

Mutationssuche bei V.a. Marfan-Syndrom (MFS; ICD-10-GM: Q87.4)

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

Kurzbeschreibung

Beim Marfan-Syndrom (MFS) handelt es sich um eine erbliche Bindegewebs-Erkrankung, die Symptome in unterschiedlichen Organsystemen umfasst, darunter z.B. Skelett und Auge. Zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen insbesondere Veränderungen des aufsteigenden Teils der Hauptschlagader (Aorta thoracica ascendens), welcher bei MFS-Patienten dazu neigt, Aneurysmen und Dissektionen auszubilden. Die individuell sehr variable Beteiligung verschiedener Organsystem erschwert die korrekte Diagnosestellung einzig auf der Grundlage von klinischen Kriterien. Eine genetische Untersuchung kann hier insofern hilfreich sein, als dass der Nachweis einer Mutation im Gen *FBN1* (Fibrillin-1) gemäß Gent-Kriterien ein diagnostisches Hauptkriterium bildet. Dieses Gen umfasst 66 Exons (kodierender Bereich: 8,616 Kilobasen) und es wurden mittlerweile mehr als 1400 Punktmutationen, 390 kleinere und 50 größere Deletionen oder Insertionen als ursächlich für MFS beschrieben (Datenbank: HGMD Professional 2016.1). Untersuchungen von Loeyes et al. deuten darauf hin, dass fast alle Patienten mit klassischem MFS pathogene Mutationen im Gen *FBN1* tragen und dass Patienten ohne Nachweis einer *FBN1* Mutation ursächliche Varianten in den Genen *TGFBR1* oder *TGFBR2* (Transforming Growth Factor Beta Receptor Type 1 bzw. 2), zwei Gene, welche mit dem phänotypisch mit dem MFS verwandten Loeyes-Dietz-Syndrom assoziiert sind.

Die routinemäßige molekulargenetische Untersuchung von Patienten mit MFS 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 ersetzt die NGS-Technologie das alte Sanger-Verfahren im Bereich der MFS-Diagnostik vollständig, 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 *FBN1*, *TGFBR1* und *TGFBR2*, inklusive flankierender Intronsequenzen. 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.

Zu beachten ist, dass die molekulargenetische Abklärung des Verdachts auf MFS im EBM durch die indikationsspezifischen Ziffern 11444 (Sequenzierung) und 11445 (Deletions- / Duplikationsanalyse) abgebildet wird und somit immer antragsfrei erfolgen kann. Diese Basis-Untersuchung erfolgt zweistufig, mit der Sequenzierung als erster Stufe, die nur dann von einer MLPA gefolgt werden kann, wenn die diagnostische

Fragestellung durch die Sequenzierung (GOP 11444) nicht abschließend geklärt werden konnte. Sollte auch die MLPA gemäß GOP 11445 nicht zu einer abschließenden Klärung der diagnostischen Fragestellung führen, so können im Rahmen der Gebührenordnungsposition (GOP) 11514 weitere Krankheitsgene bzw. Gene, die mit Differentialdiagnosen assoziiert sind, bis zu einem Volumen von 25 Kilobasen (Sequenzierung) antragsfrei untersucht werden, allerdings frühestens ein Jahr nach der Untersuchung gemäß GOP 11444 und 11445.

Allgemeine Bemerkung: Nur Untersuchungen mit einem Volumen >25 Kilobasen sind derzeit erst nach vorheriger Bewilligung eines Antrages der Patientin bzw. des Patienten durch die zuständige Krankenkasse berechnungsfähig. 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

- Klinische Zeichen des Marfan-Syndroms
- 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)
- Überweisungsschein Muster 10 mit Auftrag („Mutationssuche bei Verdacht auf Marfan-Syndrom (ICD-10: Q87.4) gemäß GOP 11444 und ggf. 11445).
- Auftragsformular (Vordruck 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: Der SALSA MLPA probemix P065-B1/P066-B2 Marfan Syndrome (MRC Holland) wird verwendet um größere Deletionen bzw. Duplikationen der Gene *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 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 und MLPA: *FBN1*, *TGFBR1*, *TGFBR2*

Referenzen

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