

Mutationssuche bei V.a. Noonan-Syndrom(ICD-10-GM: Q87.1)

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

Zu den charakteristischen Merkmalen des Noonan-Syndroms zählen neben einer unterschiedlich stark ausgeprägten allgemeinen Entwicklungsverzögerung auch spezifische Gesichtszüge, eine geringe Körpergröße sowie kongenitale Herzfehler, welche sich in mehr als der Hälfte der Patientinnen und Patienten finden. Am häufigsten sind Pulmonalklappen-Dysplasien/Stenosen, die Patientinnen und Patienten leiden aber auch häufig unter einer Hypertrophen Kardiomyopathie, die entweder schon bei der Geburt apparent ist, oder sich in Verlauf der Kindheit entwickelt. Zu den kardialen Komplikationen kommen bei manchen Patientinnen und Patienten skeletale Auffälligkeiten (Kielbrust, Trichterbrust), aber auch Störungen der Blutgerinnung oder Augenkrankheiten. Bis zu einem Viertel der Patientinnen und Patienten zeigen eine milde Einschränkung der intellektuellen Fähigkeiten. Auch sprachliche Einschränkungen sind bei Patientinnen und Patienten mit Noonan-Syndrom überrepräsentiert.

Das Noonan-Syndrom wird autosomal-dominant vererbt und geht in ca. der Hälfte der Fälle auf „gain-of-function“-Mutationen im Gen *PTPN11* zurück. Weder Nonsense- noch Frameshift-Mutationen oder größere Duplikationen bzw. Deletionen scheinen eine ursächliche Rolle zu spielen. *BRAF*, *KRAS*, *RAF1*, *RIT1*, *SOS1* sind weitere etablierte Krankheitsgene, die seltener von pathogenen Mutationen betroffen sind und die laut EBM in eine erweiterte Mutationssuche einbezogen werden sollten. Die molekulargenetische Diagnostik bei V.a. Noonan-Syndrom umfasste in der Vergangenheit eine zeit- und kosten-aufwändige Stufendiagnostik per Sanger-Sequenzierung. 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 inzwischen das alte Sanger-Verfahren im Bereich der Noonan-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 in einer ersten Auswertestufe Varianten in allen relevanten Exons des Gens *PTPN11*, inklusive flankierender Intronsequenzen. Dadurch werden Punktmutationen sowie kleinere Insertionen bzw. Deletionen erfasst.

Zu beachten ist, dass diese erste Stufe der Untersuchung im EBM durch die indikationsspezifische Gebührenordnungsposition (GOP) 11355 abgebildet ist und somit immer antragsfrei erfolgen kann. Letzteres gilt auch für die zweite analytische Stufe, die Sequenzierung der Gene *BRAF*, *KRAS*, *RAF1*, *RIT1*, *SOS1* (GOP 11356), die nur durchgeführt werden kann, falls die analytische Fragestellung durch die vorherige Analyse des Gens *PTPN11* nicht vollständig geklärt werden konnte. Sollte dann immer noch keine ursächliche Mutation detektiert worden sein, 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 vorangegangenen Untersuchung.

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

- Klinischer Verdacht auf Noonan-Syndrom
- 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 („Stufe 1: Sequenzierung *PTPN11*; Stufe 2: Sequenzierung *BRAF*, *KRAS*, *RAF1*, *RIT1*, *SOS1*“).
- 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.

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. 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

Basis-Untersuchung (Sequenzierung): *PTPN11*

Erweiterte Untersuchung (Sequenzierung): *BRAF, KRAS, RAF1, RIT1, SOS1*

Referenzen

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