

Mutationssuche bei thorakalen Aortenaneurysmen bzw. Aortendissektionen (TAA bzw. TAD, ICD10: I71.2 und I71.02).

Hintergrundinformation und Methodenbeschreibung

Kontaktinformationen

Dr. rer. nat. Stephan Waldmüller

Tel: 07071 29 77 294

Fax: 07071 29 25 204

Email: stephan.waldmueller@med.uni-tuebingen.de

Anastasia Gazou

Tel: 07071 29 72 237

Fax: 07071 29 4380

Email: anastasia.gazou@med.uni-tuebingen.de

Hintergrund

Thorakale Aortenaneurysmen mit (TAAD) oder ohne (TAA) Dissektion können sowohl im Kontext syndromaler Erkrankungen (z.B. Marfan-Syndrom) als auch isoliert auftreten (familiäres TAAD, FTAAD). Typisch sind Dilatationen der Aorta thoracica auf Höhe des Sinus valsalva oder im Aufsteigenden Teil der Aorta, sowie Dissektionen der aufsteigenden (Stanford Typ A) oder der absteigenden Aorta (Stanford Typ B). Bei ca. jedem fünften Patienten finden sich ebenfalls betroffene Verwandte ersten Grades, wobei die Vererbung i.d.R. dem autosomal-dominanten Modus folgt. In ca. 10-14% der familiären Fälle liegt der Erkrankung eine Mutation im Gen *ACTA2* zugrunde (OMIM: 102620; Guo et al., 2007). Seltener betroffen sind die Gene *COL3A1*, *FBN1*, *MYH11*, *MYLK*, *SMAD3*, *TGFB2*, *TGFBR1* und *TGFBR2*.

Die routinemäßige molekulargenetische Untersuchung von Patienten mit TAA/D erfolgte bislang mittels konventioneller Sequenzierung (Sanger-Verfahren). Modernste Sequenziermethodik (Next-Generation-Sequencing, NGS) wurde bis dato nur auf Forschungsbasis eingesetzt. Mit der Aufnahme dieser Technologie in das neue EBM ab 1.7.2016 hat die NGS-Technologie das alte Sanger-Verfahren im Bereich der TAA/D-Diagnostik vollständig ersetzt, wodurch eine wesentlich kostengünstigere und schnellere Analytik ermöglicht wird, bei gleichbleibend hoher technischer Sensitivität und Spezifität.

Methodisch führen wir eine Exomsequenzierung durch und bewerten dann Varianten in alle relevanten Exons der Gene *ACTA2*, *COL3A1*, *FBN1*, *MYH11*, *MYLK*, *SMAD3*, *TGFB2*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, inklusive flankierender Intronsequenzen. Zusätzlich zur Sequenzierung erfolgt bei Patienten mit TAA bzw. TAAD immer auch eine MLPA-Analyse der vier Gene *COL3A1*, *FBN1*, *TGFBR1* und *TGFBR2*, um größere Deletionen bzw. Duplikationen nachzuweisen. Die Sequenzierdaten aller o.g. Gene werden darüber hinaus mit Hilfe des Tools „CNV-Hunter“ auf Gendosisveränderungen hin untersucht.

Einschlusskriterien / erforderliche Unterlagen

- Aneurysmen und/oder Dissektionen der Aorta thoracica
- Prädiktive Analysen dürfen nur durch Fachärzte für Humangenetik sowie Ärzte mit entsprechender Zusatzausbildung veranlasst werden
- Relevante klinisch-genetische Angaben (z.B. Kopie internistischen/kardiologischen Befundes)

- DNA (Blut)-Proben des Patienten (mindestens 20 µg DNA bzw. 5 – 10 ml EDTA-Blut)
- GenDG konformes schriftliches Einverständnis (als Download von unserer Homepage).
- Überweisungsschein Muster 10 mit Auftrag („Mutationssuche gemäß GOP 11448“).
- Auftragsformular (als Download von unserer Homepage).
- Privat versicherte Patienten benötigen keinen Überweisungsschein. Vor der Durchführung einer molekulargenetischen Diagnostik sollte aber die Kostenübernahme durch die private Krankenkasse geklärt werden. Dazu erstellt das *Institut für Humangenetik und Angewandte Genomik* jederzeit gern einen Kostenvoranschlag.

Analysedauer / Technischer Ablauf / Datenspeicherung / Resultate

Analysedauer: Sobald die Analyse im Labor begonnen werden kann (wenn der Auftrag vollständig vorliegt), benötigen wir etwa 4 Wochen für die Sequenzierung, 2 Wochen für die Datenanalyse und ggfs. weitere 2 Wochen für Validierungssequenzierungen. Insgesamt dauert die Analyse also ca, 8 Wochen.

Technischer Ablauf der Sequenzierung: Die Sequenzierung umfasst a) die physikalische Fragmentierung der DNA, b) die Adapter-Ligation, c) die Anreicherung aller Exone inklusive flankierender Intronbereiche, d) die klonale Amplifikation der DNA auf der Flußzelle, e) die Paired-End-Sequenzierung der immobilisierten DNA.

Technischer Ablauf der Gendosisanalyse: Die SALSA MLPA probemixe P065-B1/P066-B2 Marfan Syndrome, P148 TGFBR1 – TGFBR2 und P155-D1 Ehlers-Danlos-Syndrome III & IV (MRC Holland) werden verwendet um größere Deletionen bzw. Duplikationen der Gene *COL3A1*, *FBN1*, *TGFBR1* und *TGFBR2* nachzuweisen. Ergänzend werden die NGS-Daten mittels des hauseigenen Programms „CNV-Hunter“ analysiert. Deletionen und Duplikationen werden nur dann berichtet, wenn sie sich mittels einer zweiten Technik verifizieren lassen.

Bioinformatische Analyse der Sequenzierdaten: folgende Schritte werden durchgeführt:

- Mapping der Reads auf das GRCh37 Referenzgenom (BWA-MEM)
- Detektion von Varianten: SNPs, SNVs, kurze Deletionen und Insertionen (free bayes)
- Annotation der Varianten mit Daten u.a. aus den Datenbanken 1000 Genomes, gnomAD, ExAC und ClinVar (SnpEff).

Resultate: Mit Abschluss der Analysen wird ein schriftlicher Befund erstellt. Pathogene Mutationen (Klasse 5), wahrscheinlich pathogene Varianten (Klasse 4) sowie Varianten unklarer klinischer Signifikanz (Klasse 3) werden tabellarisch mitgeteilt. Gene mit Sequenzbereichen, deren Abdeckung 20X unterschreitet werden exakt benannt. Die genauen Koordinaten dieser Sequenzbereiche werden auf Anfrage zur Verfügung gestellt.

Limitationen:

Potentielle Splice-Site Mutationen werden nur innerhalb der hochkonservierten Konsensus-Bereiche (+/- 4 Basen vom Exon-Intron-Übergang) analysiert.

Genliste

Sequenzierung: *ACTA2*, *COL3A1*, *FBN1*, *MYH11*, *MYLK*, *SMAD3*, *TGFB2*, *TGFBR1*, *TGFBR2*

MLPA: *COL3A1*, *FBN1*, *TGFBR1*, *TGFBR2*

Referenzen

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