

Mutationssuche bei Verdacht auf Long-QT-Syndrom (LQTS) bzw. Romano-Ward-Syndrom (RWS; ICD10: I49.8)

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

Beim Long-QT-Syndrom (LQTS, Synonym: Romano-Ward-Syndrom, RWS) handelt es sich um eine elektrophysiologische Erkrankung des Herzens, die sich im EKG als Verlängerung der QT-Spanne und Veränderung der T-Wellen darstellt und mit ventrikulären Torsade-de-Pointes(TdP)-Tachykardien einhergeht. Letztere ziehen in der Regel Synkopen nach sich, die das kardinale Symptom der Erkrankung sind. Normalerweise treten Synkopen ohne Vorwarnung auf. Besonders häufig ereignen sie sich während körperlicher Betätigung oder in einer Phase von emotionalem Stress, seltener auch in Ruhephasen oder im Schlaf. TdP-Tachykardien können zu Kammerflimmern und plötzlichem Herztod führen. Schwerwiegende kardiale Ereignisse treten gehäuft in den ersten drei Lebensdekaden auf. Die Erkrankung wird autosomal-dominant vererbt und ist u.a. auf Mutationen in kardial exprimierten Ionenkanal-Genen zurückzuführen, von denen die drei Gene *KCNQ1*, *KCNH2* und *SCN5A* am häufigsten betroffen sind. Seltener betroffen sind z.B. die Gene *KCNE1*, *KCNE2*, *CAV3*, *SCN4B*, *AKAP9*, *SNTA1* und *KCNJ5*. In ca. jedem vierten LQTS-Patienten findet sich jedoch keine pathogene Mutation in einem dieser Gene.

Die routinemäßige molekulargenetische Untersuchung von Patienten mit LQTS/RWS 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 seit 1.7.2016 ersetzt die NGS-Technologie das alte Sanger-Verfahren im Bereich der LQTS-Diagnostik vollständig, wodurch eine wesentlich kostengünstigere und schnellere Analytik ermöglicht wird, bei gleichbleibend hoher technischer Sensitivität und Spezifität.

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 im Falle des LQTS 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 bzw. der Patient uns bevollmächtigen, die Leistung an seiner statt zu beantragen. Ein entsprechendes Formular ist dem auf unserer Homepage verfügbaren Anforderungsbogen angefügt. Bei privat versicherten Patienten muss in jedem Fall vor Beginn der Analytik die Kostenübernahme durch die Kasse schriftlich bestätigt werden.

Einschlusskriterien / erforderliche Unterlagen

- Verdacht auf erblich bedingtes LQTS/RWS
- 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 (Download siehe Homepage).
- Bei gesetzlich Versicherten: Überweisungsschein Muster 10 mit Diagnose (z.B. „V.a. LQTS“) 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 (ggf. mit Vollmacht zur Antragsstellung; Download siehe 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: Der SALSA MLPA probemixe P108-B2 und P114-B2 (MRC Holland) wird verwendet, um größere Deletionen bzw. Duplikationen in den Genen *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNH2*, *KCNQ1* und *SCN5A* 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 (SnEff).

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

Basisuntersuchung:

Sequenzierung: *ANK2, CACNA1C, CALM1, CAV3, KCNE1, KCNE2, KCNH2, KCNQ1, SCN5A*

MLPA: *KCNE1, KCNE2, KCNH2, KCNQ1, SCN5A*

Erweiterte Untersuchung:

Zusätzliche Sequenzierung: *AKAP9, KCNJ2, KCNJ5, SCN4B, SNTA1*

Referenzen

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