Institut für
Medizinische Genetik &
Angewandte Genomik

Diagnostisches Next-Generation-Sequencing Panel

Panel-Diagnostik bei hereditären Paraplegien (HSP NGS)

Hintergrundinformation und Methodenbeschreibung
Version 1; Stand 28.06.2013; freigegeben von Peter Bauer

Kontaktinformationen

Prof. Dr. med. Peter Bauer
Tel: 07071 29 77692
Fax: 07071 29 5172
Email: peter.bauer@med.uni-tuebingen.de

Kurzbeschreibung

Bei Patienten mit Verdacht auf eine hereditäre Paraplegie werden 101 bekannte, mit einer Paraplegie assoziierte Gene durch spezifische Anreicherung (Agilent HaloPlex) und Next-Generation-Sequencing (Illumina MiSeq 2x 150 bp paired-end) analysiert. Das Panel umfasst alle Gene für die klassischen monogenen Formen der HSPs, Gene der spastischen Ataxien und Gene im Überlappungsbereich zur hereditären Neuropathie bzw. Motoneuronerkrankung Das HSP-Panel ermöglicht damit die Abklärung einfacher und komplizierter HSP-Erkrankungen.

Einschlusskritierien / erforderliche Unterlagen

- Als **Voruntersuchungen** ist eine klinische-neurologische Untersuchung einschließlich Bildgebung erforderlich (Ausschluss einer sekundären Paraplegie)
- DNA (Blut) Proben des Patienten (mindestens 20 µg DNA bzw. 5 ml EDTA-Blut)
- Relevante klinische Angaben (z.B. Kopie des genetische bzw. pädiatrischen oder neurologischen Gutachtens)
- GenDG konformes schriftliches Einverständnis
- Kostenübernahmeerklärung der Krankenkasse (ein Begründungsschreiben stellen wir gerne zur Verfügung)

Analysedauer / Technischer 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 Restriktionenzym-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).

Neben der Suche nach kleinen intra-exonischen Deletionen wird mittels einer statistischen Analyse nach Deletionen von kompletten Exons gesucht. Letztere Analyse ist derzeit noch nicht diagnostisch validiert.

Resultate:

- Mit Abschluss der Analysen wird ein schriftlicher Befund erstellt.
- Die eingesetzte Methode erlaubt es >95% der Targetregionen (insgesamt 163kb) diagnostisch (mit >20 Reads pro Base) auszuwerten. Die durchschnittliche Abdeckung (*Coverage*) beträgt dabei etwa 1.000 Reads pro Base.
- Pathogene Mutationen sowie unklassifizierte Varianten in den benannten 62 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:

- Die NGS-Diagnostik ist nicht in der Lage, Repeat-Expansions-Mutationen abzubilden.
- Potentielle Splice-Site Mutationen werden nur innerhalb der hochkonservierten Konsensus-Bereiche (+/- 5 Basen vom Exon-Intron-Übergang) analysiert.
- Eine Analyse von Exon-Deletionen ist derzeit noch nicht möglich. Sofern genomische Deletion für SPAST, SPG7 oder SPG11 noch nicht ausgeschlossen sind, können entsprechende Analysen (MLPA-Analyse) ergänzt werden.
- Die Abdeckung für CYP2U1, GBA und GJC2 liegt unter 95%.

Genliste (101 publizierte Paraplegie-Gene)

ABCD1, ABHD12, AFG3L2, AIMP1, ALDH3A2, ALS2, ANG, AP4B1, AP4E1, AP4M1, AP4S1, AP5Z1, ATL1, AUH, B4GALNT1, BICD2, BSCL2, C12ORF65, C19ORF12, CCT5, CSF1R, CYP27A1, CYP2U1, CYP7B1, DARS2, DDHD1, DDHD2, ERLIN2, FA2H, FAM126A, FIG4, FUS, FXN, GAD1, GALC, GAN, GARS, GARS, GBA, GBA2, GCH1, GFAP, GJC2, GLB1, GLTP, HEPACAM, HEXA, HSD17B4, HSPD1, KIAA0196, KIF1A, KIF1C, KIF5A, L1CAM, MARS2, MFN2, MLC1, MTPAP, NIPA1, OPA1, OPA1, OPA3, OPTN, PANK2, PDYN, PLA2G6, PLP1, PNPLA6, POLR3A, POLR3B, PPP2R2B, REEP1, RNASET2, RTN2, SACS, SETX, SIL1, SLC16A2, SLC25A15, SLC2A1, SLC33A1, SOD1, SOX10, SPAST, SPG11, SPG20, SPG21, SPG7, SPR, SUN1, TARDBP, TECPR2, TGM6, TGM6, TH, TRPV4, TTBK2, VAPB, VPS37A, ZFYVE26, ZFYVE27

Referenzen

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