

Diagnostisches Next-Generation-Sequencing Panel

NGS Sequenzierung bei mentaler Retardierung

„Kingsmore“-Panel

Hintergrundinformation und Methodenbeschreibung

Version 5; Stand 27.01.2015; freigegeben von Peter Bauer

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

Kontaktinformationen

Klinische Fragestellungen, Einschlusskriterien

Dr. med. Ute Grasshoff
Tel: 07071 29 72288
Fax: 07071 29 5171
Email: ute.grasshoff@med.uni-tuebingen.de

Laborleitung

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

Kurzbeschreibung

Bei Patienten mit mentaler Retardierung (MR) werden 526 bekannte MR-Gene durch spezifische Anreicherung (Illumina TruSeq) und Next-Generation-Sequencing (Illumina NextSeq 500 bzw. HiSeq2500 >2x 100bp paired-end) analysiert.

Einschlusskriterien / mitgeforderte Unterlagen

- Analysen dürfen nur durch Fachärzte für Humangenetik veranlasst werden
- Als **Voruntersuchungen** sind erforderlich:
 - Klinisch-genetische Begutachtung (Ausschluss einer syndromalen Erkrankung)
 - Hochauflösende Chromosomenuntersuchung (SNP-Array oder Array-CGH)
 - Ausschluss Fragiles-X-Syndrom
- DNA (Blut) Proben des Patienten und der Mutter (mindestens 20 µg DNA bzw. 5 ml EDTA-Blut)
- Relevante klinische Angaben (z.B. Kopie des genetischen bzw. pädiatrischen Gutachtens)
- Fotografien des Indexpatienten
- 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 (Covaris) auf 200-500 bp Bibliotheken, (2) die Ligation von Sequenzieradapter, die auch Molekulare Barcodes (MIDs) enthalten, (3) das Anreichern von Exonen der MR-Gene mittels Illumina TruSeq *in-solution* Technologie, (4) Qualitätskontrolle und Quantifizierung der DNA-Bibliothek, (5) paired-end Sequenzierung der DNA-Bibliothek durch Illumina NextSeq500 oder HiSeq2500 Technologie (mindestens 2x 100 bp). Die bioinformatische Analyse der Sequenzierdaten geschieht durch folgende Schritte:

- Mapping der Reads auf das hg19 Referenzgenom (BWA)
- Detektion von Varianten: SNPs, SNVs, kleine Deletionen und Insertionen (SAMtools)
- Annotation der Varianten mit Daten aus den Datenbanken dbSNP und 1000 Genomes (Annovar).
- Extraktion aller Varianten, die in CCDS-Regionen der MR-Genliste liegen.

Neben der Suche nach kleinen intra-exonischen Deletionen wird mittels einer statistischen Analyse nach Deletionen von kompletten Exons gesucht. Diese Analyse erfasst keine Duplikationen und ist auch bei Einzel-Exon-Deletionen nur bedingt sensitiv.

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

Pathogene Mutationen sowie unklassifizierte Varianten in den benannten 526 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 herausgestellt und mit vorhandenen Phänotyp-Informationen abgeglichen. 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 (FMR1, AR, ARX) abzubilden.
- Potentielle Splice-Site Mutationen werden innerhalb der hochkonservierten Konsensus-Bereiche (+/- 4 Basen vom Exon-Intron-Übergang) analysiert.
- Nur etwa die Hälfte der analysierten Gene (>200 MR-Gene) werden vollständig für den offenen Leserahmen abgedeckt und damit mit einer Sanger-vergleichbaren Qualität analysiert.
- Etwa 4-8% der Zielregion sind weniger als 20x abgedeckt und damit nicht sicher bzw. überhaupt nicht diagnostisch beurteilbar.

Genliste (526 publizierte MR-Gene)

AAAS, AASS, ABCC8, ABCD1, ABHD5, ACADM, ACAT1, ACOX1, ACY1, ADAMTSL2, ADCK3, ADK, ADSL, AFF2, AGA, AHI1, AIMP1, ALDH18A1, ALDH3A2, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH7A1, ALDOA, ALDOB, ALMS1, AMT, AP3B1, AP4E1, AP4M1, APTX, ARFGF2, ARG1, ARHGEF6, ARHGEF9, ARID1A, ARID1B, ARSA, ARSE, ARX, ASL, ASPM, ASS1, ASXL1, ASXL3, ATIC, ATL1, ATP13A2, ATP2A2, ATP6AP2, ATP6VOA2, ATP7A, ATR, ATRX, ATXN1, ATXN10, ATXN7, AUH, AVPR2, B4GALT1, BBS1, BBS2, BBS4, BBS7, BCKDHA, BCKDHB, BCOR, BCS1L, BIN1, BLM, BRAF, BRWD3, BSCL2, BSND, BTD, C10orf2, CA2, CA8, CACNA1A, CASK, CBS, CC2D1A, CC2D2A, CDK5RAP2, CDKL5, CENPJ, CEP152, CEP290, CFH, CHD7, CHRNA4, CHST14, CLCNKB, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8, CNBP, CNTNAP2, COA5, COL18A1, COL4A1, COQ2, COQ9, COX15, COX6B1, CPS1, CPT2, CRBN, CREBBP, CRLF1, CSTB, CTDP1, CTSA, CTSD, CUL4B, CYB5R3, CYP27A1, DAG1, DARS2, DBT, DCAF17, DCX, DDC, DDX11, DHCR7, DKC1, DLD, DMD, DMPK, DNAJC19, DNMT3B, DPAGT1, DPM1, DPYD, DPYS, DUOXA2, EFN1, EHMT1, EIF2AK3, EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4, EIF2B5, EPM2A, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC6, ERCC8, ERLIN2, ESCO2, ETHE1, EVC, EVC2, FA2H, FAM126A, FAM20C, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCL, FASTKD2, FBN1, FBN2, FGD1, FGF14, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FH, FKRP, FKTN, FLNA, FLNB, FMR1, FOLR1, FOXG1, FOXP2, FOXRED1, FRAS1, FREM2, FUCA1, G6PC3, GABRA1, GABRG2, GALT, GALE, GALT, GAMT, GAN, GATM, GBA, GCH1, GCK, GCSH, GFAP, GJB2, GJC2, GK, GLB1, GLDC, GLI3, GNAS, GNE, GNPAT, GNPTAB, GNS, GPC3, GPHN, GPI, GRIN2A, GRIN2B, GSS, GTF2H5, GUSB, HADH, HCCS, HDAC4, HGSNAT, HLCS, HPD, HPRT1, HRAS, HSD17B10, HSD17B4, HSPD1, HSPG2, IDS, IDUA, IGBP1, IGF1, IKBKG, IL1RAPL1, INPP5E, INSR, IQSEC2, ITGA7, ITPR1, IVD, JAG1, KCNC3, KCNJ1, KCNJ10, KCNJ11, KCNQ2, KCTD7, KDM5C, KDM6A, KIAA1279, KIF5A, KIF7, KMT2D, KRAS, L1CAM, L2HGDH, LAMA2, LAMP2, LARGE, LBR, LHX3, LMNB1, LRP2, LRP5, LRPPRC, LYST, MAN1B1, MAN2B1, MANBA,

MAP2K1, MAP2K2, MAT1A, MBD5, MBTPS2, MCCC1, MCOLN1, MCPH1, MECP2, MED12, MEF2C, MFN2, MFSD8, MGAT2, MID1, MKKS, MKS1, MLC1, MLYCD, MMAA, MMAB, MMACHC, MOCS1, MOCS2, MPV17, MTHFR, MUT, MVK, MYH3, MYO5A, NAGA, NAGLU, NAGS, NBN, NDN, NDP, NDUFA1, NDUFA11, NDUFA2, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF6, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NEU1, NF1, NGF, NHLRC1, NHS, NIPBL, NKX2-1, NKX2-5, NLGN3, NLGN4X, NPC1, NPC2, NPHP1, NSD1, NSDHL, NTRK1, NUBPL, NUP62, OAT, OCLN, OCRL, OFD1, OPA3, OPHN1, OTC, OTX2, PAFAH1B1, PAH, PAK3, PANK2, PAX3, PAX6, PC, PCDH19, PCNT, PDHA1, PDHX, PDP1, PDSS1, PDSS2, PDYN, PEPD, PEX1, PEX10, PEX13, PEX19, PEX2, PEX26, PEX3, PEX5, PEX7, PGK1, PHF6, PIGA, PLA2G6, PLOD1, PLP1, PNKP, PNP, PNPO, POLG, POLG2, POMGNT1, POMT1, POMT2, PORCN, POU1F1, PPT1, PQBP1, PRKCG, PRPS1, PRSS12, PSAP, PTCH1, PTEN, PTH1R, PTPN11, PTS, PUS1, PYCR1, QDPR, RAB39B, RAB3GAP1, RAB3GAP2, RAI1, RARS2, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, RPGRIP1L, RPS6KA3, RRM2B, SACS, SAMHD1, SATB2, SBDS, SC5D, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN4A, SCN9A, SCO2, SDHA, SDHAF1, SEMA3E, SETBP1, SETX, SGSH, SHOC2, SIL1, SIX3, SLC12A1, SLC12A6, SLC16A2, SLC17A5, SLC25A15, SLC25A22, SLC2A1, SLC35C1, SLC4A4, SLC5A5, SLC6A3, SLC6A8, SLC7A7, SLC9A6, SMARCB1, SMARCE1, SMPD1, SMS, SNAP29, SNRPN, SOS1, SOX10, SOX2, SPAST, SPG11, SPG20, SPINK5, SPTAN1, SRD5A3, ST3GAL3, ST3GAL5, STRA6, STXBP1, SUCLA2, SUCLG1, SUMF1, SUOX, SURF1, SYN1, SYNGAP1, SYP, TAT, TBC1D24, TBCE, TBP, TCF4, TCN2, TG, TGFBR1, TGFBR2, TIMM8A, TMEM216, TMEM67, TPP1, TRAPPC9, TREX1, TRIM32, TSC1, TSC2, TSEN54, TSFM, TSHB, TSHR, TTC19, TTI2, TUBA1A, TUBA8, TUBB2B, UBE2A, UBE3A, UBR1, UPB1, UPF3B, UQCRB, UQCRCQ, VIPAS39, VLDLR, VPS13B, VPS33B, VRK1, WDR62, WFS1, WNT5A, XPA, XPNPEP3, ZBTB16, ZEB2, ZFYVE26, ZIC2, ZNF592.

Diese Genliste wurde mit einer OMIM-Abfrage für die Begriffe „mental retardation“ ODER „mental retardation profound“ ODER „mental retardation range“ ODER „mental retardation ranging“ ODER „mental retardation syndrome“ ODER „mentally retarded“ ODER „learning disabilities“ ODER „learning problems“ ODER „mental deficiency“ ODER „mental delay“ ODER „mental deterioration“ ODER „mental impairment“ ODER „mental lethargy“ ODER „mental regression“ ODER „mental retardation congenital“ ODER „mental retardation gene“ ODER „development abnormalities“ ODER „developmental delay“ ODER „developmental disorder“ ODER „developmental retardation“ ODER „developmental stagnation“ ODER „developmental decline“ ODER „intellectual disability“ ODER „intellectual impairment“ ODER „intellectual regression“ ODER „autism“ ODER „autism spectrum“ ODER „autism spectrum disorder“ ODER „autistic“ ODER „development deficit“ ODER „development delayed“ ODER „development delay“ ODER „development failure“ ODER „developmental stagnation“ ODER „epileptic encephalopathy“ erstellt und zusammengeführt.