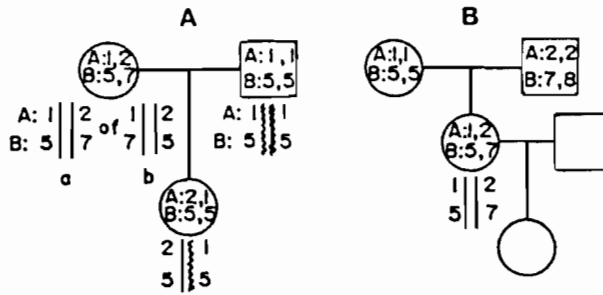
- Restriksie-ensiem Hind III vertoon drie polimorfe-fragmente van 4,4 Kb, 4,2 Kb en 4,0 Kb.
- Twee polimorfe-restriksiefragmente van 30 Kb en 25 Kb word waargeneem na vertering van genomiese DNA met EcoR V.
- Met EcoR I word òf 17 Kb-fragmente òf 11 Kb-fragmente waargeneem. Na dubbelvertering met BamH I word hierdie fragmente onderskeidelik na 8,3 Kb- en 6,5 Kb-fragmente gesplyt.
- 'n Twee-alleliese sisteem is eweneens met Xmn I waargeneem, waar polimorfe-fragmente van 9,4 Kb en 6,5 Kb voorkom.
- 'n Bgl II-punt is polimorfies en veroorsaak restriksiefragmente van òf 3,6 Kb òf 1,7 Kb.
- Restriksie-ensiem Pvu II vertoon twee polimorfe-restriksiepunte. Met die teenwoordigheid van restriksiepunt Pvu IIa word fragmente van òf 19 Kb òf 6 Kb waargeneem, terwyl met restriksiepunt Pvu IIb fragmente van òf 11,5 Kb òf 9,1 Kb waargeneem word.

Lidsky et al. (1985c) het vervolgens aangetoon dat die frekwensie van die tien RFLP's wat met die PAH-lokus assosieer, sodanig hoog is dat meer as 95% van alle Kaukasoïede heterosigoties ten opsigte van die RFLP's sal wees. Die hoë frekwensie van die polimorfismes lei daartoe dat koppelingstudies oor die voorkoms van 'n spesifieke RFLP in assosiasie met 'n genetiese siektetoestand en die oorerwing daarvan in 'n familie, gedoen kan word. Gevolglik kan RFLP-analise vir die genetiese-analise van 37 Deense families met PKU aangewend word (Woo et al., 1983; Lidsky et al., 1985c; Güttler et al., 1987) en is daar getoon dat die RFLP's in ooreenstemming met die klassieke PKU-fenotipe in die PKU-families segregeer.

Vir prenatale of draerdiagnose van PKU is dit belangrik om te bepaal in welke fase die polimorfismes met die defektiewe geen assosieer en RFLP-koppeling word gevolglik deur familiestudies gedoen. Die analise van aangetaste kinders in die familie word hiervoor benodig. Die

twyfelagtigheid in die bepaling van die fase van twee loki, A en B, indien slegs die genotipes van die ouers bekend is, word in Figuur 2.5A geïllustreer (White et al., 1985). Alhoewel die merkers kodominant is, definieer dit slegs welke allele teenwoordig is by elke lokus. Die verspreiding van die allele met betrekking tot mekaar is vir die moeder nie direk waarneembaar nie en daar bestaan twee moontlikhede van fase. Verder kon daar ook nie bepaal word welke allele met PKU assosieer nie. Indien die genotipe van die aangetaste kind ook bekend is (Figuur 2.5A), kan die fase van die polimorfismes bepaal word, asook die allele-assosiasie met PKU. In Figuur 2.5B kan waargeneem word dat indien genotipes van beide grootouers van die aangetaste kind bekend is, die fase van die polimorfismes vir die ouers met sekerheid bepaal kan word. Hejtman et al. (1986) toon verder dat indien die assosiasie van die siektetoestand met die merkerallele bepaal is deur twee familieleden, in dieselfde generasie, van bekende fenotipe en RFLP-patroon, die akkuraatheid van diagnose verminder met die vermeerdering in afstand van gekoppelde peilers (Figuur 2.6:1^o fase). Daar kan ook waargeneem word dat wanneer genoemde assosiasie deur slegs een kind bepaal is (1^o geslag) of die analise oor twee meioses strek (2^o geslag), die akkuraatheid van diagnose vinniger verminder. Uit Figuur 2.6 kan gevolglik afgelei word dat terwyl naby gekoppelde peilers analise van suboptimale stambome verdra, die diagnostiese akkuraatheid verminder soos die rekombinasiefraksie 0,1 nader.

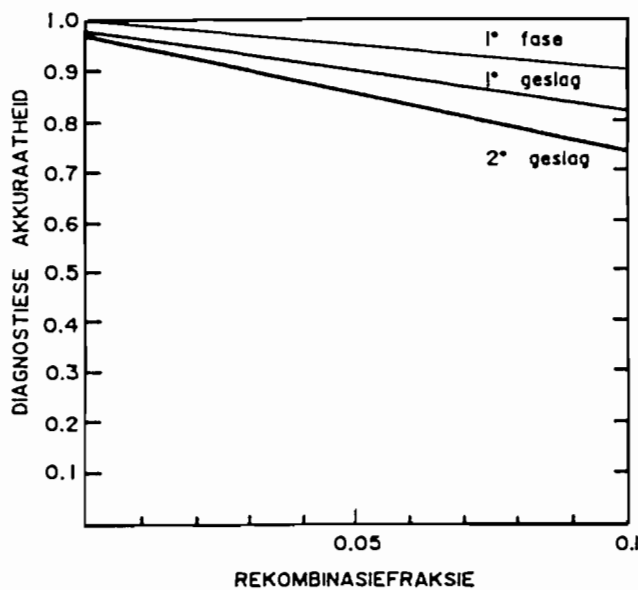
Soos reeds waargeneem, kan elke polimorfe-restriksiepunt òf teenwoordig (+) òf afwesig (-) wees in 'n spesifieke chromosoom. Die patroon of kombinasie van polimorfe-restriksiepunte vir enige chromosoom staan as 'n haplotipe bekend (Weatherall et al., 1985). Uit die RFLP-analise van die 74 normale en 74 mutante allele in die 37 Deense PKU-families (Güttler et al., 1987a) is 'n totaal van 12 haplotipes verkry (Tabel 2.3). Alhoewel getoon is dat daar 'n baie sterk koppeling tussen die RFLP-haplotipes en PKU bestaan (die lod-puntetelling was 9,96 met 'n rekombinasiefraksie van 0; Daiger et al., 1986), is daar geen klaarblyklieke assosiasie tussen spesifieke RFLP-haplotipes van die PAH-geen en PKU op populasievlak nie. Daar kon wel waargeneem word dat van die 74 mutante allele wat geanaliseer is, 91% met haplotipe 1,2,3 en 4 assosieer (Tabel 5.2). Deur 'n vergelyking van die haplotipes in die PAH-lokus en die kliniese



FIGUUR 2.5 TWYFELAGTIGE BEPALING VAN FASE INDIEN DIE GENOTIPES VAN SLEGS DIE OUERS BEKEND IS

- A. Die twee moontlikhede van fase by loki A en B vir die moeder, word as a en b aangedui.
- B. Genotipes van die grootouers is bekend en die fase van die moeder kan met sekerheid bepaal word.

(White et al., 1985).



FIGUUR 2.6 DIE EFFEK VAN DIE REKOMBINASIEFRAKSIE OP DIE DIAGNOSTIESE AKKURAAATHEID

Die akkuraatheid is met behulp van die volgende vergelykings bepaal:

eerste geslag met bepaalde fase: $1 - \text{rekombinasiefraksie}$;

eerste geslag: $\text{akkuraatheid} = (1 - \text{rekombinasiefraksie})^2$
 $(\text{rekombinasiefraksie})^2$;

tweede geslag: $\text{akkuraatheid} = (1 - \text{rekombinasiefraksie})^3$
 $(1 - \text{rekombinasiefraksie})(\text{rekombinasiefraksie})^2$.

(Hejtmancit et al, 1986).

fenotipe van PKU (Ledley et al, 1986b; Güttler et al., 1987a; Güttler et al., 1987b), is waargeneem dat individue wat homosigoties of heterosigoties is vir mutante alleles met haplotipe 2 of 3 'n ernstige kliniese toestand van PKU vertoon. In teenstelling hiermee vertoon individue met mutante alleles van òf haplotipe 1 òf haplotipe 4 'n minder ernstige kliniese fenotipe. Genomiese klonering en volgorde-analise van 'n mutante PAH-geen wat met haplotipe 2 assosieer, toon 'n puntmutasie in die eerste base van kodon 408, met 'n gevolglike aminosuurvervanging (Arg → Trp) in ekson 12 (DiLella et al., 1987). Verder is ook getoon dat 'n oligonukleotiedpeiler vir dié mutante PAH-geen slegs aan mutante alleles wat met haplotipe 2 assosieer, hibridiseer. 'n Mutante PAH-geen wat met haplotipe 3 assosieer, is ook aan genomiese klonering en volgorde-analise onderwerp. 'n Puntmutasie is waargeneem aan die 5'-splytlasdonorpunt van intron 12 (DiLella et al., 1986a). Verder is getoon dat hierdie mutasie gedurende splytlas die verwydering van ekson 12 tot gevolg het (Marvit et al., 1987). 'n Oligonukleotiedpeiler vir dié mutante PAH-geen hibridiseer weer eens slegs aan mutante alleles wat met haplotipe 3 assosieer.

2.2.2 Direkte analise van gemuteerde gene

'n Direkte waarneming van sekelselanemie is moontlik, aangesien die betrokke mutasie die verandering van herkenningspunte vir sekere endonukleases veroorsaak. Geever et al. (1981) demonstreer dat die restriksie-ensiem Dde I aangewend kan word om tussen die β^A -gene en die β^S -gene te onderskei. Die vertering van die DNA van normale selle met Dde I het fragmente van 0,20 Kb en 0,17 Kb tot gevolg, terwyl die vertering van die DNA van sekelselle met Dde I 'n fragment van 0,37 Kb vorm as gevolg van die verlies van een Dde I-herkenningspunt. Delesies kan ook direk waargeneem word deur die gebruik van restriksie-endonukleasepunte buite die delesie en 'n peiler waarvan 'n gedeelte nie die delesie insluit nie. In een tipe β -thal vertoon die β -globiengene 'n delesie van 619 bp. Na vertering van DNA met die restriksie-ensiem Pst I, word restriksiefragmente van 3,7 Kb in plaas van die normale 4,4 Kb restriksiefragmente waargeneem (Kazazian, 1985).

TABEL 2.3 RFLP-HAPLOTIPES VAN DIE DEENSE PKU-FAMILIES

Haplotipe	Bgl II	Pvu IIa	Pvu IIb	EcoR I	Msp I	Xmn I	Hind III	EcoR V
1	-	+	-	-	+	-	-	-
2	-	+	-	-	+	-	+	+
3	-	+	-	+	-	+	-	-
4	-	+	-	+	-	+	+	+
5	+	-	+	+	+	-	-	+
6	+	-	+	+	+	-	-	-
7	+	-	-	+	-	+	-	-
8	-	+	-	+	+	-	-	+
9	+	+	-	+	+	-	-	+
10	-	+	-	+	+	-	-	-
11	+	-	-	+	+	-	-	+
12	-	+	-	-	+	-	-	+

Güttler et al., 1987

Onder spesifieke kondisies kan oligonukleotiede gekonstrueer word wat aan homoloë volgordes hibridiseer, maar nie aan heteroloë volgordes nie (Wallace et al, 1981). Oligonukleotiede wat spesifiek is vir die mutante alleles wat met haplotipe 2 en 3 (sien Tabel 2.3) in twee PKU-pasiënte assosieer, is deur DiLella et al. (1986b; 1987) gesintetiseer. Genomiese DNA van 33 Deense PKU-families met gedefinieerde haplotipes is geanaliseer deur hibridisering met hierdie oligonukleotiedpeilers. Die onderskeie oligonukleotiedpeilers hibridiseer slegs aan DNA van individue wat die mutante alleles wat met haplotipe 2 of haplotipe 3 assosieer, vertoon. Om hierdie metode te vereenvoudig, asook om die sensitiwiteit en spesifisiteit te verbeter, kan polimerasekettingreaksie (PCR - polymerase chain reaction) toegepas word (Mullis et al., 1986). Hierdie tegniek is deur DiLella et al. (1988) toegepas om draers van mutante PKU-alleles te identifiseer. Genomiese DNA van PKU-families met gedefinieerde haplotipes is deur PCR versterk. Dié DNA is direk deur DOT-BLOT op membrane aangewend en geanaliseer deur hibridisering met oligonukleotiedpeilers spesifiek vir die mutante alleles wat met haplotipe 2 of 3 assosieer. Weer eens is gevind dat die onderskeie oligonukleotiedpeilers slegs aan DNA van individue met mutante alleles wat met hierdie haplotipes assosieer, hibridiseer.

2.3 KLONERING EN KARAKTERISTIEKE VAN DIE PAH-GEENSISTEEM

'n Volledige mens-cDNA teenoor PAH-mRNA is gekloneer (Robson et al., 1982; Robson et al., 1984; Kwok et al., 1985). Die lengte van die cDNA is 2448 bp en dit sluit die 19 bp-fragment van die 3'-poli(A)-gebied van die mRNA in. 'n Kontinue ooplesraam begin by die eerste ATG-kodon by posisie 223 en eindig by die TAA-kodon in posisie 1579. Die koderingsgebied is gevolglik 1353 bp lank en kodeer vir 451 aminosuurresidue. Die 3'-nie-transleerbare gebied is 851 bp lank met 'n aantal tandem terminasiekodons. Drie Brownlee-Proudfoot-volgordes kom voor by posisie 2198, 2347 en 2413. Die afstand tussen die laaste Brownlee-Proudfoot-volgorde en die poli(A)-segment is 13 bp. Hierdie PAH-cDNA-kloon is uitgedruk in 'n bepaalde sisteem en dit het gelei tot die vorming van PAH wat funksioneel aktief was (Ledley et al., 1985c) wat bewys dat dié kloon inderdaad 'n vollengte kloon is. Verder is

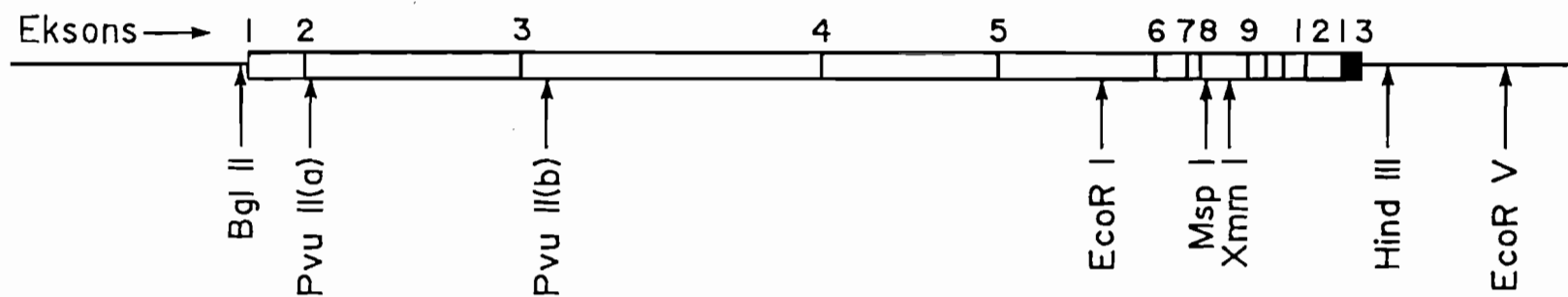
aangetoon (Ledley et al., 1987) dat die aktiwiteit van PAH self nie wesenlik deur post-transkripsionele modifisering beïnvloed word nie.

Die afgeleide aminosuurvolgordes verteenwoordig 'n proteïen van 51 672 dalton (Kwok et al., 1985), wat in ooreenstemming is met waardes vir subeenheid molekulêre massa van die ensiem (Kaufman, 1976). Die katalitiese funksie van die ensiem is in die karboksiterminale twee-derdes van die proteïen gesetel, en die regulatoriese fosforileringspunte in die aminoterminalen derde van die proteïen (Ledley et al., 1985a; Ledley et al., 1985b).

Met behulp van die vollengte cDNA-kloon is vier cosmidklone geïsoleer en gevolglik gekarakteriseer om die eienskappe van die PAH-geen te bepaal (DiLella et al., 1986a). Die geen is ongeveer 90 Kb lank, 13 eksone verteenwoordig 2,3 Kb van die geenvolgorde en introne verteenwoordig 85 Kb van die geenvolgorde. Introne verdeel die proteïenkoderingsgebied van die geen in eksone van 57 bp tot 892 bp en die introne varieer in grootte van 1 Kb tot 24 Kb. Eksone aan die 3'-gebied van die geen is nader aan mekaar geleë, terwyl die eksone aan die 5'-gebied deur groot introne geskei word. Die grootste eksone van 892 bp is saamgestel uit 41 bp proteïenkoderingsvolgorde, 'n terminasiekodon en die totale 848 bp van die 3'-nie-transleerbare gebied. Eksone 1, met 'n lengte van 149 bp, is saamgestel uit twee komponente. Die eerste gedeelte van 89 bp verteenwoordig die 5'-nie-transleerbare gebied. In Figuur 2.7 kan ook twee gebiede waar polimorfepunte voorkom, waargeneem word: Bgl II, Pvu IIa en Pvu IIb aan die 5'-gebied van die geen, en EcoR I, Xmn I, Msp Ia, Msp Ib, EcoR V en Hind III aan die 3'-gebied van die geen. Die PAH-geen is op chromosoom 12q22-q24.1 geleë (Lidsky et al., 1985a).

2.4 PROBLEEMSTELLING EN BENADERINGSWYSE

'n Program om draers van die PKU-eienskap in Suid-Afrika te identifiseer, is nog nie onderneem nie (Hitzeroth, 1983). Hierdie studie is daarom onderneem om die voorkoms van defekte allele van PKU in 'n aantal Suid-Afrikaanse PKU-families na te gaan. 'n Verdere doel met



FIGUUR 2.7 MOLEKULÈRE STRUKTUUR VAN DIE MENS-PAH-GEEN MET 13 EKSONS EN 12 INTRONS.

Posisies van die polimorfe-restriksiepunte is aangedui.

(Woo et al, 1986).

hierdie studie is om die nodige tegnologie daar te stel waarvolgens diagnosering van PKU-draers op 'n gereelde basis uitgevoer kan word. Die PAH-lokus kan op 'n geskikte wyse met behulp van RFLP-analise bestudeer word. Draers van die PKU-eienskap is reeds op so 'n wyse in die Deense populasie geïdentifiseer (Woo et al., 1983; Lidsky et al., 1985c). Die benaderingswyse wat gevolg is, was suksesvol en derhalwe is besluit om van dieselfde benaderingswyse gebruik te maak om draers van die PKU-eienskap in Suid-Afrika te identifiseer. In hierdie studie is RFLP-analise benut vir haplotipe-analise ter bepaling van die voorkoms van defekte allele van PKU in Suid-Afrikaanse Kaukasoïede PKU-families. Al die prosedures is volgens die voorskrifte in Hoofstuk 3 uitgevoer.

HOOFSTUK 3

RFLP'S IN DIE PAH-LOKUS VAN SUID-AFRIKAANSE KAUKASOÏEDE

3.1 INLEIDING

Soos reeds in Afdeling 2.2 uiteengesit, het die groep van Woo reeds bepaal dat 'n aantal RFLP's met 'n hoë frekwensie in die PAH-lokus van die Amerikaanse Kaukasoïede voorkom (Woo, 1984; Lidsky et al., 1985c). Aangesien haplotipe-analise berus op die benutting van RFLP-patrone, was dit noodsaaklik om die volgende vrae ten opsigte van die Suid-Afrikaanse Kaukasoïede populasie te beantwoord:

- Kom dieselfde RFLP's in die PAH-lokus van die plaaslike populasie voor?
- Wat is die frekwensie waarmee die RFLP's voorkom?

Hierdie hoofstuk handel oor die metodes en benaderingswyses wat vir RFLP-analise aangewend is (Afdeling 3.2) en eindig met 'n evaluering van die frekwensie waarmee bekende RFLP's in die Suid-Afrikaanse populasie voorkom (Afdeling 3.3).

3.2 RFLP-ANALISE: METODEDES EN MATERIALE

3.2.1 Inleiding

Die beginsels waarop RFLP-analise berus, is reeds in Afdeling 2.2 beskryf. Kortliks behels die tegniek die volgende fasette: isolering van genomiese DNA, vertering van die DNA-preparate met restriksieendonukleases, elektroforetiese skeiding van DNA-fragmente, Southern-oordrag en identifisering van bepaalde fragmente met behulp van 'n geskikte radioaktiefgemerkte peiler. Die onderskeie metodes wat hiervoor in hierdie ondersoek aangewend is, word hier beskryf.

3.2.2 Isolering van genomiese DNA

Hoë molekulêre massa genomiese DNA is volgens 'n wysiging van die metode, soos beskryf deur Tsipouras (1987), geïsoleer. Twintig ml EDTA-bloed is met 'n gelyke volume lisebuffer (1 mM MgCl₂, 1 mM natriumfosfaat by pH 6,5; 0,8 % (v/v) NP 40; 0,4 g % (m/v) DOC) vermeng. Die lisaat is in polipropileenbuis teen 9 000 opm vir 30 minute by 0-4°C gesentrifugeer en die gepresipiteerde kernmateriaal is in 10 ml TNE-buffer (10 mM Tris by pH 8,3; 0,15 M NaCl; 5 mM EDTA) gesuspendeer. Daarna is éers 'n oplossing van 10 g % (m/v) SDS met finale konsentrasie van 1 g %, gevolg deur 5 M NaClO₄ met finale konsentrasie van 1 M goed byvermeng. 'n Gelyke volume chloroform-isoamielalkoholmengsel (24:1) is bygevoeg en die mengsel is versigtig vir 15 minute op 'n roterende platform geskud. Na faseskeiding deur sentrifugering by 1 800 opm vir 5-10 minute, is die boonste DNA-bevattende fase met behulp van 'n stomppunt pasteurpipet in 'n skoon polipropileenbuis oorgedra en die ekstraksie is twee maal herhaal. Twee volumes etanol is bo-oor die finale ekstrak in 'n 100 ml glaskbeker gegiet om die genomiese DNA te presipiteer. Hoë molekulêre massa DNA is in die vorm van 'n fyn netwerk gepresipiteerde materiaal met behulp van 'n glasstafie opgedraai. Die monster is gedroog en in Robertsbuffer (6 mM Tris by pH 8,3; 6 mM NaCl; 0,6 mM EDTA) oornag deur stadige rotering by kamertemperatuur gesuspendeer. Die konsentrasie van die DNA is met behulp van UV-spektrofotometrie by 260 nm bepaal en die DNA is by 4°C bewaar.

3.2.3 Voorbereiding en radioaktiewe merking van die PAH-cDNA-peiler

phPAH247 is 'n rekombinante plasmied wat die mens vollengte cDNA vir fenielalanienhidroksilase (PAH) mRNA in pBR322 bevat (Afdeling 2.3). Hierdie vollengte cDNA-kloon is deur Woo¹ verskaf. Die cDNA-kloon is met die restriksie-endonukleases EcoR I, BamH I, Hind III en Bgl II

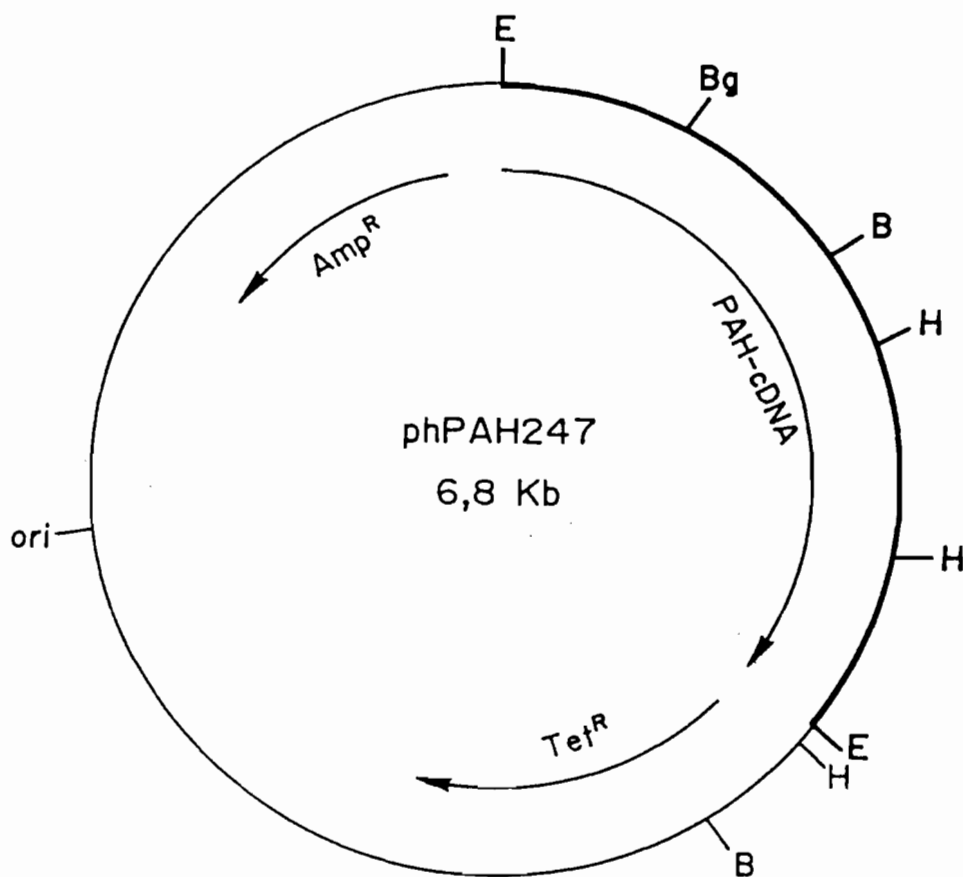
¹ Dr. Savio Woo, Howard-Hughes Medical Institute, Department of Cell Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030, USA

getoets. 'n Restriksiepatroon wat ooreenstem met die gepubliseerde kaart van die plasmied, is verkry (Figuur 3.1).

Groot hoeveelhede van die plasmied is volgens 'n wysiging van die standaardmetode van Maniatis et al. (1982), soos beskryf deur Vergeer (1988), geïsoleer en gekwantifiseer. Plasmied-DNA is by 4°C of -70°C bewaar. Om die cDNA-invoegsel uit die plasmied te verwyder, is EcoR I-snitte op 50 µg van die plasmied uitgevoer. Na inkubasie van 4 uur by 37°C is die reaksie met 10 µl 0,5 M EDTA en 80 µl 7,5 M NH₄Ac gestop. Na vermenging met 'n gelyke volume chloroform-isoamielalkoholmengsel en sentrifugering, is die boonste fase onttrek en by -20°C in die teenwoordigheid van twee volumes etanol gepresipiteer. Die presipitaat is twee maal met 70% etanol gewas en vakuumedroog. Die materiaal is in 20µl Robertsbuffer gesuspendeer en die reaksiemengsel is direk op 'n preparatiewe 1% horisontale agarosegel by 60 V geskei. Die fragment van belang, is met behulp van elektro-eluering soos volg gesuiwer: aan die anodekant van die DNA-band is 'n put in die agarosegel gesny en met anodebuffer uitgespoel. Deur verhoging van die spanning na 130 V is die DNA-band stapsgewys in die buffergevulde put geëluëer. Eluate is in 5 ml polipropileenbuis (Falcon No. 2063) versamel en met behulp van tersiëre-butanol tot 0,5 ml ingekrimp. Na ekstraksie met 'n gelyke volume chloroform-isoamielalkoholmengsel (24:1) om die etidiumbromied te verwyder, is die eluaat soos voorheen beskryf, aan etanolpresipitering onderwerp.

Die kwantifiseringstegniek, soos beskryf deur Prunell (1980), is benut om die konsentrasie van die plasmiedfragment te bepaal. Dit behels die elektroforese van die betrokke plasmiedfragment tesame met 'n geskikte konsentrasiereeks standaardfragmente in 'n etidiumbromiedbevattende agarosegel. Na elektroforese is die gel by 260 nm op Tipe 667 Polaroid-film gefotografeer en die konsentrasie van die plasmiedfragment is visueel deur vergelyking met die standaardreeks geskat.

Vervangingsmerking is volgens 'n wysiging van die metode van Lawn et al. (1980) uitgevoer. Ongeveer 100 ng DNA van die phPAH247-peiler is



FIGUUR 3.1 VOORSTELLING VAN DIE STRUKTUUR VAN PLASMIED phPAH247

Die plasmied is saamgestel uit pBR322-volgordes (---) en 'n vollengte mens PAH-cDNA (—).

Restriksiepunte wat aangetoon is, is B, BamH I, Bg, Bgl II; E, EcoR I; H, Hind III

radioaktief gemerk met 25 μCi α - ^{32}P -dCTP (Amersham). Vir die samestelling van 'n tipiese reaksiemengsel is 25 μl etanolopgeloste α - ^{32}P -dCTP (> 3000 Ci/mmol) in 'n 6 mm x 25 mm glasbuisie (Kimble) drooggedamp. Die 20 μl reaksiemengsel is daarna soos volg in dieselfde buisie saamgestel: 50 mM Tris by pH 7,9; 6 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hoogs gesuiwerde BSA (Boehringer Mannheim No. 711 454); 0,1 mM van elk van dATP, dTTP, dCTP en dGTP asook 0,015 ng DNase I (Boehringer Mannheim No. 104 159). Na inkubasie van 15 minute by 37°C is 5 U endonukleasevrye E.coli-DNA-polimerase I (Boehringer Mannheim No. 642 711) by die reaksiemengsel gevoeg. Hierdie stap is opgevolg deur 'n verdere inkubasie van 2 tot 2,5 uur by 15°C . Die reaksie is daarna deur byvoeging van 5 μl 0,5 M EDTA getermineer. Vir die skeiding van radioaktiefgemerkte DNA-fragmente en vrye dNTP's is uitsluitingschromatografie op 'n Sephadex G-50-kolom van 260 mm x 10 mm uitgevoer. Kolombuffer wat tydens die uitsluitingschromatografie gebruik is, is saamgestel uit 10 mM Tris by pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA en 0,1 g % (m/v) SDS. Die eerste vyf fraksies waarin die α - ^{32}P -dCTP-gemerkte peiler voorkom, is in 'n 15 ml polipropileenbuis versamel. Ongeveer 10 μl van die versamelde volume is na toevoeging van 0,5 ml water en 5 ml Aquasolve I aan vloeistofsintillasiespektrometrie onderwerp. Die spesifieke aktiwiteit van die α - ^{32}P -gemerkte peilers is uit dié waardes bepaal en het normaalweg tussen 1×10^8 en 3×10^8 tpm/ μg DNA gewissel. Terselfdertyd is die restant van die versamelde volume aan etanolpresipitering onderwerp na byvoeging van 10 μl 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gesoniseerde salmsperm-DNA en NaCl tot 'n finale konsentrasie van 0,3 M. Etanolgepresipiteerde α - ^{32}P -gemerkte peilers is in 'n Beckman JS-13-rotor by 9 000 opm en -10°C vir 1 uur gepresipiteer. Na versigtige dekantering van die supernatant is die presipitaat onder vakuum gedroog en vir 30 minute by 37°C in 200 μl Robertsbuffer gesuspendeer. Daarna is 1 μl van die volume weer aan vloeistofsintillasiespektrometrie onderwerp en is die spesifieke aktiwiteit weer eens bereken. Die spesifieke aktiwiteit na etanolpresipitering was gewoonlik tussen 85% en 100% van die oorspronklik berekende spesifieke aktiwiteit van die α - ^{32}P -gemerkte peilers.

3.2.4 Southern-analise

Tien μg van elke DNA-monster is vir 4-5 uur by 37°C met 20 U van elk van die volgende ensieme volgens die vervaardiger se voorskrifte verteer: Hind III, EcoR V, Xmn I, Bgl II, Pvu II, Msp I en EcoR I gevolg deur BamH I. Normaalweg is die reaksies in volumes van $40\ \mu\text{l}$ uitgevoer, behalwe wanneer die konsentrasie van die DNA-preparate te laag was. Vir sodanige gevalle is die volumes van die reaksiemengsel tot $200\ \mu\text{l}$ verhoog. Vir die laasgenoemde gevalle was dit belangrik om die DNA-fragmente na afloop van die reaksie vir agarose-elektroforese te konsentreer. Dit is soos volg gedoen: Na toevoeging van $10\ \mu\text{l}$ $0,5\ \text{M}$ EDTA en $100\ \mu\text{l}$ $7,5\ \text{M}$ NH_4Ac is die monsters met 'n gelyke volume chloroform-isoamielalkoholmengsel (24:1) vir 30 sekondes deeglik vermeng en daarna vir 5 minute in 'n Eppendorf-banksentrifuge afgeswaai. Die supernatant is met 2 volumes etanol vermeng en oornag by -20°C gelaat. Gepresipiteerde materiaal is deur sentrifugering vir 20 minute versamel en die presipitaat is twee maal met 70% etanol gewas, vakuumgedroog en in $40\ \mu\text{l}$ Robertsbuffer gesuspendeer. Waar die genomiese DNA aan dubbelvertering met EcoR I en BamH I onderwerp is, is die DNA na vertering met EcoR I eers gepresipiteer voor dit met BamH I verteer is, aangesien die reaksiekondisies van die twee ensieme verskil. By die finale reaksievolumes van $40\ \mu\text{l}$ is $3\ \mu\text{l}$ BFB-buffer (40 % (v/v) gliserol; $0,2\ \text{M}$ EDTA.Na, $0,2\ \text{g}\%$ (m/v) bromofenolblou) gevoeg.

Na restriksievertering is die DNA-monsters, tesame met DNA-standaarde van bekende groottes, elektroforeties op 'n 1% agarosegel oornag by 18 V geskei. Die gel is in die verlangde grootte gesny en soos volg vir Southern-analise voorberei: Aanvanklik is die gel met $1\ \text{M}$ KOH vir 10 minute geskud en daarna met water gewas. Om die gel te neutraliseer, is dit met vier ruilings $1\ \text{M}$ Tris by pH 7,2 behandel. Daarna is die gel in $6 \times \text{SSC}^2$ geweek. Die opstelling vir die Southern-oordrag is volgens Southern (1975) gedoen. Nitrosellulosemembrane (Schleicher en Shuell

² $1 \times \text{SSC}$ is saamgestel uit $0,15\ \text{M}$ NaCl en $0,015\ \text{M}$ natriumsitraat. Die pH van 6,8 is met behulp van $0,2\ \text{M}$ sitroensuur ingestel.

BA 85; 0,45 μm) is net kleiner as die gelle gesny en vir 1 uur in 6 x SSC geweek. Ses velle Whatman nr. 1-papier is 2 mm kleiner as die nitrosellulosemembrane gesny. Southern-oordragte is opgestel deur die nitrosellulosemembrane bo-op die gelle te plaas. Dit is gevolg deur die ses velle Whatman nr. 1-papier waarvan die eerste drie in 6 x SSC benat is, gevolg deur 'n stapel handdoekpapier, wat 2 mm kleiner as die Whatman-papier gesny is. Genoegsame voorsiening van buffer (6 x SSC) is weerskante van die opstelling gemaak (die hele opstelling is met kleefplastiek afgeseël en vir 16 tot 18 uur by kamertemperatuur gelaat) en daarna is die nitrosellulosemembrane verwyder, gelugdroog en vir 2 uur by 78°C in 'n vakuumond gebak. Die membrane is onder vakuum bewaar.

Prehibridisering van die membrane is uitgevoer deur die membrane in 6 x SSC te benat en in 'n plastieksakkie (Seal-a-meal) tesame met die prehibridiseringsmengsel te verseël. Die prehibridiseringsmengsel is by die membrane gevoeg in hoeveelhede van 25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ en is saamgestel uit 5 x SSC; 50% (v/v) formamied; 0,1 g % (m/v) SDS; 200 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ gesoniseerde salmsperm-DNA; 10 g % (m/v) dekstraansulfaat en 40 mg% (m/v) van onderskeidelik Ficoll, BSA en PVP. Na prehibridisering van 2 tot 4 uur by 37°C, is die membrane tesame met die hibridiseringsmengsel vir 3 dae by 37°C gehibridiseer. Die gehibridiseerde membrane is opeenvolgend in hoeveelhede van 500 m ℓ van die volgende gewas:

- 4 keer met 2 x SSC-0,1% SDS vir 20 minute by kamertemperatuur,
- 2 keer met 2 x SSC-0,1% SDS vir 10 minute by 60°C,
- 1 keer met 1 x SSC-0,1% SDS vir 10 minute by 60°C en
- 1 keer met 0,5xSSC-0,1% SDS vir 10 minute by 60°C.

Membrane is na die wasproses gelugdroog en vir minstens 3 dae by -70°C op Cronex-4 X-straalplate geoutoradiografeer.

3.3 FREKWENSIE VAN RFLP'S IN DIE PAH-LOKUS

Om die frekwensie waarmee verskillende RFLP's in die PAH-lokus voorkom, vas te stel, is genomiese DNA van 36 onverwante normale Suid-Afrikaanse Kaukasoïede aan RFLP-analise onderwerp. Die groep van Woo

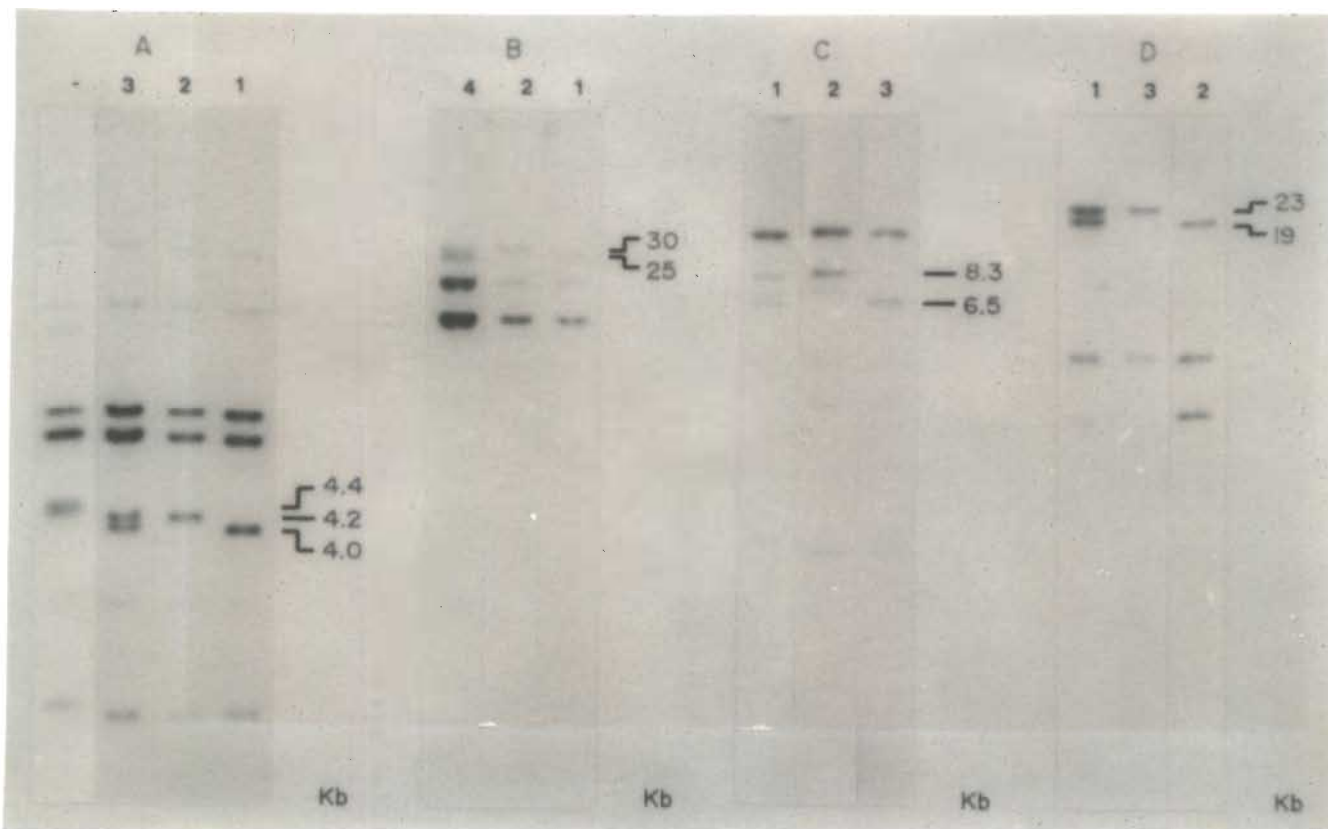
het reeds gevind dat RFLP's met die ensieme Sph I, Hind III, EcoR V, EcoR I, Msp I, Xmn I, Pvu II en Bgl II met hoë frekwensie in die Amerikaanse Kaukasoïede populasie voorkom (Lidsky et al., 1985a, 1985c). Ter vergelyking is dieselfde ensieme, behalwe Sph I, vir RFLP-analise van 'n verteenwoordigende paneel normale individue van die Suid-Afrikaanse Kaukasoïede bevolking gebruik. Die volgende RFLP's is met die verskillende ensieme waargeneem: .

Hind III Individue vertoon homo- of heterosigositeit vir òf die 4,4 Kb-, òf die 4,2 Kb- òf die 4,0 Kb-fragment behalwe, vir 'n aantal DNA-fragmente wat algemeen by al die individue voorkom (Figuur 3.2A).

EcoR V Die peiler hibridiseer aan die algemene fragmente, asook 'n fragment van òf 30 Kb òf 25 Kb (Figuur 3.2B).

EcoR I/BamH I Veelvuldige EcoR I-restriksiefragmente kom voor. Die 17 Kb-fragment bevat 'n polimorfe EcoR I restriksiepunt wat 'n 11 Kb-fragment tot gevolg het indien die polimorfepunt teenwoordig is. Die EcoR I-polimorfisme kan beter waargeneem word deur dubbelvertering met BamH I wat die 17 Kb- en die 11 Kb-fragment onderskeidelik tot 'n 8,3 Kb- en 'n 6,5 Kb-fragment verklein (Figuur 3.2C).

Msp I Twee polimorfepunte is waargeneem. Restriksiepunt Msp Ia vorm fragmente van 23 Kb en 19 Kb (Figuur 3.2D). Behalwe twee algemene fragmente en die bogenoemde RFLP's, mag drie addisionele polimorfe fragmente ook voorkom (nie hier getoon nie). Die teenwoordigheid van die polimorfe restriksiepunt Msp Ib lei tot die splyting van 'n 4,0 Kb-fragment tot twee fragmente van 2,2 Kb en 1,8 Kb. Hibridisering van die peiler aan die laasgenoemde polimorfe fragment is swak, sodat dié RFLP's nie geredelik in die meeste DNA-monsters visualiseerbaar was nie.

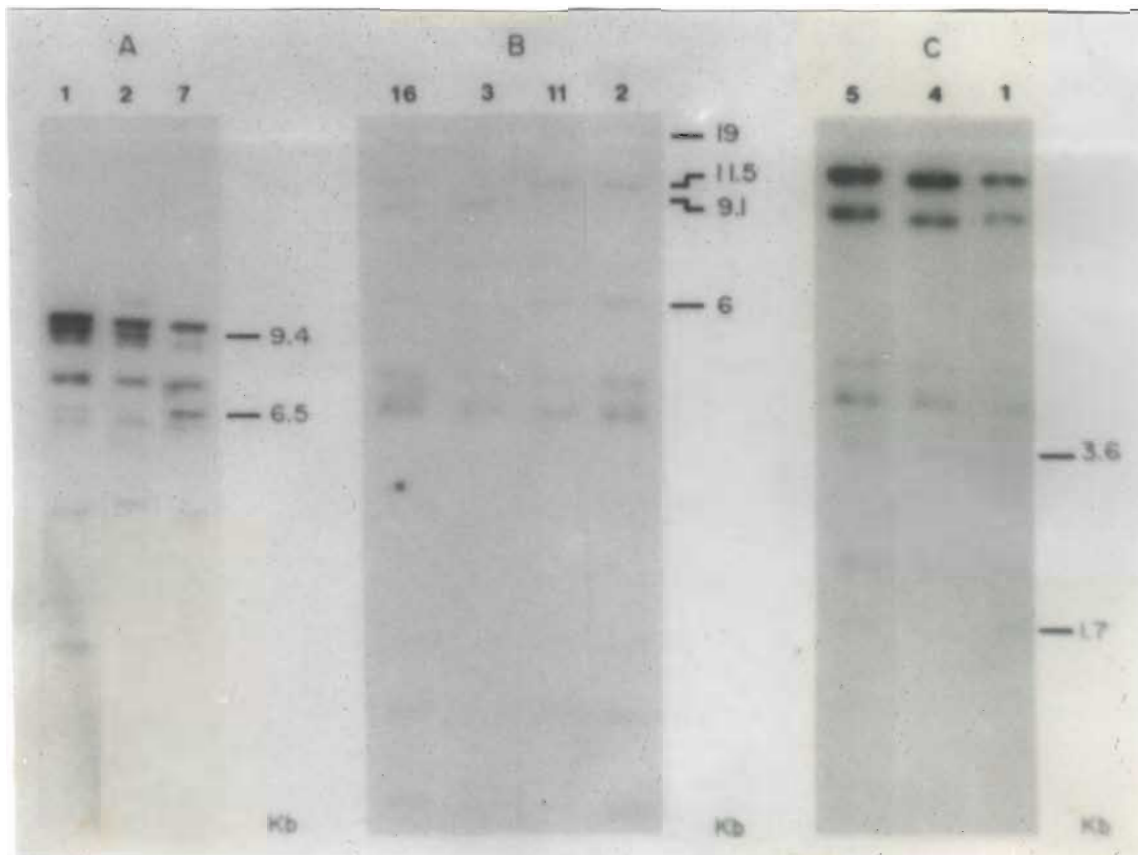


FIGUUR 3.2 SOUTHERN-OORDRAG VAN GENOMIESE DNA NA BEHANDLING MET RESTRIKSIE-ENSIEME

DNA is uit bloedmonsters van 36 onverwante normale Suid-Afrikaanse Kaukasoïede geïsoleer. Die bane is genummer om ooreen te stem met die nommer van die individue in Tabel 3.1. Genomiese DNA is verteer met:

- A. Hind III
- B. EcoR V
- C. EcoR I/BamH I
- D. Msp I

Die groottes van die fragmente is bepaal met die Hind III-fragment van bakteriofaag lambda-DNA as standaard.



FIGUUR 3.3 SOUTHERN-OORDRAG VAN GENOMIESE DNA NA BEHANDLING MET RESTRIKSIE-ENSIEME

DNA is uit 36 onverwante normale Suid-Afrikaanse Kaukasoïede geïsoleer. Die bane is genummer om ooreen te stem met die nommers van die individue in Tabel 3.1. Genomiese DNA is verteer met:

- A. Xmn I
- B. Pvu II
- C. Bgl II

Die groottes van die fragmente is bepaal met die Hind III-fragment van bakteriofaag lambda-DNA as standaard.

- Xmn I** Hierdie restriksiepuntpolimorfisme lei daartoe dat individue homo- of heterosigoties vir die 9,4 Kb- en die 6,5 Kb-fragment is (Figuur 3.3A).
- Pvu II** Southern-analise van DNA na behandeling met **Pvu II** vertoon vier polimorfe fragmente van 19,0, 11,5, 9,1 en 6,0 Kb. Twee polimorfepunte a en b kom voor. Die teenwoordigheid van punt a lei tot verskuiwing van die 19,0 Kb-fragment tot 'n 6,0 Kb-fragment. Die 11,5 Kb-fragment word na 'n 9,1 Kb-fragment deur die teenwoordigheid van punt b verklein (Figuur 3.3B).
- Bgl II** Behalwe vir die fragmente wat algemeen voorkom, is individue homo- of heterosigote vir die 3,6 Kb en/of die 1,7 Kb-fragment (Figuur 3.3C). Hibridisering van die peiler aan die 1,7 Kb-fragment was gewoonlik baie swak, sodat dié polimorfe fragment moeilik visualiseerbaar was.

Met die uitsondering van die fragmente wat deur die **Msp Ib** polimorfepunt gevorm word, word die voorkoms van die bogenoemde polimorfe fragmente, in en om die PAH gene van die verskillende individue van die paneel 36 onverwante Suid-Afrikaanse Kaukasoïede in Tabel 3.1 weergegee. Hierdie gegewens is verkry deur die analise van Southern-oordragte van die DNA-preparate van die verskillende individue na behandeling van die preparate met die aangeduide restriksie-endonukleases. Uit die resultaat is die volgende voor-die-handliggende afleidings gemaak:

- Daardie RFLP's wat deur die groep van Woo beskryf is (Lidsky et al., 1985c), kom ook in die groep Suid-Afrikaanse Kaukasoïede voor.
- Geen ander bykomende RFLP-patrone is vir dié battery ensieme waargeneem nie.

Uit die resultaat in Tabel 3.1 is die frekwensies van die onderskeie polimorfe fragmente in die algemene populasie berekenbaar. Vir die bepaling van hierdie allelefrequensies word veronderstel dat 'n enkel lokus

TABEL 3.1 GENOTIPES VAN DIE GROEP NORMALE KAUKASOÏEDE BY DIE PAH-LOKUS

Individu	Genotipe							
	Pvu IIA	Pvu IIB	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Bgl II	Hind III
1	19/19	11,5/9,1	25/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	1,7/1,7	4,0/4,0
2	6/6	11,5/11,5	30/30	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	N.B.N.	4,2/4,2
3	19/19	9,1/9,1	30/30	6,5/6,5	23/23	9,4/6,5	N.B.N.	4,2/4,0
4	6/6	11,5/11,5	30/25	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	3,6/3,6	4,2/4,2
5	6/6	11,5/11,5	25/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	3,6/1,7	4,2/4,0
6	6/6	11,5/9,1	30/25	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	3,6/1,7	4,0/4,0
7	6/6	11,5/11,5	30/25	8,3/6,5	23/19	6,5/6,5	1,7/1,7	4,2/4,0
8	6/6	9,1/9,1	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/9,4	3,6/1,7	4,2/4,2
9	19/6	9,1/9,1	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/9,4	3,6/1,7	4,0/4,0
10	6/6	9,1/9,1	30/30	8,3/6,5	23/19	9,4/9,4	3,6/1,7	4,0/4,0
11	19/6	11,5/11,5	25/25	8,3/6,5	23/19	6,5/6,5	N.B.N.	4,2/4,0
12	19/19	11,5/11,5	30/30	6,5/6,5	23/23	9,4/6,5	N.B.N.	4,2/4,2
13	6/6	9,1/9,1	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	3,6/3,6	4,2/4,0
14	6/6	9,1/9,1	N.B.N.	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	3,6/3,6	4,0/4,0
15	6/6	9,1/9,1	N.B.N.	8,3/6,5	23/19	N.B.N.	N.B.N.	N.B.N.
16	19/6	11,5/9,1	30/25	9,3/6,5	19/19	9,4/6,5	3,6/1,7	4,2/4,2
17	19/6	11,5/11,5	30/30	8,3/6,5	23/23	N.B.N.	N.B.N.	N.B.N.
18	19/6	11,5/11,5	30/25	8,3/6,5	23/23	9,4/9,4	3,6/1,7	4,2/4,2
19	6/6	11,5/11,5	25/25	8,3/8,3	19/19	6,5/6,5	3,6/1,7	4,4/4,4
20	6/6	11,5/11,5	25/25	8,3/6,5	23/23	9,4/6,5	3,6/1,7	4,0/4,0
21	6/6	11,5/11,5	30/30	8,3/8,3	23/19	9,4/9,4	1,7/1,7	4,2/4,2
22	6/6	11,5/11,5	25/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	3,6/1,7	4,4/4,0
23	6/6	11,5/9,1	30/25	8,3/6,5	19/19	9,4/9,4	3,6/1,7	4,4/4,4
24	6/6	11,5/11,5	30/25	6,5/6,5	23/23	9,4/6,5	3,6/1,7	4,2/4,0
25	6/6	11,5/11,5	25/25	8,3/6,5	23/19	9,4/9,4	3,6/1,7	4,0/4,0
26	6/6	11,5/11,5	30/25	8,3/6,5	19/19	9,4/6,5	3,6/1,7	4,2/4,0
27	19/6	11,5/9,1	25/25	8,3/6,5	23/19	N.B.N.	3,6/1,7	4,2/4,0
28	19/19	9,1/9,1	25/25	8,3/6,5	19/19	6,5/6,5	3,6/1,7	4,4/4,4
29	19/6	11,5/11,5	30/30	8,3/8,3	23/19	9,4/9,4	1,7/1,7	4,2/4,2
30	6/6	11,5/11,5	25/25	6,5/6,5	23/23	6,5/6,5	3,6/1,7	4,0/4,0
31	6/6	11,5/11,5	30/25	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	3,6/1,7	4,4/4,2
32	6/6	11,5/11,5	25/25	6,5/6,5	23/23	6,5/6,5	3,6/1,7	4,0/4,0
33	6/6	11,5/11,5	30/25	8,3/6,5	19/19	9,4/9,4	3,6/1,7	4,2/4,0
34	6/6	11,5/11,5	30/25	8,3/8,3	19/19	N.B.N.	3,6/1,7	4,2/4,0
35	6/6	11,5/11,5	30/30	8,3/6,5	19/19	9,4/9,4	3,6/1,7	4,2/4,2
36	6/6	11,5/11,5	30/25	8,3/6,5	19/19	9,4/9,4	3,6/1,7	4,2/4,2

N.B.N. Nie bepaal nie

met twee alleles, A en a, in 'n populasie voorkom en dat die individue genotipes AA, Aa òf aa vertoon. Die voorkoms van allele A onder die totale aantal individue is dan die relatiewe frekwensie van allele A en die waarde p word daaraan gekoppel. Die allelefekwensie van allele a, q, is soortgelyk bepaalbaar. Om vir al die allele wat in die populasie voorkom te verantwoord, moet $p + q = 1$ wees (Elandt-Johnson, 1971). Die allelefekwensies is bepaal deur die voorkoms van die betrokke fragment onder die 72 allele in Tabel 3.1 te tel. Die 19,0 Kb Pvu IIa-fragment se voorkoms is byvoorbeeld 15 uit 72, met 'n waargenome allelefekwensie van 0,21 vir die bepaalde genotipe; die alternatiewe Pvu IIa-fragment vertoon dus 'n allelefekwensie van 0,79. Die allelefekwensies van die onderskeie polimorfismes word in Tabel 3.2 saamgevat.

In 'n populasie waar 'n enkel lokus met twee alleles, A en a, voorkom, gee die genotiefekwensies onderskeidelik die relatiewe voorkoms van individue met 'n AA-genotipe, Aa-genotipe òf aa-genotipe in die betrokke populasie weer (Wallace, 1981). Die waargenome genotiefekwensies is uit die resultaat in Tabel 3.1 bepaal deur die voorkoms van individue met 'n bepaalde genotipe te tel. So is daar byvoorbeeld vir die Pvu IIa polimorfepunt 4 uit die 36 individue met die 19/19-genotipe, 7 individue met die 19/6-genotipe en 25 individue wat die 6/6-genotipe vertoon. Gevolglik is die genotiefekwensies dan onderskeidelik 0,22, 0,44 en 0,33. Genotiefekwensies is ook met behulp van die Hardy-Weinberg-vergelyking uit die allelefekwensies berekenbaar (Tabel 3.2). Indien twee alleles, A en a, by 'n enkel lokus met frekwensie p en q, onderskeidelik voorkom, is die verwagte frekwensies van die AA-, Aa- en aa-genotipes respektiewelik p^2 , $2pq$ en q^2 (Wallance, 1981). Vir die resultate getoon in Tabel 3.2, is die waarde p telkens aan die allelefekwensie van die groter fragment gekoppel en die waarde q aan die allelefekwensie van die kleiner fragment. Byvoorbeeld vir Pvu IIa is die 19/19-genotiefekwensie gevolglik bereken deur $(0,21)^2$, die 19/6-genotiefekwensie deur $2(0,21)(0,79)$ en die 6/6-genotiefekwensie deur $(0,79)^2$.

Uit die gegewens in Tabel 3.2 kan die volgende afleidings gemaak word. Die allelefekwensies toon dat die Suid-Afrikaanse Kaukasoïede populasie

polimorf ten opsigte van die PAH-lokus is, aangesien die frekwensie van die minder algemene allele die minimum waarde van 0,09 oorskry (Skolnick & White, 1982). Die laagste frekwensie, 0,12, is vir die 4,4 Kb-fragment van **Hind III** waargeneem. Deur 'n vergelyking van die waargenome en berekende genotiefrekwensies, kan vasgestel word of die bepaalde populasie in Hardy-Weinberg-ewewig is. Om te bepaal of die verskil tussen die genotiefrekwensies noemenswaardig is, word die chi-kwadraattoets gebruik wat die verskil in waardes herlei na die waarskynlikheid dat hierdie verskil slegs toevallig kon plaasgevind het (H_0 -hipotese) (Wallace, 1981). Die genotiefrekwensies is omgerek en na numeriese data gebaseer op die aantal individue in die paneel. Die chi-kwadraat vir elke polimorfe punt is bepaal deur die som van die

$$\frac{(\text{waargenome waarde} - \text{berekende waarde})^2}{\text{berekende waarde}}$$

van genotipe Aa, Aa en aa (Tabel 3.2). Die chi-kwadraat van hierdie berekening het een vryheidsgraad (df), wat 'n aanduiding is van die aantal onafhanklike varieerbares. Die vryheidsgraad word bereken deur die verskil in die aantal fenotipes en die aantal allele: $3-2=1$ (Stansfield, 1983). Die waarskynlikheid om afwykings so groot of groter as dié wat waargeneem is, te verkry, word bepaal uit 'n gegewe tabel van chi-kwadraatverspreiding. Normaalweg word die nul-hipotese afgekeur indien die waarskynlikheid dat die verskil slegs toevallig kon plaasgevind het, minder as 5% is (Stansfield, 1983). Vir dié gevalle kan afgelei word dat die betrokke RFLP nie in Hardy-Weinberg-ewewig is nie. In die Suid-Afrikaanse populasie is die genotiefrekwensies vir die **Pvu II**-, **Bgl II**- en **Hind III**-polimorfisme volgens die gegewens in Tabel 3.2 nie in ewewig nie. In teenstelling hiermee is die genotiefrekwensies vir die ander polimorfismes wel in Hardy-Weinberg-ewewig. Vervolgens is die genotiefrekwensies van die Suid-Afrikaanse en Amerikaanse populasies vergelyk. Die waarskynlikheid dat die verskille noemenswaardig is, word bereken deur die som van die chi-kwadrate van beide populasies by twee vryheidsgrade te bepaal (Tabel 3.2) (Wallace, 1981). Benewens vir die

TABEL 3.2 VERGELYKING VAN DIE WAARGENOME EN BEREKENDE

Suid-Afrikaanse Kaukasofiede populasie								
Restriksie- ensiem	Fragment grootte (Kb)	Allele= frekwen= sie	Genotiefrekwensie				Chi- kwadraat	Waarskyn= likheid (df=1)
				p ²	2pq	q ²		
Pvu IIa	19,0	0,21	waargenome	0,11	0,19	0,70	6,92	0,001-0,01
	6,0	0,79	berekende	0,04	0,33	0,62		
Pvu IIb	11,5	0,71	waargenome	0,64	0,14	0,22	16,63	<0,001
	9,1	0,29	berekende	0,50	0,41	0,08		
EcoR V	30,0	0,46	waargenome	0,24	0,44	0,32	0,52	0,3-0,5
	25,0	0,54	berekende	0,21	0,50	0,29		
EcoR I/BamH I	8,3	0,54	waargenome	0,22	0,64	0,14	2,58	0,1-0,2
	6,5	0,46	berekende	0,27	0,50	0,21		
Msp I	23,0	0,43	waargenome	0,22	0,42	0,36	0,54	0,3-0,5
	19,0	0,57	berekende	0,19	0,48	0,33		
Xmn I	9,4	0,64	waargenome	0,47	0,34	0,19	2,44	0,1-0,2
	6,5	0,36	berekende	0,41	0,46	0,13		
Bgl II	3,6	0,48	waargenome	0,10	0,77	0,13	10,5	0,001-0,1
	1,7	0,52	berekende	0,23	0,50	0,27		
Hind III	4,4	0,12	waargenome	0,09	0,06	0,29	23,75	<0,001
	4,2	0,46	berekende	0,01	0,11	0,21		
	4,4	0,12	waargenome	0,09	0,06	0,26	23,5	<0,001
	4,0	0,43	berekende	0,01	0,10	0,18		
	4,2	0,46	waargenome	0,29	0,58	0,26	5,0	0,05-0,01
	4,0	0,43	berekende	0,21	0,40	0,18		

FREKWENSIES VAN VERSKILLENDE ALLELES VAN DIE PAH-GEEN

Amerikaanse Kaukasofede populasie							
Allele frekwensie	Genotiefrekwensie				Chi-kwadraat	Som van die Chi kwadrate	Waarskynlikheid (df=2)
		p ²	2pq	q ²			
0,44	waargenome	0,22	0,44	0,33	0,19	7,11	0,01-0,05
0,56	berekende	0,19	0,49	0,32			
0,69	waargenome	0,50	0,39	0,11	0,12	16,75	<0,001
0,31	berekende	0,47	0,43	0,10			
0,47	waargenome	0,28	0,39	0,33	0,86	1,38	0,5
0,53	berekende	0,22	0,50	0,28			
0,59	waargenome	0,44	0,31	0,25	2,02	4,6	0,1
0,41	berekende	0,35	0,48	0,17			
0,38	waargenome	0,13	0,50	0,37	0,46	0,1	0,95
0,62	berekende	0,14	0,48	0,38			
0,67	waargenome	0,44	0,45	0,11	0,01	2,45	0,2-0,3
0,33	berekende	0,45	0,44	0,11			
0,59	waargenome	0,31	0,56	0,13	0,5	11,0	0,001-0,1
0,41	berekende	0,35	0,48	0,17			
0,06	waargenome	0	0,1	0,3	0,54	24,3	<0,001
0,61	berekende	0,004	0,07	0,37			
0,06	waargenome	0	0	0,1	0,8	24,3	<0,001
0,33	berekende	0,004	0,04	0,11			
0,61	waargenome	0,3	0,44	0,1	0,33	5,33	0,1-0,05
0,33	berekende	0,37	0,4	0,11			

Pvu II-, Bgl II- en Hind III-polimorfisme, kan afgelei word dat die genotipefrekwensie van hierdie populasies nie noemenswaardig verskil nie.

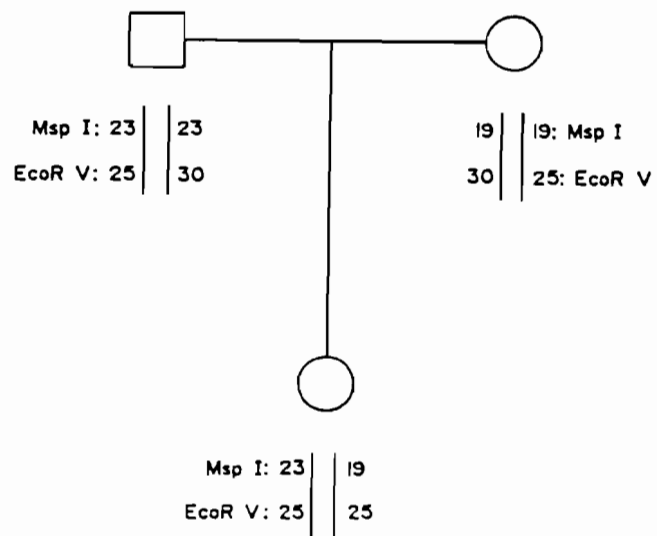
Soos reeds genoem, is die Pvu II-, Bgl II- en Hind III-polimorfisme nie in Hardy-Weinberg-ewewig nie. Hardy-Weinberg-ewewig berus op 'n aantal aannames (Wallace, 1981; Stansfield, 1983):

- Die populasie is oneindig groot en paar ewekansig.
- Daar is geen seleksievoordeel nie.
- Die populasie is geslote.
- Die mutasie van een alleliese toestand na 'n ander vind nie plaas nie.
- Meiose is normaal.

Aangesien van die polimorfismes nie in Hardy-Weinberg-ewewig is nie, kan dit aandui dat die aannames waarop die Hardy-Weinberg-vergelyking berus, nie bevredig is nie. Dit blyk onwaarskynlik te wees aangesien die ander polimorfismes wel in Hardy-Weinberg-ewewig is. Die Pvu II- en Bgl II-polimorfepunt is aan die 5'-kant van die geen geleë en klein eksone kom in dié gebied voor (DiLella et al., 1986a). Gevolglik word swak hibridisering van die radioaktiewe peiler aan die fragmente verkry. Analise van die polimorfe fragmente word hierdeur bemoeilik sodat dit voorkom asof hierdie polimorfepunte nie in Hardy-Weinberg-ewewig is nie. Volgens die gegewens in Tabel 3.2 is die Hind III-polimorfepunt ook nie in Hardy-Weinberg-ewewig nie. Drie Hind III-polimorfefragmente, naamlik 4,4 Kb, 4,2 Kb en 4,0 Kb, kom voor. Aangesien hierdie fragmentgroottes min verskil, is dit moeilik om te onderskei tussen 4,0 Kb- en 4,2 Kb-homosigote, en 4,2 Kb- en 4,4 Kb-homosigote. Soortgelyk is 4,0 Kb- en 4,2 Kb-heterosigote moeilik onderskeibaar van 4,2 Kb- en 4,4 Kb-heterosigote. Foutiewe analise van resultate kan ook verklaar waarom die Hind III-polimorfepunt skynbaar nie in Hardy-Weinberg-ewewig is nie.

RFLP-analise kan gebruik word vir die onderskeid tussen normale en mutante-alleles, mits minstens een ouer heterosigoties ten opsigte van die polimorfepunt is (Davies, 1981). Uit die diagram in Figuur 3.4 is dit duidelik dat indien beide ouers homosigoties vir die Msp I-polimorfepunt is, geen onderskeid tussen die alleles van die vader en tussen die alleles van die moeder getref kan word nie. Indien albei ouers heterosigoties ten opsigte van die EcoR V-polimorfepunt is, kan daar wel tussen die alleles van beide onderskei word. Gevolglik sou dit moontlik wees om te bepaal watter allele die kind van elke ouer geërf het. Met hierdie voorbeeld word dan ook geïllustreer dat 'n groter moontlikheid bestaan om tussen alleles te kan onderskei indien meerdere polimorfepunte aangewend word. In die bespreking wat volg, word die verband tussen die aantal RFLP's en haplotipe-analise aangetoon, asook die bruikbaarheid van RFLP-kombinasies vir diagnose. Die patroon van polimorferestriksiepunte vir enige chromosoom word 'n haplotipe genoem (Weatherall et al., 1985). Die relatiewe voorkoms van 'n bepaalde haplotipe word as die haplotipefrekwensie weergegee. Vir RFLP-analise van die paneel normale Suid-Afrikaanse Kaukasoïede is sewe ensieme gebruik wat elk twee polimorfefragmente gee, asook een ensiem wat drie polimorfe fragmente vorm. Dit volg dat daar 384 ($2^7 \times 3^1$) moontlike verskillende kombinasies van polimorfefragmente is. As voorbeeld vir die berekening van haplotipefrekwensies, is RFLP-kombinasies van die volgende ensieme gebruik: Hind III, EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I, en EcoR V. Hiervoor is daar 24 ($3^1 \times 2^3$) onderskeibare genotipes, elk met 'n karakteristieke haplotipe (Tabel 3.3). Die frekwensie waarmee elke haplotipe voorkom, is die produk van die afsonderlik waargenome allelefrekwensies (Elandt-Johnson, 1971).

Die persentasie heterosigositeit in 'n populasie is weer 'n aanduiding van die fraksie van daardie populasie wat heterosigoties ten opsigte van minstens twee van die haplotipes sal wees. Om hierdie fraksie te bereken, kan elke haplotipe as 'n allele beskou word. Soos reeds genoem, is die genotipefrekwensie van AA, Aa en aa respektiewelik p^2 , $2pq$ en q^2 , indien twee alleles, A en a, met onderskeie frekwensies, p en q, voorkom. Die som van die genotipefrekwensies is een. Die fraksie van die populasie wat homosigoties ten opsigte van die haplotipes (alleles) is,



FIGUUR 3.4 DIE VERDELING VAN ALLELES IN 'N HIPOTETIESE FAMILIE
DNA fragmente wat vorm na vertering met Msp I en EcoR V is as voorbeeld gebruik.

TABEL 3.3 HAPLOTIPES EN DIE PERSENTASIE HETEROSIGOSITEIT VAN DIE PAH-GEEN

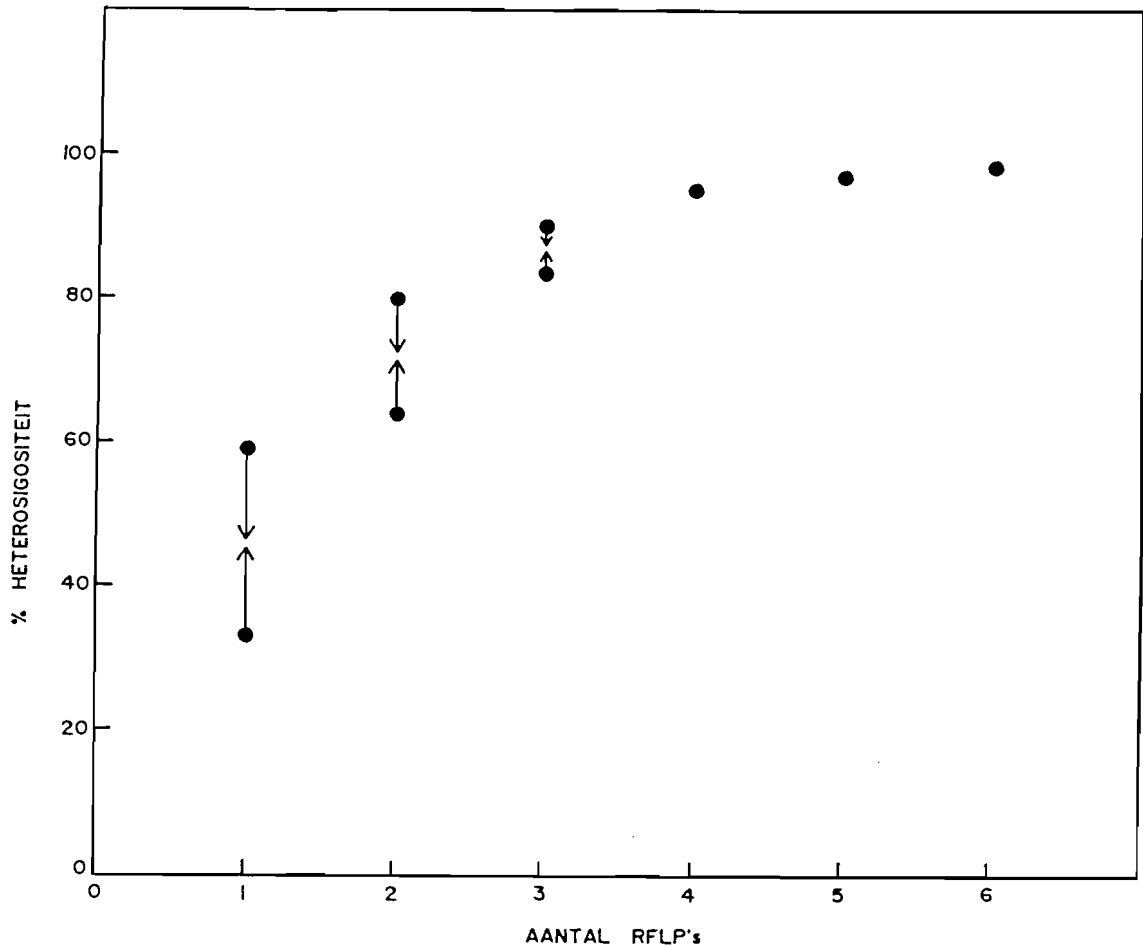
Haplo= tipe= nommer	Hind III		EcoR I/BamH I		Msp I		EcoR V		Spesifieke haplotipes	Haplo= tipefre= kwensie	% Hetero= sigosi= teit
	Allele	Allele= fre= kwensie	Allele	Allele= fre= kwensie	Allele	Allele= fre= kwensie	Allele	Allele= fre= kwensie			
1	4,4	0,12	8,3	0,54	23	0,43	30	0,46	H4,4:EB8,3:M23:E30	0,0128	
2	4,4	0,12	8,3	0,54	23	0,43	25	0,54	H4,4:EB8,3:M23:E25	0,0150	
3	4,4	0,12	8,3	0,54	19	0,57	30	0,46	H4,4:EB8,3:M19:E30	0,0170	
4	4,4	0,12	8,3	0,54	19	0,57	25	0,54	H4,4:EB8,3:M19:E25	0,0199	
5	4,4	0,12	6,5	0,46	23	0,43	30	0,46	H4,4:EB6,5:M23:E30	0,0109	
6	4,4	0,12	6,5	0,46	23	0,43	25	0,54	H4,4:EB6,5:M23:E25	0,0128	
7	4,4	0,12	6,5	0,46	19	0,57	30	0,46	H4,4:EB6,5:M19:E30	0,0145	
8	4,4	0,12	6,5	0,46	19	0,57	25	0,54	H4,4:EB6,5:M19:E25	0,0170	
9	4,2	0,46	8,3	0,54	23	0,43	30	0,46	H4,2:EB8,3:M23:E30	0,0491	
10	4,2	0,46	8,3	0,54	23	0,43	25	0,54	H4,2:EB8,3:M23:E25	0,0577	
11	4,2	0,46	8,3	0,54	19	0,57	30	0,46	H4,2:EB8,3:M19:E30	0,0651	
12	4,2	0,46	8,3	0,54	19	0,57	25	0,54	H4,2:EB8,3:M19:E25	0,0765	
13	4,2	0,46	6,5	0,46	23	0,43	30	0,46	H4,2:EB6,5:M23:E30	0,0418	
14	4,2	0,46	6,5	0,46	23	0,43	25	0,54	H4,2:EB6,5:M23:E25	0,0491	
15	4,2	0,46	6,5	0,46	19	0,57	30	0,46	H4,2:EB6,5:M19:E30	0,0555	
16	4,2	0,46	6,5	0,46	19	0,57	25	0,54	H4,2:EB6,5:M19:E25	0,0651	
17	4,0	0,43	8,3	0,54	23	0,43	30	0,46	H4,0:EB8,3:M23:E30	0,0459	
18	4,0	0,43	8,3	0,54	23	0,43	25	0,54	H4,0:EB8,3:M23:E25	0,0539	
19	4,0	0,43	8,3	0,54	19	0,57	30	0,46	H4,0:EB8,3:M19:E30	0,0609	
20	4,0	0,43	8,3	0,54	19	0,57	25	0,54	H4,0:EB8,3:M19:E25	0,0715	
21	4,0	0,43	6,5	0,46	23	0,43	30	0,46	H4,0:EB6,5:M23:E30	0,0391	
22	4,0	0,43	6,5	0,46	23	0,43	25	0,54	H4,0:EB6,5:M23:E25	0,0459	
23	4,0	0,43	6,5	0,46	19	0,57	30	0,46	H4,0:EB6,5:M19:E30	0,0519	
24	4,0	0,43	6,5	0,46	19	0,57	25	0,54	H4,0:EB6,5:M19:E25	0,0609	94,7

kan dus bereken word deur die kwadraat van die haplotipefrekwensies (allelfrekwensies). Die oorblywende waarde (1 - fraksie homosigote) verteenwoordig dus die fraksie van die populasie wat heterosigoties ten opsigte van die haplotipes sal wees. Hierdie fraksie is gevolglik as 'n persentasie uitgedruk. Indien vier polimorfepunte vir haplotipe-analise aangewend word, is die heterosigositeit bepaal as 94,7% (Tabel 3.3). Verder is minder en meerdere polimorfepunte aan 'n haplotipe gekoppel om te bepaal wat die effek op die persentasie heterosigositeit sal wees. Hierdie resultaat word in Tabel 3.4 weergegee. Met enkel ensieme word deurgaans lae waardes verkry. Die Hind III-polimorfepunt toon die grootste teoretiese persentasie heterosigositeit (58,9%) en die Pvu IIa-polimorfepunt die laagste persentasie heterosigositeit (33,2%). Die ensieme is verder in al die moontlike kombinasies van twee gegroepeer en die teoretiese persentasie heterosigositeit is bereken. Die hoogste waarde is vir die kombinasies Hind III en EcoR V, en Hind III en EcoR I/BamH I verkry. Beide toon 'n teoretiese heterosigositeit van 79,3%. Die kombinasie Xmn I en Pvu IIa toon die laagste waarde, naamlik 64%. Hierdie waarde oorskry nogtans die hoogste waarde verkry vir enkel ensieme. Die verskil in heterosigositeit tussen die kombinasie Hind III en EcoR V en die kombinasie Xmn I en Pvu IIa is 15,3%. Hierdie verskil is wel kleiner as dié vir enkel ensieme, wat 25,7% is. Deur verskeie van die ensieme in groepe van drie te kombineer, is die hoogste teoretiese persentasie heterosigositeit vir die kombinasie Hind III, EcoR V en EcoR I/BamH I bereken, naamlik 89,6%. Hierdie waarde verhoog na 94,7% indien Msp I bygevoeg word om 'n kombinasie van vier ensieme te gee. Vir 'n kombinasie van 5 ensieme is Xmn I by die vorige kombinasies gevoeg en die teoretiese heterosigositeit verhoog verder na 97%. Met die opeenvolgende byvoeging van Pvu IIa word 'n verdere verhoging na 98% waargeneem. Figuur 3.5 is 'n skematiese voorstelling van die data vervat in Tabel 3.4. Hieruit is dit duidelik dat die persentasie heterosigositeit verhoog met die vermeerdering van die aantal RFLP's.

Vir die Amerikaanse populasie is 'n teoretiese haplotipeheterosigositeit van meer as 95% bereken. Die waargenome heterosigositeit was egter slegs 83,3%. Lidsky et al. (1985c) postuleer dat hierdie verskil in waardes moontlik die gevolg daarvan is dat sommige polimorfepunte in

TABEL 3.4 DIE EFFEK VAN DIE AANTAL EN DIE KOMBINASIE RFLP'S OP DIE HETEROSIGOSITEITSWAARDES

Enkel restriksie- ensiem	% Hete= rosigi= teit	Kombinasies met twee restriksie- ensieme	% Hete= rosigi= teit	Kombinasies met drie restriksie- ensieme	% Hete= rosigi= teit	Kombinasies met meerdere restriksie- ensieme	% Hete= rosigi= teit
Hind III	58,9	Hind III, EcoR V	79,3	Hind III, EcoR V, EcoR I/BamH I	89,6	Hind III, EcoR V, EcoR I/BamH I, Msp I	94,7
EcoR V	49,7	Hind III, EcoR I/ BamH I	79,3	EcoR V, EcoR I/ BamH I, Msp I	87,2	Hind III, EcoR V, EcoR I/BamH I, Msp I, Xmn I	97,0
EcoR I/BamH I	49,7	Hind III, Msp I	79,1	EcoR V, EcoR I/ BamH I, Xmn I	86,4	Hind III, EcoR V, EcoR I/BamH I, Msp I, Xmn I, Pvu IIa	98,0
Msp I	49,0	Hind III, Xmn I	77,8	EcoR V, Msp I Xmn I	86,2		
Xmn I	46,1	EcoR V, EcoR I/ BamH I	74,7	Hind III, EcoR V, Msp I	83,9		
Pvu IIa	33,2	EcoR V, Msp I	74,4				
		EcoR I/BamH I, Msp I	74,4				
		EcoR V, Xmn I	72,9				
		EcoR I/BamH I, Xmn I	72,9				
		Hind III, Pvu IIa	72,5				
		Msp I, Xmn I	72,5				
		EcoR V, Pvu IIa	66,4				
		EcoR I/BamH I, Pvu IIa	66,4				
		Msp I, Pvu IIa	65,9				
		Xmn I, Pvu IIa	64,0				



FIGUUR 3.5 DIE EFEEK VAN DIE AANTAL RFLP's OP DIE HETEROSIGOSITEITSWAARDES

Vir die hoogste waardes is deurgaans van die mees informatiewe kombinasie van die ensieme gebruik gemaak. Die laagste waardes verteenwoordig die mins informatiewe kombinasies van ensieme in Tabel 3.4.

1. Pvu IIa en Hind III
2. Xmn I en Pvu IIa, en Hind III en EcoR V
3. Hind III, EcoR V en Msp I, en Hind III, EcoR V en EcoR I/BamH I
4. Hind III, EcoR V, EcoR I/BamH I en Msp I
5. Hind III, EcoR V, EcoR I/BamH I, Msp I en Xmn I
6. Hind III, EcoR V, EcoR I/BamH I, Msp I, Xmn I en Pvu IIa

noue koppeling (linkage disequilibrium) is. Vir die Suid-Afrikaanse populasie is 'n teoretiese haplotipeheterosigositeit, van 97% ten opsigte van die vyf mees informatiewe ensieme bereken. In die paneel normale Suid-Afrikaanse Kaukasoïede is 32 van die 36 individue heterosigoties ten opsigte van haplotipes vir hierdie vyf ensieme, wat 'n waargenome heterosigositeitswaarde van 89% gee.

Uit die persentasie heterosigositeitswaardes van die algemene populasie, kan die waarskynlikheid van voorkoms van twee heterosigotiese ouers, twee homosigotiese ouers, en een homosigotiese en een heterosigotiese ouer bepaal word (Woo, 1984). Die persentasie heterosigositeit is die voorkoms van heterosigote ten opsigte van die haplotipes in die populasie en die persentasie homosigositeit is die voorkoms van homosigote ten opsigte van dieselfde haplotipes. In Tabel 3.5 word die waarskynlikhede van die ouerkombinasies bepaal deur die binomiale uitbreiding: (persentasie heterosigositeit + persentasie homosigositeit)². Hierdie term kan geskryf word as $(p + q)^n$, waar p en q die waarskynlikhede van alternatiewe onafhanklikes is en die term n verteenwoordig die getal benodig sodat al die moontlike kombinasies bevredig kan word. Daar bestaan drie moontlike ouerkombinasies, sodat $n=2$ (Stansfield, 1983). Die persentasie heterosigositeit vir die Hind III-polimorfefragmente in die algemene populasie is 58,9% (Tabel 3.5). Die waarskynlike voorkoms in die populasie van twee heterosigotiese ouers is gevolglik $(58,9\%)^2$ of 34,69%. Indien die haplotipes van die mutante alleles van die ouers bepaal kan word, is totale prenatale diagnose moontlik. Diagnose en uitsluiting van PKU is dus moontlik en amnionsintese kan uitgevoer word. Waar beide ouers homosigoties is (waarskynlikheid $(100\%-58,9\%)^2$, of 16,89%), kan die haplotipes van die mutante alleles van die ouers nie bepaal word nie. Derhalwe is diagnose en uitsluiting van PKU nie moontlik nie en behoort amnionsintese nie uitgevoer te word nie. Die waarskynlikheid van een heterosigotiese en een homosigotiese ouer is $2(58,9\%)(100\%-58,9\%)$ of 48,42%. Die haplotipe van die mutante allele van slegs die heterosigotiese ouer kan bepaal word en gevolglik sal uitsluiting van PKU in 50% van die kinders moontlik wees. Aangesien die waarskynlikheid van hierdie ouerkombinasie 48,42% is, is die algehele waarskynlikheid van resessiewe homosigootuitsluiting 24,21% en kan amnionsintese nogtans

TABEL 3.5 DIE INVLOED VAN MEERDERE ENSIEME EN OUERKOMBINASIE OP DIE WAARSKYNLIKHEID VAN DIAGNOSE

Restriksie- endonukleases	% Hetero- sigositiet		Ouerkombinasie			Totale diagnose
			Heterosigoot x Heterosigoot	Heterosigoot x Homosigoot	Homosigoot x Homosigoot	
Hind III	58,9	Waarskynlikheid	34,69%	48,42%	16,89%	58,9%
		Uitsluiting	+	+/-	-	
		Diagnose	34,69%	(24,21%) (24,21%)	0	
Hind III en EcoR V	79,3	Amniosintese	+	+	-	79,3%
		Waarskynlikheid	62,88%	32,83%	4,29%	
		Uitsluiting	+	+/-	-	
Hind III, EcoR V en EcoR I/BamH I	89,6	Diagnose	62,88%	(16,42%) (16,42%)	0	89,6%
		Amniosintese	+	+	-	
		Waarskynlikheid	80,28%	18,64%	1,08%	
Hind III, EcoR V, EcoR I/BamH I en Msp I	94,7	Uitsluiting	+	+/-	-	94,7%
		Diagnose	80,28%	(9,32%) (9,32%)	0	
		Amniosintese	+	+	-	
Hind III, EcoR V, EcoR I/BamH I, Msp I en Xmn I	97,0	Waarskynlikheid	89,68%	10,04%	0,28%	97,0%
		Uitsluiting	+	+/-	-	
		Diagnose	89,68%	(5,02%) (5,02%)	0	
Hind III, EcoR V, EcoR I/BamH I, Msp I en Xmn I	97,0	Amniosintese	+	+	-	97,0%
		Waarskynlikheid	94,09%	5,82%	0,09%	
		Uitsluiting	+	+/-	-	
Hind III, EcoR V, EcoR I/BamH I, Msp I, Xmn I en Pvu IIa	98,0	Diagnose	94,09%	(2,91%) (2,91%)	0	98,0%
		Amniosintese	+	+	-	
		Waarskynlikheid	96,04%	3,92%	0,04%	
Hind III, EcoR V, EcoR I/BamH I, Msp I, Xmn I en Pvu IIa	98,0	Uitsluiting	+	+/-	-	98,0%
		Diagnose	96,04%	(1,96%) (1,96%)	0	
		Amniosintese	+	+	-	

uitgevoer word. Samevattend kan haplotipe-analise ten opsigte van die Hind III-polimorfepunt alleen, op $34,69\% + 24,21\% = 58,9\%$ van die individue in die Suid-Afrikaanse Kaukasoïede populasie uitgevoer word. Hierdie waarde is in ooreenstemming met die persentasie heterosigositeit wat bereken is vir die Hind III-polimorfepunt. Tabel 3.5 toon verder ook die effek van die aantal RFLP's op die persentasie diagnoseerbare individue. Soos reeds in Tabel 3.4 en Figuur 3.5 getoon, verhoog die persentasie heterosigositeit indien die kombinasie polimorfepunte vermeerder. Aangesien die waarskynlikheid van diagnose deur die persentasie heterosigositeit bepaal word, verhoog die waarskynlikheid van diagnose ook met die aanwending van meer uitgebreide kombinasies van meerdere polimorfepunte.

3.4 SAMEVATTING

In aansluiting by die motivering in Afdeling 4.1 kan die volgende afleidings uit die resultate gemaak word:

- Die RFLP's wat in die Amerikaanse Kaukasoïede populasie voorkom, is ook in die paneel Suid-Afrikaanse Kaukasoïede waargeneem. Verder is geen ander bykomstige RFLP's waargeneem nie.
- Die hoë frekwensies waarmee die RFLP's in die Suid-Afrikaanse populasie voorkom, toon dat hierdie populasie polimorf is ten opsigte van die PAH-lokus. Die frekwensies van die RFLP's is van so 'n aard dat die teoretiese heterosigositeit ten opsigte van vyf polimorfepunte 97% is en die waargenome heterosigositeit ten opsigte van dieselfde polimorfepunte 89% is.
- RFLP-patrone kan aangewend word vir haplotipe-analise van die Suid-Afrikaanse Kaukasoïede populasie. Trouens, daar is bereken dat deur slegs van ses polimorfepunte gebruik te maak, haplotipe-analise moontlik is vir 98% van hierdie populasie.

HOOFSTUK 4

HAPLOTIPE-ANALISE VAN SUID-AFRIKAANSE PKU-FAMILIES

4.1 INLEIDING

Daar is in Afdeling 3.2 bepaal dat die bekende RFLP-patrone aangewend kan word vir haplotipe-analise van die Suid-Afrikaanse Kaukasoïede populasie. Ledley et al. (1985b) het gevind dat dit moontlik is om te onderskei tussen normale en mutante PAH-gene in families met ten minste een aangetaste kind deur identifisering van RFLP-haplotipes wat met die PKU-gene in elke familie assosieer. Hierdie indirekte assosiasie berus op die volgende aannames:

- PKU is 'n resessiewe aangebore toestand, waar die pasiënt een gemuteerde allele van die vader en een gemuteerde allele van die moeder geërf het. Dit impliseer dat:

die vader en die moeder elk oor 'n mutante allele beskik en daarom per definisie draers van die PKU-eienskap is,

dat die gemuteerde allelees onverander oorgedra word.

- Slegs die PAH-allelees in die familie is gemuteerd (klassieke PKU is aan die orde).
- Dit sou moontlik wees om tussen normale en mutante allelees te kan onderskei met behulp van haplotipe-analise.

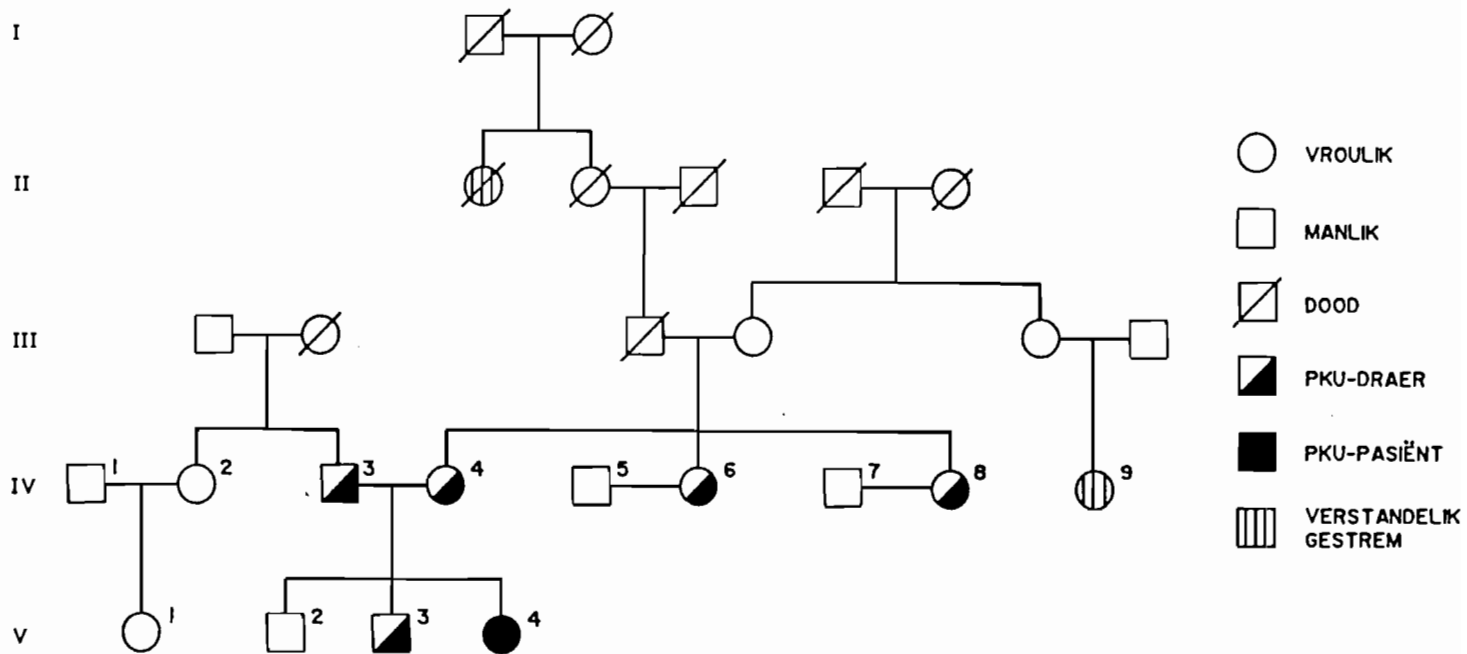
Met die doel om draers van die PKU-eienskap te identifiseer en om die aannames te toets, is agt Suid-Afrikaanse PKU-families aan haplotipe-analise onderwerp. Al die families wat bestudeer is, sluit die ouers en ten minste een aangetaste kind in. Verder bestaan daar geen klaarblyklike verwantskap van die families met mekaar nie. Southern-analise van genomiese DNA van die individue is telkens uitgevoer soos beskryf is in Afdeling 3.1. Aminosuuranalise en organiesesuuranalise is

waar moontlik op die familieledede uitgevoer en die resultaat is in Tabel 5.1 saamgevat.

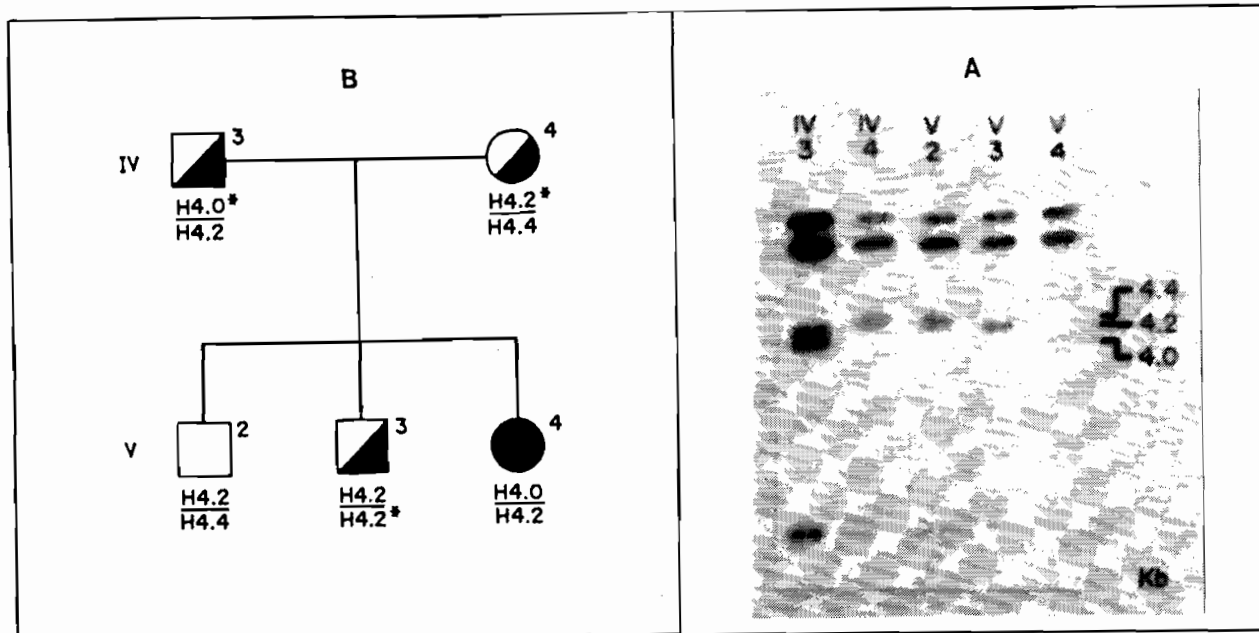
4.2 FAMILIE A

In die kerngesin is daar een aangetaste dogter. Sy was ten tye van die ondersoek 21 jaar oud. Sy is verstandelik erg gestrem, totaal onhanterbaar en baie aggressief. Verder vertoon sy abnormale spierkoördinasie, is nie in staat om self te loop nie en is totaal afhanklik van versorging. Sy is permanent opgeneem in 'n Rooms-Katolieke inrigting en het uiteraard geen skoolopleiding ondergaan nie. Alhoewel sy reeds op 'n vroeë ouderdom in Port Elizabeth as 'n klassieke fenielketonuriepatiënt met Tipe I-hiperfenielalanienemie gediagnoseer is, was sy nooit onder enige dieetbehandeling vir die toestand nie. Sy het donkerblonde hare en blou oë. Beide haar ouers is afstammeling van die Britse Setlaars en hul families is reeds vir 'n aantal geslagte aan die Oos-Kaap gevestig. Volgens die ouers is die aangetaste dogter die enigste bekende PKU-pasiënt in hul onderskeie families. Volgens oorlewering het daar wel in die voorgeslag van die moeder twee gevalle van verstandelik gestremdheid voorgekom. Die oorsaak is egter nooit bepaal nie (Figuur 4.1). Benewens die aangetaste dogter, het die ouers ook twee ouer, fenotipies normale seuns. Hulle was ten tye van die ondersoek onderskeidelik 26 en 24 jaar oud.

Aanvanklik is RFLP-analise op die pasiënt, haar ouers en die fenotipies normale broers uitgevoer. Hiervoor is van die volgende battery ensieme gebruik gemaak: Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I, Xmn I, Pvu II, en Bgl II. Die resultaat van hierdie analise word in Tabel 4.1 saamgevat. 'n Buitengewoon informatiewe erflikheidspatroon van drie Hind III-polimorfefragmente is waargeneem (Figuur 4.2). Soos geïllustreer in Figuur 4.2B, is die vader heterosigoties vir die 4,2 Kb- en 4,0 Kb Hind III-polimorfefragment, terwyl die moeder weer heterosigoties vir die 4,4 Kb- en 4,2 Kb Hind III-fragment is. Soos haar vader, is die PKU-pasiënt heterosigoties vir die 4,0 Kb- en 4,2 Kb Hind



FIGUUR 4.1 UITGEBREIDE STAMBOOM VAN FAMILIE A



FIGUUR 4.2 SOUTHERN-ANALISE VAN DIE HIND III POLIMORFISME IN FAMILIE A

- A. Southern-oordrag van genomiese DNA van die familieleden na vertering met Hind III. Die nommer van elke baan verteenwoordig die nommer van die individu in die stamboom.
- B. Stamboom van Familie A wat ook die onderskeiding van alleles in die familie aandui. Die mutante alleles word deur '*' aangedui.

III-fragment (baan 1 en 5, Figuur 4.2A). Die oudste fenotipies normale seun vertoon weer dieselfde RFLP-patroon as sy moeder. Daarteenoor is die ander fenotipies normale seun homosigoties vir die 4,2 Kb Hind III-fragment (baan 4, Figuur 4.2A).

Met die aanname dat die PKU-pasiënt 'n mutante allele van beide haar ouers geërf het, kan uit die resultate in Figuur 4.2A afgelei word dat die 4,0 Kb Hind III-polimorfisme van die vader in assosiasie met 'n mutante allele voorkom. Aangesien die aangetaste dogter die 4,2 Kb Hind III-polimorfisme slegs van haar moeder kon erf, impliseer dit dat die geassosieerde allele eweneens gemuteerd is. Hiervolgens dui die 4,2 Kb Hind III-fragment van die vader en die 4,4 Kb Hind III-fragment van die moeder op die teenwoordigheid van normale alleles, onderskeidelik. Soos skematies voorgestel in Figuur 4.2B, is dit moontlik om uit hierdie RFLP-analise draers van enigiene van die mutante alleles te identifiseer. Die fenotipies normale jongste seun het inderdaad 'n mutante allele van sy moeder geërf. Dié allele word met 'n 4,2 Kb Hind III-fragment geassosieer; die ander 4,2 Kb Hind III-fragment dui op die teenwoordigheid van 'n normale allele wat hy van sy vader geërf het. Hy is hiervolgens 'n draer van die PKU-eienskap. Die oudste seun het normale PAH-gene van beide ouers geërf en is derhalwe genotipies normaal.

Gedeeltelik informatiewe erflikheidspatrone is verkry na behandeling van die DNA-preparate met die ensiem EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I en Xmn I (Tabel 4.1). Vir die bepaalde gesin was die Pvu II- en Bgl II-polimorfismes egter nie informatief nie, aangesien al die gesinslede volledig òf homosigoties òf heterosigoties vir dié RFLP's is. Dit was wel moontlik om uit die Hind III-polimorfismes en die ander gedeeltelik informatiewe patrone haplotipe-analise op die gesinslede uit te voer (Tabel 4.2). Die doel hiervan was om 'n meer omvattende RFLP-geassosieerde onderskeid tussen die PAH-alleles van die vader en moeder te kan tref, sodanig dat die normale en mutante alleles duidelik onderskeibaar sal wees en daarom geredelik in die nageslag gevolg kan word. Dit is belangrik om te beklemtoon dat die haplotipe-analises telkens op die aannames wat in Afdeling 4.1 gemaak is, gebaseer is. Terwille van uniformigheid is

TABEL 4.1 RFLP-ANALISE VAN PAH-ALLELES: FAMILIE A

Individu	Stamboom Identifi- kasie	RFLP-patroon waargeneem met							
		Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb	Bgl II
Vader	IV-3	4,2/4,0	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6/6	11,5/11,5	3,6/1,7
Moeder	IV-4	4,4/4,2	30/25	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	6/6	11,5/11,5	3,6/1,7
Aangetaste dogter	V-4	4,2/4,0	30/25	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	6/6	11,5/11,5	3,6/1,7
Fenotipes normale oudste seun	V-2	4,2/4,2	30/30	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6/6	11,5/11,5	3,6/1,7
Fenotipes normale jongste seun	V-3	4,4/4,2	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6/6	11,5/11,5	3,6/1,7

TABEL 4.2 HAPLOTIPE-ANALISE: FAMILIE A

Individu	Stamboom Identifi- kasie	Allele	Haplotipe-analise						
			Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb
Vader	IV-3	I*	4,0	25	8,3	19	9,4	6	11,5
		II	4,2	30	6,5	23	6,5	6	11,5
Moeder	IV-4	III*	4,2	30	8,3	19	9,4	6	11,5
		IV	4,4	25	8,3	19	9,4	6	11,5
Aangetaste dogter	V-4	I*	4,0	25	8,3	19	9,4	6	11,5
		III*	4,2	30	8,3	19	9,4	6	11,5
Fenotipes normale oudste seun	V-2	II	4,2	30	6,5	23	6,5	6	11,5
		IV	4,4	25	8,3	19	9,4	6	11,5
Fenotipes normale jongste seun	V-3	II	4,2	30	6,5	23	6,5	6	11,5
		III*	4,2	30	8,3	19	9,4	6	11,5

* Toon mutante allelees

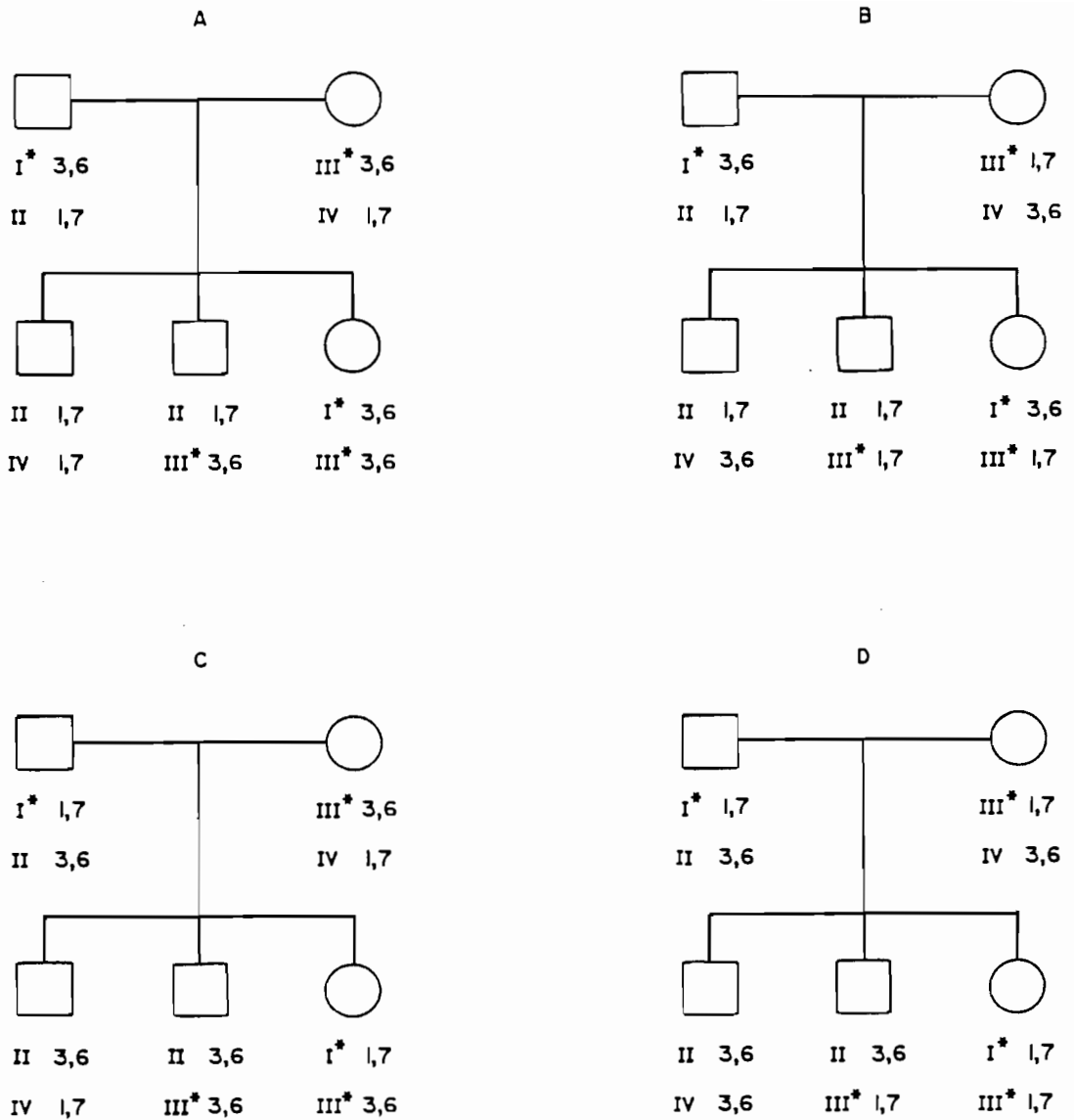
dieselfde notasie gevolg om tussen die ouers se allele te onderskei, naamlik allele I* is die mutante allele wat van die vader geërf is, allele II is die ander en normale PAH-allele van die vader, allele III* is die mutante allele wat van die moeder geërf is, en allele IV is die ander en normale PAH-allele van die moeder. Dit beteken dat die PKU-pasiënt oor haplotipe I* en III* moet beskik. Die onderskeie haplotipes is soos volg uit die gegewens in Tabel 4.1 afgelei:

- i. Soos reeds in Figuur 4.2B geïllustreer, het die PKU-pasiënt die 4,0 Kb- en 4,2 Kb Hind III-geassosieerde-alleles onderskeidelik van haar vader en moeder geërf. Hierdie waardes is derhalwe met haplotipe I* en III*, respektiewelik, geassosieer. Die oorblywende Hind III-polimorfefragmente van die vader en moeder, naamlik die 4,2 Kb- en 4,4 Kb-fragment, is gevolglik aan haplotipe III en IV onderskeidelik gekoppel. Dieselfde prosedure is gevolg ten opsigte van die RFLP-waardes wat na restriksiebehandeling met EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I, en Xmn I verkry is. (Vergelyk Tabel 4.1 en 4.2.).
- ii. Uit die RFLP-waardes wat na EcoR V-behandeling verkry is, is dit onmoontlik om uit die gegewens van die vader, moeder en aangetaste kind alleen tot 'n haplotipeverdeling te kom. Die gegewens wat ten opsigte van die fenotopies normale jongste seun verkry is, het wel haplotipeverdeling moontlik gemaak. Hy is homosigoties ten opsigte van die 30 Kb EcoR V-polimorfisme en uit die ander polimorfismepatrone is reeds bewys dat hy wel allele II van sy vader en allele III* van sy moeder geërf het (Tabel 4.2 en Figuur 4.2). Dit beteken dat die 30 Kb EcoR V-polimorfisme met beide dié allele geassosieerd is. Soos aangetoon in Tabel 4.1, is beide die vader en moeder heterosigoties ten opsigte van die EcoR V-polimorfisme, wat beteken dat die 25 Kb EcoR V-polimorfisme met allele I* van die vader én allele IV van die moeder gekoppel is. Hierdie toekenning klop met die genotipes van die oudste seun en aangetaste dogter.

- iii. Die allele-assosiasie van die twee onafhanklike Pvu II-polimorfismes is voor-die-handliggend, aangesien al die gesinslede homosigoties vir die 6 Kb Pvu IIa- en die 11,5 Kb Pvu IIb-fragment is.

Volgens die resultaat in Tabel 4.1, is al vyf die gesinslede heterosigoties ten opsigte van die Bgl II-polimorfisme. Dit impliseer dat allele I* en allele II van die vader onderskeidelik met òf die 3,6 Kb- en 1,7 Kb-fragment òf die 1,7 Kb- en 3,6 Kb-fragment geassosieer is. Dieselfde geld vir die moeder se allele. Soos in Figuur 4.3 geïllustreer, kan die bogenoemde hipotetiese alleletoekennings tot vier verskillende Bgl II RFLP-kombinasies by die drie kinders lei. Hiervolgens moet die jongste seun homosigoties ten opsigte van die Bgl II-polimorfisme wees wanneer sy aangetaste suster en ouer broer beide heterosigoties is (Figuur 4.3B en 4.3C) en omgekeerd (Figuur 4.3A en 4.3D). Daarteenoor is waargeneem dat al drie kinders, net soos hul ouers, heterosigoties vir die Bgl II-polimorfisme is (Tabel 4.1). Volgens die voorstelling in Figuur 4.3 en die motivering hierbo, is dit onmoontlik dat al vyf die gesinslede heterosigoties vir die bepaalde polimorfisme is. Twee moontlike verklarings kan vir die kortsluiting in die waargenome resultate aangevoer word. Een moontlike verklaring sou wees dat meiotiese oorkruising tussen die allele van òf die vader òf die moeder tot 'n heterosigotiese genotipe vir die jongste seun kan lei, mits 'n oorkruising tussen die Bgl II- en Pvu IIa-punt plaasgevind het (Figuur 4.3B en 4.3C). 'n Alternatiewe verklaring sou wees dat die Bgl II-RFLP's nie korrek bepaal is nie. Soos reeds genoem in Afdeling 3.3 is die Bgl II-polimorfefragment tegnies moeilik identifiseerbaar. Alhoewel Southern-analise na behandeling van die individuele se DNA-preparate met Bgl II herhaal is, is telkens swak hibridiseringspatrone verkry (resultate nie getoon nie). Op grond hiervan is dit meer waarskynlik dat die waargenome Bgl II-RFLP-data nie korrek is nie en derhalwe is die Bgl II-gegevens nie vir haplotipe-analise aangewend nie.

Die volledige haplotipe-analise, soos aangebied in Tabel 4.2, bevestig die resultaat wat in Figuur 4.2 verkry is, naamlik dat die oudste broer genotipies normaal is, en dat die fenotipies normale jongste broer in der daad 'n draer van 'n mutante PKU-allele is. Dié allele het hy van sy



FIGUUR 4.3 ILLUSTRASIE VAN DIE HIPOTETIESE ALLELE-TOEKENNINGS VAN Bgl II-POLIMORFEFRAGMENTE VIR FAMILIE A, INDIEN BEIDE OUERS HETEROSIGOTIES IS

moeder geërf. Onafhanklike aminosuuranalise is in ooreenstemming met hierdie gevolgtrekking (Tabel 5.1 en Afdeling 5.1).

Die twee susters van die PKU-pasiënt se moeder (Figuur 4.1) was beskikbaar vir RFLP-analise. Dieselfde battery ensieme, behalwe Bgl II is hiervoor aangewend (Tabel 4.3). Identiese RFLP-patrone is vir die twee susters en die moeder van die PKU-pasiënt waargeneem. Aangesien hul ouers nie vir hierdie tipe analise beskikbaar was nie, was dit nie moontlik om die haplotipes van die twee susters bo alle twyfel vas te stel nie. Desnieteenstaande dui die merkwaardige ooreenkoms in die drie susters se RFLP-data daarop dat hulle waarskynlik dieselfde PAH-alleles geërf het en dat die twee susters, net soos die moeder van die PKU-pasiënt, wel draers van 'n mutante PAH-geen is. Onafhanklike aminosuuranalise het getoon dat die voorkoms van fenielalanien relatief tot tirosien opvallend hoog in vastende serummonsters van al drie susters was (Tabel 5.1 en Afdeling 5.1). Dit is in ooreenstemming met die afleiding wat uit die DNA-analise gemaak is.

Benewens die enkele PKU-pasiënt en haar vader en moeder, is RFLP-analise op vier bykomende familieleden uitgevoer. Drie is as draers geïdentifiseer, terwyl die PKU-pasiënt se oudste broer genotipies normaal bevind is.

4.3 FAMILIE B

In die kerngesin is daar twee aangetaste kinders en twee fenotipies normale kinders. Ten tye van die ondersoek was die aangetaste dogter 37 jaar oud. Sy is tot 'n geringe mate verstandelik gestrem en het 'n spraakgebrek. Verder het sy praktiese skoolopleiding voltooi en is heeltemal selfversorgend. Sy woon by haar ouers en is as 'n verpleeg-assistent werksaam by 'n hospitaal. Alhoewel sy reeds na geboorte in Port Elizabeth en in die Verenigde Koninkryk as 'n klassieke fenielketonuriepatiënt gediagnoseer is, is dieetbehandeling vir haar toestand eers ongeveer 'n jaar daarna begin. Die dieet is tot die ouderdom van 18 jaar baie streng gevolg. Sy het ligblonde hare en blou oë

TABEL 4.3 RFLP-ANALISE VAN PAH-ALLELES: UITGEBREIDE FAMILIE A

Individu	Stamboom Identi= fikasie	RFLP-patroon waargeneem met						
		Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb
Moeder van PKU- pasiënt	IV-4	4,4/4,2	30/25	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	6/6	11,5/11,5
Oudste suster van moeder	IV-6	4,4/4,2	30/25	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	6/6	11,5/11,5
Jongste suster van moeder	IV-8	N.B.N.	30/25	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	6/6	11,5/11,5

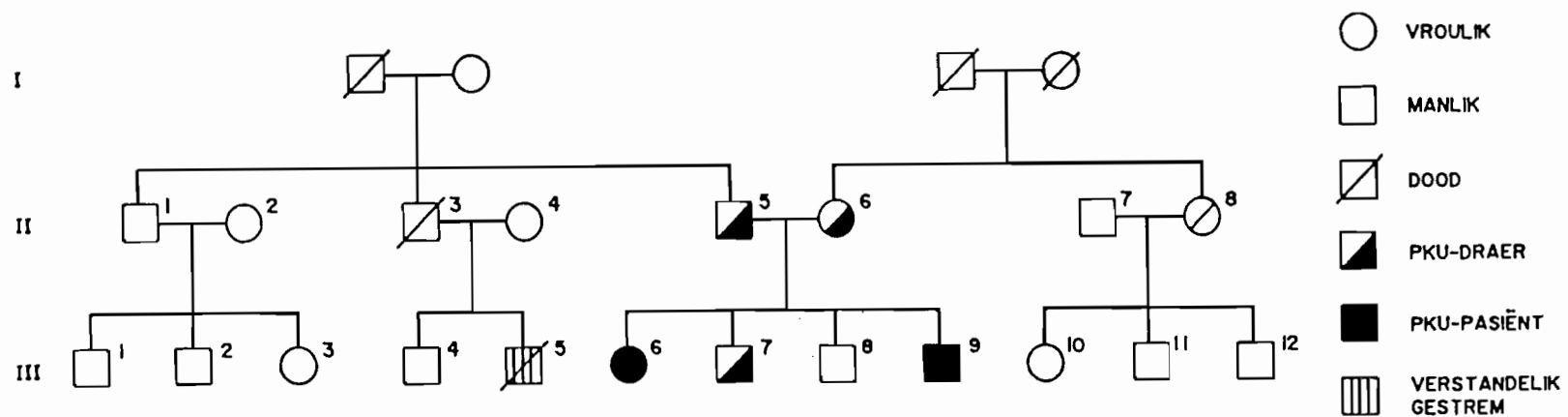
N.B.N. Nie bepaal nie

Die aangetaste seun was tydens die ondersoek 22 jaar oud. Hy is nie verstandelik gestrem nie en het sy skoolloopbaan met universiteitsvrystelling voltooi. Verder is hy 'n goeie sportman en is besig met militêre diensplig. Hy was na geboorte in Port Elizabeth as 'n klassieke fenielketonuriepatiënt met Tipe I-hiperfenielalanienemie gediagnoseer en was sedert diagnose tot 18jarige ouderdom onder streng dieetbehandeling vir sy toestand. Sedertdien monitor hy sy dieet self en pas dit met sukses daagliks aan. Hy het ligblonde hare en blou oë.

Beide ouers is van Britse afkoms en is reeds vir 'n aantal geslagte aan die Oos-Kaap gevestig. Volgens die ouers is hul aangetaste kinders die enigste gediagnoseerde PKU-pasiënte in hul onderskeie families. 'n Broerskind van die vader was wel verstandelik gestrem (Figuur 4.4) maar, die oorsaak is nooit bepaal nie en die kind is op 'n vroeë ouderdom oorlede. Benewens die aangetaste kinders, het die ouers ook twee fenotipies normale seuns. Hulle was ten tye van die ondersoek onderskeidelik 35 en 24 jaar oud.

Aanvanklik is RFLP-analise op beide pasiënte, hul ouers en fenotipies normale jonger broer uitgevoer. Die fenotipies normale ouer broer was nie vir hierdie tipe analise beskikbaar nie. Die volgende battery ensieme is hiervoor gebruik: Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I, Xmn I, Pvu II en Bgl II. Die resultaat van hierdie analise word in Tabel 4.4 saamgevat. In teenstelling met die vorige familie, is geen informatiewe erflikheidspatroon met enige een van die ensieme in hierdie gesin waargeneem nie. Gedeeltelik informatiewe erflikheidspatrone is wel verkry na behandeling van DNA-preparate met die ensieme Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I, Xmn I, Pvu II en Bgl II (Tabel 4.4). Vir hierdie gesin is die Pvu IIb-polimorfepunt egter nie informatief nie, aangesien al die gesinslede volledig homosigoties vir dié RFLP's is. Dit was wel moontlik om uit die gedeeltelik informatiewe patrone haplotipe-analise op die gesinslede uit te voer (Tabel 4.5).

Die onderskeie haplotipes is soos volg uit die gegewens in Tabel 4.4 afgelei:



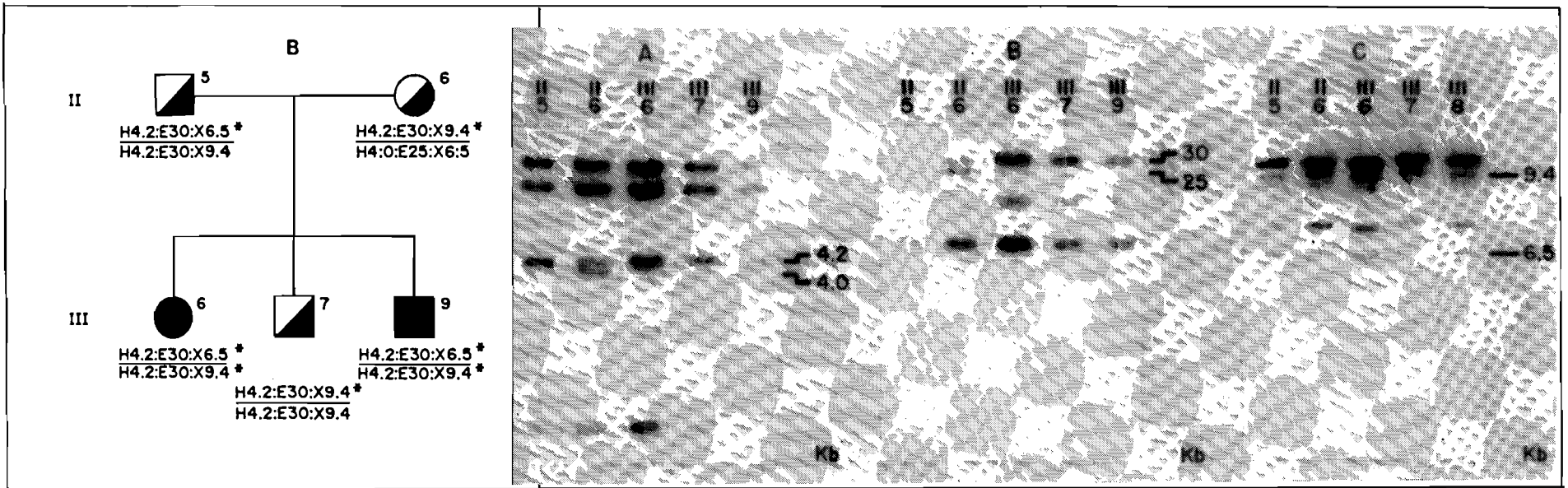
FIGUUR 4.4 UITGEBREIDE STAMBOOM VAN FAMILIE B

- i. Soos in Figuur 4.5 geïllustreer, het elk van die twee PKU-pasiënte 4,2 Kb Hind III- en 30 Kb EcoR V-geassosieerde alleles van die vader en moeder geërf. Hierdie fragmente is derhalwe met haplotipe I* en III*, respektiewelik geassosieer. Die oorblywende fragment, naamlik die 4,2 Kb Hind III- en 30 Kb EcoR V-fragment van die vader die die 4,0 Kb Hind III- en 25 Kb EcoR V-fragment van die moeder, is gevolglik aan haplotipe II en IV gekoppel.

- ii. Uit die RFLP-waardes wat met EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I, Xmn I, Pvu IIa, en Bgl II verkry is, is dit onmoontlik om uit die gegewens van die vader, moeder en aangetaste kinders alleen tot 'n haplotipeverdeling te kom. Dit was wel moontlik uit die bykomende gegewens van die fenotopies normale seun. Die prosedure wat gevolg is om die oorerwingspatrone van die ander gedeeltelik informatiewe polimorfismes in die gesin te bepaal, is in Figuur 4.4 met Xmn I as voorbeeld geïllustreer. Die fenotopies normale seun is homosigoties ten opsigte van die 9,4 Kb Xmn I-fragment. Aangesien hy allele II van sy vader en allele III* van sy moeder geërf het, beteken dit dat beide hierdie alleles met die 9,4 Kb Xmn I-polimorfisme assosieer. Albei ouers is weer heterosigoties ten opsigte van die Xmn I-polimorfisme, wat beteken dat die 6,5 Kb Xmn I-polimorfisme met allele I* van die vader en allele IV van die moeder gekoppel is. Hierdie toekenning klop met die genotipes van die twee PKU-pasiënte (Tabel 4.5).

- iii. Die allele-assosiasie van die Pvu IIb-polimorfisme is voor-die-handliggend, aangesien al die gesinslede homosigoties vir die 11,5 Kb-fragment is.

Die haplotipe-analise, soos aangebied in Tabel 4.5, toon dat die mild-aangetaste seun wel 'n PKU-pasiënt is, aangesien hy dieselfde fenotipe as sy meer aangetaste suster vertoon. Beide het dieselfde mutante PAH-alleles van hul vader en moeder geërf. Verder is getoon dat die fenotopies normale seun 'n draer van die PKU-eienskap is. Hy het 'n mutante PAH-allele van sy moeder geërf. Onafhanklike aminosuuranalise is in ooreenstemming met hierdie gevolgtrekkings (Tabel 5.1).



FIGUUR 4.5 SOUTHERN-ANALISE VAN DIE HIND III, EcoR V EN Xmn I POLIMORFISMES IN FAMILIE B

- A. Southern-oordrag van genomiese DNA van die familieleden met Hind III(A), EcoR V(B) en Xmn I(C). Die nommer van elke baan verteenwoordig die nommer van die individu in die stamboom.
- B. Stamboom van Familie B wat ook die verdeling van alleles in die familie aandui. Die mutante alleles word deur '*' aangedui.

TABEL 4.4 RFLP-ANALISE VAN PAH-ALLELES: FAMILIE B

Individu	Stamboom Identifikasie	RFLP-patroon waargeneem met							
		Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb	Bgl II
Vader	II-5	4,2/4,2	30/30	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	19/6	11,5/11,5	3,6/1,7
Moeder	II-6	4,2/4,0	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6/6	11,5/11,5	3,6/1,7
Aangetaste dogter	III-6	4,2/4,2	30/30	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	19/6	11,5/11,5	3,6/1,7
Aangetaste seun	III-9	4,2/4,2	30/30	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	19/6	11,5/11,5	3,6/1,7
Fenotopies nor= male seun	III-7	4,2/4,2	30/30	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	6/6	11,5/11,5	3,6/3,6

TABEL 4.5 HAPLOTYPE-ANALISE: FAMILIE B

Individu	Stamboom Identifikasie	Allele	Haplotype-analise							
			Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb	Bgl II
Vader	II-5	I*	4,2	30	6,5	23	6,5	19,0	11,5	1,7
		II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5	3,6
Moeder	II-6	III*	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5	3,6
		IV	4,0	25	6,5	23	6,5	6,0	11,5	1,7
Aangetaste dogter	III-6	I*	4,2	30	6,5	23	6,5	19,0	11,5	1,7
		III*	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5	3,6
Aangetaste seun	III-9	I*	4,2	30	6,5	23	6,5	19,0	11,5	1,7
		III*	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5	3,6
Fenotopies nor= male seun	III-7	II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5	3,6
		III*	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5	3,6

* Toon mutante alleleles

TABEL 4.6 RFLP-ANALISE VAN PAH-ALLELES: UITGEBREIDE FAMILIE B

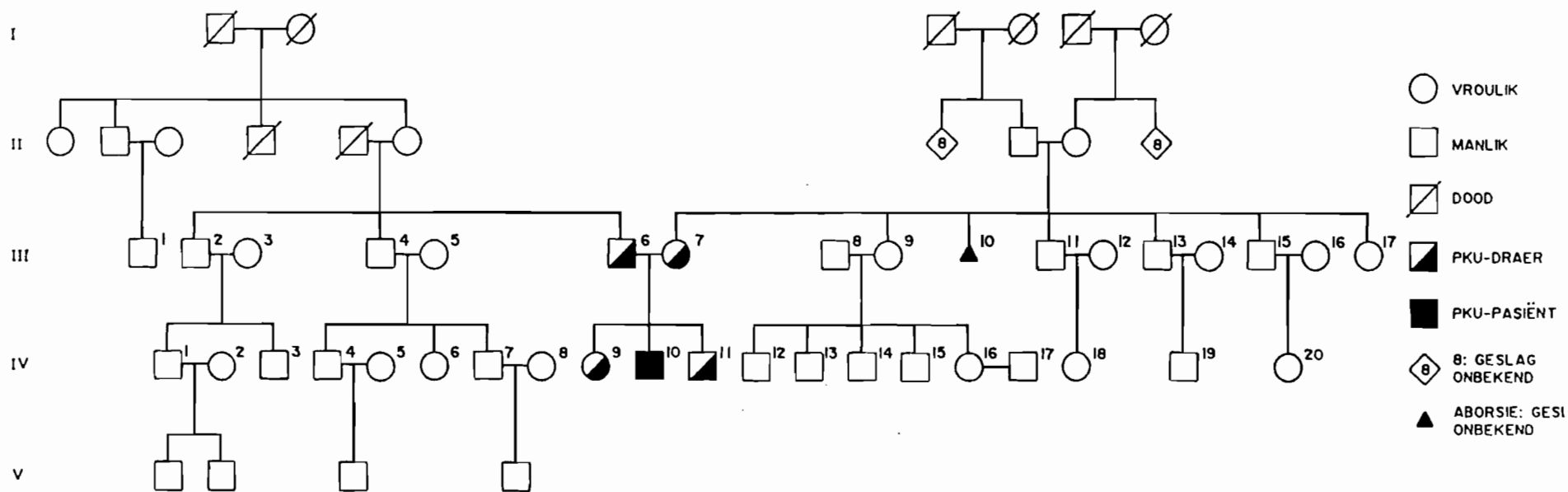
Individu	Stamboom Identifi- fikasie	RFLP-patroon waargeneem met							
		Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb	Bgl II
Moeder van die PKU-pasiënte	II-6	4,2/4,0	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5	3,6/1,7
Suster van moeder	II-8	4,0/4,0	25/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5	3,6/1,7

Die suster van die PKU-pasiënte se moeder was beskikbaar vir RFLP-analise. Dieselfde battery ensieme is hiervoor aangewend (Tabel 4.6). Beide susters is heterosigote vir die EcoR I-, Msp I-, Xmn I én Bgl II-polimorfisme en homosigote vir die Pvu II-polimorfismes. Die RFLP-patrone wat vir die moeder van die PKU-pasiënt en haar suster waargeneem is, verskil ten opsigte van die Hind III- en EcoR V-polimorfisme. Aangesien hul ouers nie vir analise beskikbaar was nie, was dit nie moontlik om die haplotipes van die suster bo alle twyfel vas te stel nie. Desnieteenstaande, is reeds getoon dat die mutante PAH-allele van die moeder met die 4,2 Kb Hind III- en die 30 Kb EcoR V-fragment assosieer (Tabel 4.5). Aangesien haar suster homosigoties vir die 4,0 Kb Hind III- en 25 Kb EcoR V-polimorfisme is, het sy nie die mutante PAH-allele geërf nie en is gevolglik nie 'n draer van die PKU-genotipe nie. Hierdie afleiding is gebaseer op die aanname dat slegs een van die ouers van die twee susters 'n PKU-draer was en dat die betrokke mutante PAH-allele die enigste mutante PAH-allele is wat die susters van hul ouers kon erf.

Benewens die twee PKU-pasiënte en hul vader en moeder, is RFLP-analise dus op twee bykomende familieleden uitgevoer. Die fenotopies normale broer van die PKU-pasiënte is as 'n draer geïdentifiseer, terwyl die suster van die moeder van die PKU-pasiënte genotopies normaal gediagnoseer is.

4.4 FAMILIE C

In die kerngesin is daar een aangetaste kind en twee fenotopies normale kinders. Die aangetaste seun was ten tye van die ondersoek 25 jaar oud. Hy is verstandelik gestrem. Alhoewel hy tot die ouderdom van 18 jaar 'n skool vir verstandelik gestremdes bygewoon het, kon hy geen formele opleiding hanteer nie en het dan ook geen spesiale opleiding deurloop nie. Hy woon by sy ouers en help met die huishouding. Hy is op die ouderdom van 18 maande in Kaapstad as 'n PKU-pasiënt met Tipe I-hiperfenielalaniëmie gediagnoseer en was tot die ouderdom van 8 ½ jaar onder dieetbehandeling. Beide sy ouers is van Keltiese afkoms en is in die Transvaal woonagtig. Volgens die ouers is die aangetaste seun die



FIGUUR 4.6 UITGEBREIDE STAMBOOM VAN FAMILIE C

enigste bekende PKU-pasiënt in hul onderskeie families. Benewens die aangetaste seun, het die ouers ook 'n ouer fenotipies normale dogter van 26 jaar en 'n jonger fenotipies normale seun van 21 jaar (Figuur 4.6).

RFLP-analise is op die gesinslede uitgevoer deur van die volgende battery ensieme gebruik te maak: Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I, Xmn I, Pvu II en Bgl II. Die resultaat van hierdie analise is in Tabel 4.7 saamgevat. Weer eens is geen informatiewe erflikheidspatruon met enige een van die ensieme waargeneem nie. Gedeeltelik informatiewe erflikheidspatrone is wel verkry na behandeling van DNA-preparate met die ensieme Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, Xmn I en Pvu II. Dit was moontlik om uit hierdie gedeeltelik informatiewe patrone haplotipe-analise op die gesinslede uit te voer (Tabel 4.8).

Die onderskeie haplotipes is soos volg uit die gegewens in Tabel 4.7 afgelei:

- i. Die PKU-pasiënt is homosigoties vir die 4,0 Kb Hind III-, en 6,0 Kb- en 11,5 Kb-Pvu II-polimorfisme. Hierdie waardes is daarom met haplotipe I* en III* geassosieer. Die oorblywende waardes, naamlik die 4,2 Kb Hind III-, 6,0 Kb Pvu IIa- en 11,5 Pvu IIb-fragment van die vader en die 4,0 Kb Hind III-, 19,0 Kb Pvu IIa- en 9,1 Kb Pvu II-fragment van die moeder, is onderskeidelik aan haplotipe II en IV gekoppel. Verder het die aangetaste seun, soos vir die Hind III-polimorfisme van Familie A, die 6,5 Kb- en 8,3 Kb EcoR I-polimorfisme van die vader en moeder onderskeidelik geërf. Hierdie fragmente is gevolglik ook met haplotipe I* en III* respektiewelik, geassosieer.
- ii. Uit die RFLP-waardes verkry met EcoR V en Xmn I, was haplotipeverdeling moontlik uit die gegewens van die fenotipies normale kinders. Dieselfde prosedure is gevolg soos vir die EcoR V-RFLP-waardes van Familie A.

TABEL 4.7 RFLP-ANALISE VAN PAH-ALLELES: FAMILIE C

Individu	Stamboom Identi= fikasie	RFLP-patroon waargeneem met					
		Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb
Vader	III-6	4,2/4,0	30/25	8,3/6,5	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5
Moeder	III-7	4,0/4,0	30/25	8,3/8,3	9,4/6,5	19,0/6,0	11,5/ 9,1
Aangetaste seun	IV-10	4,0/4,0	30/25	8,3/6,5	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5
Fenotipies nor= male dogter	IV-9	4,0/4,0	25/25	8,3/6,5	6,5/6,5	19,0/6,0	11,5/ 9,1
Fenotipies nor= male seun	IV-11	4,0/4,0	25/25	8,3/6,5	6,5/6,5	19,0/6,0	11,5/ 9,1

TABEL 4.8 HAPLOTIPE-ANALISE: FAMILIE C

Individu	Stamboom Identi= fikasie	Allele	Haplotype-analise					
			Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb
Vader	III-6	I*	4,0	25	6,5	6,5	6,0	11,5
		II	4,2	30	8,3	9,4	6,0	11,5
Moeder	III-7	III*	4,0	30	8,3	9,4	6,0	11,5
		IV	4,0	25	8,3	6,5	19,0	9,1
Aangetaste seun	IV-10	I*	4,0	25	6,5	6,5	6,0	11,5
		III*	4,0	30	8,3	9,4	6,0	11,5
Fenotipies nor= male dogter	IV-9	I*	4,0	25	6,5	6,5	6,0	11,5
		IV	4,0	25	8,3	6,5	19,0	9,1
Fenotipies nor= male seun	IV-11	I*	4,0	25	6,5	6,5	6,0	11,5
		IV	4,0	25	8,3	6,5	19,0	9,1

* Toon mutante alleles

- iii. In hierdie gesin het die restriksie-ensiem *Msp* I herhaaldelik onvolledige vertering van die DNA-preparate tot gevolg gehad en die resultate kon gevolglik nie vir RFLP-analise aangewend word nie. Verder het swak hibridisering van die peiler met die *Bgl* II-fragment herhaaldelik voorgekom en was die betrokke polimorfefragmente nie duidelik waarneembaar nie. Hierdie gegewens is ook nie vir RFLP-analise aangewend nie.

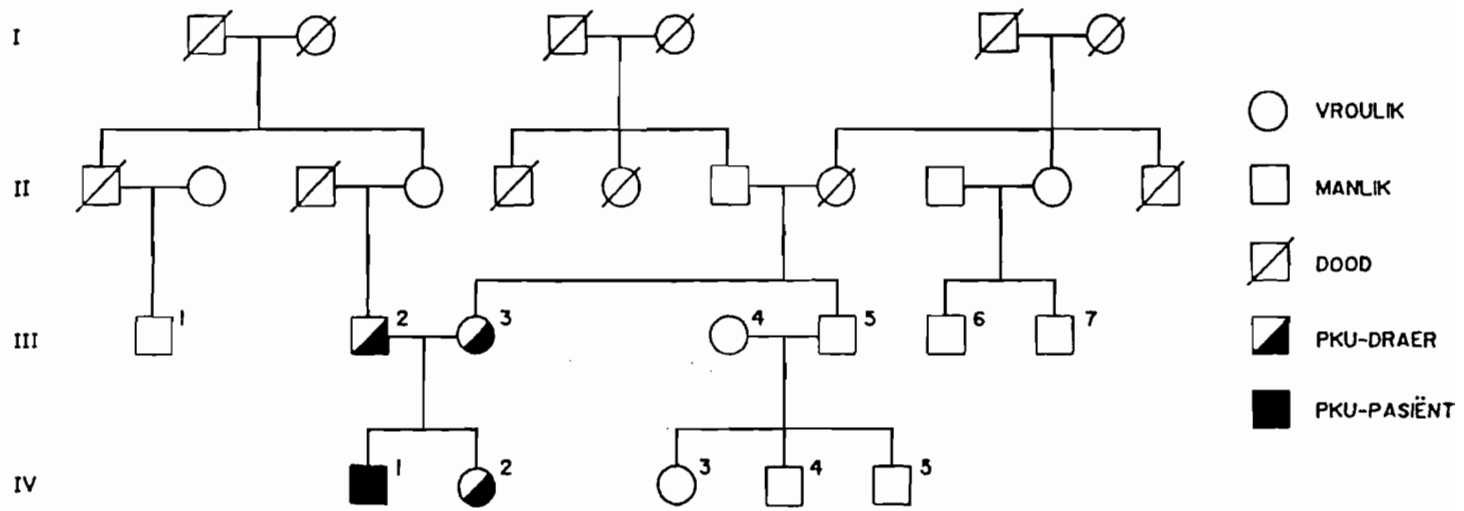
Die haplotipe-analise, soos aangebied in Tabel 4.8, toon dat die fenotopies normale dogter en die fenotopies normale seun beide draers van die PKU-eienskap is. Albei het 'n mutante PAH-allele van hul vader geërf. Onafhanklike aminosuuranalise is in ooreenstemming met hierdie gevolgtrekking (Tabel 5.1).

Samevattend is, benewens vir die PKU-pasiënt en sy ouers, RFLP-analise derhalwe op twee bykomende familieledede uitgevoer. Beide die fenotopies normale suster én broer van die PKU-pasiënt is as draers geïdentifiseer.

4.5 FAMILIE D

In die kerngesin is daar een aangetaste seun en een fenotopies normale dogter. Ten tye van die ondersoek was die aangetaste seun 18 jaar oud. Hy is verstandelik gestrem en doen metaalwerk aan 'n skool vir verstandelik gestremdes. Hy woon privaat en is selfversorgend. Hy is op 10 weke in Zimbabwe as 'n klassieke fenielketonuriepatiënt gediagnoseer en was onder dieetbehandeling tot die ouderdom van 5 jaar. Hy het ook 'n piruvaatkinase-defek (Monteagudo & Kibel, 1986). Beide sy ouers is afstammeling van die Britse Setlaars en is tans in die Transvaal woonagtig. Volgens die ouers is die aangetaste seun die enigste bekende PKU-pasiënt in hul onderskeie families. Behalwe die aangetaste seun, het die ouers ook 'n fenotopies normale 15 jarige dogter (Figuur 4.7).

RFLP-analise is op al die gesinslede uitgevoer. Hiervoor is die volgende battery ensieme gebruik: *Hind* III, *EcoR* V, *EcoR* I gevolg deur *Bam*H I, *Msp* I, *Xmn* I, *Pvu* II en *Bgl* II. Die resultaat van hierdie analise is in Tabel 4.9 saamgevat. Geen informatiewe erflikheidspatroon is vir enige



FIGUUR 4.7 UITGEBREIDE STAMBOOM VAN FAMILIE D

TABEL 4.9 RFLP-ANALISE VAN DIE PAH-ALLELES: FAMILIE D

Individu	Stamboom Identi= fikasie	RFLP-patroon waargeneem met							
		Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb	Bgl II
Vader	III-2	4,2/4,2	30/25	6,5/6,5	19/19	9,4/9,4	19/19	9,1/9,1	1,7/1,7
Moeder	III-3	4,2/4,0	25/25	6,5/6,5	23/19	9,4/6,5	19/6,0	11,5/9,1	3,6/1,7
Aangetaste seun	IV-1	4,2/4,2	30/25	6,5/6,5	19/19	9,4/9,4	19/19	9,1/9,1	1,7/1,7
Fenotopies nor= male dogter	IV-2	4,2/4,2	25/25	6,5/6,5	19/19	9,4/9,4	19/6,0	9,1/9,1	1,7/1,7

TABEL 4.10 HAPLOTIPE-ANALISE: FAMILIE D

Individu	Stamboom Identi= fikasie	Allele	Haplotype-analise							
			Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb	Bgl II
Vader	III-2	I*	4,2	30	6,5	19	9,4	19	9,1	1,7
		II	4,2	25	6,5	19	9,4	19	9,1	1,7
Moeder	III-3	III*	4,2	25	6,5	19	9,4	19	9,1	1,7
		IV	4,0	25	6,5	23	6,5	6,0	11,5	3,6
Aangetaste seun	IV-1	I*	4,2	30	6,5	19	9,4	19	9,1	1,7
		III*	4,2	25	6,5	19	9,4	19	9,1	1,7
Fenotopies nor= male dogter	IV-2	II	4,2	25	6,5	19	9,4	19	9,1	1,7
		III*	4,2	25	6,5	19	9,4	19	9,1	1,7

* Toon mutante allele

een van die ensieme waargeneem nie. Gedeeltelik informatiewe erflikheidspatrone is wel verkry na behandeling van DNA-preparate met Hind III, EcoR V, Msp I, Xmn I, Pvu II en Bgl II. Vir hierdie gesin is die EcoR I-polimorfepunt nie informatief nie, aangesien al die gesinslede volledig homosigoties daarvoor is. Uit die gedeeltelik informatiewe patrone is haplotipe-analise soos volg op die gesinslede uitgevoer.

- i. Soos voorheen in Figuur 4.4 vir Familie B geïllustreer, kan vir hierdie gesin aangetoon word dat die 4,2 Kb Hind III-, 19 Kb Msp I-, 9,4 Kb Xmn I-, 19 Kb en 9,1 Kb Pvu II-, en 1,7 Kb Bgl II-polimorfisme met haplotipe I* en III* van die vader en moeder onderskeidelik assosieer. Die oorblywende fragmente, naamlik die 4,2 Kb Hind III-, 19 Kb Msp I-, 9,4 Kb Xmn I-, 19 Kb Pvu IIa-, 9,1 Kb Pvu IIb-, en 1,7 Kb Bgl II-fragment van die vader en die moeder se 4,0 Kb Hind III-, 23 Kb Msp I-, 6,5 Kb Xmn I-, 6,0 Kb Pvu IIa-, 11,5 Kb Pvu IIb-, en 3,6 Kb Bgl II-fragment, is aan haplotipe II en IV, respektiewelik, gekoppel.
- ii. Vir haplotipeverdeling van die RFLP-waardes verkry met EcoR V, is die gegewens van die fenotipies normale dogter gebruik. Sy is homosigoties ten opsigte van die 25 Kb EcoR V-fragment, wat beteken dat haplotipe I en IV met die 30 Kb- en 25 Kb EcoR V-fragment respektiewelik, assosieer.
- iii. Die allele-assosiasie van die EcoR I-polimorfisme is voor-die-handliggend, aangesien al die gesinslede homosigoties vir die 6,5 Kb-polimorfisme is.

Die haplotipe-analise, soos aangebied in Tabel 4.10, toon dat die fenotipies normale dogter 'n draer van die PKU-eienskap is. Sy het 'n mutante PKU-allele van haar moeder geërf. Hierdie gevolgtrekking stem ooreen met onafhanklike aminosuuranalise (Tabel 5.1). Samevattend is, behalwe vir die PKU-pasiënt, sy vader en sy moeder, RFLP-analise op een bykomende familielid uitgevoer. Die fenotipies normale suster van die PKU-pasiënt is as 'n draer van die PKU-genotipe geïdentifiseer.

4.6 FAMILIE E

In die kerngesin is daar slegs een kind. Die aangetaste dogter was ten tye van die ondersoek ses jaar oud. Sy is verstandelik gestrem en het 'n spraakgebrek. Sy woon by haar ouers en het nog geen skoolopleiding ondergaan nie. Sy is op die ouderdom van 1 jaar en 9 maande as 'n klassieke fenielketonuriepatiënt met Tipe I-hiperfenielalanienemie gediagnoseer en was nie onder dieetbehandeling vir haar toestand nie. Sy het ligblonde hare en blou oë. Die vader is van Britse afkoms en die moeder waarskynlik van Duitse afkoms. Hulle was voorheen in Namibië woonagtig. Beide ouers is Afrikaanssprekend en is in die Noord-Transvaal woonagtig. Volgens die ouers is die aangetaste dogter die enigste bekende PKU-pasiënt in hul onderskeie families.

RFLP-analise is op die pasiënt en haar ouers uitgevoer. Hiervoor is van die volgende battery ensieme gebruik gemaak: Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I, Xmn I, Pvu II en Bgl II. Die resultaat van hierdie analise is in Tabel 4.11 saamgevat. Informatiewe erflikheidspatrone van die Hind III- en EcoR V-polimorfepunt is waargeneem. Beide die vader en die moeder is heterosigoties vir die 4,2 Kb- en 4,0 Kb Hind III- asook vir die 30 Kb- en 25 Kb EcoR V-fragment. In teenstelling hiermee, is die aangetaste dogter homosigoties vir die 4,0 Kb Hind III- en 25 Kb EcoR V-fragment. Uit hierdie resultaat kan afgelei word dat die 4,0 Kb Hind III- en 25 Kb EcoR V-fragment van albei ouers in assosiasie met 'n mutante allele voorkom.

'n Gedeeltelik informatiewe erflikheidspatroon is verkry na behandeling van die DNA-preparate met EcoR I gevolg deur BamH I (Tabel 4.11). Vir hierdie gesin is die Msp I-, Xmn I- en Pvu II-polimorfisme nie informatief nie, aangesien die gesinslede òf homosigoties òf heterosigoties vir dié RFLP's is. Dit is nogtans moontlik om uit die Hind III-, EcoR V- en EcoR I-polimorfisme haplotipe-analise op die gesinslede uit te voer (Tabel 4.12). Die onderskeie haplotipes is soos volg uit die gegewens van Tabel 4.11 afgelei:

TABEL 4.11 RFLP-ANALISE VAN PAH-ALLELES: FAMILIE E

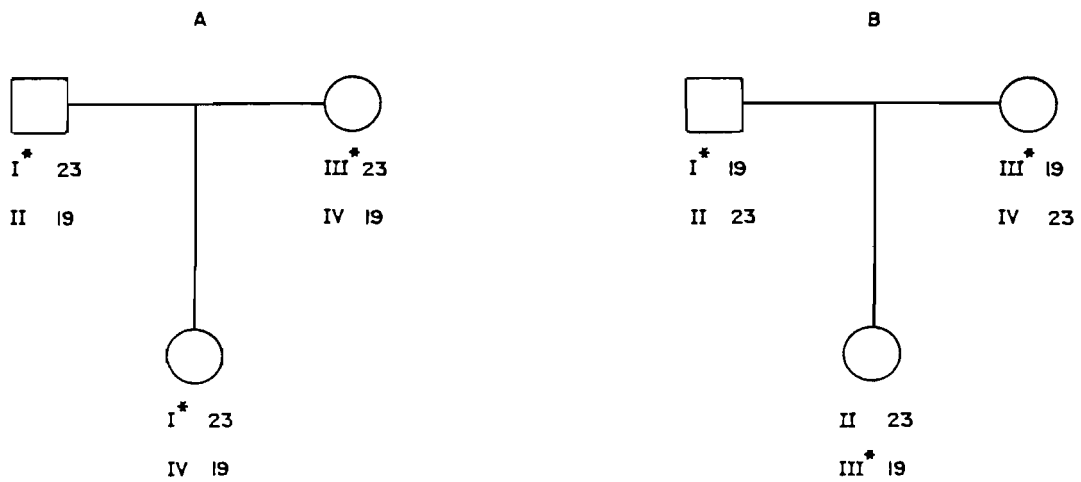
Individu	RFLP-patroon waargeneem met							
	Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb	Bgl II
Vader	4,2/4,0	30/25	6,5/6,5	23/19	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5	3,6/1,7
Moeder	4,2/4,0	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5	3,6/1,7
Aangetaste dogter	4,0/4,0	25/25	8,3/6,5	N.B.N.	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5	3,6/1,7

N.B.N. Nie bepaal nie

TABEL 4.12 HAPLOTIPE-ANALISE: FAMILIE E

Individu	Allele	Haplotype-analise				
		Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Pvu IIa	Pvu IIb
Vader	I*	4,0	25	6,5	6,0	11,5
	II	4,2	30	6,5	6,0	11,5
Moeder	III*	4,0	25	8,3	6,0	11,5
	IV	4,2	30	6,5	6,0	11,5
Aangetaste dogter	I*	4,0	25	6,5	6,0	11,5
	III*	4,0	25	8,3	6,0	11,5

* Toon mutante alleleles



FIGUUR 4.8 HIPOTETIESE ALLELETOEKENNING VAN DIE Msp-POLIMORFEFRAGMENTE VAN FAMILIE E INDIEN BEIDE OUERS HETEROSIGOTIES IS

- i. Soos reeds getoon, het die PKU-pasiënt die 4,0 Kb Hind III- en die 25 Kb EcoR V-geassosieerde allele van haar vader en moeder geërf. Hierdie waardes is derhalwe met haplotipe I* en III* onderskeidelik, geassosieer.
- ii. Die aangetaste dogter is, soos haar moeder, heterosigoties vir die 8,3 Kb- en 6,5 Kb EcoR I-polimorfisme; in teenstelling hiermee is die vader homosigoties. Hieruit is dit duidelik dat allele I* en III* onderskeidelik met die 6,5 Kb- en 8,3 Kb EcoR I-fragment assosieer (Tabel 4.12).
- iii. Die allele-assosiasie van die twee onafhanklike Pvu II-polimorfismes is voor-die-handliggend, aangesien die gesinslede homosigoties vir die 6 Kb Pvu IIa- en die 11,5 Kb Pvu IIb-fragment is.

Volgens die resultaat in Tabel 4.11, is aldrie die gesinslede heterosigote ten opsigte van die Msp I-, Xmn I- en Bgl II-polimorfisme. Met Msp I as voorbeeld, impliseer dit dat allele I* en allele II van die vader onderskeidelik met of die 23 Kb- en 19 Kb-fragment of die 19 Kb- en 23 Kb-fragment geassosieerd is. Dieselfde geld vir die moeder se allele. Soos in Figuur 4.8 geïllustreer, kan bogenoemde hipotetiese alleletoekennings tot twee verskillende RFLP-kombinasies van heterosigositeit by die aangetaste dogter lei. Dieselfde resultaat kan verkry word vir Xmn I en Bgl II. In die afwesigheid van verdere familieledes was dit gevolglik onmoontlik om dié fragmente met spesifieke allele te assosieer. Hierdie resultate is derhalwe nie vir haplotipe-analise benut nie.

4.7 FAMILIE F

In die kerngesin is daar een kind. Die aangetaste seun was 13 jaar oud ten tye van die ondersoek. Hy is verstandelik gestrem en is op die ouderdom van 9 maande as 'n klassieke fenielketonuriepasiënt met Tipe I-hiperfenielalanienemie gediagnoseer. Alhoewel die aangetaste seun onder streng dieetbehandeling was, het dit geen beduidende verligting in sy toestand tot gevolg gehad nie. Hy word deur sy ouers versorg.

Beide sy ouers is van onlangse Britse afkoms en is in die Transvaal woonagtig. Volgens die ouers is die aangetaste seun die enigste bekende PKU-pasiënt in hul onderskeie families. Die vader het wel in 'n vorige huwelik drie fenotipies normale kinders gehad.

RFLP-analise is op die drie gesinslede uitgevoer deur van die volgende batterij ensieme gebruik te maak: Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I, Xmn I, Pvu II en Bgl II. Die resultaat van hierdie analise word in Tabel 4.13 saamgevat. Informatiewe erflikheidspatrone is vir die EcoR V-, Msp I-, Xmn I- en Pvu II-polimorfepunt waargeneem. Uit hierdie resultate kan afgelei word dat die 30 Kb Hind III-, 19 Kb Msp I-, 9,4 Kb Xmn I-, 6,0 Kb Pvu IIa-, en 11,5 Kb Pvu IIb-polimorfisme van die vader in assosiasie met 'n mutante allele voorkom. Op dieselfde wyse is die mutante allele van die moeder met die 30 Kb Hind III-, 23 Kb Msp I-, 6,5 Kb Xmn I-, 6,0 Kb Pvu IIa-, en 11,5 Kb Pvu II-polimorfisme geassosieer. 'n Gedeeltelik informatiewe erflikheidspatroon is na vertering met EcoR I gevolg deur BamH I, verkry. Dit was moontlik om uit die informatiewe en die gedeeltelik informatiewe polimorfisme haplotipe-analise op die gesinslede uit te voer (Tabel 4.14):

- i. Uit die informatiewe polimorfismes is afgelei dat allele I* van die vader met 30 Kb Hind III-, 19 Kb Msp I-, 9,5 Kb Xmn I-, 6,0 Kb Pvu IIa-, en 11,5 Kb Pvu IIb-fragment assosieer, terwyl 30 Kb Hind III-, 23 Kb Msp I-, 6,5 Kb Xmn I-, 6,0 Kb Pvu IIa-, en 11,5 Kb Pvu IIb-fragment met allele III* van die moeder assosieer. Gevolglik is die 25 Kb Hind III-, 19 Kb Msp I-, 9,4 Kb Xmn I-, 19,0 Kb Pvu IIa-, en 9,1 Kb Pvu IIb-fragment aan allele II van die vader gekoppel, terwyl allele IV van die moeder met die 25 Kb Hind III-, 23 Kb Msp I-, 6,5 Kb Xmn I-, 19,0 Kb Pvu IIa-, en 9,1 Kb Pvu IIb-fragment assosieer.
- ii. Die aangetaste kind is homosigoties ten opsigte van die 6,5 Kb EcoR I-polimorfisme en hierdie waardes is dus aan haplotipe I* en III* toegeken. Derhalwe is die ander 6,5 EcoR I/BamH I-fragment van die vader met haplotipe II gekoppel en haplotipe IV met die 8,3 Kb EcoR I/BamH I-fragment van die moeder.

TABEL 4.13 RFLP-ANALISE VAN PAH-ALLELES: FAMILIE F

Individu	RFLP-patroon waargeneem met					
	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb
Vader	30/25	6,5/6,5	19/19	9,4/9,4	19/6,0	11,5/9,1
Moeder	30/25	8,3/6,5	23/23	6,5/6,5	19/6,0	11,5/9,1
Aangetaste seun	30/30	6,5/6,5	23/19	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5

TABEL 4.14 HAPLOTIPE-ANALISE: FAMILIE F

Individu	Allele	Haplotipe-analise					
		EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb
Vader	I*	30	6,5	19	9,4	6,0	11,5
	II	25	6,5	19	9,4	19,0	9,1
Moeder	III*	30	6,5	23	6,5	6,0	11,5
	IV	25	8,3	23	6,5	19,0	9,1
Aangetaste seun	I*	30	6,5	19	9,4	6,0	11,5
	III*	30	6,5	23	6,5	6,0	11,5

* Toon mutante alleles

- iii. Verder is die Hind III- en Bgl II-data nie vir RFLP-analise aangewend nie, aangesien suboptimale resultate verkry is.

4.8 FAMILIE G

In die kerngesin is daar een mildaangetaste dogter en een fenotipies normale dogter. Ten tye van die ondersoek was die aangetaste dogter ses jaar oud. Sy is verstandelik gestrem. Sy is op die ouderdom van 9 maande in Kaapstad as 'n PKU-pasiënt met Tipe I-hiperfenielalanienemie gediagnoseer en is vanaf diagnose onder dieetbehandeling. Die ouers is Engelssprekend en in die Suid-Kaap gevestig. Volgens die ouers is die aangetaste dogter die enigste bekende PKU-pasiënt in hul onderskeie families. Die fenotipies normale dogter was twee jaar oud.

RFLP-analise is op die pasiënt, haar ouers en fenotipies normale suster uitgevoer. Hiervoor is die volgende battery ensieme gebruik: Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I, Xmn I, Pvu II, en Bgl II. Die resultaat van hierdie analise word in Tabel 4.15 saamgevat. Informatiewe erflikheidspatrone is vir die Msp I-, en Xmn I-polimorfepunt waargeneem. Uit hierdie resultaat is afgelei dat die aangetaste dogter die 19 Kb Msp I- en die 9,4 Kb Xmn I-fragment van beide ouers geërf het. Hierdie waardes is derhalwe met haplotipe I* van die vader en haplotipe III* van die moeder geassosieer. Die oorblywende waardes, naamlik die 23 Kb Msp I- en 6,5 Kb Xmn I-polimorfisme van die vader en moeder, is gevolglik aan haplotipe II en IV respektiewelik gekoppel (Tabel 4.16). Aangesien die fenotipies normale dogter, soos haar ouers, heterosigoties ten opsigte van hierdie polimorfepunte is, is dit nie moontlik om tussen die haplotipes van die fenotipies normale dogter te onderskei nie. Gedeeltelik informatiewe erflikheidspatrone is met die ensieme Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I en Bgl II verkry (Tabel 4.15). Vir hierdie gesin is die Pvu II-polimorfismes nie informatief nie, aangesien al die gesinslede volledig homosigoties vir die RFLP's is.

Die onderskeie haplotipes is soos volg verder afgelei:

TABEL 4.15 RFLP-ANALISE VAN PAH-ALLELES: FAMILIE G

Individu	RFLP-patroon waargeneem met							
	Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb	Bgl II
Vader	4,2/4,2	30/30	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6/6	11,5/11,5	3,6/1,7
Moeder	4,2/4,0	30/25	6,5/6,5	23/19	9,4/6,5	6/6	11,5/11,5	3,6/3,6
Aangetaste dogter	4,2/4,2	30/30	8,3/6,5	19/19	9,4/9,4	6/6	11,5/11,5	3,6/3,6
Fenotipies normale dogter	4,2/4,0	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6/6	11,5/11,5	3,6/3,6

TABEL 4.16 HAPLOTYPE-ANALISE: FAMILIE G

Individu	Allele	Haplotype-analise							
		Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb	Bgl II
Vader	I*	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5	3,6
	II	4,2	30	6,5	23	6,5	6,0	11,5	1,7
Moeder	III*	4,2	30	6,5	19	9,4	6,0	11,5	3,6
	IV	4,0	25	6,5	23	6,5	6,0	11,5	3,6
Aangetaste dogter	I*	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5	3,6
	III*	4,2	30	6,5	19	9,4	6,0	11,5	3,6
Fenotipies normale dogter	I*	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5	3,6
	IV	4,0	25	6,5	23	6,5	6,0	11,5	3,6

* Toon mutante alleles

- i. Uit die RFLP-waardes wat met Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, en Bgl II verkry is, is dit moontlik om uit die gegewens van die vader, moeder en aangetaste dogter alleen tot 'n haplotipeverdeling te kom. Die aangetaste dogter is, soos haar vader, homosigoties vir die 4,2 Kb Hind III-, en 30 Kb EcoR V-fragment, terwyl die moeder heterosigoties ten opsigte van hierdie polimorfismes is. Haplotipe I* en III* van die vader en moeder onderskeidelik, is dus geassosieer met die 4,2 Kb Hind III- en 30 Kb EcoR V-fragment. Hieruit is dit duidelik dat allele II van die vader met die 4,2 Kb Hind III- en 30 Kb EcoR V-fragment koppel en die 4,0 Kb Hind III- en 25 Kb EcoR V-fragment van die moeder met haplotipe IV assosieer. Verder is die aangetaste dogter en haar vader heterosigoties ten opsigte van die 8,3 Kb- en 6,5 Kb EcoR I/BamH I-fragment en haar moeder homosigoties vir die 6,5 Kb fragment. Die 8,3 Kb- en 6,5 Kb EcoR I/BamH I-fragment assosieer dus onderskeidelik met haplotipe I* en III*, terwyl haplotipe II en IV elk met 'n 6,5 Kb-fragment koppel.
- ii. Op dieselfde wyse was dit moontlik om 'n onderskeid tussen die alleles van die fenotipies normale dogter te tref. Hiervolgens is allele I* van die vader en allele IV van die moeder aan hierdie dogter toegeken. Deur hierdie toekenning was dit moontlik om die Msp I-, en Xmn I-polimorfisme van die fenotipies normale dogter korrek toe te ken.
- iii. Aangesien al die gesinslede homosigoties vir die 6,0 Kb Pvu IIa- en die 11,5 Kb Pvu IIB-polimorfisme is, is die allele-assosiasie van hierdie polimorfismes voor-die-handliggend.

Die haplotipe-analise, soos aangedui in Tabel 4.16, toon dat die fenotipies normale dogter 'n draer van die PKU-eienskap is. Sy het 'n mutante PAH-allele van haar vader geërf. Samevattend is benewens vir die PKU-pasiënt, haar vader en moeder, RFLP-analise op een bykomende familielid uitgevoer. Die suster van die PKU-pasiënt is as 'n draer van 'n mutante allele geïdentifiseer.

4.9 FAMILIE H

Die kerngesin het een aangetaste seun en een fenotipies normale seun. Die aangetaste seun was ten tye van die ondersoek ses jaar oud. Hy is verstandelik gestrem en ondergaan remediërende skoolopleiding. Hy woon by sy moeder. Hy is op die ouderdom van 13 $\frac{1}{2}$ maande in Johannesburg as 'n PKU-pasiënt met Tipe I-hiperfenielalanienemie gediagnoseer. Tydens die ondersoek was hy onder streng dieetbehandeling vir sy toestand. Hy het blonde hare en blou oë. Alhoewel die ouers Engelssprekend is, stam beide uit ou Kaapse families. Volgens die ouers is die aangetaste seun die enigste bekende PKU-pasiënt in hul onderskeie families. Benewens die aangetaste seun, het die ouers ook 'n fenotipies normale seun van agt jaar.

Aanvanklik is RFLP-analise op die pasiënt, sy ouers en fenotipies normale broer uitgevoer. Hiervoor is van die volgende battery ensieme gebruik gemaak: Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I, Xmn I, Pvu II en Bgl II. Die resultaat van hierdie analise is in Tabel 4.17 saamgevat. 'n Informatiewe erflikheidspatroon is met Xmn I waargeneem. Uit hierdie resultaat kan afgelei word dat die 6,5 Kb Xmn I-polimorfisme van die vader en die moeder in assosiasie met allele I* en III* respektiewelik, voorkom. Allele II en IV assosieer gevolglik met die 9,4 Kb Xmn I-fragment. Aangesien die fenotipies normale seun, net soos sy ouers, heterosigoties vir die 9,4 Kb- en 6,5 Kb Xmn I-polimorfisme is, was dit onmoontlik om uit hierdie gegewens alleen tussen die allele van die fenotipies normale seun te onderskei. Gedeeltelik informatiewe erflikheidspatrone is verkry vir Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, en Msp I. Die Pvu II-polimorfisme was nie informatief nie, aangesien al die gesinslede volledig homosigoties vir dié RFLP's is.

Uit die Xmn I-polimorfisme en die gedeeltelik informatiewe patrone is haplotipe-analise soos volg op die gesinslede uitgevoer (Tabel 4.18):

- i. Dit is moontlik om uit die RFLP-waardes na behandeling van DNA-preparate met Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, en Msp I tot 'n haplotipeverdeling van die vader, moeder

TABEL 4.17 RFLP-ANALISE VAN PAH-ALLELES: FAMILIE H

Individu	Stamboom Identi- fikasie	RFLP-patroon waargeneem met							
		Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb	Bgl II
Vader	II-7	4,2/4,0	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5	3,6/1,7
Moeder	II-8	4,2/4,2	30/30	6,5/6,5	23/23	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5	3,6/1,7
Aangetaste seun	III-9	4,2/4,0	30/25	6,5/6,5	23/23	6,5/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5	3,6/1,7
Fenotipies nor- male seun	III-8	4,2/4,2	30/30	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5	3,6/1,7

TABEL 4.18 HAPLOTIPE-ANALISE: FAMILIE H

Individu	Stamboom Identi- fikasie	Allele	Haplotype-analise				
			Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I
Vader	II-7	I*	4,0	25	6,5	23	6,5
		II	4,2	30	8,3	19	9,4
Moeder	II-8	III*	4,2	30	6,5	23	6,5
		IV	4,2	30	6,5	23	9,4
Aangetaste seun	III-9	I*	4,0	25	6,5	23	6,5
		III*	4,2	30	6,5	23	6,5
Fenotipies nor- male seun	III-8	II	4,2	30	8,3	19	9,4
		III*	4,2	30	6,5	23	6,5

* Toon mutante allelees

en aangetaste seun te kom. Die aangetaste kind is, soos sy vader, heterosigoties ten opsigte van die 4,2 Kb- en 4,0 Kb Hind III-, en 30 Kb- en 25 Kb EcoR V-fragment. In teenstelling hiermee is sy moeder 'n homosigoot vir die 4,2 Kb Hind III-, en 30 Kb EcoR V-fragment. Hieruit is afgelei dat die 4,0 Kb Hind III- en die 25 Kb EcoR V-fragment met allele I* van die vader assosieer en dat haplotipe III* van die moeder met die 4,2 Kb Hind III- en die 30 Kb EcoR V-fragment koppel. Haplotipe II en IV koppel gevolglik met die 4,2 Kb Hind III-, en 30 Kb EcoR V-fragment. Verder is die aangetaste seun en sy moeder homosigoties vir die 6,5 Kb EcoR I/BamH I-, en die 23 Kb Msp I-fragment, terwyl die vader 'n heterosigoot ten opsigte van hierdie polimorfepunte is. Derhalwe assosieer die 6,5 Kb EcoR I/BamH I- en die 23 Kb Msp I-fragment met haplotipe I* en III*. Haplotipe II en IV assosieer gevolglik respektiewelik met die 8,3 Kb EcoR I/BamH I- en die 19 Kb Msp I-fragment van die vader, en die 6,5 Kb EcoR I/BamH I- en die 23 Kb Msp I-fragment van die moeder. Net so was dit moontlik om 'n onderskeid tussen die allele van die fenotipes normale seun te tref. Hiervolgens het hy allele II van die vader en allele III* van die moeder geërf. Aangesien spesifieke Xmn I-fragmente met allele II en III* van die ouers assosieer, is dit gevolglik moontlik om tussen die Xmn I-polimorfisme van die fenotipes normale seun te onderskei (Tabel 4.18).

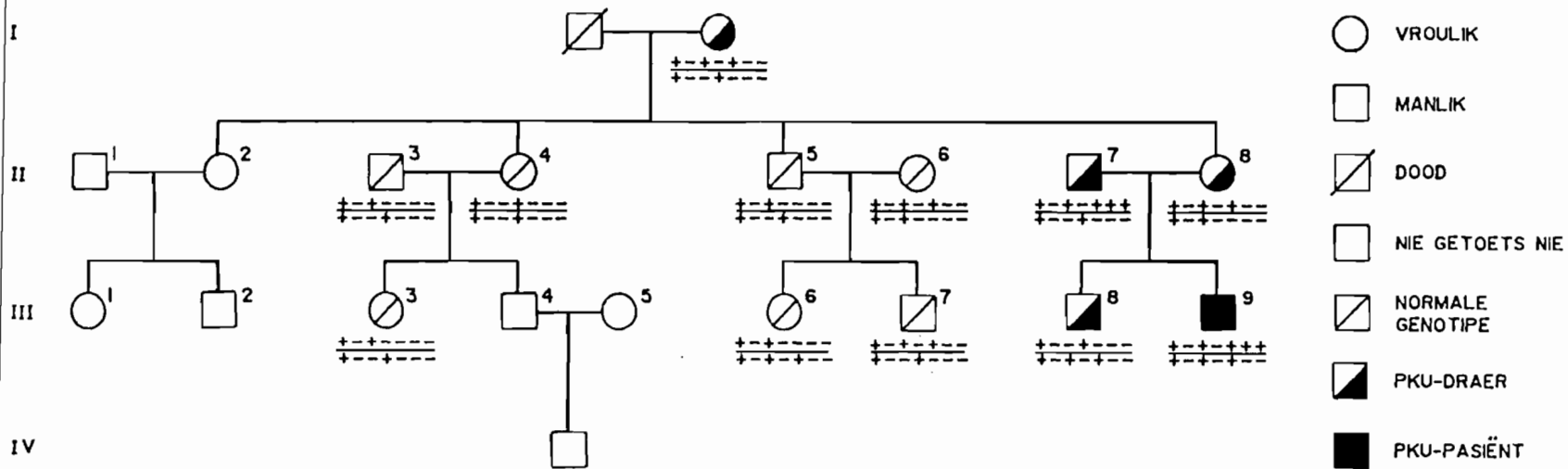
- ii. Die allele-assosiasie van die twee onafhanklike Pvu II-polimorfismes is voor-die-handliggend, aangesien al die gesinslede homosigoties vir die 6,0 Kb Pvu IIa- en die 11,5 Kb Pvu IIb-polimorfisme is.
- iii. Volgens die resultaat in Tabel 4.17 is alvier die gesinslede heterosigoties ten opsigte van die Bgl II polimorfisme. 'n Soortgelyke teenstrydigheid in die waargenome resultate is ook vir Familie A waargeneem en die bespreking wat dáár geld, is ook op hierdie gesin van toepassing. Op grond hiervan is dit weer eens waarskynlik dat die waargenome Bgl II-RFLP-data

nie korrek is nie en hierdie gegewens is gevolglik nie vir haplotipe-analise aangewend nie.

Die haplotipe-analise, soos aangebied in Figuur 4.18, toon dat die fenotopies normale broer van die PKU-pasiënt 'n draer van die PKU-eienskap is. Hy het 'n mutante PAH-allele van sy moeder geërf. Onafhanklike aminosuuranalise is in ooreenstemming met hierdie gevolgtrekking (Tabel 5.1).

Op hul versoek is RFLP-analise op 'n aantal familieleden van die PKU-pasiënt se moeder uitgevoer. Die materne tante en haar gesin, die materne oom en sy gesin, asook die materne grootmoeder van die PKU-pasiënt (Figuur 4.9) was vir RFLP-analise beskikbaar. Dieselfde batterij ensieme, behalwe Bgl II, is hiervoor aangewend (Tabel 4.19). Geen informatiewe erflikheidspatroon is vir hierdie familieleden met enige een van die polimorfismes waargeneem nie. Verder is al die familieleden homosigoties vir die 4,2 Kb Hind III-, die 30 Kb EcoR V- en die 6,0 Kb- en 11,5 Kb Pvu II-polimorfisme. Gedeeltelik informatiewe erflikheidspatrone is wel met die ensieme EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I en Xmn I verkry.

Die onderskeie haplotipes is soos volg uit die gegewens in Tabel 4.19 afgelei (Tabel 4.20): Met die aanname dat die moeder van die PKU-pasiënt 'n mutante allele van een van haar ouers geërf het, kan uit die resultaat afgelei word dat die 6,5 Kb EcoR I-, die 23 Kb Msp I-, en die 6,5 Kb Xmn I-polimorfisme van die materne grootmoeder van die PKU-pasiënt in assosiasie met 'n mutante allele voorkom. Die allele-assosiasie van die Hind III-, EcoR V- en Pvu II-polimorfisme is voor-die-handliggend, aangesien die materne grootmoeder en die moeder van die PKU-pasiënt beide homosigoties vir dieselfde polimorfismes is. Aangesien die materne grootvader van die PKU-pasiënt nie vir hierdie tipe analise beskikbaar was nie, was dit nie moontlik om bo alle twyfel vas te stel dat die materne grootmoeder van die PKU-pasiënt wel 'n draer van 'n mutante allele is nie. Onafhanklike aminosuuranalise is wel in ooreenstemming met die afleiding dat die materne grootmoeder van die



FIGUUR 4.9 VERKORTE STAMBOOM VAN DIE MATERNE FAMILIE VAN DIE PKU-PASIËNT

TABEL 4.19 RFLP-ANALISE VAN PAH-ALLELES: MATERNE FAMILIE VAN DIE PKU-PASIËNT

Individu	Stamboom Identi- fikasie	RFLP-patroon waargeneem met						
		Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb
Moeder van die PKU- pasiënt	II-8	4,2/4,2	30/30	6,5/6,5	23/23	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5
Moeder van moeder	I-2	4,2/4,2	30/30	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5
Suster van moeder	II-4	4,2/4,2	30/30	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	6,0/6,0	11,5/11,5
Swaer van moeder	II-3	4,2/4,2	30/30	8,3/6,5	23/19	9,4/9,4	6,0/6,0	11,5/11,5
Susterskind (dogter)	III-3	4,2/4,2	30/30	8,3/6,5	23/29	9,4/9,4	6,0/6,0	11,5/11,5
Broer van moeder	II-5	4,2/4,2	30/30	8,3/6,5	23/19	9,4/9,4	6,0/6,0	11,5/11,5
Skoonsuster van moeder	II-6	4,2/4,2	30/30	6,5/6,5	23/23	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5
Broerskind (dogter)	III-6	4,2/4,2	30/30	6,5/6,5	23/23	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5
Broerskind (seun)	III-7	4,2/4,2	30/30	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5

TABEL 4.20 HAPLOTIPE-ANALISE: MATERNE FAMILIE VAN DIE PKU-PASIËNT

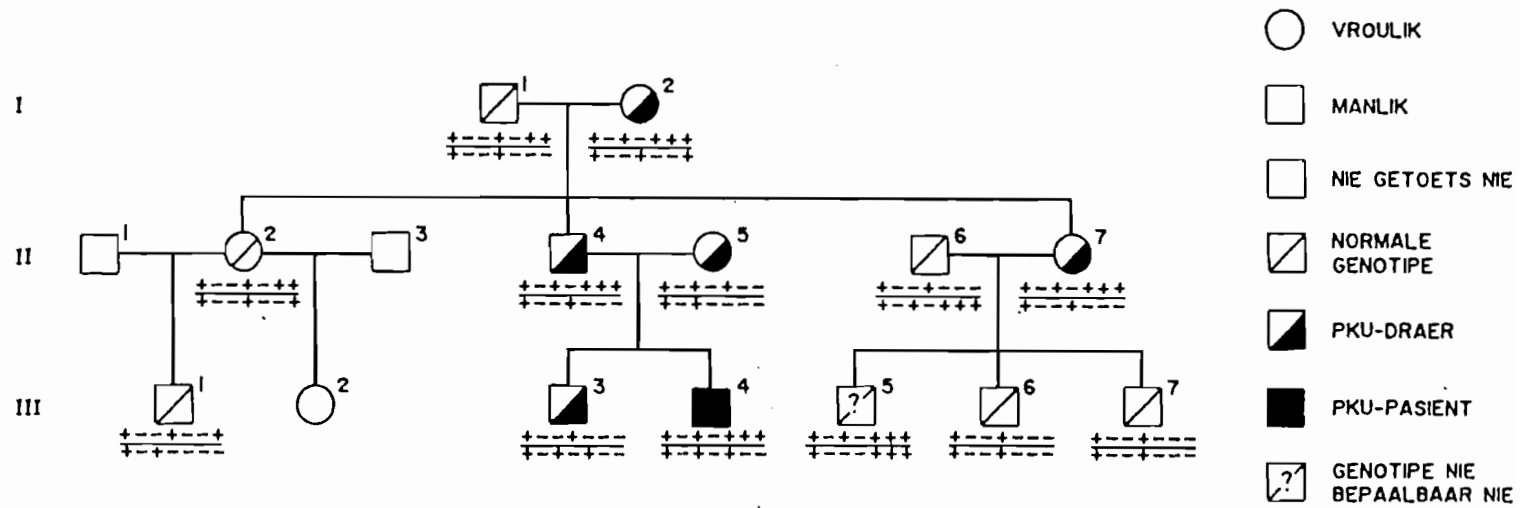
Individu	Stamboom Identi- fikasie	Allele	Haplotype-patroon						
			Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb
Moeder van moeder	I-2	III *	4,2	30	6,5	23	6,5	6,0	11,5
		II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5
Suster van moeder	II-4	II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5
		II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5
Swaer van moeder	II-3	V	4,2	30	6,5	23	9,4	6,0	11,5
		II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5
Susterskind (dogter)	III-3	V	4,2	30	6,5	23	9,4	6,0	11,5
		II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5
Broer van moeder	II-5	V	4,2	30	6,5	23	9,4	6,0	11,5
		II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5
Skoonsuster van moeder	II-6	III	4,2	30	6,5	23	6,5	6,0	11,5
		V	4,2	30	6,5	23	9,4	6,0	11,5
Broerskind (dogter)	III-6	V	4,2	30	6,5	23	9,4	6,0	11,5
		III	4,2	30	6,5	23	6,5	6,0	11,5
Broerskind (seun)	III-7	III	4,2	30	6,5	23	6,5	6,0	11,5
		II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5

*Vertoon mutante allele

PKU-pasiënt 'n draer van die PKU-eienskap is (Tabel 5.1) en dus oor 'n mutante PAH-allele beskik.

Die haplotipeverdeling van die PKU-pasiënt se materne tante en haar gesin, asook van die materne oom en sy gesin, is uit die gedeeltelik informatiewe patrone volgens die prosedure wat vir die kerngesin gevolg is, afgelei (Tabel 4.20). Daar is reeds vir die kerngesin getoon dat die 6,5 Kb XmnI-polimorfisme van die moeder van die PKU-pasiënt met die mutante PAH-allele assosieer. Aangesien beide haar broer en suster homosigoties vir die 9,4 Kb Xmn I-polimorfisme is, het albei 'n normale PAH-allele van hul ouers geërf en is dus nie draers van die PKU-eienskap nie. Met die aanname dat beide die swaer en skoonsuster van die moeder van die PKU-pasiënt normale PAH-alleles besit, kan afgelei word dat die kinders in die onderskeie gesinne ook nie draers van die PKU-eienskap is nie. Onafhanklike aminosuuranalise is in ooreenstemming met hierdie gevolgtrekkings (Tabel 5.1). Die familieverband, die haplotipe patroon, asook die status van die familieledede, is opsommenderwys in Figuur 4.9 weergegee.

RFLP-analise is ook op 'n aantal familieledede van die PKU-pasiënt se vader uitgevoer. Die paterne tantes en hul gesinne, asook die paterne grootouers van die PKU-pasiënt, was beskikbaar vir RFLP-analise (Figuur 4.10). Hiervoor is die volgende battery ensieme aangewend: Hind III, EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I, Xmn I en Pvu II. Die resultaat van hierdie analise word in Tabel 4.21 saamgevat. Geen informatiewe erflikheidspatroon is vir die paterne grootouers en die vader van die PKU-pasiënt waargeneem nie. Aangesien die vorige eggenoot van die paterne ouer tante van die pasiënt nie beskikbaar was vir RFLP-analise nie, is vir hierdie gesin ook geen informatiewe erflikheidspatrone waarneembaar nie. Informatiewe erflikheidspatrone is wel vir die PKU-pasiënt se paterne jonger tante en haar gesin met Hind III, EcoR V, Msp I, en Xmn I waargeneem. Gedeeltelik informatiewe erflikheidspatrone is vir al die familieledede waargeneem. Daarteenoor is die Pvu II-polimorfisme vir al die familieledede nie informatief nie, aangesien almal volledig homosigoties vir die RFLP's is.



FIGUUR 4.10 VERKORTE STAMBOOM VAN DIE PATERNE FAMILIE VAN DIE PKU-PASIENT

TABEL 4.21 RFLP-ANALISE VAN PAH-ALLELES: PATERNE FAMILIE VAN DIE PKU-PASIENT

Individu	Stamboom Identifi- fikasie	RFLP-patroon waargeneem met						
		Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb
Vader	II-4	4,2/4,0	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5
Vader van vader	I-1	4,2/4,0	30/25	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	6,0/6,0	11,5/11,5
Moeder van vader	I-2	4,2/4,0	25/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5
Suster van vader	II-2	4,2/4,0	25/25	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	6,0/6,0	11,5/11,5
Susterskind	III-1	4,2/4,2	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/9,4	6,0/6,0	11,5/11,5
Suster van vader	II-6	4,2/4,0	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5
Swaer van vader	II-7	4,2/4,0	30/25	8,3/6,5	23/19	9,4/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5
Susterskind	III-5	4,0/4,0	25/25	8,3/6,5	23/23	6,5/6,5	6,0/6,0	11,5/11,5
Susterskind	III-6	4,2/4,2	30/30	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	6,0/6,0	11,5/11,5
Susterskind	III-7	4,2/4,2	30/30	8,3/8,3	19/19	9,4/9,4	6,0/6,0	11,5/11,5

TABEL 4.22 HAPLOTIPE-ANALISE: PATERNE FAMILIE VAN DIE PKU-PASIENT

Individu	Stamboom Identi- fikasie	Allele	Haplotype-patroon						
			Hind III	EcoR V	EcoR I/ BamH I	Msp I	Xmn I	Pvu IIa	Pvu IIb
Vader van vader	I-1	VI	4,0	25	8,3	19	9,4	6,0	11,5
		II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5
Moeder van vader	I-2	I*	4,0	25	6,5	23	6,5	6,0	11,5
		VII	4,2	25	8,3	19	9,4	6,0	11,5
Suster van vader	II-2	VI	4,0	25	8,3	19	9,4	6,0	11,5
		VII	4,2	25	8,3	19	9,4	6,0	11,5
Susterskind (seun)	III-1	VII	4,2	25	8,3	19	9,4	6,0	11,5
		IV	4,2	30	6,5	23	9,4	6,0	11,5
Suster van vader	II-6	I*	4,0	25	6,5	23	6,5	6,0	11,5
		II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5
Swaer van vader	II-7	II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5
		I	4,0	25	6,5	23	6,5	6,0	11,5
Susterskind (seun)	III-5		4,0	25		23	6,5	6,0	11,5
			4,0	25	8,3/6,5	23	6,5	6,0	11,5
Susterskind (seun)	III-6	II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5
		II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5
Susterskind (seun)	III-7	II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5
		II	4,2	30	8,3	19	9,4	6,0	11,5

Die onderskeie haplotipes is soos volg uit die gegewens in Tabel 4.21 afgelei:

- i. Uit die RFLP-waardes wat met EcoR V, EcoR I gevolg deur BamH I, Msp I en Xmn I verkry is, is dit moontlik om uit die gegewens van die vader en die grootouers van die PKU-pasiënt tot 'n haplotipeverdeling te kom. Die paterne grootvader is, soos sy seun (vader van die PKU-pasiënt), heterosigoties vir die 30 Kb- en 25 Kb Hind III-fragment terwyl die paterne grootmoeder homosigoties vir die 25 Kb Hind III-fragment is. Aangesien die haplotipepatrone van die vader van die PKU-pasiënt reeds bepaald is, kan gesien word dat die 25 Kb Hind III-fragment van die paterne grootmoeder met haplotipe I* koppel en die 30 Kb Hind III-fragment van die paterne grootvader met haplotipe II. Verder is die paterne grootmoeder en die vader van die PKU-pasiënt beide heterosigoties ten opsigte van die EcoR I/BamH I-, Msp I- en Xmn I-polimorfisme. Daarenteen is die grootvader van die PKU-pasiënt homosigoties vir die 8,3 Kb EcoR I/BamH I-, 19 Kb Msp I- en 9,4 Kb Xmn I-fragment. Hieruit is dit duidelik dat die 6,5 Kb EcoR I/BamH I-, 23 Kb Msp I- en 6,5 Kb Xmn I-fragment van die paterne grootmoeder met allele I* assosieer en die 8,3 Kb EcoR I/BamH I-, 19 Kb Msp I- en 9,4 Xmn I-fragment van die paterne grootvader met allele II assosieer. Uit die gegewens van die paterne grootvader, paterne grootmoeder en vader van die PKU-pasiënt alleen, is dit nie moontlik om die Hind III-fragment aan spesifieke allele te koppel nie. Die allele-assosiasie van die Pvu II-polimorfisme is voor-die-handliggend, aangesien al die gesinslede homosigoties ten opsigte van die polimorfefragmente is.
- ii. Daar is reeds vir die kerngesin getoon dat die 6,5 Kb EcoR I/BamH I-, die 23 Kb Msp I-, en die 6,5 Kb Xmn I-polimorfisme met die mutante allele van die vader van die PKU-pasiënt assosieer. Aangesien die paterne oer tante van die PKU-pasiënt homosigoties is vir die 8,3 Kb EcoR I/BamH I-, die 19 Kb Msp I-, en die 9,4 Kb Xmn I-polimorfisme het sy normale PAH-alleles van haar ouers geërf (Tabel 4.22). Hierdie paterne oer tante is heterosigoties ten opsigte van die 4,2 Kb- en 4,0 Kb Hind III-fragment, terwyl

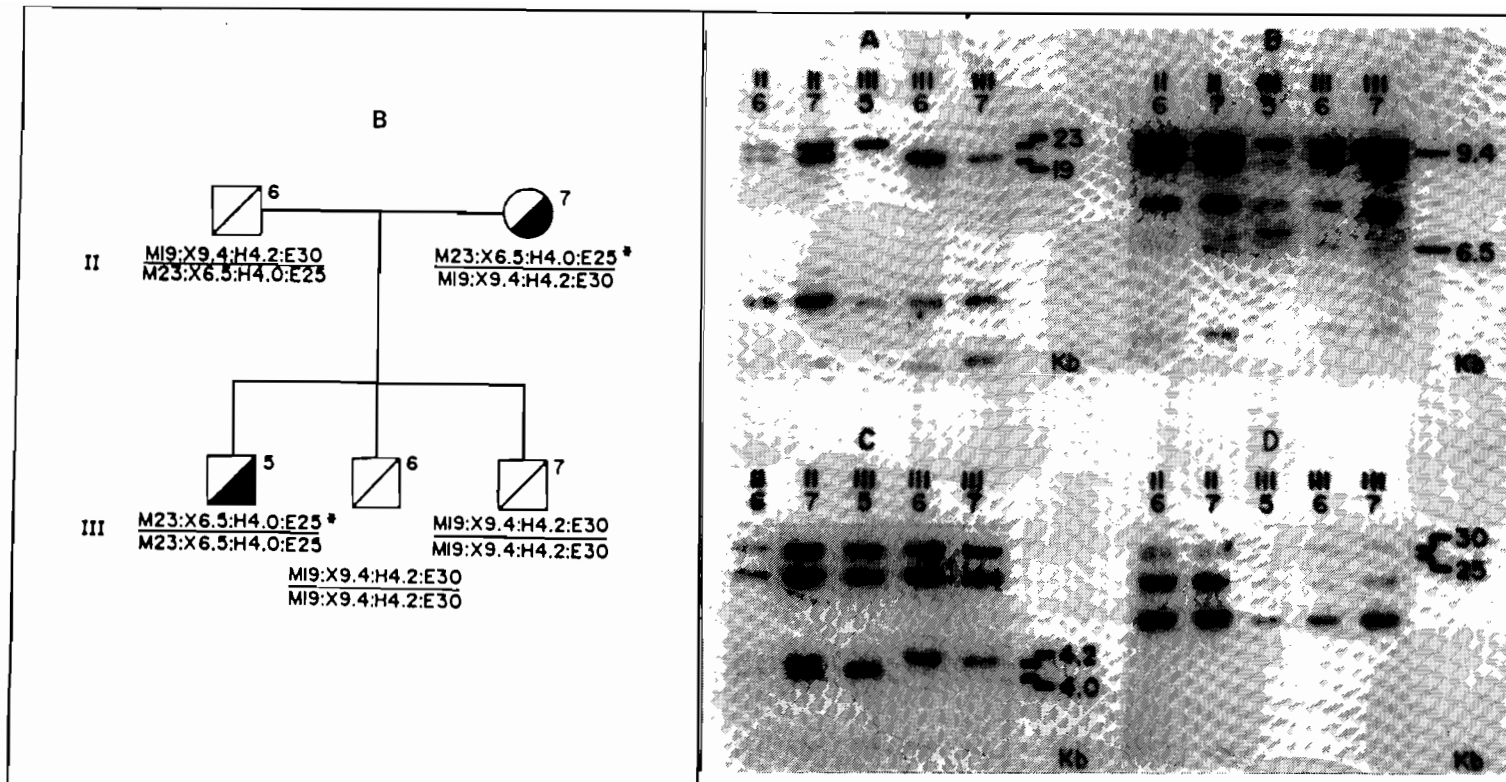
haar seun homosigoties vir die 4,2 Kb Hind III-fragment is. Die 4,2 Kb Hind III-fragment van die seun assosieer gevolglik met allele IV van sy moeder. Die seun is heterosigoties vir die 30 Kb- en 25 Kb Hind III-, die 8,3 Kb- en 6,5 Kb EcoR I/BamH I-, en 23 Kb- en 19 Kb Msp I-fragment. Daarenteen is sy moeder (paterne ouer tante van die PKU-pasiënt) homosigoties ten opsigte van die 25 Kb Hind III-, 8,3 EcoR I/BamH I-, en 19 Kb Msp I-fragment. Gevolglik assosieer die 25 Kb Hind III-, 8,3 Kb EcoR I/BamH I- en 19 Kb Msp I-fragment van die seun met allele IV van sy moeder. Allele-assosiasie van die Xmn I- en Pvu II-polimorfisme is voor-die-handliggend aangesien beide homosigote is.

- iii. Die vader van die PKU-pasiënt en sy jonger suster se RFLP-data stem ooreen (Tabel 4.21) en uit die haplotipeverdeling kan afgelei word dat sy ook die mutante PAH-allele van haar moeder geërf het (Tabel 4.22). Hierdie paterne jonger tante van die PKU-pasiënt en haar gesin vertoon informatiewe erflikheidspatrone vir die fragmente verkry deur Hind III-, EcoR V-, Msp I- en Xmn I-vertering. Beide ouers in hierdie kerngesin is heterosigote, terwyl die oudste seun homosigoties vir die 4,0 Kb Hind III-, 25 Kb EcoR V-, 23 Kb Msp I-, en 6,5 Kb Xmn I-fragment is en die ander twee seuns homosigoties ten opsigte van die 4,2 Kb Hind III-, 30 Kb EcoR V-, 19 Kb Msp I-, en 9,4 Kb Xmn I-fragment is (Figuur 4.11A). Allele I en IV van die vader en moeder, onderskeidelik, assosieer dus met die 4,2 Kb Hind III-, 30 Kb EcoR V-, 19 Kb Msp I-, en 9,4 Kb Xmn I-fragment. Allele II en III* koppel gevolglik aan die 4,0 Kb Hind III-, 25 Kb EcoR V-, 23 Kb Msp I-, en 6,5 Kb Xmn I-fragment (Figuur 4.11B). Verder is die ouers en die oudste seun heterosigoties ten opsigte van die EcoR I/BamH I-polimorfisme, terwyl die ander twee seuns homosigoties vir die 8,3 Kb EcoR I/BamH I-fragment is (Figuur 4.11C). Daar is reeds getoon dat die twee jonger seuns allele I en IV van hul ouers geërf het en dus assosieer die 8,3 Kb EcoR I/BamH I-fragment met hierdie alleles. Daar is ook getoon dat die oudste seun allele II en III* van sy ouers geërf het. Hiervolgens behoort hy homosigoties ten opsigte van die 6,5 Kb EcoR I/BamH I-fragment te wees. In teenstelling hiermee is 'n 8,3 Kb- en 'n 6,5 Kb EcoR I/BamH

I-fragment waargeneem (Figuur 4.11C) en geen allele-assosiasie is moontlik nie. Hierdie teenstrydigheid in die resultate word volledig in Afdeling 5.3 bespreek. Die allele-assosiasie van die Pvu II-polimorfisme is voor-die-handliggend aangesien al die gesinslede homosigoties ten opsigte van die fragmente is.

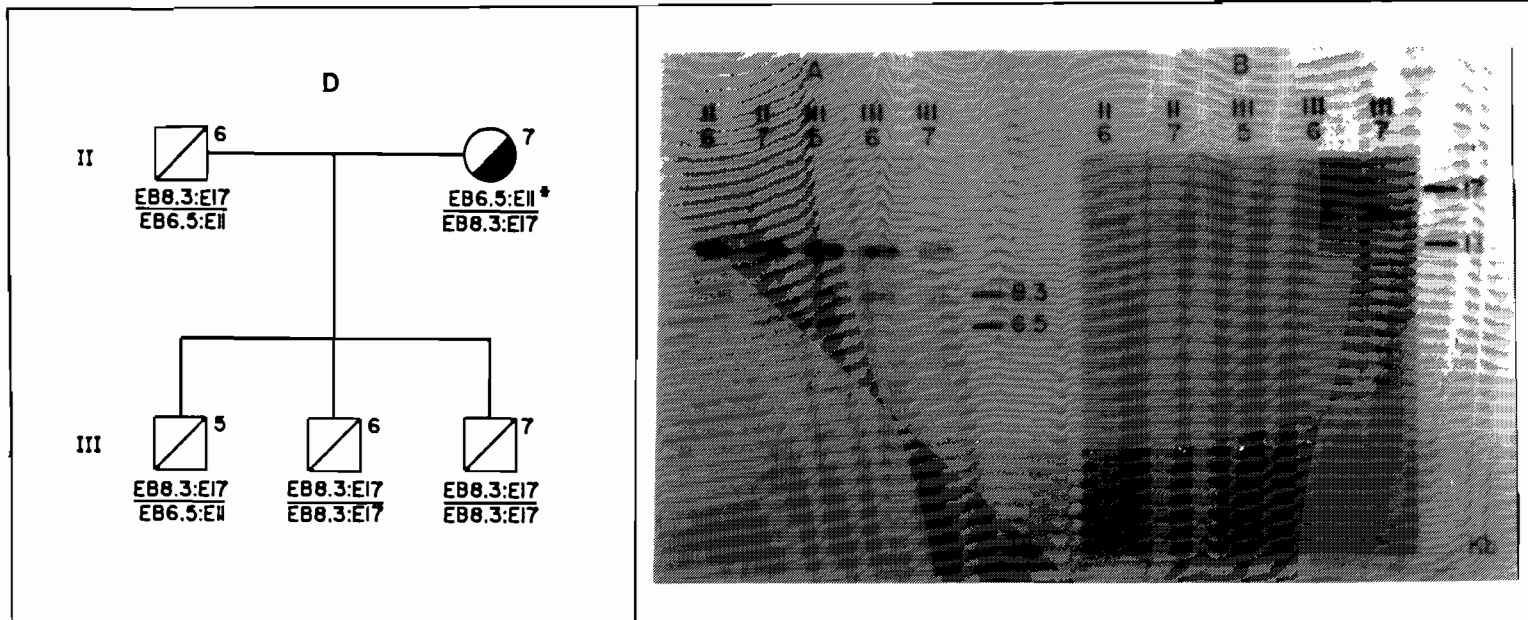
Die volledige haplotipe-analise, soos aangebied in Tabel 4.22, toon die volgende:

- i. Met die aanname dat die vader van die PKU-pasiënt 'n mutante allele van een van sy ouers geërf het, is getoon dat die mutante allele van die vader van die PKU-pasiënt met 'n allele van sy moeder assosieer. Sy is dus 'n draer van die PKU-eienskap. Die grootvader van die PKU-pasiënt is volgens die aanname nie 'n draer van die PKU-eienskap nie. Onafhanklike aminosuuranalise is in ooreenstemming met hierdie afleiding (Tabel 5.1).
- ii. Die paterne ouer tante van die PKU-pasiënt het normale PAH-alleles van haar ouers geërf en is gevolglik nie 'n draer van die PKU-eienskap nie. Haar seun sal dus ook nie 'n draer van die PKU-eienskap wees nie, indien aangeneem word dat sy vader normale PAH-alleles besit. Hierdie afleidings is in ooreenstemming met onafhanklike aminosuuranalise (Tabel 5.1).
- iii. Die paterne jonger tante van die PKU-pasiënt is 'n draer van die PKU-eienskap. Sy het 'n mutante PAH-allele van haar moeder geërf. Die twee jonger seuns van hierdie tante het beide normale PAH-allele geërf, terwyl die draerstatus van die oudste seun nie bepaal kon word nie. Onafhanklike aminosuuranalise op vastende serummonsters van die gesinslede is in ooreenstemming met die draerstatus van die gesinslede, behalwe vir die oudste seun wat vir hierdie analise grenswaardes vertoon het (Tabel 5.1). Om die draerstatus van die oudste seun te bepaal, is die gesinslede aan



FIGUUR 4.11 SOUTHERN-OORDRAG VAN DIE POLIMORFISMES VAN DIE PATERNE JONGSTE TANTE VAN DIE PKU-PASIËNT EN HAAR GESIN

- A. Southern-oordrag van genomiese DNA van die gesinslede verteer met Msp I(A), Xmn I(B), Hind III(C) en EcoR V(D). Die nommer van elke baan verteenwoordig die nommer van die individu in die stamboom.
- B. Stamboom van die gesin wat ook die verdeling van alleles in die gesin aandui. Die mutante alleles word deur '*' aangedui.



- C. Southern-oordrag van genomiese DNA van die gesinslede verteer met EcoR I(A) en EcoR I/BamH I(B). Die nommer van die baan verteenwoordig weer eens die nommer van die individu in die stamboom.
- D. Stamboom van die gesin wat ook die verdeling van alleles in die gesin aandui. Die mutante alleles word deur '*' aangedui.

'n fenilalanienbeladingstoets onderwerp en die resultaat daarvan word in Afdeling 5.1 voorgehou.

Samevattend is, benewens die PKU-pasiënt en sy ouers, RFLP-analise op 18 bykomende familielede uitgevoer. Hiervan is vier individue as draers van die PKU-eienskap geïdentifiseer, terwyl 13 individue nie draers van die PKU-eienskap is nie. Die status van een familielid kon nie bepaal word nie.

4.10 SAMEVATTING

In hierdie hoofstuk is agt PKU-families aan haplotipe-analise onderwerp. 'n Totaal van 53 individue is in die studie ingesluit. Hiervan is nege PKU-pasiënte. Benewens vir die ouers van die PKU-pasiënte, wat volgens die aannames vervat in Afdeling 4.1, verpligte draers van die PKU-eienskap is, is 12 individue geïdentifiseer om draers van die PKU-eienskap te wees. Verder is 15 individue as genotipes normaal gediagnoseer. Die status van een individu (H III-5) is nie bepaal nie en word in Hoofstuk 5 verder toegelig. Die haplotipe-, organiesesuur- en aminosuurdata wat vir die verskillende families verkry is, word in Hoofstuk 5 saamgevat en daaruit word enkele afleidings gemaak oor die haplotipeverspreiding in die PKU-families asook die verband tussen die fenotipe en genotipe van die aangetaste individue.

HOOFSTUK 5

BESPREKING

5.1 SAMEVATTENDE DATA VAN

HAPLOTIPE- EN AMINOSUURANALISE VAN DIE PKU-FAMILIES

Met behulp van RFLP-analise is die haplotipe-patrone van individue in agt PKU-families bepaal (Hoofstuk 4). Die voorkoms van die haplotipe-patrone in elke familie het die identifisering van draers van die PKU-eienskap moontlik gemaak. Die haplotipe-patrone asook die gevolglike status van die familieledede in hierdie ondersoek is in Tabel 5.1 weergegee. Die haplotipetoewysing is volgens Woo, soos in Afdeling 2.2.1 beskryf. Bykomend tot hierdie data, is standaard organiesesuuranalise op urienmonsters (Erasmus et al., 1985) en aminosuuranalise (op 'n Carlo Erba 3A29 aminosuuranaliseerder) op serummonsters van vastende individue uitgevoer³ en 'n verhouding van die konsentrasie fenielalanien tot tirosien is bepaal (Tabel 5.1). Oor die algemeen dui waardes van 0,08 en hoër op draers van die PKU-eienskap, terwyl waardes van 0,06 en laer op nie-draers van die PKU-eienskap dui met grensgevalle wat tussen die waardes 0,06 en 0,08 voorkom (Figuur 5.1). 'n Geringe wisseling van hierdie waardes word wel binne gesinsverband waargeneem. So kan daar uit Tabel 5.1 waargeneem word dat vir Familie C individu IV-II, met 'n waarde van 0,076, 'n draer van die PKU-eienskap is, terwyl vir Familie H individu III-3, met 'n waarde van 0,074, nie 'n draer van die PKU-eienskap is nie.

Uit die gegewens in Tabel 5.1 sal twee verdere aspekte ontwikkel word:

³ Organiesesuuranalise en aminosuuranalise is gedoen in samewerking met J.H. Ueckermann en L.J. Mienie, Departement Biochemie, PU vir CHO, Potchefstroom, 2520

TABEL 5.1 HAPLOTYPE-, ORGANIESESUUR- EN AMINOSUURANALISE:
8 SUID-AFRIKAANSE PKU-FAMILIES

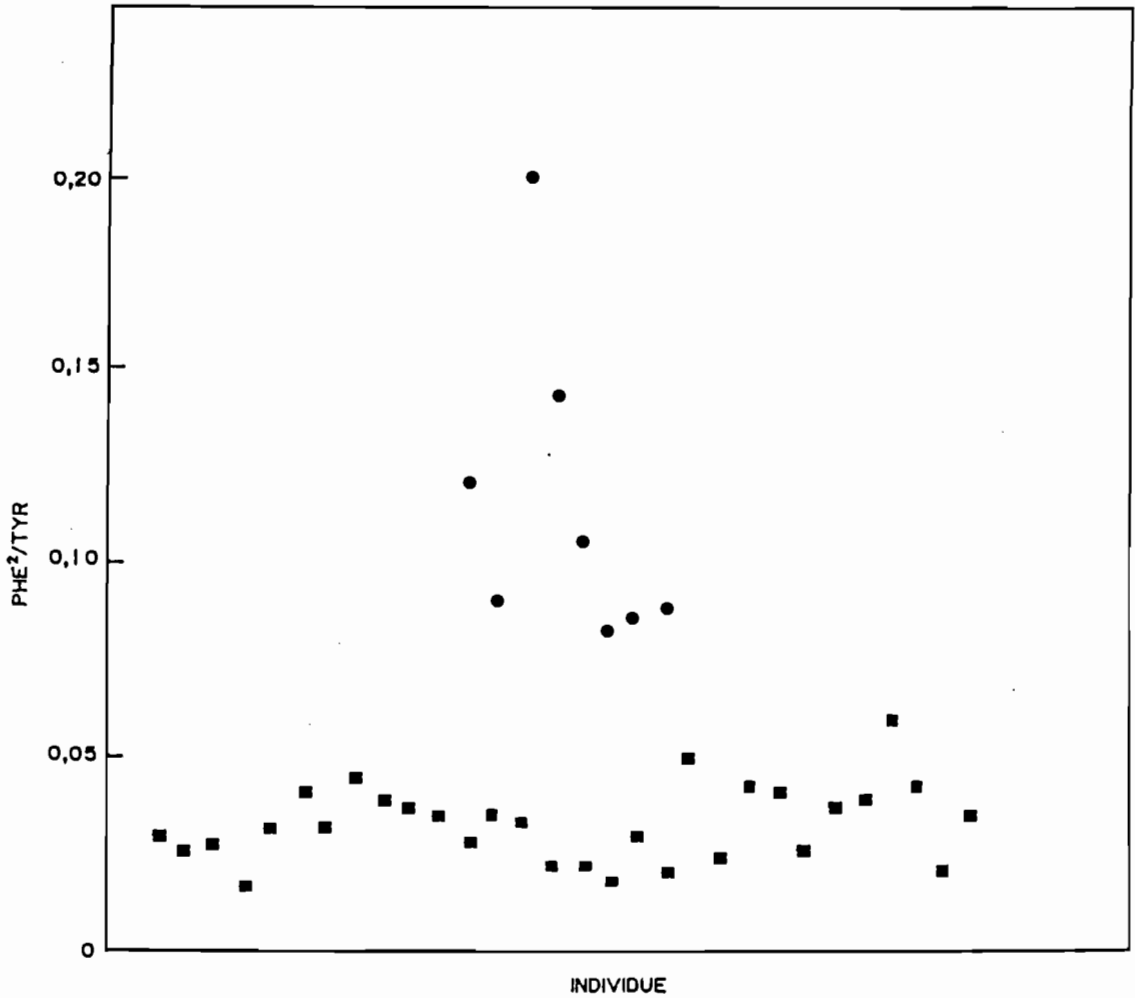
Familie= lid	Status	Haplo- type- patroon	Haplo= type toe= wysing	Organiesesuur= analise (finale diagnose*)	Aminosuuranalise			Status van individu
					phe ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)	tyr ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)	phe ² /tyr	
A IV-3	Vader	+ - - + - + + + - - + - + -	2 3	normaal	0,075	0,064	0,087	Draer
A IV-4	Moeder	+ - - + - + - + - - + - + +	1 12	normaal	0,076	0,065	0,088	Draer
A V-2	Normale seun	+ - - + - + - + - - + - + +	3 12	normaal	0,057	0,051	0,064	Nie-draer
A V-3	Normale seun	+ - - + - + - + - - + - + -	3 1	normaal	0,068	0,057	0,081	Draer
A V-4	Aangetaste dogter	+ - - + - + + + - - + - + -	2 1	Tipe I-hiperfe= nielalanienemie	NEN	NEN	NEN	Pasiënt
A IV-6	Suster van moeder	+ - - + - + - + - - + - + +	1 12	normaal	0,109	0,095	0,126	Draer
A IV-7	Suster van moeder	+ - - + - + - + - - + - + +	1 12	normaal	0,116	0,078	0,173	Draer
B II-5	Vader	- - + - + - - + - - + - + -	7 1		0,085	0,068	0,107	Draer
B II-6	Moeder	+ - - + - + - + - - + - + +	1 4		0,069	0,059	0,083	Draer
B III-6	Aangetaste dogter	- - + - + - - + - - + - + -	7 1		1,0	0,066		Pasiënt
B III-8	Normale seun	NEN		NEN	NEN	NEN	NEN	NEN
B III-7	Normale seun	+ - - + - + - + - - + - + -	1 1		0,082	0,070	0,097	Draer
B III-9	Aangetaste seun	- - + - + - - + - - + - + -	7 1		0,094	0,071		Pasiënt
B II-8	Suster van moeder	+ - - + - + + + - - + - + +	4 2		NEN	NEN	NEN	Nie-draer
C III-6	Vader	+ - - + - + + + - - + - + -	4 1	normaal	0,084	0,016	0,44	Draer
C III-7	Moeder	+ - - + - + + - + - - + + +	2 13	normaal	0,079	0,038	0,144	Draer
C IV-9	Normale dogter	+ - - + - + + - + - - + + +	4 13	normaal	0,062	0,04	0,096	Draer
C IV-10	Aangetaste seun	+ - - + - + + + - - + - + +	4 2	Tipe I-hiperfe= nielalanienemie	1,404	0,045		Pasiënt
C IV-11	Normale seun	+ - - + - + + - + - - + + +	4 13	normaal	0,063	0,052	0,076	Draer
D III-2	Vader	- + + - - - - - + + - - - +	6 5	normaal	0,077	0,049	0,121	Draer
D III-3	Moeder	- + + - - - + + - - + - + +	5 4	normaal	0,061	0,041	0,090	Draer
D IV-1	Aangetaste seun	- + + - - - - - + + - - - +	6 5	Tipe I-hiperfe= nielalanienemie	1,494	0,057		Pasiënt
D IV-2	Normale dogter	- + + - - - + - + + - - - +	5 5	normaal	0,067	0,024	0,187	Draer
E1	Vader	+ - - + - + + + - - + - + -	4 10	normaal				Draer
E2	Moeder	+ - - + - + + + - - + - + -	2 3	normaal	NEN	NEN	NEN	Draer
E3	Aangetaste dogter	+ - - + - + + + - - + - + +	4 2	Tipe I-hiperfe= nielalanienemie				Pasiënt
F1	Vader	+ - - + - + - - + + - - - +	10 5					Draer
F2	Moeder	+ - - + - + - - + - - + + +	3 13	NEN	NEN	NEN	NEN	Draer
F3	Aangetaste seun	+ - - + - + - + - - + - + -	10 3					Pasiënt

Familie= lid	Status	Haplotipe- patroon	Haplo tipe toe= wysing	Organiesesuur= analise (finale diagnose*)	Aminosuuranalise			Status van individu
					phe ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)	tyr ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)	phe ² /tyr	
G1	Vader	+ - - + - - -	1	NBN	NBN	NBN	NBN	Draer
		+ - - + - - -	3					
G2	Moeder	+ - + + - - +	4					
		+ - + + - - -	10					
G3	Aangetaste dogter	+ - - + - - -	1	NBN	NBN	NBN	NBN	Pasiënt
		+ - + + - - +	4					
G4	Normale dogter	+ - - + - - -	1	NBN	NBN	NBN	NBN	Draer
		+ - - + - - -	10					
H II-7	Vader	+ - + - + + +	4	normaal	NBN	NBN	NBN	Draer
		+ - - + - - -	1	normaal	0,091	0,054	0,153	Draer
H II-8	Moeder	+ - - + - - -	14					
H III-8	Normale seun	+ - - + - - -	1	normaal	0,082	0,039	0,172	Draer
		+ - - + - - -	3	Tipe I-hiperfe= nielalanienemie	1,0	0,037		Pasiënt
H III-9	Aangetaste seun	+ - - + + + +	4					
		+ - - + - - -	3	normaal	0,073	0,064	0,083	Draer
H I-2	Moeder van moeder	+ - - + - - -	3					
		+ - - + - - -	1	normaal	0,045	0,055	0,036	Nie-draer
H II-4	Suster van moeder	+ - - + - - -	1					
H II-3	Swaer van moeder	+ - - + - - -	14	normaal	0,053	0,069	0,048	Nie-draer
		+ - - + - - -	1	normaal	0,056	0,042	0,074	Nie-draer
H III-3	Susterskind	+ - - + - - -	14					
		+ - - + - - -	1	normaal	0,061	0,075	0,049	Nie-draer
H II-5	Broer van moeder	+ - - + - - -	14					
		+ - - + - - -	1	normaal	0,041	0,037	0,045	Nie-draer
H II-6	Skoonsuster van moeder	+ - - + - - -	3					
		+ - - + - - -	14	normaal	0,04	0,045	0,035	Nie-draer
H III-6	Broerskind	+ - - + - - -	14					
		+ - - + - - -	3	normaal	0,035	0,061	0,02	Nie-draer
H III-7	Broerskind	+ - - + - - -	3					
		+ - - + - - -	1	normaal	0,059	0,081	0,043	Nie-draer
H I-1	Vader van vader	+ - - + - - -	2					
		+ - - + - - -	1	normaal	0,069	0,056	0,085	Draer
H I-2	Moeder van vader	+ - - + - - -	4					
		+ - - + - - -	12	normaal	0,051	0,046	0,056	Nie-draer
H II-2	Suster van vader	+ - - + - - -	2					
		+ - - + - - -	12	normaal	0,042	0,049	0,036	Nie-draer
H III-1	Susterskind	+ - - + - - -	12					
		+ - - + - - -	1	normaal		0,122		Draer
H II-7	Suster van vader	+ - - + - - -	4					
		+ - - + - - -	1	normaal		0,036		Nie-draer
H II-6	Swaer van vader	+ - - + - - -	1					
		+ - - + + + +	4	normaal		0,079		Nie-draer ¹
H III-5	Susterskind	+ - - + + + +	4					
		+ - - + + + +	15	normaal		0,027		Nie-draer
H III-6	Susterskind	+ - - + - - -	1					
		+ - - + - - -	1	normaal		0,042		Nie-draer
H III-7	Susterskind	+ - - + - - -	1					
		+ - - + - - -	1	normaal				Nie-draer

Normaal - geen organiesesure in verhoogde konsentrasie in die urine uitgeskei nie

Tipe I-hiperfenielalanienemie - verhoogde konsentrasie organiesesure uitgeskei soos beskryf in Afdeling 5.1.1

¹ Bespreek in Afdeling 5.3



FIGUUR 5.1 DIE phe²:tyr-VERHOUDING VAN NORMALE INDIVIDUE EN VERPLIGTE DRAERS VAN DIE PKU-EIENSKAP

■ - normale individue

● - verpligte draers

(Hierdie resultaat is opgestel deur Ueckermann, J.H., Departement Biochemie, PU vir CHO.)

- Die verspreiding van haplotipes in PKU-families (Afdeling 5.2).
- Die bepaling van die status van individu H III-5 (Afdeling 5.3).

5.2 HAPLOTIPEVERSPREIDING IN DIE PKU-FAMILIES

'n Totaal van twaalf verskillende haplotipe-patrone is vir al die individue wat in Tabel 5.1 aangetoon is, waargeneem (Tabel 5.2). Haplotipe 1, 2, 3 en 4 kom oorwegend voor en verteenwoordig 60% van die normale alleles en 78% van die mutante alleles. Drie PAH-haplotipes (13, 14 en 15) wat met normale alleles assosieer en wat nie in die Deense PKU-families voorkom nie, is waargeneem. Haplotipe 13 vertoon nie 'n redelike verband met enige van die Deense haplotipes nie, maar verskil wel slegs ten opsigte van die Pvu II-restriksiepunt van haplotipe 15. Haplotipe 15 verskil weer van haplotipe 4 ten opsigte van die EcoR I-restriksiepunt. Haplotipe 14 vertoon 'n verband met haplotipe 3 en 10, en verskil onderskeidelik ten opsigte van die Xmn I- en die Msp I-restriksiepunt.

In die 37 Deense PKU-families assosieer 'n totaal van 12 verskillende haplotipes met normale en mutante alleles, waarvan 91% van die mutante alleles met haplotipe 1, 2, 3 en 4 assosieer (Tabel 5.3). Haplotipe 2 en 3 verteenwoordig 53% van die mutante alleles. Aangesien beide ouers van 'n PKU-pasiënt volgens die aannames vervat in Afdeling 4.1 verpligte draers van die PKU-eienskap is, is vier onafhanklike haplotipes van die ouers in elke gesin bepaal, twee wat met mutante alleles assosieer en twee wat met normale alleles assosieer. Alhoewel haplotipes dus vanaf familieleden bereken is, is die haplotipeverspreiding van onafhanklike chromosome bepaal. Gevolglik is die data van Güttler et al (1987a) slegs relevant vir die ouers van die PKU-pasiënte. Ter vergelyking van die data van die Deense en Suid-Afrikaanse families word haplotipeverspreiding van die ouers van die Suid-Afrikaanse PKU-pasiënte in Tabel 5.3 weergegee. 'n Totaal van elf verskillende haplotipe-patrone is waargeneem. Hiervan is vyf teenwoordig op beide die normale en PKU-chromosome, drie op slegs normale chromosome en drie op slegs PKU-chromosome. Die analise van die 16 mutante alleles toon dat 12 (75%) met haplotipe 1, 2, 3 en 4 assosieer (Tabel 5.3).

TABEL 5.2 VOORKOMS VAN HAPLOTIPES
IN SUID-AFRIKAANSE PKU-FAMILIES

Haplotipe	Normale Allele		Mutante Allele	
	Getal	%	Getal	%
1	19	32	13	28
2	3	5	6	13
3	9	15	5	11
4	5	8	12	26
5	3	5	3	7
6	0	0	2	4
7	0	0	3	7
10	3	5	2	4
12	7	12	0	0
13	4	7	0	0
14	6	10	0	0
15	1	2	0	0
	60		46	

TABEL 5.3 HAPLOTYPE-ANALISE VAN DIE DEENSE EN SUID-AFRIKAANSE POPULASIE

HAPLOTYPE: DEENSE PKU-FAMILIES ¹										Normale allelees		Mutante allelees		
										n	%	n	%	
1	+	-				-	+	-	-	-	23	35	12	18
2	+	-				-	+	-	+	+	3	4,5	13	20
3	+	-				+	-	+	-	-	2	3	25	38
4	+	-				+	-	+	+	+	21	32	9	14
5	-	+				+	+	-	-	+	7	11	0	0
6	-	+				+	+	-	-	-	0	0	2	3
7	-	-				+	-	+	-	-	7	11	1	1,5
8	+	-				+	+	-	-	+	1	1,5	0	0
9	+	-				+	+	-	-	+	0	0	1	1,5
10	+	-				+	+	-	-	-	1	1,5	0	0
11	-	-				+	+	-	-	+	1	1,5	1	1,5
12	+	-				-	+	-	-	+	0	0	2	3
HAPLOTYPE: SUID-AFRIKAANSE PKU-FAMILIES										Normale allelees		Mutante allelees		
										n	%	n	%	
1	+	-				-	+	-	-	-	3	19	3	19
2	+	-				-	+	-	+	+	0	0	3	19
3	+	-				+	-	+	-	-	3	19	2	12,5
4	+	-				+	-	+	+	+	2	12,5	4	25
5	-	+				+	+	-	-	+	2	12,5	1	6
6	-	+				+	+	-	-	-	0	0	1	6
7	-	-				+	-	+	-	-	0	0	1	6
10	+	-				+	+	-	-	-	2	12,5	1	6
12	+	-				-	+	-	-	+	1	6	0	0
13	-	+				-	-	+	+	+	2	12,5	0	0
14	+	-				+	-	-	-	-	1	6	0	0

¹ Woo et al. (1986)

Haplotipe 2 en 4 verteenwoordig 44% van al die mutante allele en 12,5% van die normale allele. Haplotipe 1 en 3 kom oorheersend onder die normale allele voor (37,5%) en 31% van die mutante allele assosieer daarmee. Deur gebruik te maak van oligonukleotiedpeilers is in die Deense PKU-families aangetoon dat twee spesifieke mutasies onderskeidelik met haplotipe 2 (DiLella et al., 1987) en haplotipe 3 (DiLella et al., 1986b) assosieer. Verder is voorlopig bewys gelewer dat in ander Europese populasies dieselfde mutasies met hierdie haplotipes assosieer (Güttler et al., 1987a). Hierdie waarnemings steun die hipotese dat enkele mutante chromosome in die Kaukasoïede populasie deur "founder effect" versprei het. Die haplotipes wat in hierdie studie waargeneem is, stem grootliks ooreen met die PAH-haplotipes van die Deense populasie. Verder is haplotipe 1 tot 4 ook oorheersend in die Suid-Afrikaanse PKU-families. Hierdie resultate blyk die verspreiding van mutante allele deur 'n "founder effect" te ondersteun. Oligonukleotiedpeilers sal egter gebruik moet word om te toon dat ooreenstemmende haplotipes met dieselfde mutasie assosieer. Verder is dit duidelik dat meer as een tipe mutasie vir PKU verantwoordelik is.

In Tipe I-hiperfenielalanienemie kom fenotipiese variasie voor, sodat sommige pasiënte 'n meer aangetaste kliniese beeld as ander vertoon. In Familie A byvoorbeeld, toon die PKU-pasiënt 'n baie ernstige kliniese beeld, terwyl die PKU-pasiënte in Familie B 'n milde kliniese beeld vertoon. Soortgelyk is daar kliniese varieerbaarheid in die Deense PKU-families waargeneem (Güttler et al., 1987b). Die identifisering van individuele PAH-allele deur haplotipe-analise, maak 'n vergelyking van die fenotipes van die pasiënte met hul genotipes moontlik (Güttler et al., 1987b). In 'n studie op die Deense populasie (Güttler et al., 1987b) is waargeneem dat PKU-pasiënte wat homosigoties vir haplotipe 2 of 3 is, of oor beide haplotipe 2 en 3 beskik, 'n ernstige kliniese beeld vertoon (Tabel 5.4). Verder toon 18 van die 21 aangetaste individue met 'n mutante allele wat met òf haplotipe 1 òf haplotipe 4 assosieer, 'n milder kliniese beeld. Hieruit is afgelei dat die mutasies wat met haplotipe 2 en 3 assosieer, meer nadelig is. In hierdie studie van die Suid-Afrikaanse PKU-families is 'n soortgelyke vergelyking getref (Tabel 5.5). Homosigote vir haplotipe 2 en 3, asook heterosigote vir haplotipe 2 en 3

TABEL 5.4 VERBAND TUSSEN HAPLOTIPES WAT MET MUTANTE ALLELES ASSOSIEER EN FENOTIPES VAN AANGETASTE PASIËNTE IN DEENSE PKU-FAMILIES

Haplotipe van mutante allele	Haplotipe van mutante allele			
	1	2	3	4
1	Mild			
2	Ernstig Mild Mild Mild	Ernstig Ernstig		
3	Mild Mild Mild Mild	Ernstig Ernstig	Ernstig Ernstig Ernstig Ernstig	Ernstig Ernstig Mild Mild Mild Mild
4	Mild Mild Mild Mild			Mild

Aangepas uit Güttler et al. (1987)

TABEL 5.5 'N VERGELYKING VAN DIE GENOTIPES EN FENOTIPES VAN SUID-AFRIKAANSE PKU-PASIËNTE

Haplotipe I* (vanaf vader)	Haplotipe III* (vanaf moeder)				
	1	2	3	4	5
2	ernstig aangetas (AV-4)			mild aangetas (C IV-10)	
3					
4	mild aangeetas (G3)	mild aangeetas (E3)	mild aangeetas (H III-9)		
6					mild aangeetas (D IV-1)
7	mild aangeetas (B III-6) mild aangeetas (B III-9)				
10			ernstig aangetas (F3)		

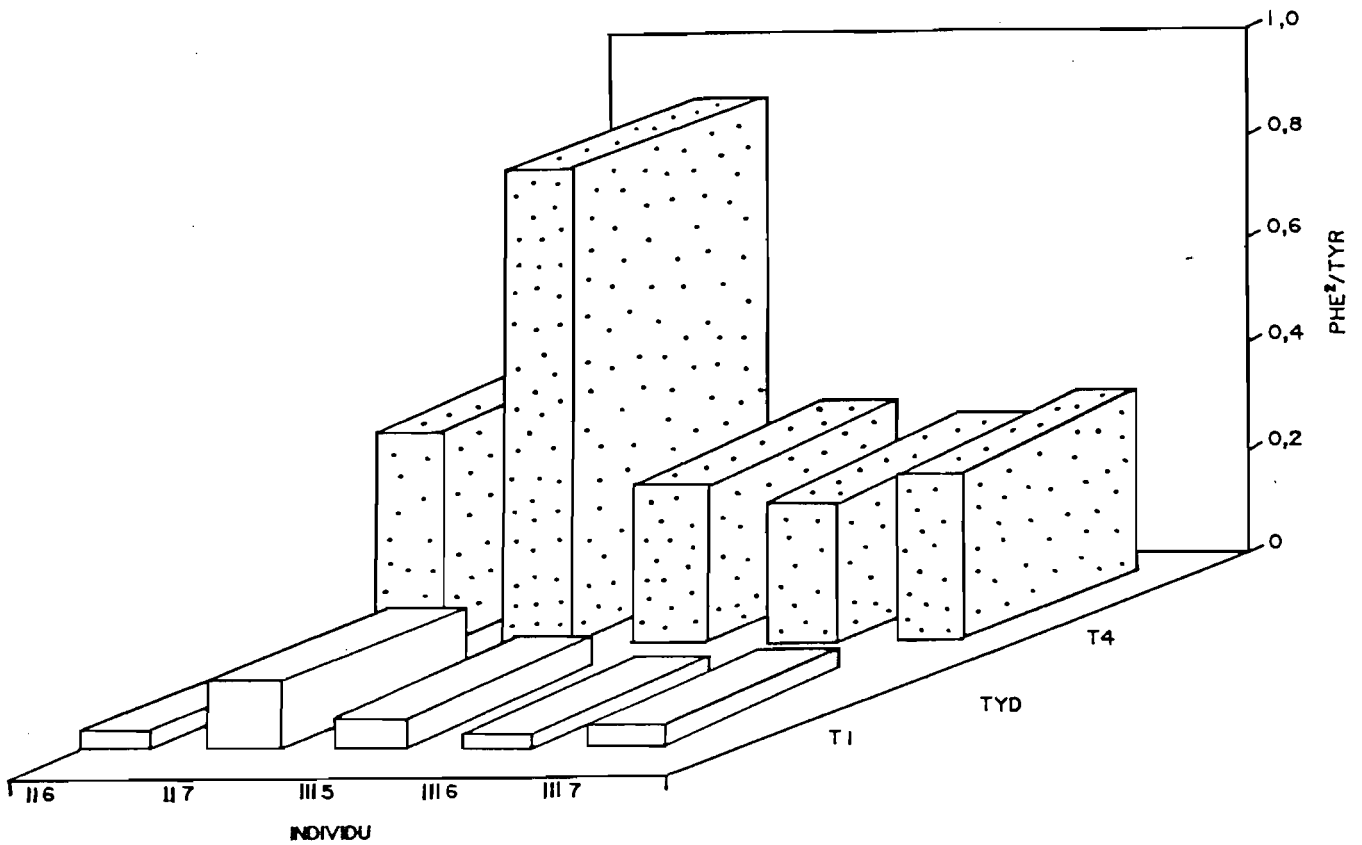
is nie waargeneem nie. 'n Kombinasie van haplotipe 2 en 4 is waargeneem en beide pasiënte is mild aangetas. Die kombinasies van haplotipe 1 en 2, en haplotipe 3 en 10 het 'n ernstige kliniese toestand tot gevolg. Uit die resultate kan waargeneem word dat vyf van die nege PKU-pasiënte met haplotipe 1 tot 4 assosieer en dat vyf pasiënte met haplotipe 2 of 3 assosieer. Van hierdie vyf PKU-pasiënte vertoon drie 'n milde kliniese beeld, sodat die tipe mutasies in die Suid-Afrikaanse populasie waarskynlik 'n milde verloop tot gevolg het.

Die skynbare lae voorkoms van PKU in Suid-Afrika kan verklaar word deur hierdie hoë voorkoms van mutasies wat 'n milde verloop van die siektetoestand tot gevolg het. In teenstelling met die Deense PKU-families is 'n lae voorkoms van die meer ernstige mutasies en kombinasies van haplotipes in die Suid-Afrikaanse PKU-families waargeneem. Dit kan verklaar waarom die voorkoms van PKU-pasiënte in inrigtings vir verstandelik gestremdes so laag is (Reinekce et al., 1983).

5.3 'N VOORBEELD VAN MEIOTIESE OORKRUISING

In Afdeling 4.9 is aangetoon dat die status van die oudste seun (H III-5) van die paterne jonger tante van die betrokke PKU-pasiënt nie met behulp van haplotipe-analise bepaal kon word nie. Aminosuurdata van vastende serummonsters kon ook nie bo alle twyfel die status van hierdie kind aandui nie, aangesien die waardes in 'n grensgebied vir hierdie gesin voorkom. Gevolglik is al die gesinslede aan 'n fenielalanienbeladingstoets onderwerp (Figuur 5.2). Waardes vir die betrokke kind, is vergelykbaar met dié van sy vader en twee broers wat nie draers van die PKU-eienskap is nie. Die moeder, wat wel 'n draer van die PKU-eienskap is, se waardes is aansienlik hoër as dié van die ander gesinslede. Hieruit kan afgelei word dat die oudste seun in hierdie gesin nie 'n draer van die PKU-eienskap is nie.

Tydens haplotipe-analise van die gesin is waargeneem dat die haplotipepatroon van hierdie seun nie verklaarbaar was uit dié van sy ouers nie. Vaderskap- en moederskapbepaling toon dat die ouers wel die genetiese ouers van die seun is. Daar is in Afdeling 4.9 ook getoon dat die twee



FIGUUR 5.2 FENIELALANIENBELADINGSTOETS VAN DIE PATERNE JONGSTE TANTE VAN DIE PKU-PASIËNT EN HAAR GESIN

T 1 - vastende serummonster

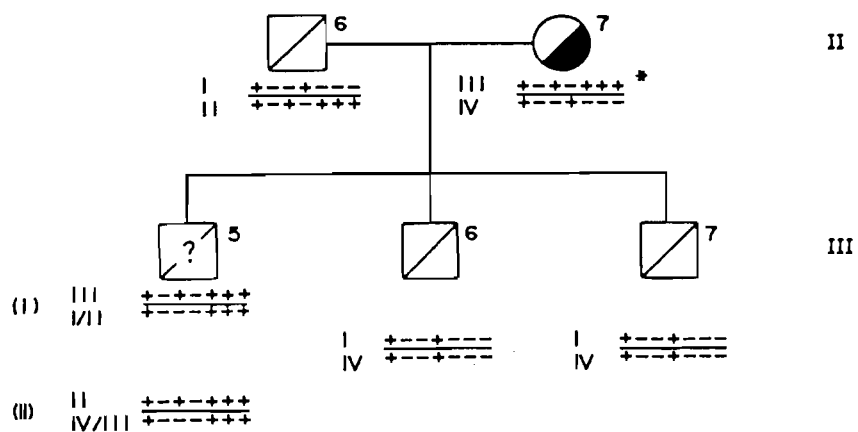
T 4 - serummonster geneem 4 uur na fenielalanienbelading

(Hierdie resultaat is opgestel deur Ueckermann, J.H., Departement Biochemie, PU vir CHO.)

ander seuns in die gesin allele I en IV van hul ouers geërf het en die 8,3 Kb EcoR I/BamH I-fragment gevolglik met hierdie allele assosieer. Daar is ook aanvanklik getoon dat die oudste seun waarskynlik allele II en III* van sy ouers geërf het. Hiervolgens sou hy homosigoties ten opsigte van die 6,5 Kb EcoR I/BamH I-fragment wees. In teenstelling hiermee is 'n 8,3 Kb- en 'n 6,5 Kb EcoR I/BamH I-fragment waargeneem met die gevolglike ontstaan van 'n nuwe haplotipe (haplotipe 15 in Tabel 5.2), sodanig dat daar nie getoon kon word vanaf watter ouer die haplotipes geërf is nie. 'n Moontlike verklaring vir die skynbare kortsluiting in die resultate sou meiotiese rekombinasie wees.

Tydens meiotiese oorkruising word die polimorfe merkers in die DNA aangrensend tot die rekombinasiepunt uitgeruil (Old et al., 1986). Aangesien die haplotipes van die ouers dieselfde is, is twee oorerwingspatrone hier moontlik. In die eerste geval ((i) in Figuur 5.3) is haplotipe III* in sy geheel vanaf die moeder geërf en 'n rekombinante haplotipe I/II, bestaande uit die 5'-groep van polimorfismes van haplotipe I (+ - -) en die 3'-groep van haplotipe II (- + + +) vanaf die vader geërf. In hierdie geval sal die kind 'n draer van die PKU-eienskap wees aangesien die PKU-allele vanaf die moeder geërf is. Alternatiewelik ((ii) in Figuur 5.3) is haplotipe II van die vader geërf en 'n rekombinante haplotipe III*/IV van die moeder. Die rekombinante haplotipe bestaan in hierdie geval uit die 5'-groep van polimorfismes van die normale allele (+ - -, haplotipe IV) en die 3'-groep van die PKU-allele (- + + +, haplotipe III*). Aangesien daar met behulp van aminosuuranalise getoon is dat die betrokke kind nie 'n draer van die PKU-eienskap is nie, sal die tweede moontlikheid geld, mits die mutasie van die moeder se mutante allele aan die 5'-kant van die oorkruisingspunt voorkom. In hierdie geval sou die kind 'n rekombinante normale allele van die moeder geërf het. Figuur 5.4 is 'n skematiese voorstelling van die wyse waarop dié rekombinante haplotipe deur 'n oorkruising in die DNA-gebied tussen die EcoR I- en Msp I-restriksiepunt gevorm is. Uit hierdie verklaring kan twee afleiding gemaak word:

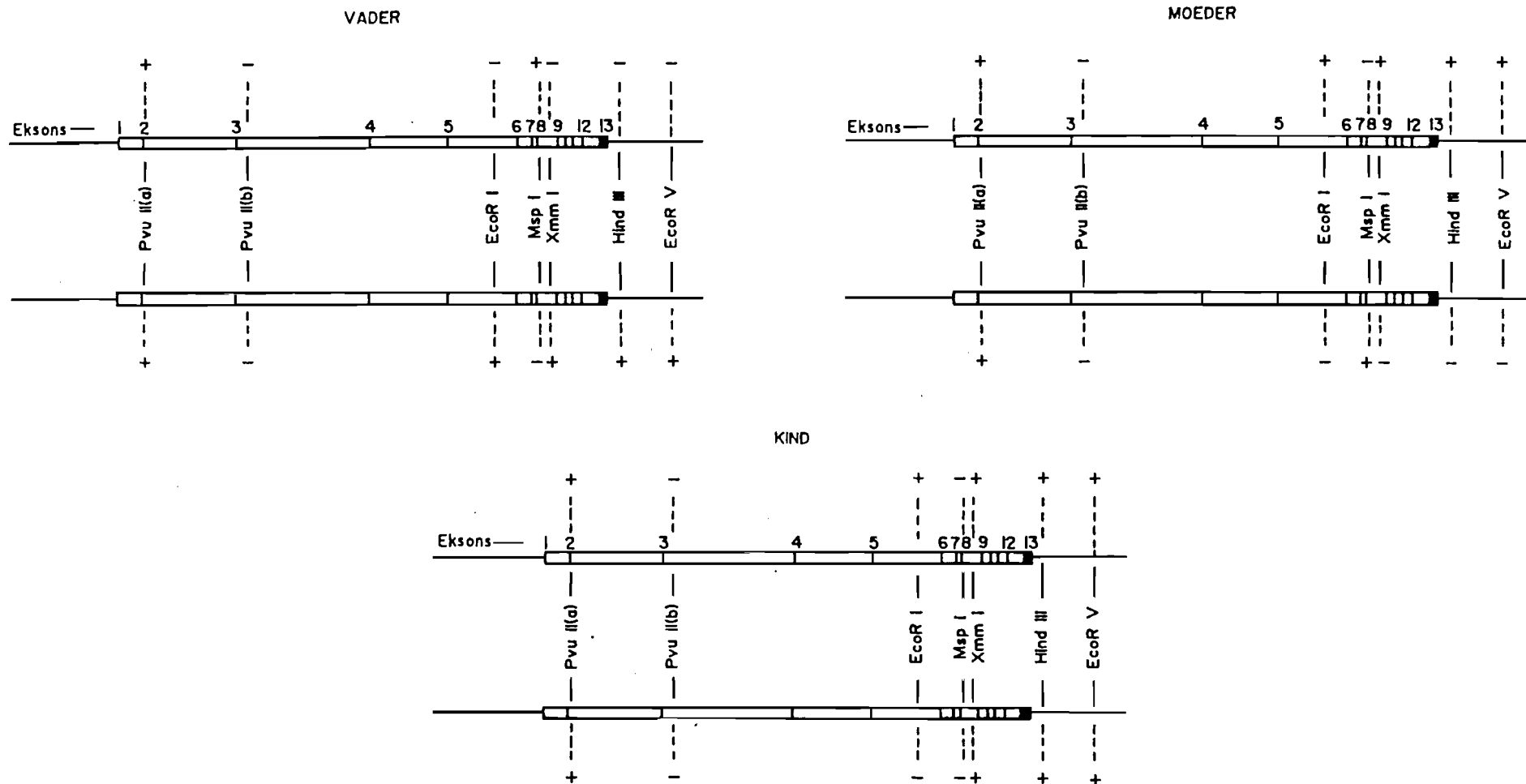
- 'n Nuwe haplotipe, haplotipe 15, is deur meiotiese oorkruising geskep. Hiervolgens is dit duidelik dat haplotipes nie noodwendig



FIGUUR 5.3 HIPOTETIESE ALLELETOEKENNING VAN DIE OUDSTE SEUN VAN DIE JONGSTE PATERNE TANTE VAN DIE BETROKKE PKU-PASIËNT

Moontlikheid (i) is aan die orde indien meiotiese oorkruising tussen die allele van die vader plaasgevind het.

Moontlikheid (ii) geld indien 'n meiotiese kruising tussen die allele van die moeder plaasgevind het.



FIGUUR 5.4 VORMING VAN HAPLOTYPE 15 IN PASIËNT H III-5 DEUR MEIOTIESE OORKRUISTING TUSSEN DIE ALLELES VAN SY MOEDER

Die oorkruising het tussen die Msp I- en EcoR I- polimorfepunt plaasgevind.

slegs deur mutasies van RFLP-punte gevorm word nie, maar ook deur meiotiese oorkruising. Dit beteken dat mutasies wat tot die inaktivering van 'n geen lei, met verskillende haplotipes mag assosieer. In hierdie besondere geval het die oorkruising tot die verlies van die mutasie gelei.

- Die mutasie wat met die moeder se mutante allele III* (haplotipe 4) assosieer kom hiervolgens aan die 5'-kant van die oorkruisingspunt voor. Soos reeds hierbo genoem, is die oorkruisingspunt tussen die EcoR I- en Msp I-polimorfepunt wat onderskeidelik in intron 5 en 8 geleë is (Figuur 5.4). Aangesien die mutasie wat met haplotipe 4 assosieer nog nie bepaal is nie, kan hierdie gegewens die lokalisering en uiteindelik tipering van die betrokke mutasie vergemaklik. Volgens hierdie gegewens is die mutasie aan die 5'-kant van ekson 9. Die aard van die mutasie behoort met behulp van oligonukleotiedpeilers of PCR en genomiese volgordebepaling ondersoek te word.

5.4 SLOTSOM

Hierdie is die mees omvangryke molekulêr-genetiese studie wat tot dusver oor PKU in Suid-Afrika onderneem is. 'n Aantal belangrike gevolgtrekkings kan uit die gegewens wat verkry is gemaak word:

- Agt PKU-families is in hierdie studie ingesluit. Van die 53 individue wat geanaliseer is, is nege PKU-pasiënte, 28 draers van die PKU-eienskap en 16 nie draers van die PKU-eienskap nie. 'n Aantal ander PKU-families is ook geïdentifiseer, maar hulle was nie bereid om deel te vorm van hierdie program nie. Alhoewel die doel van hierdie studie nie was om die voorkomssyfer van PKU in Suid-Afrika te bepaal nie, wil dit voorkom asof die syfer veel hoër is as wat tot dusver uit die gegewens van Op't Hof & Hitzeroth (1987) afgelei is. Die skynbaar lae voorkoms van PKU in Suid-Afrika kan toegeskryf word aan die voorkoms van milde haplotipes of mutasies in die Suid-Afrikaanse populasie (sien Tabel 5.2) en dit mag verklaar waarom die siftingsprogram by pasgebore babas (Op't Hof & Hitzeroth, 1987)

ooglopend negatief was. Dit kan ook verklaar waarom daar min PKU-pasiënte in inrigtings vir verstandelike gestremde individue is (Reinecke et al., 1983).

- 'n Totaal van twaalf haplotipes is in die Suid-Afrikaanse PKU-families waargeneem. Haplotipe 1 tot 4 kom wel oorheersend voor, soos vir die Deense PKU-families. Hierdie waarneming kan 'n "founder effect" van PKU in 'n breë sin gesien, steun. Drie haplotipes wat nie in die Deense PKU-families voorkom nie, is in die Suid-Afrikaanse PKU-families waargeneem. Dit is egter nie moontlik om 'n verband tussen die haplotipes en die Deense mutasies aan te toon nie, alvorens die mutasies van die Suid-Afrikaanse haplotipes nie vasgestel is nie. In hierdie verband is dit belangrik om te beklemtoon dat 'n haplotipe nie noodwendig 'n bepaalde mutasie tipeer nie, aangesien sommige van die haplotipes met beide normale en mutante alleles assosieer. Verder is dit duidelik dat meer as een tipe mutasie vir PKU verantwoordelik kan wees.
- In Hoofstuk 3 is getoon dat die akkuraatheid van diagnose verhoog indien meerdere restriksiepunte vir haplotipe-analise aangewend word. Aangesien 'n meiotiese oorkruisingsgebeure in die PAH-geen waargeneem is, is dit verder belangrik om sover moontlik van restriksiepunte aan die 5'- én 3'- kant van die geen gebruik te maak sodat die akkuraatheid van diagnose verder verhoog word.
- Daar is nog 'n groot aantal individue in elk van die families wat nog getoets kan word en hierdie studie behoort opgevolg te word. Die gegewens wat vir die families ingesamel is, is ook vir die toekoms van die families van belang aangesien 'n groot aantal draers van die PKU-eienskap geïdentifiseer is. Hierdie individue behoort verder opgevolg te word soos hulle trou en 'n gesin beplan. Hierdie studie hoef nie noodwendig deur genetiese analise te wees nie, maar kan byvoorbeeld deur 'n fenielalanienbeladingstoets gedoen word.

AFKORTINGSLYS

Arg	arginien
bp	base pare
BSA	beesserumalbumien
cDNA	polideoksiribonukleotied gesintetiseer onder leiding van RNA-afhanklike DNA-polimerase.
df	vryheidsgraad
DNA	deoksiribonukleïensuur
DOC	natriumdeoksicholaat
Dopa	3,4-dihidroksifenielalanien
DTT	dittiotreitol
EDTA	etileendiamientetra-asynsuur
Kb	kilobase
mRNA	boodskapper ribonukleïensuur
NP40	Nonidet P-40
opm	omwentelinge per minuut
PAH	fenielalanienhidroksilase
PCR	polimerasekettingreaksie
Phe	fenielalanien

PKU	feniëlketonurie
R	weerstandbiedend
RFLP	restriksiefragmentpolimorfisme
SDS	natriumdodesielsulfaat
tpm	tellings per minuut
Tris	tris-(hidroksimetiel)-aminmetaan
Trp	triptofaan
Tyr	tirosien
U	eenheid
UV	ultraviolet

BIBLIOGRAFIE

ARMSTRONG, M.D. & TYLER, F.H. 1955. Studies on phenylketonuria: Restricted phenylalanine intake in phenylketonuria. *Journal of Clinical Investigation*, 34:565.

BREMER, H.J., DURAN, M., KAMERLING, J.P., PRZYREMBEL, H. & WADMAN, S.K. Disturbances of Amino Acid Metabolism: Clinical Chemistry & Diagnosis. Munich : Urban & Schwarzenberg, p. 204.

CASKEY, C.T. 1987. Disease diagnosis by recombinant DNA methods. *Science*, 236:1223.

DAIGER, S.P., CHAKRABORTY, R., GÜTTLER, F., LIDSKY, A.S., KOCH, R. & WOO, S.L.C. 1986. Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase locus in prenatal diagnosis of phenylketonuria. *The Lancet*, 1:229.

DAVIES, K.E. 1981. The application of DNA recombinant technology to the analysis of the human genome and genetic disease. *Human Genetics*, 58:351.

DILELLA, A.G., LEDLEY, F.D., REY, F., MUNNICH, A. & WOO, S.L.C. 1985. Detection of phenylalanine hydroxylase messenger RNA in liver biopsy samples from patients with phenylketonuria. *The Lancet*, 1:160.

DILELLA, A.G., KWOK, S.C.M., LEDLEY, F.D., MARVIT, J. & WOO, S.L.C. 1986a. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry*, 25:743.

DILELLA, A.G., MARVIT, J., LIDSKY, A.S., GÜTTLER, F. & WOO, S.L.C. 1986b. Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria. *Nature*, 322:799.

DILELLA, A.G., MARVIT, J., BRAYTON, K. & WOO, S.L.C. 1987. An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. *Nature*, 327:333.

- DILELLA, A.G., HUANG, W. & WOO, S.L.C. 1988. Screening for phenylketonuria mutations by DNA amplification with the polymerase chain reaction. *The Lancet*, 1:497.
- ERASMUS, C., MIENIE, L.J., REINECKE, C.J. & WADMAN, S.K. 1985. Organic aciduria in late-onset biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 8:105.
- ELANDT-JOHNSON, R.C. 1971. Probability Models and statistical Methods in Genetics. New York : John Wiley & Sons.
- GEEVER, R.F., WILSON, L.B., NALLASETH, F.S., MILNER, P.F., BITTNER, M. & WILSON, J.T. 1981. Direct identification of sickle cell anemia by blot hybridization. *The National Academy of Sciences. Proceedings*, 78:5081.
- GOLDSMITH, L.A. 1983. Tyrosinemia and related disorders (In Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, New York : McGraw-Hill Book Company. p. 287.)
- GÜTTLER, F. 1980. Hyperphenylalaninemia. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 280:7.
- GÜTTLER, F., DILELLA, A.G., LEDLEY, F.D., LIDSKY, A.S., KWOK, S.C.M., MARVIT, J. & WOO, S.L.C. 1987a. Molecular biology of phenylketonuria. *The European Journal of Pediatrics*, 146:A5.
- GÜTTLER, F., LEDLEY, F.D., LIDSKY, A.S., DILELLA, A.G., SULLIVAN, S.E. & WOO, S.L.C. 1987b. Correlation between polymorphic DNA haplotypes at phenylalanine hydroxylase locus and clinical phenotypes of phenylketonuria. *The Journal of Pediatrics*, 110:68.
- HEIJTMANCIT, J.F., HARRIS, S.G., WARD, P.A. & CASKEY, C.T. 1986. A recombinant DNA diagnostic program in practice. *Annals of Clinical Research*, 18:250.

HITZEROTH, H.W. 1983. Phenylketonuria in South Africa. *South African Medical Journal*, 63:756.

HOLTZMANN, N.A., KRONMAL, R.A., VAN DOORNINCK, W., AZEN, C. & KOCH, R. 1986. Effect of age at loss of dietary control on intellectual performance and behavior of children with phenylketonuria. *The New England Journal of Medicine*, 314:593.

HSIA, D.Y. 1970. Phenylketonuria and its variants. (In Steinberg, A.G. & Bearn, A.G. eds. *Progress in Medical Genetics*. New York : Grune & Stratton. p. 29.)

JERVIS, G.A. - 1953. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *The Society of Experimental Biological Medicine. Proceedings*, 82:514.

KAN, Y.W. & DOZY, A.M. 1978a. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β -globin structural gene: Relationship to sickle mutation. *The National Academy of Sciences. Proceedings*, 75:5631.

KAN, Y.W. & DOZY, A.M. 1978b. Antenatal diagnosis of sickle-cell anaemia by DNA analysis of amniotic-fluid cells. *The Lancet*, 1:910.

KAUFMAN, S. 1976. Phenylketonuria: Biochemical mechanisms. *Advances in Neurochemistry*, 2:1.

KAUFMAN, S., BERLOW, S., SUMMER, G.K., MILSTEIN, S., SCHULMAN, J.D., ORLOFF, S., SPIELBERG, S. & PUESCHEL, S. 1978. Hyperphenylalaninemia due to a deficiency of bipterin. *The New England Journal of Medicine*, 299:673.

KAZAZIAN, H.H., ORKIN, S.H., MARKHAM, A.F., CHAPMAN, C.R., YOUSSEFIAN, H. & WABER, P.G. 1984. Quantification of the close association between DNA haplotypes and specific β -thalassaemia mutations in Mediterraneans. *Nature*, 310:152.

KAZAZIAN, H.H. 1985. Gene probes: Application to prenatal and postnatal diagnosis of genetic disease. *Clinical Chemistry*, 31:1509.

KIDD, K.K. 1987. Phenylketonuria-Population genetics of a disease. *Nature*, 327:282.

KNOX, W.E. 1972. Phenylketonuria. (In Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. & Fredrickson, D.S. eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York : McGraw-Hill Book Company p. 266-295.)

KOCH, R. BLASKOVICS, M., WENZ, E., FISHLER, K. & SCHAEFFLER, G. 1974. Phenylalaninemia and Phenylketonuria. (In Nyhan, W.L. ed. *Heritable Disorders of Amino Acid Metabolism*. New York : John Wiley & Sons. p. 109-140.)

KOCH, R., AZEN, C.G., HURST, N., GROSS FRIEDMAN, E. & FISHER, K. 1987. The effects of diet discontinuation in children with phenylketonuria. *The European Journal of Pediatrics*, 146:A12.

KRUGER, J.A. 1986. 'n Ondersoek na fenielketonurie variante in S.A. Referaat vir Honns. B.Sc.-graad, PU vir CHO.

KWOK, S.C.M., LEDLEY, F.D., DILELLA, A.G., ROBSON, K.J.H. & WOO, S.L.C. 1985. Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry*, 24:556.

LA DU, B.N. & GJESSING, L.R. 1978. Tyrosinosis and Tyrosinemia. (In Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. & Fredrickson, D.S. eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, New York : McGraw-Hill Book Company. p. 296.)

LAWN, R.M., EFSTRATIADIS, A., O'CONNELL, C. & MANIATIS, T. 1980. The nucleotide sequence of the human β -globin gene. *Cell*, 21:647.

LEDLEY, F.D., DILELLA, A.G., KWOK, S.C.M. & WOO, S.L.C. 1985a. Homology between phenylalanine and tyrosine hydroxylases reveals common structural and functional domains. *Biochemistry*, 24:3389.

LEDLEY, F.D., DILELLA, A.G. & WOO, S.L.C. 1985b. Molecular biology of phenylalanine hydroxylase and phenylketonuria. *Trends in Genetics*, 1:309.

LEDLEY, F.D., GRENETT, H.E., MCGINNIS-SHELNUTT, M. & WOO, S.L.C. 1986a. Retroviral mediated gene transfer of human phenylalanine hydroxylase into NIH3T3 and hepatoma cells. *The National Academy of Sciences. Proceedings*, 83:409.

LEDLEY, F.D., LEVY, H.L. & WOO, S.L.C. 1986b. Molecular analysis of the inheritance of phenylketonuria and mild hyperphenylalaninemia in families with both disorders. *The New England Journal of Medicine*, 314:1276.

LEDLEY, F.D., GRENETT, H.E. & WOO, S.L.C. 1987. Biochemical characterization of recombinant human phenylalanine hydroxylase produced in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 262:2228.

LIDSKY, A.S., ROBSON, K.J.H., THIRUMALACHARY, C., BARKER, P.E., RUDDLE, F.H. & WOO, S.L.C. 1984. The PKU locus in man is on chromosome 12. *American Journal of Human Genetics*, 36:527.

LIDSKY, A.S., GÜTTLER, F. & WOO, S.L.C. 1985a. Prenatal diagnosis of a classic phenylketonuria by DNA analysis. *The Lancet*, 1:549.

LIDSKY, A.S., LAW, M.L., MORSE, H.G., KAO, F., RABIN, M., RUDDLE, F.H. & WOO, S.L.C. 1985b. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *The National Academy of Sciences. Proceedings*, 82:6221.

LIDSKY, A.S., LEDLEY, F.D., DILELLA, A.G., KWOK, S.C.M., DAIGER, S.P., ROBSON, K.J.H. & WOO, S.L.C. 1985c. Extensive restriction site polymorphism at the human phenylalanine hydroxylase locus and application in prenatal diagnosis of phenylketonuria. *American Journal of Human Genetics*, 37:619.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor. p. 68; 86-94; 468.

MARVIT, J., DILELLA, A.G., BRAYTON, K., LEDLEY, F.D., ROBSON, K.J.H. & WOO, S.L.C. 1987. *Nucleic Acids Research*, 15:5613.

MICHALS, K., DOMINIK, M., SCHUETT, V., BROWN, E. & MATALON, R. 1985. Return to diet therapy in patients with phenylketonuria. *Journal of Pediatrics*, 106:933.

MONTEAGUDO, F.S.E. & KIBEL, M.A. 1986. Combined phenylketonuria and pyruvate kinase deficiency. *South African Medical Journal*, 69:761.

MOSS, A.R., SCHOENHEIMER, R. 1940. The conversion of phenylalanine to tyrosine in normal rats. *Journal of Biological Chemistry*, 135:415.

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, L1:263.

NIEDERWEISER, A., BLAU, N., WANG, M., JOLLER, P., ATARES, M. & CORDESA-GARCIA, J. 1984. *The European Journal of Pediatrics*, 141:208.

OLD, J.M., HEATH, C., FITCHES, A., THEIN, S.L., JEFFREYS, A.J., PETROU, M., MODELL, B. & WEATHERALL, D.J. 1986. Meiotic recombination between two polymorphic restriction sites within the β globin gene cluster. *Journal of Medical Genetics*, 23:14.

OP'T HOF, J. & HITZEROTH, H.W. 1987. Phenylketonuria (PKU) in the RSA. *South African Medical Journal*, 71:538.

ORKIN, S.H., LITTLE, P.F.R., KAZAZIAN, H.H. & BOEHM, C. 1982. Improved detection of the sickle mutation by DNA analysis. *The New England Journal of Medicine*, 307:32.

PELTONEN, L. & PULKKINEN, L. 1986. How to find a mutation behind a inherited disease. *Annals of Clinical Research*, 18:224.

PRUNELL, A. 1980. A photographic method to quantitate DNA in gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, 65:353.

REINECKE, C.J., MIENIE, L.J., HITZEROTH, H.W. & OP'T HOF, J. 1983. Screening for inborn errors of metabolism among mentally retarded patients. *South African Medical Journal*, 63:14.

ROBSON, K.J.H., CHANDRA, T., MACGILLIVRAY, R.T.A. & WOO, S.L.C. 1982. Polysome immunoprecipitation of phenylalanine hydroxylase mRNA from rat liver and cloning of its cDNA. *The National Academy of Sciences. Proceedings*, 79:4701.

ROBSON, K.J.H., BEATTIE, W., JAMES, R.J., COTTON, R.C.H., MORGAN, F.J. & WOO, S.L.C. 1984. Sequence comparison of rat liver phenylalanine hydroxylase and its cDNA clones. *Biochemistry*, 23:5671.

SCHMIDT, H., MAHLE, M., MICHEL, U. & PIETZ, J. 1987. Continuation vs discontinuation of low-phenylalanine diet in PKU adolescents. *The European Journal of Pediatrics*, 146:A17.

SCRIVER, C.R. 1986. Soundings at the PKU locus. *Trends in Genetics*, 1:251.

SCRIVER, C.R. & CLOW, C.L. 1980. Phenylketonuria: Epitome of human biochemical genetics. *The New England Journal of Medicine*, 303:1336-1432, 1394-1400.

SHEAR, C.S., WELLMAN, N.S. & NYHAN, W.L. 1974. Phenylketonuria: Experience with diagnosis and management. (In Nyhan, W.L. ed. Heritable Disorders of Amino Acid Metabolism. New York: John Wiley & Sons. p. 141-159.)

SKOLNICK, M.H. & WHITE, R. 1982. Strategies for detecting and characterizing restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Cytogenetic Cell Genetics*, 32:58.

SOUTHERN, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98:503.

SPEER, A., DAHL, H., RIESS, O., COBET, G., HANKE, R., COTTON, R.G.H. & COUTELLE, C. 1986. Typing of families with classical phenylketonuria using three alleles of the Hind III linked restriction fragment polymorphism, detectable with a phenylalanine hydroxylase cDNA probe. *Clinical Genetics*, 29:491.

STANSFIELD, W.D. 1983. *Schaum's outline of theory and problems of genetics*. New York : McGraw-Hill Book Company.

TOURIAN, A. & SIDBURY, J.B. 1983. Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. (In Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. p. 270.)

TSIPOURAS, P. 1987. Restriction fragment length polymorphisms. *Methods in Enzymology*, 145:205.

VANDERPLAS, S., WIID, I., GROBLER-RABIE, A., BREBNER, K., RICKETTS, M., WALLIS, G., BESTER, A., BOYD, C. & MATHEW, C. 1984. Blot hybridisation analysis of genomic DNA. *Journal of Medical Genetics*, 21:164.

VERGEER, W.P. 1988. Transfeksie van soogdiersellyne met pendelvektore vir die bestudering van transkripsionele

reguleringsvolgordes in die mensgeen vir pro- α 1(I)-kollageen. Verhandelings vir M.Sc.-graad, PU vir CHO.

WALLACE, B. 1981. Basic Population Genetics. New York : Columbia University Press.

WALLACE, R.B., SCHOLD, M., JOHNSON, M.J., DEMBEK, P. & HAKURA, K. 1981. Oligonucleotide directed mutagenesis of the human β -globin gene: a general method for producing specific point mutations in cloned DNA. *Nucleic Acids Research*, 9:3647.

WEATHERALL, D.J., OLD, J.M., THEIN, S.L., WAINSCOAT, J.S. & CLEGG, J.B. 1985. Prenatal diagnosis of the common haemoglobin disorders. *Journal of Medical Genetics*, 22:422.

WHITE, R., LEPPERT, M., BISHOP, D.T., BARKER, D., BERKOWITZ, J., BROWN, C., CALLAHAN, P., HOLM, T & JEROMINSKI, L. 1985. Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes. *Nature*, 313:101.

WOO, S.L.C., LIDSKY, A.S., GÜTTLER, F., CHANDRA, T. & ROBSON, K.J.H. 1983. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature*, 306:151.

WOO, S.L.C. 1984. Prenatal diagnosis and carrier detection of classic phenylketonuria by gene analysis. *Pediatrics*, 74:412.

WOO, S.L.C., DILELLA, A.G., MARVIT, J. & LEDLEY, F.D. 1986. Molecular basis of phenylketonuria and potential somatic gene therapy. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, L1:395.

BEDANKINGS

My dank aan die volgende persone en instansies:

- Prof. dr. W.J. de Wet vir sy hulp, leiding en aanmoediging met hierdie studie.
- Die PKU-families wat bereid was om deel te vorm van hierdie studie.
- Al my kollegas in die Departement Biochemie vir hulle belangstelling en ondersteuning.
- Mnre. L.J. Mienie, J.H. Ueckermann en C.H. Marais vir hulle hulp en raad.
- My familie en vriende vir hulle belangstelling.
- My ouers vir hulle liefde, belangstelling en finansiële steun gedurende die afgelope jare.
- Mev. Henriëtte Hayes vir die natrek van die figure.
- Dr. Susan Prinsloo vir die taalkundige versorging van die verhandeling.
- Alet van Biljon vir die tik van die verhandeling.