

Institut für Medizinische Genetik & Angewandte Genomik
Calwerstrasse 7 • 72076 Tübingen

Diagnostisches Next-Generation-Sequencing Panel

Panel-Diagnostik bei Hereditären Dystonie (DYT NGS)

Hintergrundinformation und Methodenbeschreibung

Version 3; Stand 28.06.2013; freigegeben von Peter Bauer

Prof. Dr. med. Olaf Riess (Direktor)

Calwerstrasse 7
DE 72076 Tübingen

Prof. Dr. med. Peter Bauer
Leiter Molekulargenetik
Tel. 07071/29-77692
Fax 07071/29-5172
peter.bauer@med.uni-tuebingen.de

Kontaktinformationen

Klinische Fragestellungen, Einschlusskriterien

Dr. med. Kathrin Grundmann
Tel: 07071 29 72292
Fax: 07071 29 5171
Email: kathrin.grundmann@med.uni-tuebingen.de

Laborleitung

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 Dystonie bzw. Dyskinesien werden 42 bekannte mit einer dystonen bzw. dyskinetischen Bewegungsstörung 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 **primären Torsionsdystonie TOR1A** (DYT1) und **THAP1** (DYT6). Daneben sind jene Gene berücksichtigt, die für die sog. **Dystonie-Plus Syndrome** ursächlich sein können (**SGCE** (DYT11), **GCH1**, **TH1** (DYT5), **ATP1A3** (DYT12) und **PRKRA** (DYT16)). Darüber hinaus werden **paroxysmale Dystonien** und **Dyskinesien** untersucht sowie eine große Zahl weiterer Krankheitsgene für Bewegungsstörungen, die klinisch auch durch eine dystone Bewegungsstörung imponieren. Das Dystonie-Panel ermöglicht damit die Abklärung dystoner Bewegungsstörung sowie Dyskinesien, die im Rahmen anderer Syndrome bzw. Erkrankungen auftreten.

Einschlusskriterien / erforderliche Unterlagen

- Als **Voruntersuchungen** sind erforderlich:
 - Klinisch-genetische Begutachtung (Ausschluss einer sekundären Dystonie)
- 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)

Universitätsklinikum Tübingen
Anstalt des öffentlichen Rechts
Sitz Tübingen
Geissweg 3 • 72076 Tübingen
Tel. 07071/29-0
www.medicin.uni-tuebingen.de
Steuer-Nr. 86156/09402
USt.-ID: DE 146 889 674

Aufsichtsrat
Hartmut Schrade (Vorsitzender)
Vorstand
Prof. Dr. Michael Bamberg (Vorsitzender)
Gabriele Sonntag (Stellv. Vorsitzende)
Prof. Dr. Karl Ulrich Bartz-Schmidt
Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth
Jana Luntz

Baden-Württembergische Bank Stuttgart
BLZ 600 501 01 Konto-Nr. 7477 5037 93
IBAN: DE41 6005 0101 7477 5037 93
SWIFT-Nr.: SOLADEST
Kreissparkasse Tübingen
BLZ 641 500 20 Konto-Nr. 14 144
IBAN: DE79 6415 0020 0000 0141 44
SWIFT-Nr.: SOLADES1TUB

- GenDG konformes schriftliches Einverständnis (siehe LINK)
- 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-Verdaus, (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 (Stampy)
- Detektion von Varianten: SNPs, SNVs, kurze Deletionen und Insertionen (SAMtools)
- Annotation der Varianten mit Daten aus den Datenbanken dbSNP und 1000 Genomes (Annovar).

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 34 Genen werden tabellarisch mitgeteilt und hinsichtlich ihrer möglichen Pathogenität gewertet. Ebenso werden nicht-ausreichend analysierte Teilbereiche („Analyselücken“) exakt benannt. Alle plausibel pathogen gewerteten Varianten werden durch konventionelle Sequenzierung bestätigt. 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 (SCA17) abzubilden.
- Heterozygote Gendosis-Veränderungen (Deletionen, Duplikationen), werden bioinformatisch bisher nicht sicher erfasst.
- Potentielle Splice-Site Mutationen werden nur innerhalb der hochkonservierten Konsensus-Bereiche (+/- 5 Basen vom Exon-Intron-Übergang) analysiert.

Genliste (42 publizierte Dystonie Gene)

ARSA, ARX, ATM, ATP13A2, ATP1A3, ATP7B, CIZ1, CLN3, FBXO7, FTL, GCDH, GCH1, HEXA, HPRT1, MECP2, MR1, NPC1, NPC2, PANK2, PARK2, PARK7, PLA2G6, PRKRA, PRRT2, SGCE, SLC2A1, SPR, TAF1, TBP, TH, THAP1, TIMM8A, TOR1A, VPS13A, ANO3, ARSA, ARX, ATM, ATP13A2, ATP1A3, ATP7B, CIZ1, CLN3, CP, DSC3, FBXO7, FTL, GCDH, GCH1, GNAL, HEXA, HPRT1, JPH3, MECP2, MR1, NPC1, NPC2, PANK2, PARK2, PARK7, PLA2G6, PNKD, PRKRA, PRRT2, SGCE, SLC16A2, SLC2A1, SLC6A3, SPR, TAF1, TBP, TH, THAP1, TIMM8A, TOR1A, VPS13A

Referenzen

Phukan et al., Lancet Neurol (2011); 10: 1074-85.