

## Mutationssuche bei Verdacht auf Ehlers-Danlos-Syndrom (EDS) Typ IV (vaskulärer Typ, vEDS, ICD10: Q79.6)

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 Ehlers-Danlos-Syndrom handelt es sich um eine erbliche Bindegewebs-Erkrankung, die mit oder ohne Beteiligung der Gefäße verlaufen kann. Charakteristisch für den vaskulären Typ (Typ IV, vEDS) ist eine dünne und durchscheinende Haut, eine Neigung zu Hämatomen sowie eine Fragilität bestimmter Gefäße, aber auch einiger Eingeweide, wie z.B. des Uterus. Lebensbedrohliche Komplikationen resultieren häufig aus Dissektionen, die z.B. den aufsteigenden Teil der Hauptschlagader betreffen können, oder auch aus gastrointestinalen Perforationen und Organ-Rupturen. Der vaskuläre Typ des EDS wird in der Regel autosomal-dominant vererbt. Einige wenige Berichte deuten zusätzlich auf einen biallelicchen Modus hin. Die Sequenzierung des Gens *COL3A1* (Kollagen, Typ 3, Alpha-1) ermöglicht in >95% der Fälle die Aufklärung der molekulargenetischen Ursache und damit die Bestätigung der klinischen Verdachtsdiagnose vEDS. In seltenen Fällen (ca. 1%) finden sich per MLPA-Analyse größere Deletionen bzw. Duplikationen.

Die routinemäßige molekulargenetische Untersuchung von Patienten mit vEDS 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 inzwischen das alte Sanger-Verfahren im Bereich der EDS-Diagnostik vollständig, wodurch eine wesentlich kostengünstigere und schnellere Analytik ermöglicht wird, bei gleichbleibend hoher technischer Sensitivität und Spezifität.

Methodisch untersuchen wir alle relevanten Exons des Gens *COL3A1* inklusive flankierender Intronsequenzen mittels Next-Generation-Sequencing (NGS)-basierter Exomsequenzierung. 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 EDS Typ IV im EBM durch die indikationsspezifische Ziffer 11446 abgebildet ist und somit immer antragsfrei erfolgen kann. Sollte die Untersuchung des *COL3A1*-Gens nicht zu einer abschließenden Klärung der diagnostischen Fragestellung führen, so können im Rahmen der Gebührenordnungsposition 11514 weitere Krankheitsgene bis zu einem Volumen von 25 Kilobasen (Sequenzierung) antragsfrei untersucht werden, allerdings frühestens ein Jahr nach der Untersuchung gemäß GOP 11444.

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  
Klaus Tischler

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

**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 vEDS
- 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
- Überweisungsschein Muster 10 mit Auftrag („Mutationssuche bei Verdacht auf vaskuläres Ehlers-Danlos-Syndrom, Q79.6, gemäß GOP 11446).
- Auftragsformular (als Download von unserer Homepage; der Anhang „Übertragung der Vollmacht“ wird nicht benötigt)
- 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 P155-D1 (MRC Holland) wird verwendet, um größere Deletionen bzw. Duplikationen im Gen *COL3A1* 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). Sequenzbereiche, 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: *COL3A1*

MLPA: *COL3A1*

**Referenzen**

Literatur-Stellen sind auf unserer Homepage referiert ([www.medgen-tuebingen.de](http://www.medgen-tuebingen.de))