

Diagnostisches Next-Generation-Sequencing Panel

Hereditäre Ataxien

Hintergrundinformation und Methodenbeschreibung

Kontaktinformationen

Prof. Dr. med. Peter Bauer

Tel: 07071 29 77692

Fax: 07071 29 5172

Email: peter.bauer@med.uni-tuebingen.de

Kurzbeschreibung

Bei Patienten mit Verdacht auf eine hereditäre Ataxie werden 168 bekannte mit einer Ataxie assoziierte Gene durch spezifische Anreicherung (Agilent HaloPlex) und Next-Generation-Sequencing (Illumina MiSeq 2x 150 bp paired-end) analysiert. Das Panel umfasst Gene für die klassischen monogenen Formen der **ADCA- und ARCA-Gene sowie episodische Ataxie-Gene**. Daneben sind jene Gene berücksichtigt, die für **Metabolische Erkrankungen mit Ataxie** ursächlich sein können. Schließlich ist eine Genliste für **mitochondriale Ataxien** und überlappende Phänotypen integriert, die klinisch auch durch eine Ataxie-Erkrankung imponieren. Das Ataxie-Panel ermöglicht damit die Abklärung isolierter zerebellärer Ataxien und Ataxie-Störungen im Rahmen syndromaler Erkrankungen.

Einschlusskriterien / erforderliche Unterlagen

- Als **Voruntersuchungen** sind erforderlich:
 - Klinisch-genetische Begutachtung (Ausschluss einer sekundären Ataxie)
 - Gegebenenfalls vorab Ausschluss der Repeat-Expansionserkrankungen (FXN, SCA1, 2, 3, 6, 7, 8, 10, 12, 17, 36)
- DNA- (Blut-) Proben des Patienten (mindestens 20 µg DNA bzw. 5 ml EDTA-Blut)
- Relevante klinische Angaben (z.B. Kopie des genetische bzw. pädiatrischen oder neurologischen Gutachtens)
- GenDG konformes schriftliches Einverständnis
- Kostenübernahmeerklärung der Krankenkasse (ein Begründungsschreiben stellen wir gerne zur Verfügung)

Analysedauer / Technischer Ablauf / Datenspeicherung / Resultate

Analysedauer: Sobald die Analyse im Labor begonnen werden kann (der Auftrag vollständig vorliegt) benötigen wir etwa 8 Wochen für die Sequenzierung, 4 Wochen für die Datenanalyse und ggfs. weitere 4-8 Wochen für Validierungssequenzierungen. Insgesamt dauert die Analyse also 12-20 Wochen.

Technischer Ablauf: Die Sequenzierung umfasst die (1) Fragmentierung der DNA durch multiple Restriktionsenzym-Verdau, (2) die Zirkularisierung spezifischer DNA-Spaltprodukte durch Selector-Probe Sonden und anschließendes Ligieren zu ringförmiger DNA, (3) die PCR-Amplifikation zirkulärer DNA mit patientenspezifischen Barcodes (MIDs), (4) Qualitätskontrolle und Quantifizierung der DNA-Bibliothek, (5) paired-end Sequenzierung der DNA-Bibliothek durch Illumina MiSeq Technologie (mindestens 2x 150 bp).

Die bioinformatische Analyse der Sequenzierdaten geschieht durch folgende Schritte:

- Mapping der Reads auf das hg19 Referenzgenom (BWA)
- Detektion von Varianten: SNPs, SNVs, kurze Deletionen und Insertionen (freebayes)
- Annotation der Varianten mit Daten aus den Datenbanken dbSNP und 1000 Genomes (SnEff).

Neben der Suche nach kleinen intra-exonischen Deletionen wird mittels einer statistischen Analyse nach Deletionen von kompletten Exons gesucht. Letztere Analyse ist derzeit noch nicht diagnostisch validiert.

Resultate: Mit Abschluss der Analysen wird ein schriftlicher Befund erstellt.

Pathogene Mutationen sowie unklassifizierte Varianten in den benannten 168 Genen werden tabellarisch mitgeteilt und hinsichtlich ihrer möglichen Pathogenität gewertet. Ebenso werden komplett analysierte Gene benannt. Sog.

„Analyselücken“, d.h. nicht-analyisierte Teilbereiche sind bei Bedarf erhältlich.

In einigen Fällen wird es für die Beurteilung der Krankheitsrelevanz von Varianten notwendig sein, molekulargenetische Tests auch bei Angehörigen durchzuführen (Ko-Segregations-Analysen).

Limitationen:

- Die NGS-Diagnostik ist nicht in der Lage, Repeat-Expansions-Mutationen (SCA1, 2, 3, 6, 7, 8, 10, 12, 17, 33) abzubilden.
- Potentielle Splice-Site Mutationen werden nur innerhalb der hochkonservierten Konsensus-Bereiche (+/- 5 Basen vom Exon-Intron-Übergang) analysiert.
- Eine Analyse von Exon-Deletionen ist derzeit noch nicht möglich. Bei begründetem Verdacht auf EA2 können entsprechende Analysen für *CACNA1A* bzw. *POLG* (MLPA-Analyse) ergänzt werden.

Genliste (168 publizierte Ataxie-Gene)

ABCB7, ABCD1, ABHD12, ACO2, ADCK3, AFG3L2, AHI1, ALAS2, ALG6, AMACR, AMT, ANO10, APTX, ARL13B, ARSA, ARX, ATCAY, ATM, ATP2B2, ATP2B3, ATP7B, BTBD, C10ORF2, CA8, CACNA1A, CACNB4, CAMTA1, CC2D2A, CEP290, CLN5, COQ2, COQ6, COQ9, CP, CSTB, CYP27A1, CYP7B1, DARS, DARS2, DDB2, DLAT, DNAH3, DNAJC19, DNAJC3, DNAJC5, EIF2, EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4, EIF2B5, ELOVL4, ELOVL5, EPM2A, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ETFA, ETFB, ETFDH, FGF14, FLVCR1, FOLR1, FXN, GALC, GBA, GBA2, GBE1, GCDH, GCLC, GCSH, GFAP, GLB1, GLDC, GM2A, GPR56, GRM1, HEXA, HEXB, HPRT1, HTRA1, INPP5E, ITM2B, ITPR1, KCNA1, KCNC3, KCNJ10, KIAA0226, KIF5C, L2HGDH, MFSD8, MLC1, MRE11A, MTPAP, MTTF, NEU1, NHLRC1, NPC1, NPC2, NPHP1, OPA1, OPA3, PAX6, PDHX, PDSS1, PDSS2, PDYN, PEX10, PEX2, PEX7, PHYH, PIK3R5, PLA2G6, PLEKHG4, PMM2, PNPLA6, POLG, POLH, POLR3A, POLR3B, PRICKLE1, PRKCG, PRRT2, RAB3A, RARS2, RELN, RNF216, RPGRIP1L, RRM2B, SACS, SETX, SIL1, SLC17A5, SLC19A3, SLC1A3, SLC25A15, SLC2A1, SLC9A1, SNX14, SPG7, SPR, SPTBN2, SRY, STUB1, SYNE1, SYT14, TDP1, TMEM216, TMEM240, TMEM67, TPP1, TRPC3, TSEN2, TSEN34, TSEN54, TSFM, TTBK2, TTPA, VAMP1, VLDLR, VPS13A, VRK1, WFS1, WWOX, XPA, XPC, ZNF592

Referenzen

Literatur-Stellen sind auf unserer Homepage referiert (www.medgen-tuebingen.de)