

Institut für Medizinische Genetik & Angewandte Genomik
Calwerstrasse 7 • 72076 Tübingen

Prof. Dr. med. Olaf Riess (Direktor)

Calwerstrasse 7
DE 72076 Tübingen

Prof. Dr. med. Peter Bauer
Leiter Molekulargenetik
Tel. 07071/29-77692
Fax 07071/29-5172
peter.bauer@med.uni-tuebingen.de

Panel Diagnostik für Hereditäre Parkinson-Erkrankungen

Hintergrundinformation und Methodenbeschreibung

Version 2; Stand 25.03.2014; freigegeben von Peter Bauer

Kontaktinformationen

Dr. rer. nat. Anne Söhn
Tel: 07071 29 72312
Fax: 07071 29 25065
Email: anne.soehn@med.uni-tuebingen.de

Kurzbeschreibung

Bei Patienten mit Verdacht auf eine hereditäre Parkinson-Erkrankung werden insgesamt 35 Gene, die mit hereditärem Parkinsonismus in Verbindung gebracht werden, durch spezifische Anreicherung (Agilent HaloPlex) und Next-Generation-Sequencing (Illumina MiSeq 2x 150 bp paired-end) analysiert. Das Panel umfasst dabei sechs Gene, die für klassische monogenetisch verursachte Parkinson-Erkrankungen ursächlich sind (*PARK2*, *PINK1*, *PARK7* für juvenile, rezessiv vererbte Parkinson-Formen und *SNCA*, *LRKK2*, *UCHL1* für dominante Formen), und weitere 27 Gene für atypische Formen und den Überlappungsbereich zu Dystonie, Spastik und Ataxie. Darüber hinaus werden zwei rekurrende Mutationen (*VPS35*: p.Asp620Asn für spätmanifestes Parkinson-Syndrom und *TAF1/DYT3*: DSC3 für X-gekoppeltes Dystonie-Parkinson-Syndrom/Lubag) untersucht.

Einschlusskriterien / erforderliche Unterlagen

Als **Voruntersuchungen** sind erforderlich:

- Klinisch-genetische Begutachtung (Ausschluss eines sekundären Parkinsonismus)
- DNA-Proben (oder Blut) des Patienten (mindestens 20 µg DNA bzw. 5 ml EDTA-Blut)
- Relevante klinische Angaben (z.B. Kopie des genetischen oder neurologischen Gutachtens)
- GenDG-konformes schriftliches Einverständnis
- Kostenübernahmeerklärung der Krankenkasse (ein Begründungsschreiben stellen wir gerne zur Verfügung)

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

Analysedauer / Ablauf / Datenspeicherung / Resultate

Analysedauer: Sobald die Analyse im Labor begonnen werden kann (der Auftrag vollständig vorliegt) benötigen wir etwa 8 Wochen für die Sequenzierung, 4 Wochen für die Datenanalyse und ggfs. weitere 4-8 Wochen für Validierungssequenzierungen. Insgesamt dauert die Analyse also 12-20 Wochen.

Technischer Ablauf: Die Sequenzierung umfasst die (1) Fragmentierung der DNA durch multiple Restriktionsenzym-Verdaus, (2) die Zirkularisierung spezifischer DNA-Spaltprodukte durch Selector-Probe Sonden und anschließendes Ligieren zu ringförmiger DNA, (3) die PCR-Amplifikation zirkulärer DNA mit patientenspezifischen Barcodes (MIDs), (4) Qualitätskontrolle und Quantifizierung der DNA-Bibliothek, (5) paired-end Sequenzierung der DNA-Bibliothek durch Illumina MiSeq Technologie (mindestens 2x 150 bp).

Die bioinformatische Analyse der Sequenzierdaten geschieht durch folgende Schritte:

- Mapping der Reads auf das hg19 Referenzgenom (Stampy)
- Detektion von Varianten: SNPs, SNVs, kurze Deletionen und Insertionen (SAMtools)
- Annotation der Varianten mit Daten aus den Datenbanken dbSNP und 1000 Genomes (AnnoVar).

Parallel wird mittels MLPA (Kit P051 und P052, MRC Holland) auf Gendosisaberrationen in denen Genen *LRRK2*, *PARK2*, *PARK7*, *PINK1*, *SNCA* und *UCHL1* hin analysiert.

Resultate: Mit Abschluss der Analysen wird ein schriftlicher Befund erstellt.

Pathogene Mutationen sowie unklassifizierte Varianten in den benannten acht Genen werden tabellarisch mitgeteilt und hinsichtlich ihrer möglichen Pathogenität gewertet. Ebenso werden nicht-ausreichend analysierte Teilbereiche („Analyselücken“) exakt benannt. Alle plausibel pathogen gewerteten Varianten werden durch konventionelle Sequenzierung bestätigt. In einigen Fällen wird es für die Beurteilung der Krankheitsrelevanz von Varianten notwendig sein, molekulargenetische Tests auch bei Angehörigen durchzuführen (Ko-Segregations-Analysen).

Limitationen:

- Potentielle Splice-Site-Mutationen werden nur innerhalb der hochkonservierten Konsensus-Bereiche (+/- 4 Basen vom Exon-Intron-Übergang) analysiert.

Genliste (35 publizierte Parkinson-Gene)

AFG3L2, *ATP13A2*, *ATP1A3*, *ATP7B*, *C10ORF2*, *C19ORF12*, *CP*, *CSF1R*, *DCTN1*, *FBXO7*, *FGF14*, *GCH1*, *GRN*, *HTRA2*, *LRRK2*, *MAPT*, *PANK2*, *PARK2*, *PARK7*, *PDGFRB*, *PINK1*, *PLA2G6*, *POLG*, *PRKCG*, *PRKRA*, *SLC20A2*, *SLC30A10*, *SLC6A3*, *SNCA*, *TAF1* (nur *DSC3*), *TH*, *UCHL1*, *VPS13A*, *VPS35* (nur p.Asp620Asn), *WDR45*

Ausgewählte Referenzen

Parkinson Disease Overview. Pankratz ND, Wojcieszek J, Foroud T. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 19932004 May 25 [updated 2014 Feb 27].

Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, Somer H, Suomalainen A.: Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet*. 2004 Sep 4-10;364(9437):875-82.

Baloh RH, Salavaggi E, Milbrandt J, Pestronk A.: Familial parkinsonism and ophthalmoplegia from a mutation in the mitochondrial DNA helicase *twinkle*. *Arch Neurol*. 2007 Jul;64(7):998-1000.

Wang C, Li Y, Shi L, Ren J, Patti M, Wang T, de Oliveira JR, Sobrido MJ, Quintáns B, Baquero M, Cui X, Zhang XY, Wang L, Xu H, Wang J, Yao J, Dai X, Liu J, Zhang L, Ma H, Gao Y, Ma X, Feng S, Liu M, Wang QK, Forster IC, Zhang X, Liu JY.: Mutations in *SLC20A2* link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nat Genet*. 2012 Feb 12;44(3):254-6.

Nicolas G, Pottier C, Maltête D, Coutant S, Rovelet-Lecrux A, Legallic S, Rousseau S, Vaschalde Y, Guyant-Maréchal L, Augustin J, Martinaud O, Defebvre L, Krystkowiak P, Pariente J, Clanet M, Labauge P, Ayrignac X, Lefaucheur R, Le Ber I, Frébourg T, Hannequin D, Campion D.: Mutation of the *PDGFRB* gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. *Neurology*. 2013 Jan 8;80(2):181-7.

Nolte D, Niemann S, Müller U.: Specific sequence changes in multiple transcript system *DYT3* are associated with X-linked dystonia parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 2;100(18):10347-52.