

Mutationssuche bei erblichen Kardiomyopathien (HCM, DCM, ARVC, RCM, LVNC)

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

Dr. med. Miriam Stampfer

Tel: 07071 29 72 262

Fax: 07071 29 55 94

Email: miriam.stampfer@med.uni-tuebingen.de

Kurzbeschreibung

Internationale Richtlinien empfehlen derzeit bei Patienten mit Symptomen der Hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) entweder eine auf die fünf hochpenetranten Gene (Hauptgene; *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* und *TPM1*) der HCM fokussierte oder eine alle Krankheitsgene umfassende Genanalytik. Analog dazu wird eine Genanalytik auch für andere Formen der Kardiomyopathien (Dilatative Kardiomyopathie, DCM; Restriktive Kardiomyopathie, RCM; Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie, ARVC; Linksventrikuläre Noncompaction Kardiomyopathie, LVNC) als nützlich erachtet, insbesondere wenn die Familiengeschichte schwerwiegende Krankheitsfälle aufweist und ein Mutationsnachweis die Möglichkeit einer prädiktiven Diagnostik eröffnet. Aus Kostengründen wurden bislang in der Regel nur wenige der Hauptgene mittels Sanger-Sequenzierung analysiert, so z.B. die beiden Gene *MYH7* und *MYBPC3* bei Patienten mit HCM. Dadurch konnte in ca. 40% der Fälle die Verdachtsdiagnose einer erblichen/vererbaren HCM gesichert werden. 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 ersetzt die NGS-Technologie das alte Sanger-Verfahren im Bereich der Kardiomyopathie-Diagnostik vollständig, wodurch eine wesentlich kostengünstigere und schnellere Analytik ermöglicht wird, bei gleichbleibend hoher technischer Sensitivität und Spezifität. Sehr große Gene, wie z.B. *TTN* (Titin), das Hauptgen der Dilatativen Kardiomyopathie, können seit dem routinemäßig untersucht werden.

Methodisch untersuchen wir alle relevanten Exons inklusive flankierender Intronsequenzen mittels Next-Generation-Sequencing (NGS)-basierter Exomsequenzierung und Phänotyp-basierter Priorisierung der Auswertung. Dadurch werden Punktmutationen sowie kleinere Insertionen bzw. Deletionen erfasst. In Ergänzung zu der Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification-Methode (MLPA), eignet sich das Verfahren aber auch, um größere genomische Aberrationen wie Exon-Deletionen und –Duplikationen nachzuweisen. Bezüglich indikationsspezifischer Genlisten verweisen wir auf unser Leistungsverzeichnis so wie die jeweiligen Anforderungsformulare.

Sequenzierungen bis zu einem Volumen von 25 Kilobasen können derzeit im Rahmen der Gebührenordnungsposition 11514 antragsfrei durchgeführt werden. Zu beachten ist aber, dass die umfassende Analyse aller bekannten Krankheitsgene in der Regel das Volumen von 25 Kilobasen überschreitet. Damit ist eine solche Untersuchung bei gesetzlich Versicherten derzeit nur nach vorheriger Bewilligung eines Antrages der Patientin bzw. des Patienten durch die zuständige Krankenkasse berechnungsfähig ist. Antrags-Unterlagen (zur Weiterleitung an die Patientin bzw. den Patienten) stellen wir gerne zur Verfügung. Alternativ kann die Patientin

Universitätsklinikum Tübingen
Anstalt des öffentlichen Rechts
Sitz Tübingen
Geissweg 3 • 72076 Tübingen
Tel. 07071/29-0
www.medizin.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

bzw. der Patient uns bevollmächtigen, die Leistung an seiner statt zu beantragen. Ein entsprechendes Formular ist dem auf unserer Homepage verfügbaren Anforderungsbogen angefügt. Bei Fällen von DCM ist eine Antragsstellung momentan obligat, da eine Basis-Untersuchung (<25 KB) aufgrund der wichtigen Rolle des Gens *TTN* (Titin, ca. 100 KB) nicht sinnvoll ist. Bei privat versicherten Patienten muss in jedem Fall vor Beginn der Analytik die Kostenübernahme durch die Kasse schriftlich bestätigt werden.

Einschlusskriterien / erforderliche Unterlagen

- Klinische Zeichen der HCM, DCM, RCM, ARVC oder Kardiomyopathie unklarer Genese oder Klärung der Ursache eines plötzlichen Herztodes bei V.a. Kardiomyopathie.
- 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 (Vordruck als Download von unserer Homepage).
- Bei gesetzlich Versicherten: Überweisungsschein Muster 10 mit Diagnose (z.B. „V.a. HOCM“) und Auftrag (z.B. „Sequenzierung und Gendosisanalyse aller Krankheitsgene (Sequenzierung >25 Kilobasen, gemäß GOP 11514); bei Ablehnung der Kostenübernahme: Basis-Diagnostik (Sequenzierung <25 Kilobasen, gemäß GOP 11513)“). Alternativ kann in dem Auftragsfeld auch auf das ausgefüllte Auftragsformular verwiesen werden. Muster-Überweisungsscheine finden Sie auf unserer Homepage.
- Auftragsformular (mit Vordruck für Vollmacht zur Antragsstellung, als Download von unserer Homepage). Hier können handschriftlich auch individuelle Aufträge erteilt werden.
- 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 P048 (*LMNA*), P098 (*TNNT2*), P100 (*MYBPC3*), P168 (PKP2 und DSP) und P418(*MYH7*; MRC Holland) werden verwendet um größere Deletionen bzw. Duplikationen 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 Untersuchung wird ein schriftlicher Befund erstellt. Mitgeteilt werden sowohl eindeutig pathogene Varianten (Klasse 5) als auch wahrscheinlich pathogene Varianten (Klasse 4). 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 (maximal): *ACTC1, ACTN2, ALMS1, ANKRD1, BAG3, BRAF, CASQ2, COX15, CRYAB, CSRP3, DES, DMD, DSC2, DSG2, DSP, EMD, FHL1, FHL2, FKTN, FXN, GATAD1, GLA, GPD1L, HCN4, ILK, JPH2, JUP, KLF10, LAMA2, LAMA4, LDB3, LMNA, MIB1, MURC, MYBPC3, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYLK2, MYOZ2, MYPN, NEXN, NKX2-5, NPPA, PDLIM3, PKP2, PLN, PRDM16, PRKAG2, RAF1, RBM20, RYR2, SCN5A, SGCD, SLC25A4, SOS1, TAZ, TBX20, TBX5, TCAP, TGFB3, TMEM43, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TRIM63, TTN, TTR, TXNRD2, VCL*

MLPA: *LMNA, DSP, MYBPC3, MYH7, PKP2, TNNT2*

Referenzen

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