

Dissertation

KARDIOGENETIK

Im Hochdurchsatz zur Verbesserung der Patientenversorgung und
Abklärung von bisher nicht diagnostizierbaren genetischen Ursachen bei
Patienten mit schwer abgrenzbaren Erkrankungen

eingereicht von

Dr. med. univ. Ingrid Lafer, MSc

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der Medizinischen Wissenschaften
(Dr. scient. med.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Humangenetik

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Mag. Dr. Christian Windpassinger

PD Mag. Dr. Thomas Schwarzbraun

Univ. Prof. Dr. Andreas Gamillscheg

2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und abgefasst, und jene Personen und Institutionen, die am Zustandekommen der Forschungsdaten beteiligt waren, namentlich genannt habe. Andere als die angegebenen Quellen habe ich nicht verwendet und die den benutzen Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit an der Dissertation und daraus entstandener Publikationen wurde gemäß den Regeln der „Good Scientific Practice“ durchgeführt.

Graz, am 28.08.2015

Dr. Ingrid Lafer, MSc

Vorwort

Ein großes Dankeschön an alle, die mich während dieses Studiums unterstützt,
begleitet und motiviert haben!

Inhalt

1. EINLEITUNG	11
1.1. MEILENSTEINE DER GENETIK	11
1.2. VON DER SANGER-SEQUENZIERUNG ZUM THIRD GENERATION SEQUENCING	15
1.2.1. Sanger-Sequenzierung	15
1.2.2. Next Generation Sequencing.....	17
1.2.3. Sanger versus NGS	19
1.3. KARDIOGENETISCHE KRANKHEITSBILDER	20
1.3.1. Hypertrophe Kardiomyopathie	24
1.3.2. Restriktive Kardiomyopathie	25
1.3.3. Linksventrikuläre Noncompaction Kardiomyopathie	26
1.3.4. Dilatative Kardiomyopathie	27
1.3.5. Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	28
1.3.6. Long-QT-Syndrom	29
1.3.7. Catecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie	30
1.3.8. Short-QT-Syndrom	31
1.3.9. Brugada-Syndrom	32
1.3.10. Plötzlicher Herztod	33
1.4. ERBGÄNGE	34
1.5. HUMANGENETISCHES BERATUNGSGESPRÄCH	35
2. METHODEN.....	37
2.1. PANELDESIGN	37
2.2. LABORTECHNISCHE AUSFÜHRUNG.....	40
2.2.1. Library-Preparation entsprechend dem HaloPlex Target Enrichment System	40
2.2.2. Sequenzierung mittels MiSeq – Illumina	45
2.2.3. Sanger – Sequenzierung.....	47
2.2.4. Splicing-Analysen	47
2.2.5. Segregationsanalysen	49
2.3. DATENANALYSE UND -INTERPRETATION	50
2.3.1. Bioinformatik – Datenanalyse.....	51
2.3.2. SureCall	53
2.3.3. Illumina Variant Studio	54
2.3.4. SeqScape	54
2.3.5. Regionenprogramm I und II	54
2.3.6. Beratungsprogramm.....	55
2.3.7. Datenbanken.....	56
2.3.8. Klassifizierung	58
3. RESULTATE.....	65
3.1. ETABLIERUNG	65
3.2. STATISTISCHE ERGEBNISSE	69
3.3. AUSGEWÄHLTE FALLBEZOGENE RESULTATE.....	82
4. DISKUSSION	95
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	105
6. ANHANG	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sanger-Sequenzierung	16
Abbildung 2: Next Generation Sequencing	18
Abbildung 3: Kostenentwicklung pro sequenzierter Mb DNA	19
Abbildung 4: Überblick kardiogenetischer Erkrankungen	20
Abbildung 5: Elektronenmikroskopische bzw. schematische Darstellung des Sarkomers	22
Abbildung 6: Einfluss von Mutationen auf das Aktionspotential	23
Abbildung 7: Herzpräparat bei HCM	24
Abbildung 8: Echobild - Gradient	24
Abbildung 9: Echobild - HCM	24
Abbildung 10: MRT Darstellung bei RCM	25
Abbildung 11: oben: Echobild bei NCMP; unten: Herzpräparat mit Kennzeichnung eines Thrombus	26
Abbildung 12: Echobild bei DCM	27
Abbildung 13: EKG- bzw. MRT-Bild bei ARVC	28
Abbildung 14: EKG's bei LQT	29
Abbildung 15: EKG-Beispiel bei CPVT	30
Abbildung 16: EKG-Beispiele bei SQT	31
Abbildung 17: EKG-Darstellungen bei Brugada-S.	32
Abbildung 18: Autopsieergebnisse bei jungen Menschen (4-35 J.) nach SCD	33
Abbildung 19: Graphische Darstellung des AD-Erbganges	34
Abbildung 20: Graphische Darstellung des AR-Erbganges	34
Abbildung 21: Library-Preparation nach dem Haloplex Target Enrichment Protokoll	41
Abbildung 22: Prinzip der Sequenzierung am Illumina MiSeq	46
Abbildung 23: Beispiele für alternatives Splicing	48
Abbildung 24: Graphische Darstellung Coverage	67
Abbildung 25: Graphische Darstellung der Coverage mittels Mittelwerten	67
Abbildung 26: Graphische Darstellung der Coverage mittels Median	68
Abbildung 27: Graphische Darstellung von Basen < 50x pro Gen und Exon (Auszug)	69
Abbildung 28: Überblick über die Anzahl der Indikationen rhythmologisch / strukturell	70
Abbildung 29: Anzahl spezifischer Indikationen	71
Abbildung 30: Detektionsrate Gesamtkollektiv	72
Abbildung 31: Detektionsrate strukturelle Erkrankungen (Beispiel)	72
Abbildung 32: Detektionsrate ARVC / LQT	72
Abbildung 33: Mutationsspektrum gelöster Fälle	74
Abbildung 34: Mutationsspektrum wahrscheinlich gelöster Fälle	74
Abbildung 35: Spektrum, in welchem UV's nachgewiesen wurden	81
Abbildung 36: Workflow – Kardiopanel	96

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersicht - Protokoll zur Libraryerstellung bei Haloplexanwendungen.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 2: Unterschiede zwischen den Protokollen Version B - D3.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 3: Übersicht über Mutationstypen.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 4: Klassifizierung nach Thompson et al.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 5: ACMG-Klassifizierung (mod. nach Richards et al.).....</i>	<i>63</i>
<i>Tabelle 6: Schweregrad der klinischen Ausprägung.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabelle 7: Validierungsergebnisse vor visueller Kontrolle.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabelle 8: Validierungsergebnisse nach visueller Kontrolle.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 9: Indikationsspezifische Auflistung der Detektionsrate.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabelle 10: Relevante Ergebnisse von 68 Patienten.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabelle 11: Reaktionsansatz für PCR.....</i>	<i>111</i>
<i>Tabelle 12: Temperaturprofil der PCR.....</i>	<i>111</i>
<i>Tabelle 13: Reaktionsansatz für die Sequenzierung.....</i>	<i>111</i>
<i>Tabelle 14: Temperaturprofil für die Sequenzierung.....</i>	<i>112</i>

Zusammenfassung

Einleitung

In den letzten Jahren konnte sich die Humangenetik als bedeutendes Fachgebiet in der „Medizinischen Landschaft“, sowohl im Bereich der Forschung, als auch in der Patientenversorgung, etablieren. Dies ist nicht zuletzt auf neuere technologische Möglichkeiten zurückzuführen. Mit der Anwendung des Next Generations Sequencings, zunächst im Rahmen von Forschungsprojekten, nun ebenfalls im diagnostischen Setting, ist es gelungen auch jene klinische Fragestellungen molekulargenetisch zu untersuchen, deren Komplexität uns sehr lange die Grenzen humangenetischer Leistungen aufgezeigt haben. In diese Kategorie müssen häufig auch kardiale Krankheitsbilder eingeordnet werden. So zeichnen sich selbst klinisch abgrenzbare Syndrome, wie z.B. LQT oder HCM, durch eine starke genetische Heterogenität aus. Mit dem Einsatz von Hochdurchsatzverfahren zur parallelen Diagnostik von Genen, die mit strukturellen und rhythmologischen kardiologischen Erkrankungen im Zusammenhang stehen, ist es am Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz gelungen, als erste Einrichtung Österreichs, eine Kardiogenetik zu etablieren.

Methoden

Die vorliegende Dissertation umfasst nun die Entwicklung und Etablierung eines entsprechenden Analyseworkflows, samt Methodvalidierung, und weiterführend den Aufbau eines robusten Ablaufes zur Phänotyp-Genotyp-Korrelation. Neben der molekulargenetischen und klinischen Interpretation von Varianten, wurden einzelne Veränderungen deren Krankheitsrelevanz nicht unmittelbar zuordenbar ist, zusätzlich mit bioinformatischen und experimentellen Ansätzen analysiert.

Ergebnisse

Durch den Aufbau der Kardiogenetik in Graz war es möglich bis zum Mai 2015 bei 68 Patientinnen und -patienten eine molekulargenetische Untersuchung durchzuführen. Dieses Kollektiv setzt sich aus 41 Patientinnen und -patienten zusammen, bei welchen eine strukturelle Herzerkrankung vorliegt, bei 24 ist der Verdacht einer rhythmologischen Erkrankungen gegeben, in drei Fällen war eine explizite

Abgrenzung nicht möglich. Bereits zu diesem Zeitpunkt kann von einer sehr hohen Detektionsrate gesprochen werden, was wiederum auf die Identifizierung guter Einschlussparameter zurückzuführen ist. Somit konnte in 33,82 % der Indexpatienten eine eindeutige krankheitsverursachende Veränderung nachgewiesen werden. In weiteren 33,82 % der Fälle wurden Sequenzvarianten identifiziert, welche als wahrscheinlich pathogen einzustufen sind. Daneben konnten zahlreiche Sequenzveränderungen (UV's) nachgewiesen werden, deren klinische Wertigkeit derzeit nicht exakt interpretiert werden kann.

Schlussfolgerung

Die bisherigen Daten zeigen nicht nur eine gute technische Umsetzbarkeit, sondern auch eine hohe Detektionsrate. Ein wesentlicher Anteil liegt hierfür sicherlich an der bereits sehr gut etablierten Kooperation zwischen Klinik und Genetik, womit ein umfassender und rascher Informationsaustausch gewährleistet wird. Hinsichtlich der nachgewiesenen Veränderungen werden zum einen, wie zu erwarten, Mutationen in Genen identifiziert, welche in der Literatur bereits häufig mit einem Erkrankungsbild assoziiert wurden. Daneben werden aufgrund der parallelen Untersuchung zahlreicher Gene auch vermehrt unklassifizierte Varianten nachgewiesen. Dies ist nicht zuletzt auch darauf zurück zu führen, dass aufgrund der verbesserten Technik häufig Gene untersucht werden, die bisher einen untergeordneten Stellenwert eingenommen haben. Um eine sichere Klassifikation dieser Veränderungen zu erlauben, ist gewiss die weitere wissenschaftliche Datenlage abzuwarten. Dies stellt nicht nur im Bereich der Interpretation erhobener Befunde einige Herausforderungen dar. Insbesondere die umfassende Aufklärung und Beratung bereits vor Initiierung einer molekulargenetischen Analyse, als auch bei Vorliegen des molekulargenetischen Befundes zeigen einen großen Stellenwert. Damit ist es in vielen Fällen möglich, eventuell entstehende Unsicherheiten von Seiten des Patienten zu verhindern.

Abstract

Introduction

In research as well as in patient care, human genetics has been established as a significant specialty in the “medical landscape” over the last few years. This is quite significantly attributable to recent technological advancements and options. The use of next-generation sequencing, initially in research projects and now also in the diagnostic setting, has made it possible to perform molecular genetic investigations even for those clinical questions whose complexity has long defied the state of the art in human genetics. Many cardiac diseases belong to this category. Even clinically identifiable syndromes like HCM or the long QT syndrome are very heterogeneous in nature. By the use of high-throughput procedures for parallel diagnostic investigation of genes associated with structural and rhythmological heart diseases, we at the Institute of Human Genetics, Medical University of Graz, have been able to establish the first facility for cardiogenetics in Austria.

Method

The present dissertation addresses the development and establishment of a suitable analysis workflow, including validation of the method, and the creation of a robust procedure for the correlation of phenotype and genotype. In addition to molecular genetic-based and clinical interpretation of variants, some changes – whose pathological relevance cannot be directly established at the present time – were additionally analyzed by using bioinformatic and experimental approaches.

Results

The establishment of cardiogenetics in Graz made it possible to perform molecular genetic investigations in 68 patients (of both genders) by May 2015. This population consists of 41 patients with a structural heart disease and 24 with a suspected rhythmological disease; an explicit condition could not be determined in three cases. Even at this early point in time we registered a very high detection rate, which was attributable to the identification of meaningful inclusion parameters. A clear disease-causing pathological change was identified in 33.82% of the index patients. Sequence variants, most likely pathogenic, were identified in a further 33.82%. We

also found numerous sequential changes whose clinical significance cannot be fully interpreted at the present time.

Conclusion

The data obtained thus far demonstrate not only the technical feasibility of the approach but also a high detection rate. The success is definitely attributable to the well-established cooperation between the Clinic and the genetics department, which ensures comprehensive and rapid exchange of information. With regard to the detected changes, we found - as expected - gene mutations which have been frequently associated with specific diseases in the published literature. Due to the parallel investigation of several genes, we also found many non-classified variants. One of the main reasons for such detection was that, owing to improved techniques, we now investigate genes which were previously considered insignificant and assigned a minor position. To classify these changes with certainty we will have to await the acquisition of further scientific data. This poses a challenge in many fields, one of which is the interpretation of findings. Comprehensive explanation and consultation of patients prior to the initiation of a molecular genetic analysis, and also after one has obtained a molecular genetic report are very important. This, in many cases, will relieve the patient of his/her potential uncertainties.

1. Einleitung

Die Humangenetik stellt sicherlich ein eher junges Fach der Medizin dar, dennoch durchläuft es rasante Entwicklungen, womit immer größerer Einfluss auf die moderne Medizin ausgeübt wird. Die medizinische Genetik dringt somit in zahlreiche klinische Fachdisziplinen vor und nimmt einen zunehmenden Stellenwert in der medizinischen Betreuung von Patienten und deren Familien ein. Damit lässt sich zeigen, dass auch in kurzer Zeit bedeutendes Wissen generiert werden konnte.

Ziel der Arbeit war es, ein Hochdurchsatzverfahren zur Verbesserung der Patientenversorgung und Abklärung von bisher nicht diagnostizierbaren genetischen Ursachen bei Patienten mit komplexen Erkrankungen aufzubauen. In diesem Zusammenhang wurden ein Analyseworkflow entwickelt, Methoden validiert und unklare Veränderungen mittels bioinformatischen und experimentellen Ansätzen überprüft. Gleichzeitig sollen diese Unternehmungen es ermöglichen, ein kardiogenetisches Arbeitsfeld, nicht nur im diagnostischen Setting, sondern zunehmend auch im wissenschaftlichen Bereich, zu etablieren.

1.1. Meilensteine der Genetik

Würde man die Frage stellen, wo die Anfänge der Humangenetik zu sehen sind, bekäme man sicherlich Georg Mendel zur Antwort. Er publizierte 1866 die nach ihm benannten mendelschen Regeln, die wesentliche Konzepte definieren – wie etwa dominante oder rezessive Merkmale, sowie die unabhängige Vererbung von Merkmalen. Diese Erkenntnisse stellen auch heute noch die Grundlage der Genetik dar. Als weiterer Meilenstein ist sicherlich das Experiment von O. Avery et al. zu bezeichnen, mit welchem nachgewiesen werden konnte, dass die DNA Träger der genetischen Information ist und nicht wie lange angenommen die Proteine. Etwa 10 Jahre später, 1953, wurde in der renommierten Zeitschrift Nature das von Watson und Crick beschriebene Doppelhelix-Modell der DNA veröffentlicht. Dies zeigt zwei antiparallel umeinander gewundene DNA-Stränge, die, wie heute bekannt ist, durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den

Basenpaaren, zusammengehalten werden. Im Jahre 1956 gelang es dem amerikanischen Zellbiologen J. Tijo die korrekte Anzahl der Chromosomen, in Summe 46, zweifelsfrei festzustellen. Lange Zeit gingen Forscher eher davon aus, dass der Kern menschlicher Zellen 48 Chromosomen aufweise. Aufgrund dieser Darlegungen war es nun möglich, Chromosomenanalysen durchzuführen und Abweichung mit spezifischen Krankheitsbildern in Verbindung zu bringen. Ein weiterer bahnbrechender Schritt lag in der Entschlüsselung des genetischen Codes. 1963 konnte M. Nirenberg nachweisen, dass je drei Basen für eine Aminosäure codieren. Die Aufeinanderfolge von drei Basen wird als Codon bezeichnet, die Zusammensetzung mehrerer Codons ergeben wiederum die Funktionsweise eines Proteins. Diese und weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, dass es sich um einen „universellen“ genetischen Code handelt, der bei allen Organismen, beginnend beim Bakterium bis hin zum Menschen, Gültigkeit besitzt. Dabei sind 61 Basentriplets bestimmten Aminosäuren zuzuordnen, die verbleibenden drei Codons sind als Stoppcodons anzusehen, die das Ende der Synthese signalisieren.

In den nachfolgenden Jahren machten sich Wissenschaftler diese Erkenntnisse zum Nutzen, indem sie ihre Aufmerksamkeit beispielsweise der künstlichen Herstellung von Genen widmeten. Dieses engagierte Ziel konnte 1976 realisiert werden, womit unter anderem die Gründung des ersten Biotechnologie-Unternehmens, der Firma Genentech in San Francisco, einherging.

Ein weiterer Name, welcher sicherlich jedem bekannt ist, ist Frederick Sanger. Er erhielt 1980 für seine Arbeiten zur DNA-Sequenzierung gemeinsam mit W. Gilbert und P. Berg den Nobelpreis für Chemie. Die Sequenzierung, welche es ermöglicht, die Nukleotidabfolge einer DNA-Sequenz zu bestimmen, stellt die Grundvoraussetzung zur Analyse komplexer Genstrukturen, deren Expression und Regulation, sowie daraus resultierender Proteininteraktionen und molekularer Abläufe dar. Trotz zahlreicher technischer Weiterentwicklungen findet die Sanger-Sequenzierung auch heute noch in allen Laboratorien Anwendung und wird gerne als Goldstandard bezeichnet.

Ein Verfahren, welches als Genetic Fingerprinting bezeichnet wird und insbesondere aus dem forensischen Alltag kaum noch wegzudenken wäre, wurde 1984 eher per Zufall vom britischen Genetiker A. Jeffrey entwickelt. Untersucht werden lediglich nicht-codierende Bereiche, deren repetitive Anteile eine

unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen und so in hohem Maße für ein Individuum charakteristisch sind.

Zu den bedeutendsten Methoden der Molekularbiologie ist sicherlich die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu zählen. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, spezifische Sequenzbereiche auch aus minimalen Ausgangskonzentrationen in kurzer Zeit zu vervielfältigen und damit die Grundlage für zahlreiche weitere Verfahren zu legen. Erste Ansätze zur biochemischen Amplifikation von DNA wurden bereits 1971 von Kleppe et al. unternommen. Das von ihm entwickelte Verfahren konnte sich jedoch aufgrund thermischer Eigenschaften nicht durchsetzen. In den 1980er Jahren fand K. Mullis eine Lösung dieses Problems durch die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Seine Abhandlung zur PCR-Technik wurde 1985 in Science publiziert und brachte Mullis 1993 den Nobelpreis für Chemie ein. Die PCR ist heute sowohl aus der Grundlagenforschung, wie auch der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken. Zahlreiche weitere Meilensteine der Genetik wären ohne diese Technik sicherlich nicht realisierbar gewesen. Als eines der nennenswertesten Ereignisse ist wohl das Humane Genomprojekt zu nennen, das 1990 in den USA mit einem drei Milliarden Dollar Budget und einer Laufzeit von 15 Jahren ins Leben gerufen wurde. Ziel dieses internationalen Projektes war es, die gesamte Erbinformation des Menschen zu sequenzieren und damit eine lückenlose Aufschlüsselung der Basenabfolge des menschlichen Genoms zu gewährleisten. 2001 konnten wesentliche Elemente dieser Arbeit der interessierten Öffentlichkeit zugänglich gemacht werden. Sie wurden nahezu gleichzeitig in den renommierten Journals Science und Nature publiziert (1,2). Im Rahmen dieses Forschungsprojektes konnte nachgewiesen werden, dass ein überwiegender Teil des menschlichen Genoms aus repetitiven Sequenzen aufgebaut ist. Dem gegenüber fungiert nur ein geringer Anteil als proteinkodierende Region und stellt damit jene Bereiche dar, auf welche derzeit in Forschung und Diagnostik fokussiert wird. Epochal gesprochen, trat die Genetik damit den Weg in ein neues Zeitalter an. Doch dies bringt auch immer wieder die Notwendigkeit neuer Technologien bzw. die Weiterentwicklung bestehender Ansätze mit sich. Insbesondere wurde mit Fertigstellung des humanen Genomprojektes 2009 der Ruf nach Sequenzierverfahren, die höhere Durchsatzraten und zeit- und kostensensitivere Analysen ermöglichen, laut. Diese

Anforderungen werden durch eine Technik erfüllt, welche unter dem Begriff Next Generation Sequencing zusammengefasst wird. Hierauf, insbesondere auf deren Anwendungen, Limitationen und Grenzen vor allem im Bereich kardiologischer Erkrankungen wird in der vorliegenden Arbeit eingegangen.

Durch diese Methode wird nun rund 30 Jahre nach der Entwicklung der Sanger-Sequenzierung der „Markt“ der DNA-Sequenzierung erneut revolutioniert und damit ein weiterer Meilenstein in der Geschichte der Genetik gesetzt.

1.2. Von der Sanger-Sequenzierung zum Third Generation Sequencing

Mittels einer Sequenzierreaktion ist es möglich, die exakte Nukleotidabfolge innerhalb eines bestimmten DNA-Abschnittes zu ermitteln. Dies stellt damit die Grundvoraussetzung zur Untersuchung komplexer Genstrukturen bzw. molekularbiologischer Abläufe dar (3). In den letzten Jahrzehnten wurden unterschiedliche Verfahren zur DNA-Sequenzierung entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit wird primär auf das Next-Generation Sequencing bzw. die Sanger-Sequenzierung eingegangen, da es sich hierbei um die im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen angewandten Methoden handelt.

1.2.1. Sanger-Sequenzierung

Dieser Terminus bezeichnet eine enzymatische Methode (Didesoxymethode), welche auch als Kettenabbruchverfahren bekannt ist. Die Entwicklung dieser Technik, die auf Frederick Sanger im Jahre 1977 zurückzuführen ist, stellt wie bereits beschrieben, einen Meilenstein im Hinblick auf molekulargenetische Analysen dar (4). Mit Recht trägt die Sanger-Sequenzierung auch heute noch die Bezeichnung des Goldstandards.

Für die Sequenzierung mittels der Sanger-Methode ist das Vorliegen einzelsträngiger DNA-Moleküle erforderlich. Somit wird die doppelsträngige DNA zunächst denaturiert. Durch die Anlagerung eines Primers, dabei handelt es sich um einen kurzen Abschnitt einer bekannten Sequenz, wird die Synthese eines komplementären Gegenstranges initiiert (5). In dem hierbei verwendeten Reaktionsgemisch sind neben den Desoxyribonucleosidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP und dTTP in geringen Mengen auch Didesoxy-Nucleosid-Triphosphate (ddNTPs) enthalten. Diese sind durch das Fehlen einer 3'-OH-Gruppe charakterisiert, womit ein weiterer Nucleotideinbau durch die DNA-Polymerase limitiert wird – ein Kettenabbruch ist die Folge. Daraus resultieren DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Infrüheren Ansätzen wurden die ddNTPs radioaktiv markiert, heute werden diese Substanzen durch Fluoreszenzfarbstoffe ersetzt. Diese Modifikation

ermöglicht es, alle vier ddNTPs in einer Reaktion zuzuführen. Damit ist die Anwendung eigenständiger Ansätze bzw. der Gebrauch von Radioisotopen nicht weiter erforderlich. Anhand einer Kapillarelektrophorese werden die Abbruchprodukte aufgetrennt und nun mittels eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Da die ddNTPs unterschiedliche Farbmarkierungen aufweisen, können die Fluoreszenzsignale entsprechend der Farbe durch einen Detektor erkannt werden. Damit lässt sich die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges widerspiegeln (5-8). Insbesondere die Herstellung der Templates, der zu sequenzierenden DNA-Moleküle, in ausreichender Menge und Qualität, stellte über geraume Zeit einen limitierenden Faktor der Sanger-Sequenzierung dar. Die Lösung dieses Problems lag in der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (9).

Die Sanger-Sequenzierung kann somit grundsätzlich in sechs Schritte gegliedert werden:

- PCR (Denaturierung – Annealing – Extension)
- Gelelektrophorese – optional (zur Überprüfung des PCR-Produktes)
- Cycle Sequenzieransatz - PCR
- Aufreinigung der Cycle Seq PCR (zur Entfernung überschüssiger ddNTPs)
- Cycle Sequenzierung
- Analyse

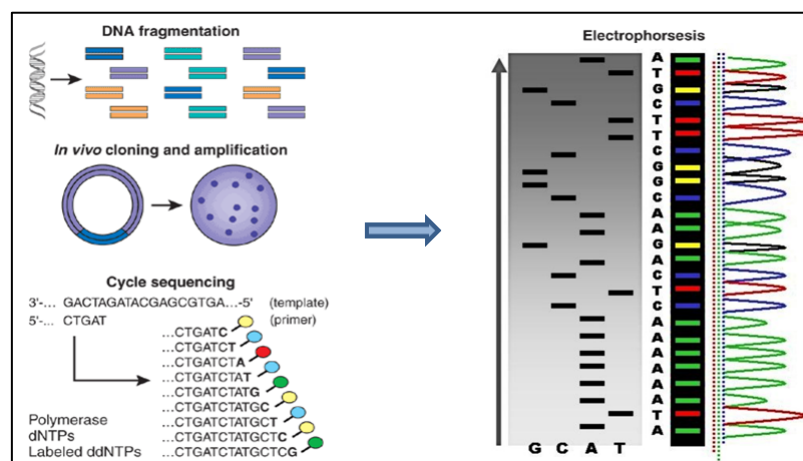


Abbildung 1: Sanger-Sequenzierung
(mod. nach http://www.nature.com/nbt/journal/v26/n10/fig_tab/nbt1486_F1.html)

1.2.2. Next Generation Sequencing

Hierbei handelt es sich um verschiedene neue Verfahren der Hochdurchsatz-Sequenzierung, die unter dem Begriff Next Generation Sequencing zusammengefasst werden. Allen Technologien gemeinsam ist die Möglichkeit der massiven parallelen Sequenzierung von Millionen von DNA-Fragmenten. Damit ist es gewährleistet, mit gezielten Anreicherungsverfahren die Sequenz eines definierten Sets an Genen bzw. an genomischen Regionen in einem Ansatz zu ermitteln. Dies erlaubt einerseits die Kosten deutlich zu senken, gleichzeitig kann jedoch auch die Bearbeitungsdauer entsprechender molekulargenetischer Analysen auf einem vertretbaren Niveau gehalten werden. Allerdings ist ein erheblicher Shift im Arbeitsablauf zu beobachten. So fanden sich bei der Sanger-Sequenzierung die Arbeitsprozesse vorwiegend im laborchemischen Part wieder. Durch die Generierung einer Vielzahl von Datenpunkten nimmt der experimentelle Anteil bei NGS-Untersuchungen eher einen untergeordneten Anteil an und führt zu einer Verschiebung des Arbeitsaufwandes in Richtung Analyse und Interpretation der Daten (5,10,11). Durch die hierbei erhobenen Mengen an Daten ist es zwar möglich einen umfassenden Einblick bezüglich genetischer Varianten krankheitsrelevanter Gene zu erhalten, gleichzeitig werden jedoch häufig Sequenzvarianten identifiziert, welche nicht in jedem Fall einem spezifischen Phänotyp zuzuordnen sind (12,13).

Unterschiedliche Technologiekonzerne arbeiteten an der Entwicklung von NGS-Methoden, weswegen mittlerweile zahlreiche Plattformen kommerziell erhältlich sind. Diese Verfahren unterscheiden sich im Detail beträchtlich, teilen jedoch bestimmte Grundprinzipien (5,14). Die einzelnen Schritte sind nachfolgend aufgelistet:

- Library-Erstellung
- Klonale Amplifikation
- Parallele Sequenzierung
- Primäranalyse
- Sekundäranalyse

Die Fragmentierung der DNA und die anschließende Adapterligierung im Zuge der Library-Preparation stellen die Voraussetzungen für eine klonale

Amplifikation dar. Für diesen Prozess stehen systemabhängig verschiedene Methoden beispielsweise die Emulsions- oder Bridge-PCR zur Verfügung. Bei nahezu allen NGS-Verfahren wird die DNA-Sequenz in Lichtsignalen kodiert und durch eine Digitalkamera erfasst. Zyklen, welche sich aus Sequenzierreaktion, Signaldetektion und Signalauslöschung zusammensetzen, werden mehrfach aufeinanderfolgend wiederholt. Hierbei werden primär Sequenzen einer Länge von etwa 50 – 500 Nukleotiden generiert, da die Qualität des Signals mit zunehmender Leselänge abnimmt. Dennoch kann mit den derzeit zur Verfügung stehenden, hochparallelen Verfahren ein Sequenzieroutput von mehreren Gigabasen erreicht werden (10). Diese Datenmengen werden nun zunächst im Rahmen der Primäranalyse zu Rohsequenzen verarbeitet. Die Zusammensetzung zu einer kontinuierlichen Basensequenz wird im Zuge der Sekundäranalyse angeschlossen, worauf wiederum ein aufwendiger Prozess der Dateninterpretation folgt (10).

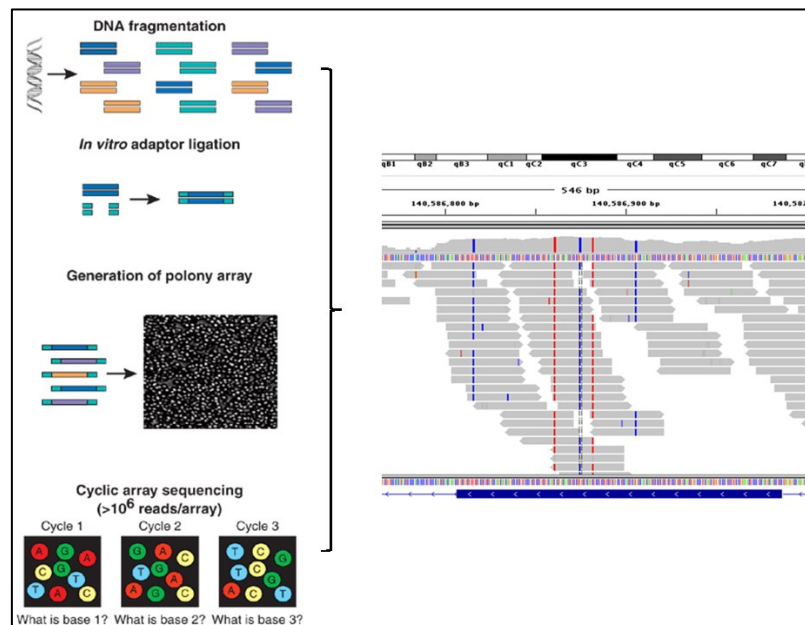


Abbildung 2: Next Generation Sequencing
(mod. nach http://www.nature.com/nbt/journal/v26/n10/fig_tab/nbt1486_F1.html)

1.2.3. Sanger versus NGS

Weder in der Routinediagnostik noch im Zusammenhang mit wissenschaftlichen Fragestellungen wäre die eine oder andere Technik aus dem molekulargenetischen Alltag wegzudenken. So ist beispielsweise die Sanger-Sequenzierung das Verfahren der ersten Wahl um spezifische Sequenzvarianten zu bestätigen oder auch NGS-Datensätze zu komplettieren. Doch ermöglichte erst die Etablierung von Hochdurchsatzverfahren die Bearbeitung zahlreicher komplexer Fragestellungen. Dies ist nicht zuletzt auf deren ökonomische Auswirkungen zurückzuführen. Wie der nachfolgenden Abbildung, als auch der internationalen Literatur zu entnehmen, betragen die Sequenzierkosten pro Mb DNA im Jahre 2001 noch \$ 10.000,-. Diese sind in den letzten Jahren drastisch gesunken, wobei nun auch das \$ 1.000,- Genom in greifbare Nähe zu rücken scheint. Insbesondere dann, wenn man den Prognosen einer weiteren Kostenreduktion Glauben schenken darf.

Da auch im Gesundheitswesen finanzielle Aspekte bzw. Vergleiche immer mehr an Bedeutung gewinnen, werden diese Entwicklungen direkten Einfluss auf die Patientenversorgung nehmen (15,5).

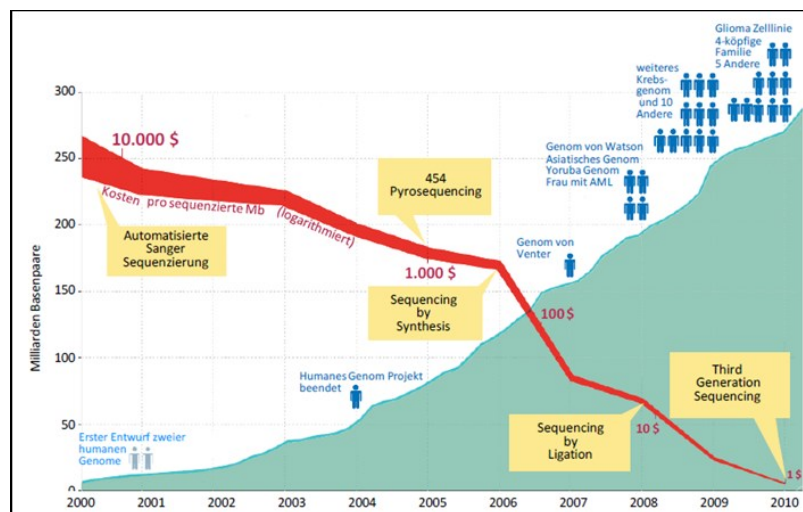


Abbildung 3: Kostenentwicklung pro sequenzierter Mb DNA
(mod. nach Nature 464)

1.3. Kardiogenetische Krankheitsbilder

Die Technik des Next Generation Sequencings ermöglicht es nun auch, sehr heterogene Erkrankungen, die bisher primär im Bereich der Forschung von Interesse waren, einem diagnostischen Ansatz zuzuführen. Diese Heterogenität trifft unter anderem auf zahlreiche kardiale Erkrankungen zu. Weiterführend werden jene Krankheitsbilder kurz umrissen, deren Bearbeitung im Rahmen der Dissertation erfolgte.

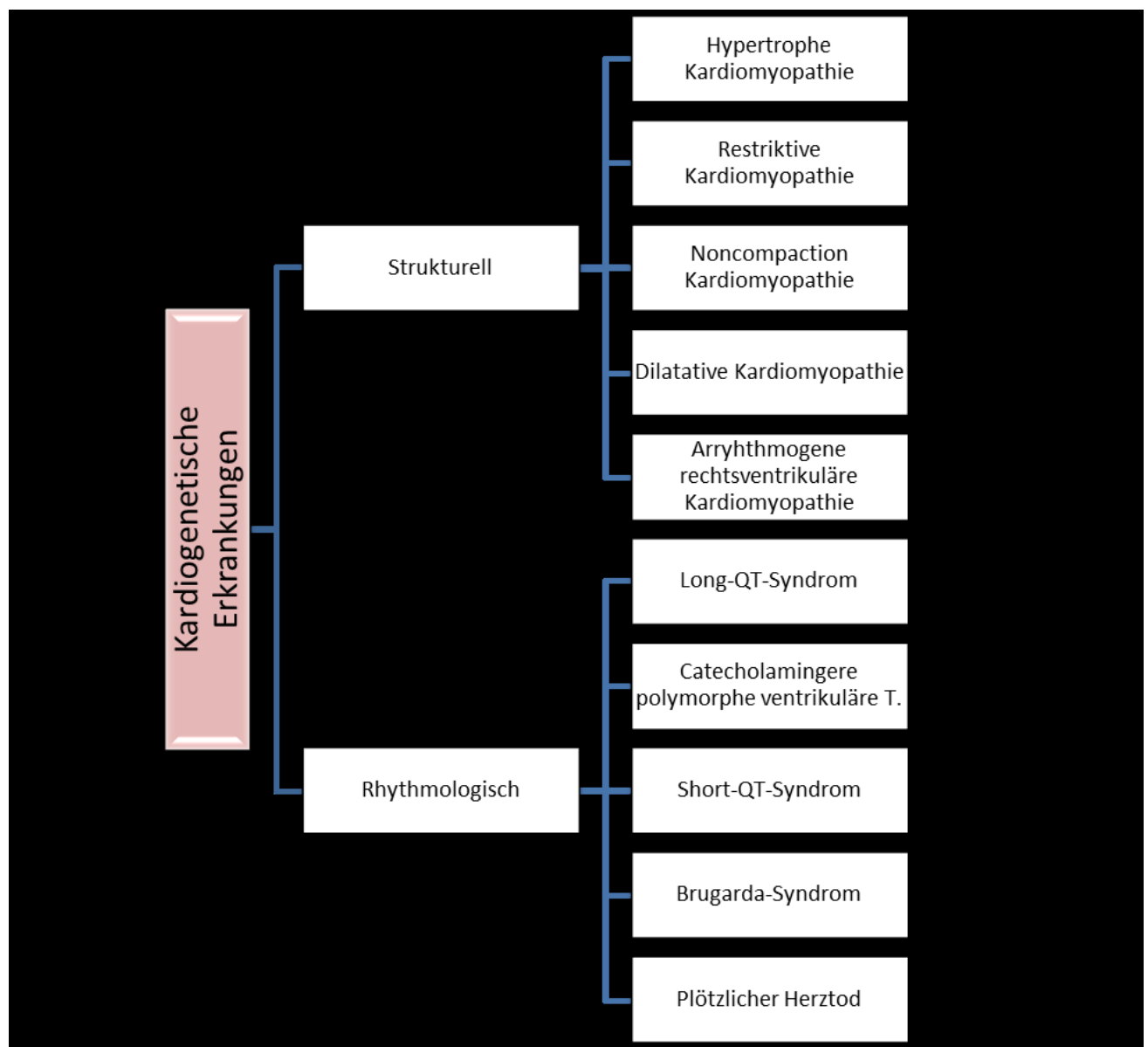


Abbildung 4: Überblick kardiogenetischer Erkrankungen

Bei strukturellen Herzerkrankungen wird deren genetische Ursache häufig in Genen, welche für das Sarkomer kodieren, vermutet. Das Sarkomer stellt die kleinste kontraktile Einheit einer Myofibrille, die wiederum in großer Anzahl die Muskelzelle bildet, dar. Sarkomere sind aus dünnen (9 nm) und dicken (15 nm) Proteinfilamenten aufgebaut. Damit ergeben sich verschiedene Bereiche, deren A-Bande sich aus den dicken Filamenten, die I-Bande aus den dünnen Filamenten zusammensetzt. Im Zentrum des Sarkomers findet sich die M-Bande, die Begrenzung ist durch sogenannte Z-Scheiben gegeben. Proteinfilamente der I-Bande umfassen Aktin, Tropomyosin und Troponin, in den dicken Filamenten findet sich primär Myosin, das wiederum in drei Anteile (Myosinköpfchen, Hals- und Schwanzteil) gegliedert werden kann (16). Auf eine weitere Aufspaltung ihrer Feinstruktur in leichte und schwere Ketten bzw. deren Zusammensetzung wird in diesem Rahmen verzichtet. Von Relevanz ist jedoch, dass der „Kopfteil“ des Myosins über Querbrücken mit Aktin in Verbindung tritt, womit die dicken und dünnen Filamentsysteme miteinander korrespondieren. Dies bedingt unter anderem die Kontraktionsfähigkeit des Muskels. Durch das vom Sinusknoten generierte Aktionspotential kommt es zur Öffnung von Kalziumkanälen in der Zellmembran und im sarkoplasmatischen Retikulum. Der damit einhergehende Kalziumeinstrom erhöhte die intrazelluläre Kalziumkonzentration deutlich. Dieses Kalzium bindet an Troponin, eine Konformationsänderung folgt, die wiederum ein Verschieben der Tropomyosinfilamente nach sich zieht. Damit ist die Voraussetzung zur Bindung der Myosinköpfe an Aktin gegeben. Aufgrund der Abspaltung von ADP ändert sich die Position der Myosinköpfe, sodass die Aktinfilamente in der Mitte des Sarkomers lokalisiert sind. Am anderen Ende desselben Filamentes erfolgt gleiches in gegengesetzte Richtung, woraus eine Verkürzung des Sarkomers resultiert. Die Ablösung des Myosins von Aktin wird durch die Bindung von ATP an den Myosinkopf bedingt. Die Hydrolyse von ATP und die dabei freiwerdende Energie wird wiederum zur Überführung des Myosinköpfchens in die Ausgangsposition verwendet (17).

Dieses Wissen lässt in vielen Fällen nachvollziehen, weswegen pathogene Mutationen in entsprechenden Genen, Erkrankungen wie die Hypertrophe Kardiomyopathie bedingen. Für die HCM sind mittlerweile zahlreiche Gene bekannt, zu den relevantesten zählen nach wie vor die Gene MYBPC3, MYH7,

TNNT2 und TNNI3. Bisher ist es leider noch nicht gelungen, eine eindeutige Phänotyp-Genotyp-Korrelation herzustellen (18).

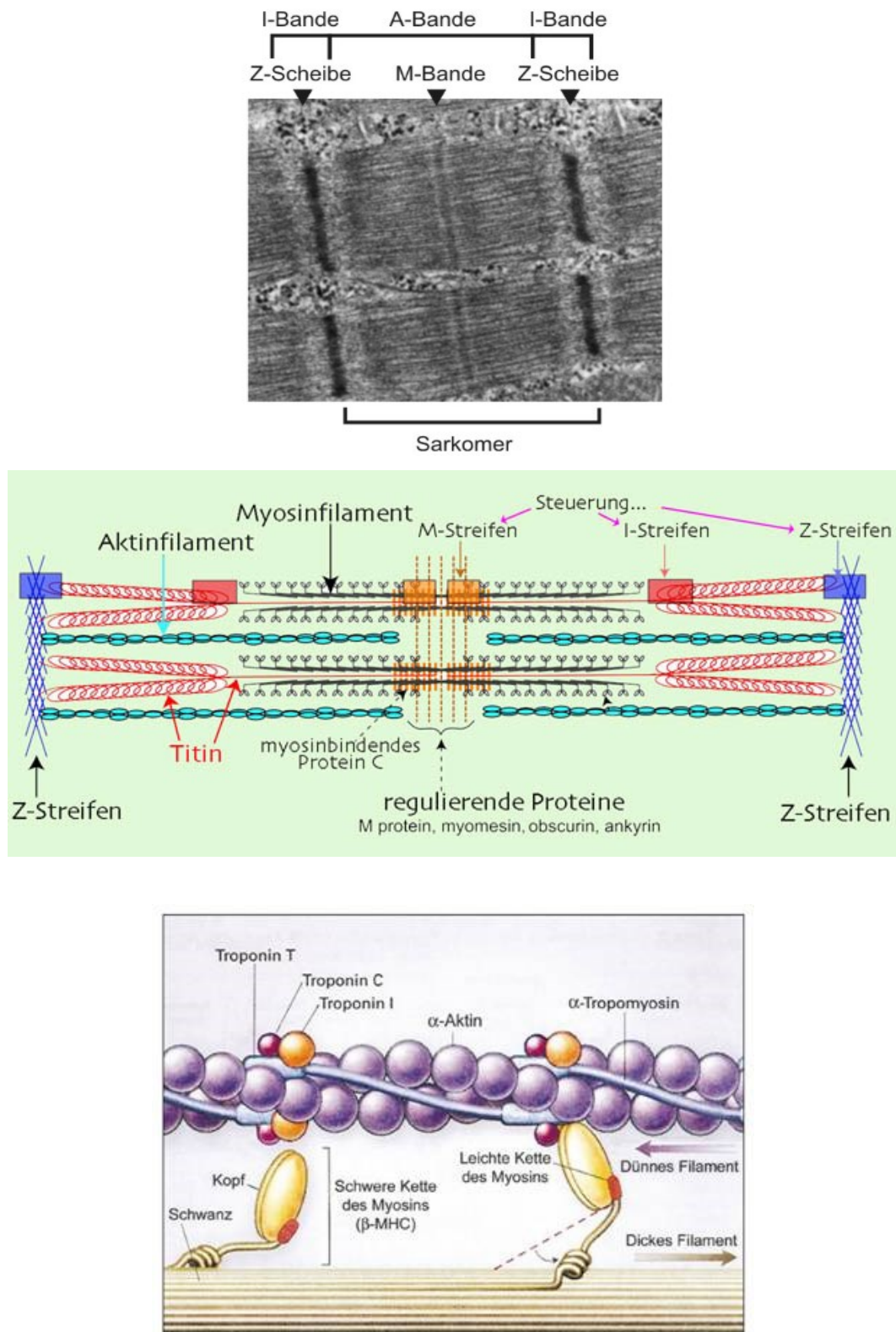


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische bzw. schematische Darstellung des Sarkomers

(nach <http://user.meduniaraz.at/helmut.hinghofer-szalkay>; <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/>)

Für hereditäre rhythmologische Erkrankungen nehmen Kanalproteine einen großen Stellenwert ein. Beispielhaft soll in diesem Zusammenhang das Long-QT-Syndrom Typ 1, welches durch Mutationen im KCNQ1-Gen begründet ist, in vereinfachter Weise herangezogen werden. Dieses Gen kodiert für die porenbildende α -Untereinheit eines spannungsabhängigen Kaliumkanals. Derzeit geht man davon aus, dass vier dieser Einheiten gemeinsam mit der β -Untereinheit KCNE1 (Produkt des Gens KCNE1) einen funktionellen Kanal bilden, welcher den langsam repolarisierenden Kaliumstrom I_{KS} leitet. Diese KCNQ1/KCNE1-Kanalkomplexe werden, wie bereits erwähnt, den langsam öffnenden spannungsabhängigen Kanälen zugeordnet, die die Repolarisation des Herzens initialisieren. Mutationen im KCNQ1-Gen bedingen ein verlängertes QT-Intervall im EKG, intrazellulär spiegelt sich dies in einer Reaktivierung von Kalziumkanälen wieder. Als Folge dessen kommt es zur Störung der geregelten Herzaktion (19).

Mittlerweile sind molekulare Ursachen zahlreicher Long-QT-Typen, sowie deren Einfluss auf das Aktionspotential bekannt. Die nachfolgende Grafik soll dies im Überblick darstellen.

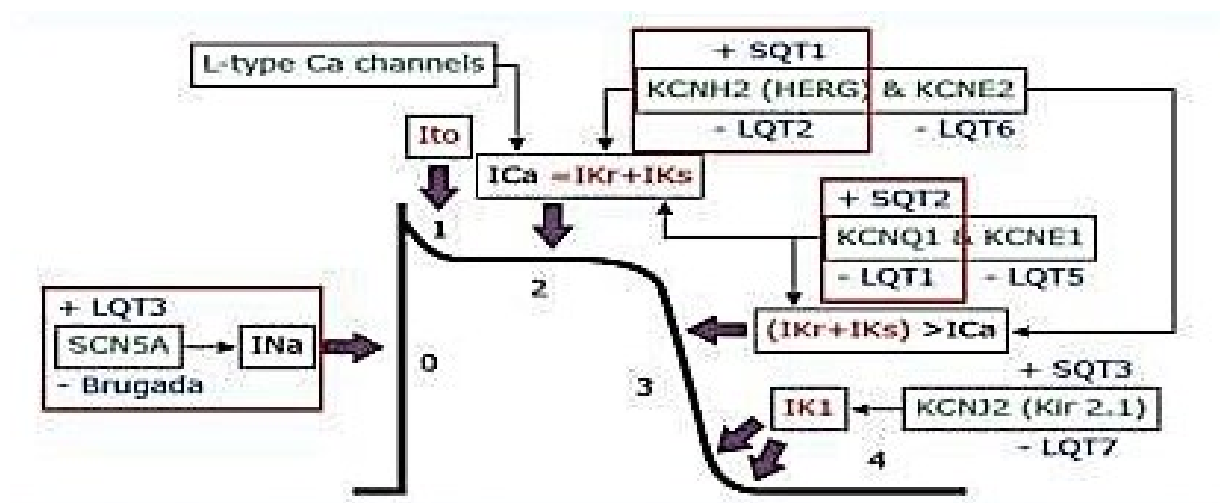


Abbildung 6: Einfluss von Mutationen auf das Aktionspotential

(nach Topo EJ, Califf RM et al. Textbook of Cardiovascular Medicine, 3rd Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006)

1.3.1. Hypertrophe Kardiomyopathie

Abkürzung	HCM
Prävalenz	1:500
Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> - Hypertrophie v.a. des linken Ventrikels - Volumenzunahme und „disarray“ der Kardiomyozyten - Interstitielle Fibrose
Erbgang	Autosomal dominant
Gene	MYBPC3, MYH7, TNNI3, TNNT2, TPM1, CSRP3, FHL1, LDB3, MYH6, MYO6, NEXN, PRKAG2, TCAP, TNNC1, TTR, VCL, ACTC1, ACTN2, ANKRD1, CALR3, CAV3, CFT1, COX15, CRYAB, GAA, GLA, JPH2, LAMP2, MYL2, MYL3, MYLK2, MYO2, MYPN, NDUFV2, PLN, TRIM63, TTN

Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) wird den primären Kardiomyopathien zugerechnet und stellt somit eine Erkrankung des Myokards dar. Sie ist häufig durch eine asymmetrische Verdickung des linken Ventrikels charakterisiert, seltener liegt eine rechtsventrikuläre Hypertrophie vor. Hierbei ist es entscheidend, dass die Volumszunahme nicht auf eine vermehrte Beanspruchung (z.B. Hypertonie, sportliche Aktivität etc.) zurückzuführen ist. Abhängig vom Vorliegen einer Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes lässt sich die obstruktive von der nicht-obstruktiven Form unterscheiden. Ausmaß und Lokalisation der Wandverdickung sind dabei hochvariabel. Die klinische Manifestation ist ebenso sehr vielfältig, sowohl den Zeitpunkt erster Symptome betreffend, als auch deren Ausprägung. Diese kann von völliger Symptomfreiheit ohne Therapie und normaler Lebenserwartung über Belastungseinschränkungen, vor allem durch Atemnot und Synkopen, bis zur therapierefraktären Herzinsuffizienz reichen (18,20).

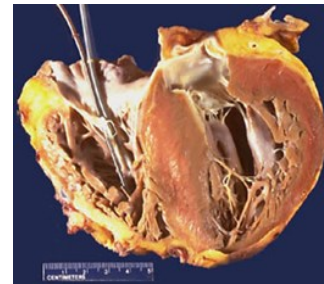


Abbildung 7: Herzpräparat bei HCM

(nach http://www.megru.uzh.ch/j3/plain/pat/pat_ID215_m0.html)

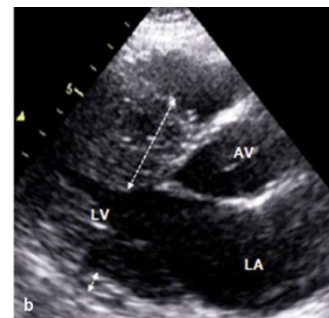


Abbildung 9: Echobild - HCM

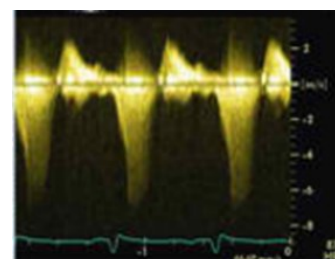


Abbildung 8: Echobild - Gradient

1.3.2. Restriktive Kardiomyopathie

Abkürzung	RCM
Prävalenz	unklar
Charakteristika	<ul style="list-style-type: none">- Einflusstauung vor dem rechten Ventrikel- Vermindertes diastolisches Volumen eines o. beider Ventrikel → diast. Relaxationsstörung- Normale systolische Funktion- Normal breite Ventrikelwand
Erbgang	Autosomal dominant
Gene	MYH7, TNNI3, ACTC1, CSRP3, DES, GLA, LDB3, LMNA, MYBPC3, MYL2, MYOZ2, MYPN, PLN, TAZ, TCAP, TNNC1, TNNT2, TPM1, TTN

Auch bei diesem Erkrankungsbild werden primäre von sekundären Formen unterschieden. Allen gemeinsam ist die Präsentation einer zunehmenden Steifigkeit des Herzens, wobei sowohl das Myokard, das Endokard und auch das Interstitium beteiligt sein können.

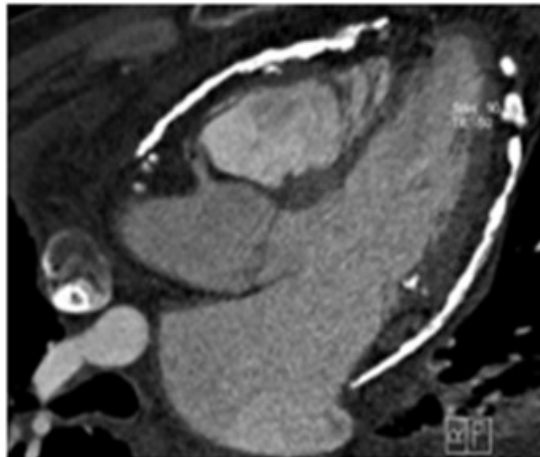


Abbildung 10: MRT Darstellung bei RCM

Dies ist wiederum auf einen interstitiell-fibrotischen Umbau des

Gewebes zurück zu führen und erklärt damit die herabgesetzte Dehnbarkeit des Myokards. In der Frühphase der Erkrankung können die systolische Funktion und die Wanddicke der Ventrikel noch normal sein. Aufgrund der diastolischen Funktionsstörung besteht allerdings eine erschwerte Ventrikelfüllung mit reduziertem diastolischem Ventrikelvolumen und einer deutlichen Vergrößerung der Vorhöfe. Gleichzeitig liegt eine starke Erhöhung der Füllungsdrücke vor. Die klinische Symptomatik ist uncharakteristisch und entspricht häufig dem Bild einer Herzinsuffizienz. Zusätzlich werden auch Herzrhythmusstörungen und Synkopen beobachtet. Insbesondere bei Manifestationen im Kindesalter sind die Prognosen schlecht (21).

1.3.3. Linksventrikuläre Noncompaction Kardiomyopathie

Abkürzung	LVNC
Prävalenz	Unklar (~ 0,05 – 0,25 % / Jahr)
Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> - Ausgeprägtes trabekuläres Maschenwerk - Intratrabekuläre Rezessi - Subendokardiale Fibrosen - Mikrozirkulationsstörungen
Erbgang	Autosomal dominant
Gene	LDB3, ACTC1, CASQ2, DTNA, LMNA, MIB1, MYBPC3, MYH7, PRDM16, TAZ, TNNT2, TPM1

Hierbei handelt es sich ebenso um einen Subtyp der primären Kardiomyopathien. Charakteristisch ist eine tiefe Trabekulierung der Ventrikelwand, welche insbesondere im Bereich der linken Herzspitze besonders ausgeprägt ist. Dies führt zur Bildung von zahlreichen Recessi, die wiederum mit dem Ventrikel kommunizieren. Nach heutigen Kenntnissen wird bei der LVNC eine zugrundeliegende Störung der embryonalen endomykardialen Morphogene vermutet, die durchaus auf genetische Komponenten zurückzuführen sein könnte. Der klinische Verlauf gestaltet sich variabel, die Patienten können asymptomatisch sein, können aber auch schwere Herzinsuffizienzsymptome, ventrikuläre Arrhythmien und systemische thromboembolische Ereignisse aufweisen (22).

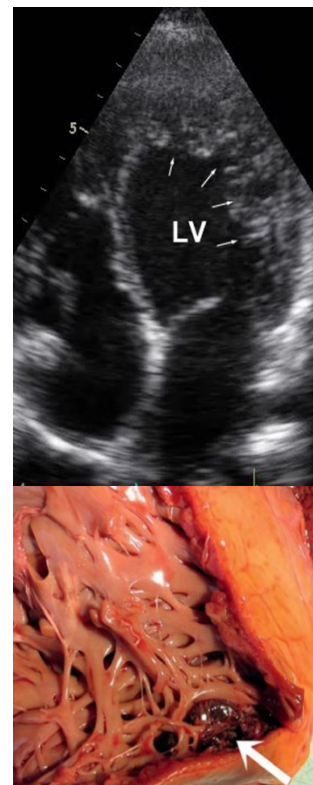


Abbildung 11: oben: Echobild bei NCMP; unten: Herzpräparat mit Kennzeichnung eines Thrombus

1.3.4. Dilatative Kardiomyopathie

Abkürzung	DCM
Prävalenz	1:2500
Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> - Dilatation: linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD) > 117 % vom Soll - Eingeschränkte Funktion: linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) < 45 % - Unerklärte supraventrikuläre und ventrikuläre Arrhythmien - Unerklärte Leitungsstörung (AV-Block etc.) - Regionale Wandbewegungsstörungen ohne Schenkelblock o. KHK
Erbgang	Autosomal dominant, Autosomal rezessiv, X-chromosomal
Gene	LDB3, LMNA, MYBPC3, MYH7, PLN, TNNT2, ABCC9, ACTC1, ACTN2, ATP2A2, CRYAB, CSRP3, DTNA, LAMA2, LAMA4, NEBL, NEXN, TAZ, TCAP, TNNI3, TPM1, TTN, ANKRD1, BAG3, CHRM2, CTF1, DES, DMD, DNAJC19, DSC2, DSG2, DSP, EMD, EYA4, FHL2, FKTN, FOXD4, ILK, LAMP2, MYH6, MYPN, PRDM16, PSEN1, PSEN2, RBM20, SCN5A, SDHA, SGCB, SGCD, SYNE1, SYNE2, TBX20, TMPO, TTR, VCL

Unter dem Begriff DCM wird eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Myokards zusammengefasst. Hämodynamisch zeigt sich eine eingeschränkte Pumpfunktion mit Kardiomegalie, wiederum in einer verminderten EF resultierend. Zudem werden häufig schon im Anfangsstadium diastolische Funktionsstörungen nachgewiesen. Das pathomorphologische Korrelat findet sich in der interstitiellen Fibrose. Neben der familiären Häufung und der damit einhergehenden genetischen Komponente, sind auch die Folge von Infektionen, das Endstadium von Erkrankungen und Noxen als Ursache zu nennen. Klinisch zeigt sich dies durch eine progressive Linksherzinsuffizienz, die im Weiteren in eine Globalinsuffizienz übergehen wird. Daneben finden sich auch Rhythmusstörungen, Thromboembolien, aber auch der plötzliche Herztod (23-25).

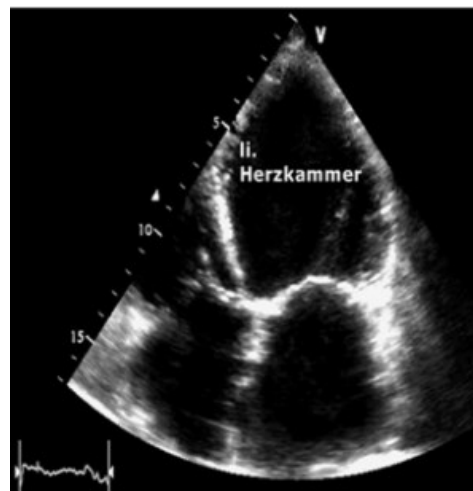


Abbildung 12: Echobild bei DCM

1.3.5. Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

Abkürzung	ARVC
Prävalenz	1:2500 – 1:5000
Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> - Dilatation des rechten Ventrikels - Ersatz des Myokardiums durch Fettzellen → fibro-lipomatöser Degeneration - Lokalisierte rechtsventrikuläre Aneurysmen - Reduktion der rechtsventrikulären Funktion
Erbgang	Autosomal dominant
Gene	DES, DSC2, DSG2, DSP, JUP, PKP2, TMEM43, CTNNA3, RYR2, TGFB3

Die ARVC kennzeichnet sich häufig durch lebensbedrohliche Kammerarrhythmien und ist somit nicht selten die Ursache des plötzlichen Herztodes bei jungen Menschen bzw. Athleten. Morphologisch wird das Myokardgewebe des rechten Ventrikels durch Fett-, Binde- und Narbengewebe ersetzt. Initial ist eine regionale, mit Fortschreiten der Erkrankung eine globale Beteiligung des rechten Ventrikels zu erwarten. Dieser Umstrukturierungsprozess führt sekundär zu einer Vergrößerung des rechten Ventrikels, die mit einer Einschränkung der rechtsventrikulären Funktion einhergeht. Als klinisches Leitsymptom der ARVC wird das plötzliche Auftreten maligner ventrikulärer Arrhythmien, insbesondere unter Belastung, definiert. Nicht selten stellt Kammerflimmern das erste Symptom dar. Ferner kann es zu Synkopen, Palpitationen, sowie einer rechts- oder auch biventrikulären Herzinsuffizienz kommen (26-28).

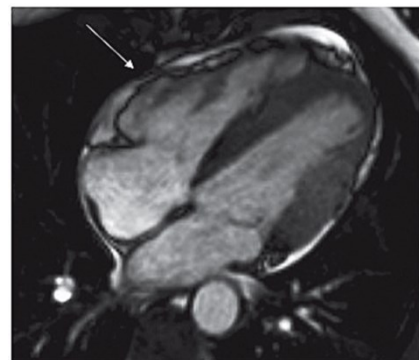


Abbildung 13: EKG- bzw. MRT-Bild bei ARVC

1.3.6. Long-QT-Syndrom

Abkürzung	LQT
Prävalenz	1:2000
Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> - Pathologisch verlängerte QTc-Zeit - Abnorme T-Wellen Morphologie - Torsade de Pointes
Erbgang	Autosomal dominant
Gene	KCNH2, KCNQ1, SCN5A, AKAP9, ANK2, CACNA1C, CALM1, CALM2, CAV3, KCNE1, KCNE2, KCNJ2, KCNJ5, SCN4B, SNTA1

Das LQT-Syndrom umfasst eine Gruppe von genetisch bedingten, funktionellen Störungen verschiedener Ionenkanäle in der Zellmembran des Herzens. Dies zeigt sich beispielsweise in einem verlängerten QT-Intervall im EKG, einer verzögerten elektrischen Repolarisation der Ventrikel, sowie dem Auftreten spezifischer Herzrhythmusstörungen. Das klinische Erkrankungsbild reicht hierbei von völliger Symptomfreiheit, über Synkopen bis hin zum Plötzlichen Herztod. Wie an der Anzahl der oben genannten Gene ersichtlich, spiegelt das LQT-Syndrom eine große genetische Heterogenität wieder. Dennoch kann zunächst auf drei Gene (KCNQ1, KCHN2, SCN5A) fokussiert werden, da in rund 90 % der Patienten mit molekulargenetisch gesichertem Befund die pathogene Veränderung in einem dieser drei Gene nachgewiesen werden konnte. Damit stellen diese drei Formen (LQT 1-3) auch die wichtigsten Subtypen zur Einstufung der klinischen Betreuung dar (29,30).

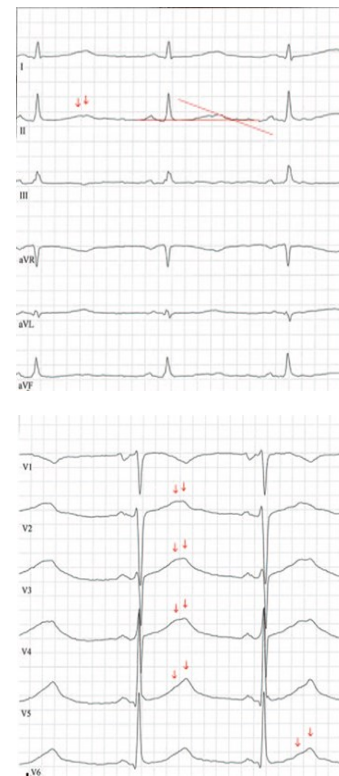
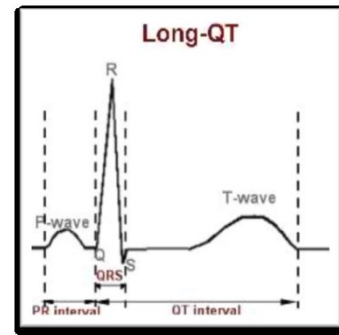


Abbildung 14: EKG's bei LQT

1.3.7. Catecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie

Abkürzung	CPVT
Prävalenz	1:10.000
Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> - Polymorphe ventrikuläre Extrasystolen - Bidirektionale oder polymorphe ventrikuläre Tachykardie in Form von Kammerflimmern - Plötzlicher Herztod (in ~ 10 – 20 % die Erstsymptomatik)
Erbgang	Autosomal dominant, Autosomal rezessiv (selten)
Gene	CASQ2, KCNJ2, RYR2, CALM1, CALM2, TRDN

Die CPVT wird als schwere, genetisch bedingte Störung mit adrenerg induzierter Kammertachykardie bezeichnet. Eine strukturelle Veränderung des Myokards scheint hierbei nicht vorzuliegen. Nicht selten stellt der Plötzliche Herztod die Erstmanifestation dar. In anderen Fällen werden Synkopen insbesondere nach körperlicher oder emotionaler Belastung als erstes Symptom beschrieben. Das typische Erkrankungsalter liegt bei beiden Geschlechtern zwischen dem 7. – 9. Lebensjahr. Das Ruhe-EKG, als auch die kardiale Bildgebung zeigen typischerweise unauffällige Befunde. Derzeit wird davon ausgegangen, dass die Prognose umso schlechter ist, je früher die Symptomatik auftritt. Die CPVT stellt ein schweres Erkrankungsbild dar, doch bei frühzeitiger Diagnose und entsprechender Behandlung (z.B. Betablocker-Therapie, ICD-Implantation) kann die Lebenserwartung deutlich gesteigert werden (31).

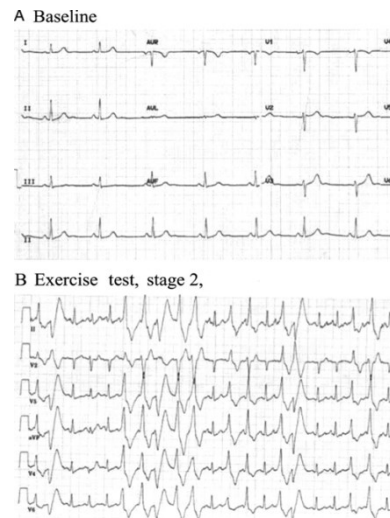


Abbildung 15: EKG-Beispiel bei CPVT

1.3.8. Short-QT-Syndrom

Abkürzung	SQT
Prävalenz	unklar
Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> - Verkürztes QT-Intervall (< 330 ms) - Teilweise deutlich überhöhte T-Welle
Erbgang	Autosomal dominant
Gene	KCNH2, KCNJ2, KCNQ1, CACNA2D1, CACNB2

Das Short-QT-Syndrom stellt ein eher seltenes Erkrankungsbild dar, das bisher nur in wenigen Fällen beschrieben wurde. Im Elektrokardiogramm findet sich typischerweise ein verkürztes QT-Intervall, gegebenenfalls können deutlich überhöhte T-Wellen nachgewiesen werden. Es ist derzeit anzunehmen, dass hierfür eine Überfunktion mutierter Kanäle verantwortlich ist, die wiederum zu einer reduzierten Dauer des Aktionspotentials führen. Von diesem Syndrom sind primär Kinder bzw. junge Erwachsene betroffen. Das klinische Spektrum zeigt wiederholt eine große Spannweite, wobei primär ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Vorhofflimmern, von Synkopen und dem Plötzlichen Herztod beschrieben sind. Spezifische Auslöser eines Ereignisses konnten aufgrund der geringen Fallzahlen bisher nicht identifiziert werden. Ebenso sind nur eingeschränkt Therapieempfehlungen vorliegend (32).

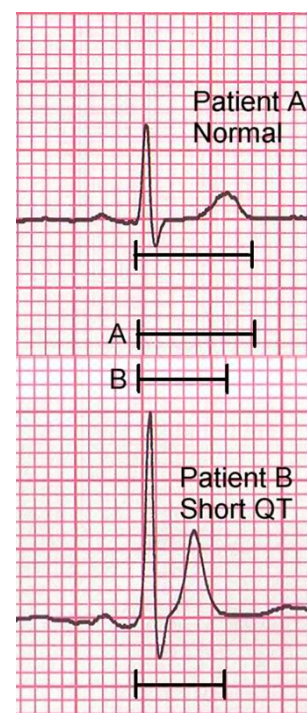


Abbildung 16: EKG-Beispiele bei SQT

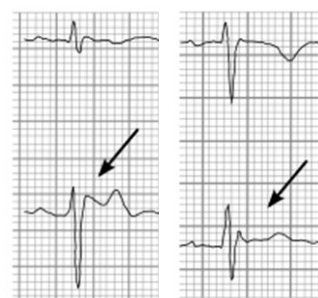
1.3.9. Brugada-Syndrom

Abkürzung	BrS
Prävalenz	1:1.000 – 1:10.000
Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> - Typisches EKG - kompletter o. inkompletter RSB - angehobenes (zelt- oder sattelförmiges) ST-Segment in den rechtspräkordialen Ableitungen - Tachykarde ventrikuläre Rhythmusstörungen - Vermehrtes Vorkommen in Südostasien
Erbgang	Autosomal dominant
Gene	SCN5A, SCN10A, ABCC9, CACNA2D1, CACNB2, GPD1L, HCN4, KCND3, KCNE1L, KCNE3, KCNJ8, PKP2, RANGRF, SCN1B, SCN2B, SCN3B, SLMAP, TRPM4

Das Brugada-Syndrom unterliegt großen regionalen und geschlechtsspezifischen Schwankungen. Dies ist unter anderem ein Aspekt, weswegen eindeutige Inzidenzzahlen nur schwer zu erheben sind. Es ist jedoch bekannt, dass das BrS-Syndrom häufiger im Südostasiatischen Raum zu finden ist und hiervon überwiegend Männer mit einem strukturell gesund erscheinenden Herzen im Verhältnis von 8:1 betroffen sind. Die zugrundeliegenden molekularen Gegebenheiten sind derzeit nur unzureichend geklärt. Klinisch zeigen sich einerseits asymptomatischen Patienten. Andererseits wurden Synkopen, tachykarde Rhythmusstörungen, sowie der plötzliche Herztod dokumentiert. Typische EKG-Veränderungen erlauben einem erfahrenen Kardiologen von einer Blickdiagnose zu sprechen (33,34).



Type 1:
Coved type
ST-segment
elevation



Type 2:
saddle-back type
ST-segment
elevation

Type 3:
Saddle-back type
"ST-segment
elevation"

Abbildung 17: EKG-Darstellungen bei Brugada-S.

<http://www.textbookofcardiology.org>

1.3.10. Plötzlicher Herztod

Abkürzung	SUDS
Prävalenz	0,1 – 0,2 % der Gesamtbevölkerung ~ 15.000 Fälle / Jahr in Österreich
Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> - Strukturelle Herzerkrankungen - Rhythmologische Herzerkrankungen - Ischämien - Autonome / toxische Einflüsse
Erbgang	?
Gene	KCND3, KCNH2, KCNQ1, RYR2, SCN5A, CALM1, CALM2, CASQ2, GPD1L, HCN4, KCNJ2, KCNJ8, SCN3B, SCN4B, SNTA1, TRDN

Der Plötzliche Herztod stellt kein isoliertes Erkrankungsbild dar, sondern ist vielmehr die Folge anderer zugrundeliegender Syndrome. In diesem Zusammenhang sind beispielsweise strukturelle und rhythmologische Herzerkrankungen zu nennen. Zahlreiche Parameter können pathophysiologisch als Einflussgröße agieren und damit als Auslöseereignis für ventrikuläre Tachykardien bzw. Fibrillationen betrachtet werden. Die interagierenden Konstanten und damit auch die zugrundeliegende Ätiologie unterscheiden sich in hohem Ausmaß vom Alter des Betroffenen. So ist bekannt, dass rund 80 % der Fälle von SCD im Alter von > 35 Jahren durch ischämische Ereignisse verursacht werden. In jüngeren Jahren spielen hereditäre Variablen hingegen eine bedeutende Rolle. Insbesondere bei diesem Kollektiv nehmen molekulargenetische Untersuchungen damit einen zunehmenden Stellenwert ein. Dies bezieht sich einerseits auf die Vermeidung von Ereignissen bei Indexpatienten, aber auch auf die Prävention von Angehörigen (35-37).

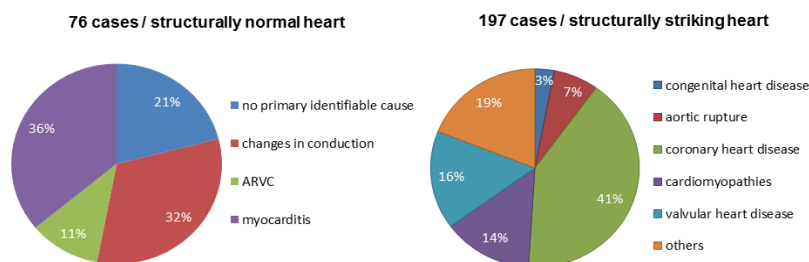


Abbildung 18: Autopsieergebnisse bei jungen Menschen (4-35 J.) nach SCD
(mod. nach SCD (mod. nach Corrado et al. 2001))

1.4. Erbgänge

Im Zusammenhang mit hereditären kardialen Erkrankungen werden häufig zwei Erbgänge beobachtet. Zum einen der autosomal dominante, in seltenen Fällen jedoch auch der autosomal rezessive. Die menschlichen Erbanlagen bestehen aus 22 Chromosomenpaaren (Autosomen) und den beiden Geschlechtschromosomen X und Y. „Autosomal“ bedeutet hierbei, dass das krankheitsverursachende Gen nicht auf einem der Geschlechtschromosomen liegt. „Dominant“ bedeutet, dass eine veränderte Kopie des Gens ausreicht, das entweder vom Vater oder von der Mutter vererbt wurde, damit es zur Erkrankung kommt. Das Risiko für Kinder, die für die Erkrankung verantwortliche Erbanlage zu erhalten, beläuft sich demnach auf 50 % (5,38).

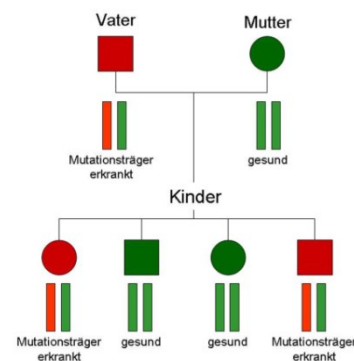


Abbildung 19: Graphische Darstellung des AD-Erbganges
(<http://humangenetics.uni-bonn.de/forschung>)

Hingegen tritt eine Erkrankung, welche dem autosomal rezessiven Erbgang folgt, nur dann auf, wenn beide Allele des ursächlichen Gens eine pathogene Veränderung aufweisen. Wenn es sich hierbei um dieselbe Variante handelt, wird dies als homozygot bezeichnet. Sind die Mutationen auf beiden Allelen unterschiedlich, liegt ein compound heterozygoter Zustand vor. Bei einem veränderten Allel ist von einem heterozygoten Anlageträger auszugehen, der in der Regel gesund ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei heterozygote Anlageträger jeweils ihr verändertes

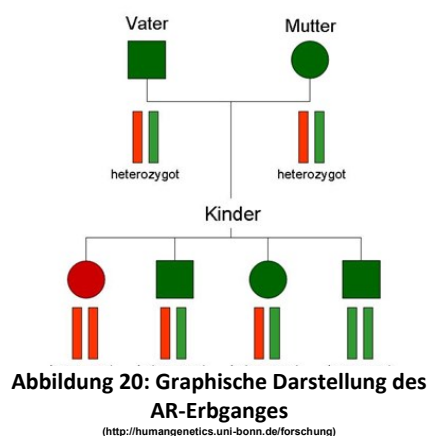


Abbildung 20: Graphische Darstellung des AR-Erbganges
(<http://humangenetics.uni-bonn.de/forschung>)

Gen weitervererben, erfolgt zufällig und kann nicht beeinflusst werden. Die statistische Wahrscheinlichkeit, dass das Kind somit zwei veränderte Anlagen trägt und daher erkrankt, beträgt 25 %. Autosomal rezessive Erkrankungen treten häufiger in konsanguinen Familien auf. Dies lässt sich auf gemeinsame Erbanlagen durch den gemeinsamen Vorfahren zurückführen (5,39).

1.5. Humangenetisches Beratungsgespräch

Die gesetzlichen Rahmenbedingungen genetischer Analysen, als auch des humangenetischen Beratungsgespräch, sind im Österreichischen Gentechnikgesetz in den § 64-79 (Genetische Analysen und Gentherapie am Menschen) zu finden. Hier ist auch die Unterscheidung von vier Typen genetischer Analysen zu medizinischen Zwecken klar definiert.

- Typ I Nachweis einer bestehenden Erkrankung (Somatisch)
- Typ II Nachweis einer bestehenden Erkrankung in der Keimbahn
- Typ III Nachweis der Prädisposition für eine Erkrankung bzw. des Überträgerstatus für welche nach dem derzeitigen Stand der Technik Prophylaxe oder Therapie möglich sind
- Typ IV Nachweis der Prädisposition für eine Erkrankung bzw. des Überträgerstatus für welche nach dem derzeitigen Stand der Technik keine Prophylaxe oder Therapie möglich sind

Insbesondere Analysen des Typs III und IV folgen klaren Richtlinien: „...*dürfen nur in hierfür zugelassenen Einrichtungen und nur auf Veranlassung eines in Humangenetik / medizinischer Genetik ausgebildeten Facharztes oder eines für das Indikationsgebiet zuständigen behandelnden oder diagnosestellenden Facharztes erfolgen.*“ (§ 65 Abs.1) (40).

Wie bereits erwähnt, ist auch die grundlegende Auslegung eines humangenetischen Beratungsgesprächs im GTG festgelegt.

„§ 69. (1) Eine genetische Analyse des Typs 2, 3 oder 4 einschließlich einer genetischen Analyse im Rahmen einer pränatalen Untersuchung, darf nur nach Vorliegen einer schriftlichen Bestätigung der zu untersuchenden Person durchgeführt werden, dass sie zuvor durch einen in Humangenetik/medizinische Genetik ausgebildeten Facharzt oder einen für das Indikationsgebiet zuständigen Facharzt über deren Wesen, Tragweite und Aussagekraft aufgeklärt worden ist und aufgrund eines auf diesem Wissen beruhenden freien Einverständnisses der genetischen Analyse zugestimmt hat. Werden diese Untersuchungen pränatal durchgeführt, so müssen Aufklärung und Zustimmung der Schwangeren auch die Risiken des vorgesehenen Eingriffes umfassen.

(2) Die Bestätigung gemäß Abs. 1 erteilt

1. *für eine mündige minderjährige Person diese selbst nach Maßgabe des § 146c*

ABGB,

2. für eine unmündige Person ein Erziehungsberechtigter und
3. für eine Person, der ein Sachwalter bestellt ist, dessen Wirkungsbereich die Zustimmung zur genetischen Analyse umfasst, der Sachwalter.

(3) Vor Durchführung einer genetischen Analyse gemäß Abs.1 hat eine ausführliche Beratung der zu untersuchenden Person sowie des allenfalls gemäß Abs. 2 vertretungsbefugten Erziehungsberechtigten oder Sachwalters über das Wesen, die Tragweite und die Aussagekraft der Analyse durch den diese genetische Analyse veranlassenden in Humangenetik/medizinischer Genetik ausgebildeten Facharzt bzw. den für das Indikationsgebiet zuständigen Facharzt stattzufinden.

(4) Die Beratung nach Durchführung einer genetischen Analyse gemäß Abs.1 muss die sachbezogene umfassende Erörterung aller Untersuchungsergebnisse und medizinischen Tatsachen sowie mögliche medizinische, soziale und psychische Konsequenzen umfassen. Dabei ist bei entsprechender Disposition für eine erbliche Erkrankung mit gravierenden physischen, psychischen und sozialen Auswirkungen auch auf die Zweckmäßigkeit einer zusätzlichen nichtmedizinischen Beratung durch einen Psychologen oder Psychotherapeuten oder durch einen Sozialarbeiter schriftlich hinzuweisen. Zusätzlich kann auf andere Beratungseinrichtungen und Selbsthilfegruppen hingewiesen werden.

(5) Beratungen vor und nach einer genetischen Analyse gemäß Abs.1 dürfen nicht direktiv erfolgen. Der Ratsuchende ist bereits bei Beginn der Beratungsgespräche darauf hinzuweisen, dass er - auch nach erfolgter Einwilligung zur genetischen Analyse oder nach erfolgter Beratung - jederzeit mitteilen kann, dass er das Ergebnis der Analyse und der daraus ableitbaren Konsequenzen nicht erfahren möchte.

(6) Beratungen vor und nach einer genetischen Analyse gemäß Abs.1 sind mit einem individuellen Beratungsbrief an den Ratsuchenden abzuschließen, in dem die wesentlichen Inhalte des Beratungsgesprächs in allgemein verständlicher Weise zusammengefasst sind.“(40).

Somit ist klar ersichtlich, dass der humangenetischen Beratung sowohl vor, als auch nach einer genetischen Analyse große Relevanz eingeräumt wird. Im Rahmen dieser Gespräche sollen dem Ratsuchenden Informationen vermittelt werden, die es ihm möglich machen anhand valider Angaben autonome Entscheidungen zu treffen. Bei einem Aufklärungsgespräch nehmen neben Eigen- und Familienanamnese sowie Stammbaumanalysen, genetische Hintergründe zu spezifischen Krankheitsbildern, als auch entsprechende Vererbungsmodi bzw. Wiederholungsrisiken großen Raum ein. Weiters werden die technischen Möglichkeiten einer genetischen Analyse, deren Limitationen, aber auch Konsequenzen diskutiert. Ebenso umfassend müssen erhobene Befunde nach erfolgter Testung besprochen werden, um deren Auswirkung auf das Individuum bzw. deren Angehörige verständlich zu vermitteln (5,41).

2. Methoden

Die Methode des Next Generation Sequencings ermöglicht es, die Sequenz einer Vielzahl von Genen gleichzeitig zu erheben. Da die Sequenzierung des gesamten Genoms (Whole Genome Sequencing) auch einige Hürden mit sich bringt, wie beispielsweise Interpretationslücken, Qualitätseinbußen, Bearbeitungsdauer aber auch ökonomische und finanzielle Aspekte, wird im diagnostischen Setting zur Beantwortung spezifischer Fragestellung aktuell die sogenannte Paneldiagnostik herangezogen. Ein Vorgehen, welches derzeit internationale Gültigkeit besitzt. Hierbei werden relevante Gene, welche mit spezifischen Erkrankungen assoziiert werden, parallel auf einer Plattform analysiert. Dies bietet insbesondere für jene hereditären Erkrankungen beachtliche Vorteile, die eine große Heterogenität zeigen bzw. welche aufgrund Ihrer klinischen Variabilität ausschließlich eine Eingrenzung zu einem Erkrankungskomplex, nicht aber einer spezifischen Indikation erlauben.

In der durchgeführten Dissertation wurde hierzu ein sogenanntes „Kardiopanel“ konzipiert. Zu Beginn des Projektes brachte die Firma Agilent mit ihren HaloPlex Anwendungen ein Produkt auf den Markt, welches in wesentlichen Punkten den Anforderungen zur Untersuchung kardiogenetischer Krankheitsbilder entspricht. Relevante Etablierungsschritte bzw. –methoden werden weiterführend dargestellt.

2.1. Paneldesign

Mit der Einführung von NGS-Produkten stellte die Firma Agilent Technologies ein anwenderfreundliches Designtool (SureDesign) zur Verfügung, welches es ermöglicht Anreicherungskits zusammenzustellen, die den individuellen Bedürfnissen der spezifischen Anwender entsprechen. Im Falle des vorliegenden Kardiopanel wurde ausschließlich auf Gene fokussiert, die mit strukturellen oder rhythmologischen Erkrankungen assoziiert werden. Die Festlegung dieses Gensets erfolgte nach einer umfangreichen Literaturrecherche der aktuellen internationalen Fachliteratur. Dabei handelt es sich um einen sehr arbeitsintensiven Schritt, die anschließende Bearbeitung der Genliste stellt allerdings eine Voraussetzung zur Bestellung des Anreicherungskits dar. Hierzu

ist es erforderlich ein Design mit eindeutiger Produkterkennung (Designname) zu vergeben. Weiterführend werden die gewünschten Genregionen über anwenderselektierte Datenbanken identifiziert und damit automatisch ins Design aufgenommen. Nach umfassender Definition der Targets (z.B. Anzahl der flankierenden intronischen Basen) berechnet das Softwaretool die zu erwartende Größe, Abdeckung, sowie die Anzahl der Amplicons für den in Bearbeitung befindlichen Anreicherungs-kit. Die ermittelten Parameter sind dem generierten Designreport zu entnehmen. Besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die errechnete Coverage, als auch die Panelgröße gelegt werden. Erstgenannte könnte durch entsprechende Adaptierungen an den Standardeinstellungen verbessert werden. Der Panelumfang wirkt sich einerseits auf die Bearbeitungsdauer im Labor, als auch auf die Höhe der Reagenzienkosten aus.

Aktuell wird Version 3 des Kardiopanel in der Routinediagnostik angewandt. Das erste Design und der daraus resultierende Anreicherungs-kit ist als Pilotprojekt zu betrachten. Dies betrifft nur in geringem Maße das Design, deutlich stärker die labortechnische Aufarbeitung. Hierbei ist einerseits das Handling, aber auch die stete Weiterentwicklung des Protokolls durch Agilent zu berücksichtigen. Eine detaillierte Auflistung der Protokolladaptierungen wird unter dem Punkt labortechnische Ausführungen aufgelistet.

Eine umfangreiche Anpassung, in erster Linie das Design betreffend, wurde in Version 3 vorgenommen. Bevor eine neue Reagenziencharge geordert wird, liegt eine Überarbeitung der Genliste nahe. Dies ist jener Zeitpunkt, an dem am einfachsten auf die aktuellen Forschungsergebnisse eingegangen werden kann. So wurde aufgrund neuerer Literaturdaten der Umfang des Panels von 97 (409 kb) Genen auf 117 und damit 512 kb erweitert. Ferner wurde versucht jene Regionen, welche in der tatsächlichen Durchführung eine geringere Coverage aufweisen, mit weiteren Amplicons zu verstärken. Auf die Ermittlung der betroffenen Bereiche wird im Punkt Datenauswertung explizit eingegangen. Aus ökonomischer Sicht sind mit dieser Ausdehnung und den derzeitigen Marktentwicklungen die Grenzen der HaloPlex-Anwendung erreicht. Dieser Aspekt wird bei der Überarbeitung des Kardiopanel zu Version 4 sicherlich berücksichtigt werden.

Da das Kardiopanel auch in der Routinediagnostik eingesetzt wird, mussten im Vorfeld Formulare entwickelt werden, welche einerseits eine Zuweisung von extern, als auch eine umfassende Patientenaufklärung im Haus ermöglichen. Der Anforderungsbogen beinhaltet neben patienten- und zuweiserspezifischen Daten, sowie Angaben zum benötigten Untersuchungsmaterial, die Möglichkeit / Aufforderung die molekulargenetische Untersuchung eines spezifischen Krankheitsbildes anzuweisen. Die gesamte weiterführende Analyse erhobener Rohdaten bezieht sich lediglich auf Gene, welcher der spezifischen Indikation zugeordnet wurden.

Um dies auch Ratsuchenden ersichtlich zu machen, wurde eine Patienteninformation erstellt, die wesentliche Informationen zur Technik bzw. Probenbearbeitung, als auch die indikationsspezifische Genliste enthält. Damit soll wiederholt verdeutlicht werden, dass im Rahmen diagnostischer Untersuchungen lediglich jene Gene in die Analyse einbezogen werden, die dem klinischen Krankheitsbild entsprechen. Ein bereits vorliegendes positives Ethikvotum der Medizinischen Universität Graz erlaubt im wissenschaftlichen Bereich weiterführende Auswertungen in anonymisierter Form.

Um auf die Besonderheiten des Next Generation Sequencings (parallele Sequenzierung von zahlreichen Genen, indikationsspezifische Analyse etc.) ausführlich hinzuweisen, wurden spezifische Einverständniserklärungen konzipiert. Damit wurde versucht auf alle Anforderungen dem österreichischen Gentechnikgesetz entsprechend einzugehen, soweit dies aufgrund der derzeitigen Rahmenbedingungen überhaupt möglich ist.

2.2. Labortechnische Ausführung

Hier sollen wesentliche Methoden, die im Rahmen der Dissertation Anwendung fanden, dargestellt werden.

2.2.1. Library-Preparation entsprechend dem HaloPlex Target Enrichment System

Bei diesem Produkt handelt es sich um einen PCR-basierenden Hybridisierungsansatz. Damit wird die Kenntnis über die Sequenz der gewünschten Region vorausgesetzt. Dies wird durch die Festlegung der Gene im Design und der darauf basierenden Erstellung des Anreicherungskits erreicht. In diesem werden genau jene Bereiche im Genom mit Amplicons angereicht, die weiterführend untersucht werden sollen.

Logistisch muss ein Zeitfenster von rund acht Wochen von der Designübermittlung an Agilent Technologies bis zum Erhalt des Anreicherungskits einkalkuliert werden. Die Größe des Produktes umfasst je nach Wunsch 48 oder 96 Reaktionen.

Um optimale Ergebnisse zu erhalten, wird vom Hersteller die Durchführung des laborchemischen Prozesses entsprechend dem von Agilent entwickelten Protokoll für HaloPlex Target Enrichment System empfohlen. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 21 ersichtlich.

Selbstverständlich geht diesem Verfahren, falls noch nicht erfolgt, die Isolierung von DNA aus Vollblut oder anderen Materialien (Speichel, Gewebe etc.) voraus.

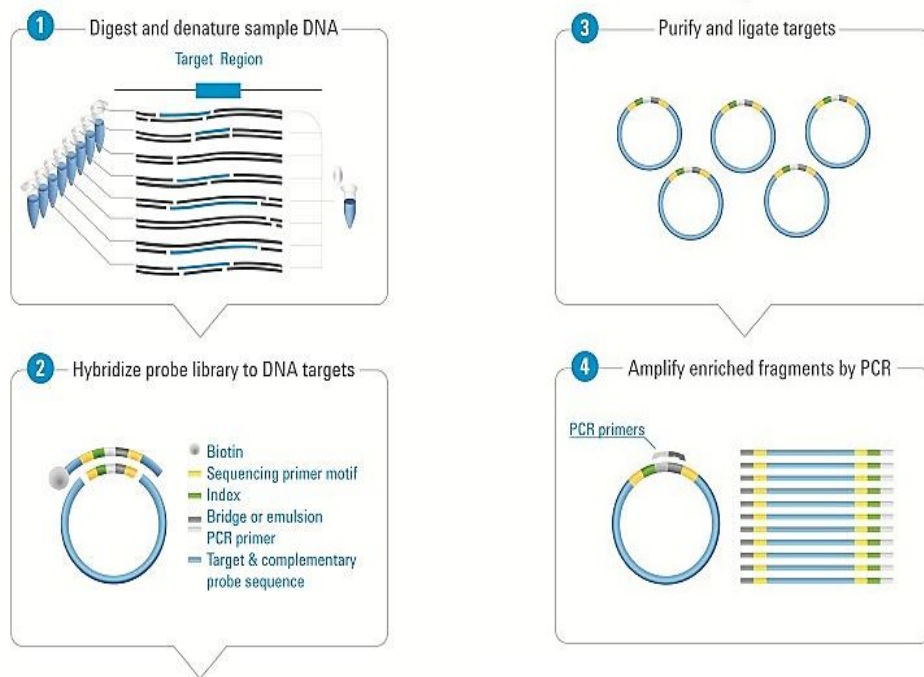


Abbildung 21: Library-Preparation nach dem Haloplex Target Enrichment Protokoll

Dieses Protokoll umfasst eine Bearbeitungsdauer von drei Tagen. Die nachfolgende Tabelle soll die erforderlichen Prozesse übersichtlich darstellen. Bezüglich der exakten Reagenzien bzw. deren Konzentrationen wird auf das entsprechende Protokoll verwiesen.

Tabelle 1: Übersicht - Protokoll zur Libraryerstellung bei Haloplexanwendungen

	Arbeitsschritt	Dauer	Anmerkung
Tag 1	DNA Quantifizierung	1 h 45 min	
	DNA verdünnen und Verdau ansetzen		
	Restriktionsverdau	30 min	Möglicher Stoppunkt
	Hybridisierung ansetzen	30 min	
Tag 2	Hybridisierung	3 – 16 h	Abhängig vom Design
	Anreicherung der Zielsequenzen, Indizierung, Zirkularisierung der angereicherten Fragmente mittels Ligation	2 h 30 min	
	PCR Amplifikation der zirkulären Zielsequenzen	1 h 20 min	Möglicher Stoppunkt
	Aufreinigung der Zielsequenzen	1 h	Möglicher Stoppunkt
	Aufreinigung der Zielsequenzen	45 min	Möglicher Stoppunkt
Tag 3	Validierung der Quantifizierung der angereicherten Ziel-DNA mittels Bioanalyser	45 min	

Protokollverlauf:

- DNA-Quantifizierung

Die Vermessung der generierten Daten des Kardiopanel erfolgte mittels des Qubit™ 2.0 Fluorometer. Hierbei binden fluoreszenzmarkierte MolecularProbes® Dyes an DNA- oder auch RNA-Moleküle. Die damit einhergehende Emission wird zur Quantifizierung herangezogen. Um auch die DNA-Qualität zu überprüfen erfolgt weiterführend die spektrophotometrische Vermessung unter Anwendung eines NanoDrop Gerätes. Im Zuge der DNA-Quantifizierung sollten die Parameter der Mindestmenge von 200 ng und das Vorliegen nicht degradierter DNA gewährleistet werden.

Die praktische Anwendung beinhaltet zunächst das Verdünnen der Probenausgangskonzentration auf 10ng/µl, eine anschließende Requantifizierung um weiterführend die Endkonzentration von 5 ng/µl herzustellen.

- Verdau genomischer DNA mit Restriktionsenzymen

Der Kit beinhaltet 16 divergente Restriktionsenzyme. Damit wird die Herstellung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe erzielt.

- Hybridisierung

Dieser Schritt umfasst die Hybridisierung der verdauten DNA-Fragmente mit der „HaloPlex Probe Capture Library“. Diese ist explizit auf die im Design ausgewählten „Target Regions“ des humanen Genoms zugeschnitten. Die Hybridisierungsdauer korreliert weitestgehend mit der Größe des Panels, womit mit Spannbreiten von 3 – 16 Stunden zu rechnen ist. Da das Kardiopanel hinsichtlich der Größe am oberen Limit angesiedelt wurde, zeigte eine 16stündige Hybridisierungsdauer bessere Ergebnisse.

- Anreicherung der Zielsequenzen und Indizierung

Die erworbenen HaloPlex-Proben sind mit einer Biotinmarkierung versehen. Die DNA-HaloPlex-Probe-Hybride werden hierüber angereichert.

- Zirkularisierung der angereicherten Fragmente mittels Ligation
Die angereicherten DNA-Fragmente werden ligiert und über die HaloPlex-Probe zirkuliert.
- PCR-Amplifikation der zirkulären Zielsequenzen
Die zirkulär vorliegenden Fragmente werden mittels PCR amplifiziert. Die Anzahl der erforderlichen Zyklen variiert in Abhängigkeit vom Design. Für die Kardioproben wurden 20 Zyklen veranschlagt.
- Aufreinigung der Zielsequenzen
Hierzu wurden „AMPure XP Beads“ herangezogen. Da nach diesem Aufreinigungsschritt ein Adaptorpeak > 10 % der Zielfragmente nachweisbar war, wurde dieser Reinigungsschritt wiederholt (durchschnittlich zweimal) durchgeführt.
- Validierung und Quantifizierung der angereicherten Ziel DNA mittels Bioanalyser
Die Quantifizierung der Proben ist für die weiterführende Sequenzierung, hinsichtlich der einzusetzenden Probenmenge, unerlässlich. Die Amplicons sollten sich im Bereich zwischen 175 – 625 bp befinden. Im Idealfall weist das Hauptprodukt eine Größe von 225 – 525 bp auf. Um am Bioanalyser die Molarität [pmol/l] zu berechnen wird der gesamte Zielbereich von 175 – 625 bp eingestellt. Peaks in einer Größe von rund 125 bp weisen auf Adaptoren hin und sollten, sofern vorhanden, nicht in die Analyse integriert werden.
- Poolen der Proben mit unterschiedlichen Indizes und Probenvorbereitung für das Sequenziersystem MiSeq
Die gereinigten Proben werden entsprechend ihrer Konzentration mittels RNase-freiem Wasser auf 4 nM verdünnt. Das Endvolumen muss 10 µl umfassen.
Damit ist die Library-Preparation abgeschlossen, als nächster Schritt folgt die Sequenzierung (5,42).

Wie bereits erwähnt, wird von der Firma Agilent Technologies eine konstante Weiterentwicklung des Protokolls angestrebt. So wurden dem Anwender des HaloPlex Target Enrichment Kits in den letzten Jahren verschiedene Protokollversionen mit den entsprechenden Adaptierungen zur Verfügung gestellt. Dies wurde selbstverständlich auch bei der Bearbeitung des Kardiopanel berücksichtigt. Eine Auflistung relevanter Schritte mit gegebenenfalls vorgenommenen Anpassungen zwischen den Protokollen (Version B – D3) ist in der nachfolgenden Tabelle angeführt.

Tabelle 2: Unterschiede zwischen den Protokollen Version B - D3

	Version B (ab April 2012)	Version D (ab August 2012)	Version D3 (ab Dezember 2012)
Vermessung	PicoGreen o. Qubit	PicoGreen o. Qubit	PicoGreen o. Qubit
Step 1 (Digest)	Ident	Ident	Ident
Step 2 (Hybridize)	95° C f. 10 min 46° C f. 3 h 8° C Hold (f. 72 h) unabh. v. Panelgr.	1 – 500 kb 95° C f. 10 min 54° C f. 3 h Sofort weiter!!!	501 kb – 5 Mb 95° C f. 10 min 54° C f. 16 h Sofort weiter!!!
Step 3 (Capture)	Inkub. bei 46° C f. 10 min 4° C Hold f. 10 min	Inkub. bei 46° C f. 10 min Kein Hold	
Step 5 (PCR-MM)	KAPA HiFi Buffer KAPA HiFi Polymerase	5 X Herculase II Reaction Buffer Herculase II Fusion DNA Polymerase	
Step 7 (PCR)	1 Cycle 95° C f. 5 min 20 Cycles 98° C f. 20 sec 65° C f. 15 sec 72° C f. 30 sec 72° C f. 5 min 8° C Hold (max. 72 h) 20 Zyklen	1 Cycle 98° C f. 2 min 20 Cycles 98° C f. 30 sec 60° C 30 sec 72° C 1 min 72° C 10 min 8° C Hold (max 72 h) 20 Zyklen	
Step 8 (Purify)	60 µl AMPure B. zu 40µl Library-Probe (1,5:1 Bead – Sample volume) 5 min RT (Einfrieren – 1 J)	Mix aus 40µl Wasser + 100 µl AMPure B. 140µl Beadsuspension zu 40µl Library-Probe 5 min RT (kont. Schütteln) (Einfrieren – 1 J)	
			<ul style="list-style-type: none"> - Update zur Verwendung der Enzyme - Anpassung an 12 Reaktionen

2.2.2. Sequenzierung mittels MiSeq – Illumina

Die Bridge-PCR zur Amplifikation der zu sequenzierenden DNA und die Cyclic Reversible Termination (CRT) stellen die Kernkomponenten der Illumina-Technologie dar, womit sich diese Anwendung deutlich von anderen derzeit auf dem Markt befindlichen Systemen unterscheidet.

Nach Fertigstellung der Library ist es möglich, die Proben für längere Zeit, bei entsprechenden Bedingungen, zu lagern.

Um die für die Sequenzierung erforderlichen einzelsträngigen DNA-Moleküle zu erhalten, werden die doppelsträngigen DNA-Fragmente der Library-Pools zunächst durch Zugabe einer Natriumhydroxid-Lösung denaturiert. Die für das weitere Prozedere notwendigen Adaptoren wurden bereits im Zuge der Library-Preparation an die Fragmente ligiert. Die so vorbereiteten Proben (einzelsträngige DNA-Moleküle) werden von der Cartridge über die Flow-Cell gespült. Dabei handelt es sich um einen Glasobjektträger, an dem sich zu den Library-Fragmenten komplementäre, immobile Oligonucleotide (Adaptoren) befinden. Die Bindung zwischen diesen Adaptoren ist Voraussetzung für die erforderliche Hybridisierung. Nach Zugabe von Enzymen und Nukleotiden folgt die PCR, wobei der immobile Adaptor der Flow Cell als Primer fungiert. Der neusynthetisierte, kovalent mit der Flow Cell verbundene Strang, klappt um und hybridisiert an ein anderes komplementäres Oligonucleotid dieser Oberfläche. Somit entsteht eine doppelsträngige Brückenstruktur, die schlussendlich zur Clusterbildung führt. Ein Cluster repräsentiert hierbei ein DNA-Fragment und besteht ausschließlich aus Vorwärtssträngen (5,43,44). Die Sequenzierung nach der CRT-methode (Cyclic Reversible Termination) startet durch die Bindung der Sequenzierprimer an die Cluster. Die Zugabe aller vier Nukleotide, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen und Terminationsgruppe am 3'Ende versehen sind, erfolgt zeitgleich. Durch Bestrahlen der Flow-Cell mittels Laserstrahl werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und dessen Signal detektiert. Anschließend werden die Farbstoffe mitsamt der Terminationsgruppe abgespalten und stehen damit einem neuen Syntheszyklus zur Verfügung (10).

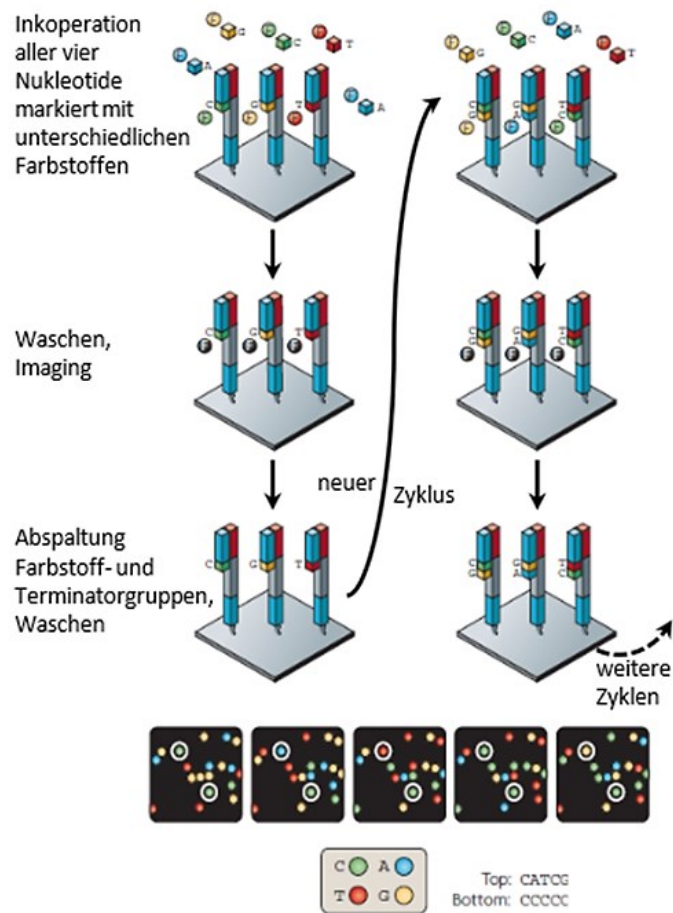
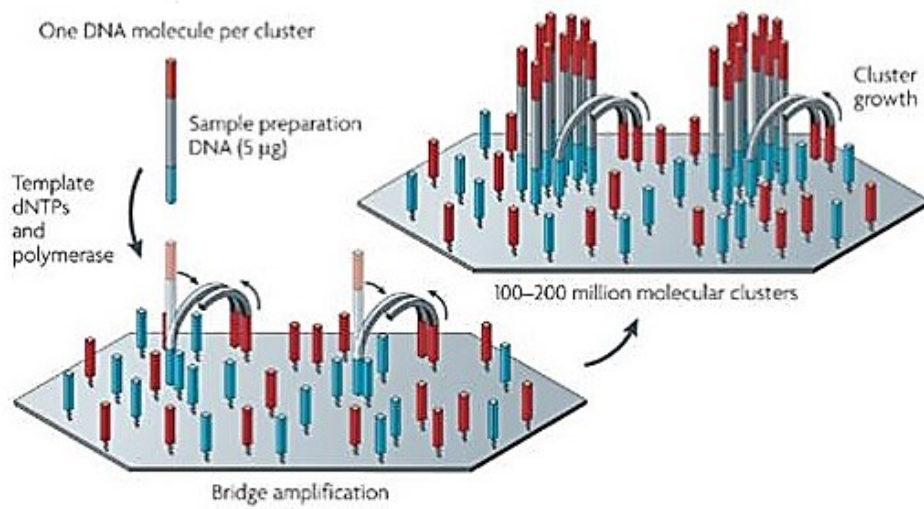


Abbildung 22: Prinzip der Sequenzierung am Illumina MiSeq
(mod. nach Metzker)

2.2.3. Sanger – Sequenzierung

Diese Methode wurde im Rahmen der Dissertation primär zur Vervollständigung von NGS-Datensätzen, zur Überprüfung von relevanten Varianten anhand einer weiteren Technik bzw. zur Bestimmung des Mutationsstatus im Zusammenhang mit Segregationsanalysen verwendet. Die Experimente wurden entsprechend eines Standardprotokolls durchgeführt (PCR, Agarosegel-Überprüfung, Sequenzier-PCR, Aufreinigung, Sequenzierung). Die diesbezüglichen Ansätze und Temperaturprofile sind im Anhang ersichtlich (Tabelle 11-14).

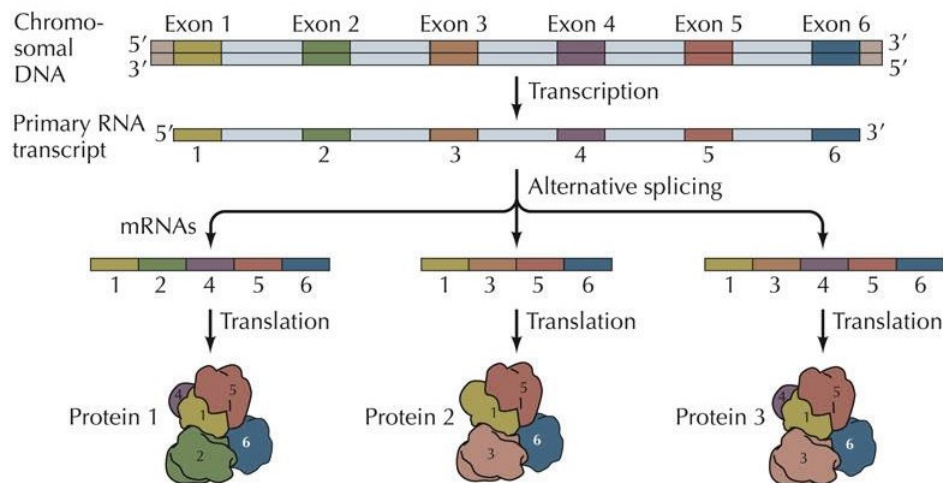
2.2.4. Splicing-Analysen

Bei der Proteinsynthese wird die genetische Information zunächst in RNA transkribiert, woran sich die Translation in eine spezifische Aminosäure anschließt. Die Transkription wird im Zellkern durchlaufen. Mithilfe DNA-abhängiger RNA-Polymerasen wird ein Primärtranskript (prä-mRNA oder hnRNA) erstellt. Hierbei handelt es sich um eine idente Kopie eines Gens in Form eines RNA-Einzelstranges. Bis zum Vorliegen reifer mRNA durchläuft die Präkursor-mRNA einige posttranskriptionelle Modifikationen. Dies beinhaltet zum einen das „capping“ (Anhängen eines 7-Methylguanosin-Triphosphats), zum anderen die Anheftung eines Poly-A-Schwanzes, zusammengesetzt aus Adenylresten, am 3'OH-Ende. Beide Anpassungen sollen die RNA vom vorzeitigen Abbau durch Nukleasen schützen. Ferner ermöglicht das capping den Transport durch die Kernporen und die Anlagerung an die Ribosomen. Ein weiterer Schritt im Rahmen der Umwandlung zur reifen mRNA stellt das Splicing dar. Hierbei werden die Introns aus der prä-mRNA entfernt und die Exons miteinander verbunden. Dieser Vorgang findet während oder anschließend an die Transkription im Zellkern statt und wird durch die übrigen RNA-Modifikationen nicht beeinflusst. Um einen reibungslosen Splice-Vorgang zu ermöglichen, ist die exakte Erkennung der Exon-Intron-Grenzen, der sogenannten Splice-Sites, unerlässlich. Die 5'-Splice-Site (Acceptor-Site) stellt den Übergang vom Exon zum Intron dar. Diese ist durch eine hochgradig konservierte Konsensussequenz in Form eines GT-Dinukleotids repräsentiert. Die 3'-Splice-Site zeigt mit der Konsensussequenz AG das Ende

des Introns an (GT-AG-Regel). Auf eine detailliertere Darstellung des RNA-Splicing Mechanismus wird an dieser Stelle, mit dem Verweis auf spezifische Fachliteratur, verzichtet.

Die Hypothese „ein Gen – ein Protein“ konnte durch zahlreiche Forschungsergebnisse widerlegt werden. Insbesondere der Mechanismus des alternativen Splicings führt zu einer deutlichen Proteinviefalt. Dadurch gehen aus einem RNA-Primärtranskript verschiedene reife mRNAs hervor, welche wiederum für funktionell divergente Proteine kodieren können. Dies begründet das Vorliegen von Isoformen für zahlreiche Gene.

Alternatives Splicing kann aber auch unmittelbaren Einfluss auf die Funktion eines Proteins haben. So ist es möglich, dass aufgrund der Anzahl der Nukleotiden in der alternativ und konstitutiv gespleißten RNA ein Frameshift entsteht, der die Aminosäuresequenz downstream der alternativen Splice-Site verändert. Dabei könnte ein vorzeitiges in-frame Stoppcodon entstehen und damit im Zuge der Translation ein verkürztes Protein nach sich ziehen (45,46).



THE CELL, Fourth Edition, Figure 5.5 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Abbildung 23: Beispiele für alternatives Splicing

Damit werden mRNA-Analysen immer häufiger als funktionelle Tests zur Überprüfung eines möglichen Splicing-Effektes eingesetzt.

Da die in der Zirkulation befindliche RNA sehr instabil ist (Abbau durch RNAsen) werden in der Routine sogenannte PAX-Röhrchen eingesetzt. Dabei handelt es sich um Blutröhrchen, die bereits eine Lösung mit RNase-Inhibitoren beinhalten. Dies soll den Abbau der RNA verzögern.

Nach Entnahme der Blutprobe wird die RNA entsprechend spezifischer Standardprotokolle isoliert. Weiterführend wird die Gewinnung von cDNA angestrebt. Dies wird durch die Zugabe eines „Poly-T-Primers“ (Oligo-dT-Nukleotid), welcher komplementär zum Poly-A-Schwanz ist, erreicht. Der produzierte cDNA-Strang ist zu diesem Zeitpunkt noch mit dem ursprünglichen RNA-Strang hybridisiert. Durch Zugabe von RNase H wird ein Abbau letzteres erreicht. Mithilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase kann nun ein komplementärer Strang zur cDNA synthetisiert werden. Da für die resultierende doppelsträngige cDNA eine prozessierte RNA als Matrize diente, sind in der cDNA keine Introns enthalten, diese ist jedoch deutlich stabiler, als die meisten RNA-Formen. Somit kann die cDNA zur Überprüfung des Splicingeffektes spezifischer Varianten herangezogen werden. Hierzu muss lediglich eine PCR und Sequenzierung, den Standardprotokollen entsprechend, erfolgen (38).

2.2.5. Segregationsanalysen

Segregationsanalysen werden herangezogen, um festzustellen, wie ein Merkmal in einer Familie weitergegeben wird bzw. welcher Erbgang diesem zugrunde liegt. Insbesondere bei umfangreichen molekulargenetischen Untersuchungen werden häufig mehrere Veränderungen in Genen identifiziert, deren Bedeutung für die Entstehung der Erkrankung eines Patienten nicht eindeutig zu beurteilen sind. Bei diesen Veränderungen kann es sich um pathogene Mutationen oder lediglich um seltene Varianten, die nicht für die Erkrankung als kausal anzusehen sind, handeln. Wenn eine Sequenzveränderung auch bei Familienmitgliedern vorliegend ist und diese gesund sind bzw. keine phänotypischen Merkmale aufweisen, ermöglicht dies eventuell den Rückschluss auf eine seltene Variante. Bei der Durchführung von Segregationsanalysen werden jedoch lediglich Varianten überprüft, welche beim Indexpatienten identifiziert wurden. Dies ist am effizientesten mittels Sanger-Sequenzierungen durchzuführen

2.3. **Datenanalyse und -interpretation**

Die Bezeichnung Datenanalyse und Dateninterpretation werden oft simultan verwendet, eine Differenzierung hat häufig nur semantischen Wert. Es beinhaltet jedenfalls die Aufarbeitung der Rohdaten, wobei der Prüfung auf Plausibilität große Bedeutung eingeräumt wird. Weiterführend ist die Relevanz der Datenpunkte zu prüfen, sowie deren klinische und molekulargenetische Bedeutung um schlussendlich auch eine Klassifizierung vornehmen zu können.

Bei der Anwendung von NGS-Technologien im diagnostischen Setting wird versucht, Rohdaten ausschließlich indikationsspezifisch zu bearbeiten. Dies ist darin begründet, dass die Wahrscheinlichkeit zahlreiche Varianten zu identifizieren, deren Interpretation oft nicht möglich ist bzw. großen Einschränkungen unterliegt, steigt, je umfangreicher die untersuchten Abschnitte im Genom sind. Diese, als unklassifizierte Varianten bezeichneten Sequenzveränderungen, sind hinsichtlich der klinischen Relevanz schwer bis kaum zu interpretieren, womit häufig eine Verunsicherung von Patienten und auch klinisch tätigen Kollegen einhergeht. Ferner vermindert die indikationsspezifische Datenbearbeitung das Risiko Zusatzbefunde zu generieren.

Im Falle des Kardiopanel wurden die Daten vorwiegend einer indikationsspezifischen Auswertung unterzogen, da die Befunde im Rahmen der Routinediagnostik erhoben worden. Vermehrt wurde jedoch aufgrund des vorliegenden positiven Ethikvotums, eine Bearbeitung über das gesamte Panel durchgeführt. Dies ist insbesondere bei besonders interessanten Fragestellungen der Fall.

Im Zuge indikationsspezifischer Analysen erfolgte weiterführend eine Gliederung in „Hauptgene oder Gene der Gruppe I“ und „Screeninggene bzw. Gene der Gruppe II“. Der erstgenannten Klasse werden jene Bereiche zugeordnet, die entsprechend der aktuellen Fachliteratur, eine hohe Prävalenz hinsichtlich der klinischen Fragestellung aufweisen. Diese Regionen werden, falls erforderlich, mit zusätzlichen Methoden komplettiert. Die Datenauswertung der Gene, welche der

Screeninggruppe zugeordnet werden, bezieht sich ausschließlich auf die mit NGS generierten Sequenzen.

2.3.1. Bioinformatik – Datenanalyse

Mit dem Einsatz von Next Generation Sequencing Technologien vervielfachte sich wohl fast zeitgleich die Anforderungen an die Bioinformatik. Die Befundung umfangreicher NGS-Untersuchungen wäre aufgrund der großen Datenmengen ohne ein valides bioinformatisches Prozedere nicht zu bewerkstelligen. Hierzu sind bioinformatische Pipelines erforderlich, die einen Komplex von Algorithmen und Programmelementen darstellen, welche die Transformation von Rohsequenzdaten zu interpretierbaren Genotypen ermöglichen. Diese können im Einzelnen unterschiedlich aufgebaut sein, weisen jedoch meist bestimmte Standardfunktionen auf. Dies integriert das:

- Base Calling
- Mapping
- Variant Calling
- Annotation
- Filtering (47).

Für molekulargenetische Untersuchungen, insbesondere im diagnostischen Setting, ist es auch im NGS-Sektor erforderlich, bestimmte Qualitätskriterien zu erfüllen. Hierzu zählen:

- Coverage
Beschreibt wie oft ein bestimmter Datensatz verlässlich sequenziert wurde. Um zuverlässig zwischen Sequenzierartefakt und dem Vorliegen einer tatsächlichen Sequenzveränderung unterscheiden zu können, muss ein bestimmtes Mindestmaß an Coverage vorliegend sein. Für Analysen konstitutioneller DNA wurde dies international bei zumindest 30x festgelegt. Damit ist eine hohe Wahrscheinlichkeit (> 99 %) zur Identifizierung beider Allele gegeben (48).
- Q20
Dabei handelt es sich um ein Qualitätsmaß, dass angibt mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit ein Genotyp auch wirklich korrekt ist (38).

- Readanzahl bzw. Readlänge
Read bezeichnet die Anzahl unabhängig ermittelter Sequenzierinformationen. Die Readlänge ist von Relevanz, da die Sequenzidentifikation umso eindeutiger ist, je länger ein Read ist. Dies reduziert ein unspezifisches Mapping und lässt eine höhere Coverage sowie das Sequenzieren kleinerer repetitiver Abschnitte zu (5,38).
- Reads on Target
Wird prozentuell angegeben und deklariert, wie viele Reads der qualitätsgefilterten Rohdaten schlussendlich der Target Region zuzurechnen sind (38).

Mittlerweilesind zahlreiche Softwarelösungen kommerziell oder auch kostenfrei erhältlich. Diese unterscheiden sich je nach Produkt und weisen häufig auch eine divergente Handhabung auf, weisen jedoch in den grundsätzlichen Anforderungen Übereinstimmung auf. Zu diesen zählen, wie bereits erwähnt, Trimming, Alignment und Quality assesment, variant calling (Abgleich mit dem Referenzgenom) und variant annotation (Annotierung zu spezifischen Datenbanken). Diese von der Software vorgenommenen Schritte, folgt ein spezifischer Filterprozess. Die Filterung steht immer in engem Bezug zur klinischen Fragestellung und berücksichtigt diesbezüglich die Indikation, als auch den vermuteten Erbgang. Varianten werden entsprechend ihrer Allelfrequenz in der europäischen Bevölkerung gefiltert. All jene, welche eine Frequenz von > 10 % aufweisen, werden den weiterführenden Analyseschritten nicht mehr unterzogen. Die verbleibenden seltenen Varianten werden zunächst auf ihre Plausibilität geprüft. Diese umfasst nachfolgende Parameter und soll der Beantwortung der Frage dienen, ob eine Variante tatsächlich vorhanden und korrekt annotiert ist.

- Qualität > Q20
- Coverage > 50x
- Sequenzveränderung in forward und reverse reads etwa gleich vertreten (> 33 % - < 66 %)
- Bereich mit komplexen Strukturen (poly-N, Repeat etc.)
- Adaptorenrest (vor allem am Ende eines Reads zu sehen)

Als Visualisierungstool wird hierzu der Integrative Genomics Viewer (IGV) verwendet, wobei dessen Darstellung teilweise bereits in den NGS-Softwareprogrammen integriert ist.

Anschließend werden die Varianten auf ihre Relevanz geprüft, wobei es hierbei nachfolgende Fragen zu beantworten gibt:

- Stimmt die beobachtete Frequenz mit dem vermuteten Phänotyp überein?
- Gibt es bereits Einträge in Mutationsdatenbanken?
- Wurde die Variante in der Literatur bereits beschrieben?

Damit kommt sowohl der Prüfung auf Plausibilität, als auch auf Relevanz großer Stellenwert zu. Dies zeigt, dass eine valide Befundung im NGS-Sektor nur noch unter Verwendung spezieller Softwarelösungen gewährleistet werden kann.

Zur Datenanalyse und -interpretation des Kardiopanel wurden aufgrund dessen, bereits gut etablierte, Pipelines herangezogen:

- SureCall (Agilent Technologies)
- Illumina Variant Studio (Illumina)
- SeqScape (Life Technologies) – nur periphere Anwendung
- Regionenprogramm I / II (in house)
- Beratungsprogramm (in house)

2.3.2. SureCall

Hierbei handelt es sich um eine von Agilent kostenfrei zur Verfügung gestellte Softwarelösung zur Bearbeitung der HaloPlex Target Enrichment Systeme. Damit ist Agilent Technologies eine anwenderfreundliche Lösung gelungen, welche alle bereits genannten Mindestanforderungen an eine Auswerte-Pipeline integriert. An dieser Stelle soll die praktische Anwendung kurz skizziert werden.

Zunächst wird ein FastQ-file, welches vom Sequenzer generiert wurde, hochgeladen. Über den Button „Import Unaligned“ werden die im Hintergrund befindlichen Algorithmen der Pipeline gestartet. Dieser Prozess kann in Abhängigkeit von der Dateigröße einige Minuten – Stunden in Anspruch nehmen. Nach Abschluss dieses Prozesses sind die Daten so aufbereitet, dass eine Prüfung auf Plausibilität und Relevanz erfolgen kann.

2.3.3. Illumina Variant Studio

Dies ist ein von der Firma Illumina konzipiertes Analysetool. Es basiert in zahlreichen Aspekten auf gleichen bzw. ähnlichen Algorithmen wie die zuvor beschriebene SureCall-Software. Für den Anwender ersichtliche Unterschiede zeigen sich primär in der Benutzeroberfläche.

2.3.4. SeqScape

SeqScape stellt eine Softwarelizenz dar, die von Lifetechnologies angeboten wird. Dieses Programm wird lediglich zur Beurteilung von Sanger-Sequenzierungen herangezogen. Der Erwerb eines NGS-Moduls wäre jedoch prinzipiell möglich.

2.3.5. Regionenprogramm I und II

Die Anwendung des Kardiopanel in der Routinediagnostik zieht insbesondere in Bezug auf die Coverage höhere Qualitätskriterien nach sich, als dies in einer alleinigen Forschungsanwendung der Fall wäre. Da alle NGS-Verfahren eine bestimmte Fehleranfälligkeit zeigen, muss eine bestimmte Coverage erreicht werden, um einerseits Sequenzierartefakte von tatsächlichen Mutationen zu unterscheiden und andererseits heterozygote Mutationen eindeutig als solche identifizieren zu können. Die Coverage ist in der Regel nicht für alle Regionen gleich, es kann sein, dass einige eine besonders hohe Coverage aufweisen, während andere aufgrund unzureichender Coverage keine zuverlässige Beurteilung erlauben. Für Untersuchungen mittels des Kardiopanel wurde eine Abdeckung von mindestens 50x festgesetzt. Im Falle einer heterozygoten Mutation kann nicht erwartet werden, dass exakt 50 % der sequenzierten Fragmente diese Mutation aufweisen werden. Häufig kann der Prozentsatz von Fragmenten mit Mutation stark variieren (z.B. statt der theoretischen 50% zu 50% kann auch eine Verteilung 20% zu 80% auftreten). Je nachdem, wie die Schwellwerte für die Identifizierung heterozygoter Mutationen gewählt werden, können diese dann vielleicht übersehen oder umgekehrt zu viele falsch positive erkannt werden. Von daher ist es essentiell, dass die Möglichkeit besteht, in Abhängigkeit von der Coverage oder anderen Qualitätsmerkmalen diese

Schwellwerte zu variieren, um mit größtmöglicher Sicherheit Mutationen zu identifizieren.

Um Bereiche, welche unter dem festgelegten Grenzwert gecovert wurden, routinemäßig zu ermitteln, wurde in Kooperation mit Herrn PD Mag. Dr. T. Schwarzbraun ein spezifisches Python-Skript programmiert. SureCall reiht im txt-Format Positionen auf, die unter dem festgelegten Grenzwert liegen. Mit dieser Information ist es nicht möglich, rasch zusammenhängende Abschnitte zu erkennen. Das „Regionenprogramm I“ gleicht nun die von SureCall generierten Informationen mit dem Referenzfile des Designs ab. Die Filterung zur Identifizierung fehlender Abschnitte erfolgt hierbei über Regionen. Damit werden Informationen erhoben, die eine rasche Nachsequenzierung einzelner Bereiche ermöglichen.

Ein weiteres mit Herrn PD Mag. Dr. T. Schwarzbraun entwickeltes Programm bezieht sich nicht auf Regionen, sondern explizit auf Basen. Das „Regionenprogramm II“ gleicht jede einzelne Base mit dem Referenzfile des Designs ab. Das Programm zählt damit jede Base eines jeden Reads. Damit lässt sich die Coverage für jede spezifische Position exakt ermitteln. Das Skript ermöglicht es zudem, diese Informationen über alle analysierten Patienten zu summieren. Damit kann dargestellt werden, in welcher Region auch nur eine einzelne Base im Vergleich zur Referenz eine Coverage $< 50x$ aufweist. Die betroffenen Exons werden farblich markiert, wobei sich die Markierung ändert, je häufiger ein Fehlen von Basen im gleichen Exon beobachtet wird.

2.3.6. Beratungsprogramm

Eine NGS-Analyse stellt eine sehr komplexe Untersuchung dar. Um den Ratsuchenden relevante Qualitätsmerkmale nachvollziehbar darstellen zu können, wurde ebenfalls mit PD Mag. Dr. T. Schwarzbraun das „Beratungsprogramm“ entwickelt. Dies zeigt einerseits die Coverage für den einzelnen Patienten im Gesamten, als auch isoliert für die spezifische Fragestellung. Weiters können die Coverage für jedes einzelne Gen, sowie die

Anzahl der fehlenden Basen pro Gen ermittelt werden. Die entsprechenden graphischen Darstellungen bieten eine Hilfestellung in der Beratungssituation.

2.3.7. Datenbanken

Wie bereits mehrfach betont, hat sich durch die Next Generation Sequencing Technologien der Arbeitsaufwand vom experimentellen Teil zur Datenanalyse und –interpretation verschoben. Um die damit einhergehende Datenflut zu bewerkstelligen, rücken Datenbanken immer mehr in den Fokus. Es ist mittlerweile unerlässlich, erhobene Informationen mit internationalen Daten abzugleichen. Hierzu stehen Angebote zur Verfügung, wobei im Rahmen dieser Arbeit nur jene berücksichtigt werden, welche zur „Kardiogenetik-Befundung“ herangezogen wurden.

- Integrative Genom Viewer

Um genomische Daten zu analysieren, stellt die Datenvisualisierung eine zentrale Komponente dar. Allerdings stellen die Größe und auch Vielfalt der produzierten Datensätze erhebliche Herausforderungen an Visualisierungstools dar. Beim Integrative Genom Viewer handelt es sich um ein „High-Performance-Viewer“ der es möglich macht, große heterogene Datensätze effizient zu verarbeiten, gleichzeitig aber auch die erforderliche Anwenderfreundlichkeit gewährleistet. Damit wird IGV häufig zur Analyse von Next Generation Sequencingdaten herangezogen (49).

- Genom Browser

Unter diesem Begriff werden Tools zusammengefasst, die eine graphische Darstellung von Genomdaten ermöglichen. Sie dienen einerseits der Visualisierung, erlauben aber auch den Abgleich kompletter Genome mit annotierten Daten hinsichtlich Struktur, Protein, Regulierung, Varianten etc. Insbesondere die detaillierte Aufbereitung von Struktur- oder Sequenzinformationen begründen die Effizienz dieser Browser. Sie unterscheiden sich von anderen biologischen Datenbanken, da sie Daten in einem graphischen Format präsentieren. Als Beispiel kann hier das

Auftragen der Genomkoordinaten auf einer Achse oder die Auflistung von Genen genannt werden. Hierbei handelt es sich um Standardeinstellung, die von allen Webtools erfüllt werden können. Unterschiede beziehen sich häufig auf das Oberflächenformat bzw. auf Zusatztools, die die Bearbeitung spezifischer Fragestellungen ermöglichen.

Exemplarisch wird in diesem Zusammenhang der UCSC Browser genannt, da er sicherlich zu den am häufigsten verwendeten Sequenzdatenbanken zählt. Diese Datenbank integriert eine Toolsammlung für das humane Genom, als auch für zahlreiche Modellorganismensysteme. Zudem wurden bereits Daten anderer Projekte (z.B. 1000 Genomes Project, Exom-Variant-Projekt) eingespeist. Damit bieten sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, die auch im Bereich der Analyse von Next Generation Sequencingdaten einen festen Platz einnehmen (50).

- Datenbanken zur Frequenz / genetischer Variabilität

Zu den ältesten und am meist verwendeten Datenbanken zur Dokumentation genetischer Variabilität zählt sicherlich dbSNP (51). Hier werden häufige und seltene SNV's (single nucleotide Variants) strukturiert annotiert. Daneben sind Informationen zur exakten Lokalisation, zur genomischen Veränderung, zur Häufigkeit in verschiedenen Populationen und teilweise auch Angaben zur klinischen Relevanz zu finden. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass der Frequenz im Rahmen der Befundung immer größerer Stellenwert eingeräumt wird. Dies begründet sich darin, dass nicht davon auszugehen ist, dass häufige Polymorphismen für seltene Erkrankungen ursächlich sind. Je nach zugrundeliegendem Phänotyp werden Varianten daher als wahrscheinlich nicht hochpenetrant eingestuft, wenn sie in einer Populationshäufigkeit von $> 1\%$ auftreten (38,51).

Eine weitere Datenbank, welche zunehmend Anwendung findet, ist der Exome Variant Server (EVS). Hier sind Sequenzinformationen zu mehreren Tausend Exomdatensätzen enthalten, wobei insbesondere die Information wie häufig SNP's in spezifischen Entitäten vorkommen, immer mehr an Bedeutung gewinnen (52).

- Mutationsdatenbanken

Da humangenetische Analysen nicht nur im Forschungssektor angewandt werden, sondern zunehmend in den klinisch diagnostischen Alltag Einzug nehmen, kommt einer zuverlässigen Phänotyp-Genotyp-Korrelation eine immer größere Bedeutung zu. Dies beinhaltet unter anderem die präzise Differenzierung pathogener Mutationen von seltenen Varianten. Somit wurden international bereits große Anstrengungen betrieben, um das Wissen zu pathogenen Veränderung strukturiert aufzuarbeiten und damit einer effizienten Bearbeitung zugänglich zu machen. Dies ist in der Bereitstellung verschiedener Mutationsdatenbanken ersichtlich, die eine Sammlung tausender Publikationen enthalten, wobei durch die rasche Datengenerierung kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben werden kann. Dennoch stellen diese Datenbanken eine große Hilfestellung bei der Dateninterpretation dar. Exemplarisch können die Datenbanken HGMD (The Human Gene Mutation Database), LOVD (Leiden Open Variation Database) und ClinVar genannt werden.

- Predictionprogramme

Dabei handelt es sich um Rechenprogramme, die den Einfluss einer Variante auf die zugrunde liegende Proteinfunktion bzw. deren Konservierung im Genom beurteilen. Beispielhaft wird der Mutationtaster angeführt. Von Bedeutung ist, dass in vitro Berechnungen lediglich theoretische Überlegungen widerspiegeln und in keinem Fall gänzlich auf eine in vivo Situation umzulegen sind (5,53).

2.3.8. Klassifizierung

Um die internationale Vergleichbarkeit von molekulargenetischen Befunden zu gewährleisten, ist ein einheitliches Nomenklatorsystem unerlässlich. Eine zentrale Bedeutung kommt hierbei der Referenzsequenz zu, mit welcher alle Varianten abgeglichen werden. Aktuell wird das humane Genom auf die Version „hg19“ bezogen.

Da mit enormer Geschwindigkeit neue Daten veröffentlicht werden, muss die Beschreibung und Nomenklatur von Sequenzveränderungen immer wieder adaptiert bzw. angepasst werden. Dies wird von internationalen Expertengruppen übernommen und ist über die Website der Human Genome Variation Society zugänglich (54).

Neben der eindeutigen und nachvollziehbaren Nomenklatur kommt der Interpretation und Wertung von Sequenzvarianten ein großer Stellenwert zu. Eine erste Hilfestellung gibt hier die Einordnung in Mutationsklassen, wie nachfolgend dargestellt (38).

Tabelle 3: Übersicht über Mutationstypen

Typ	Veränderung	Beschreibung
Synonyme Veränderung (stumme Veränderung)	Meist harmlose Veränderung	Obwohl ein Basenaustausch vorliegt, ändert sich die Translation des Codons wegen des degenerierten genetischen Codes nicht. Oft symptomloser Polymorphismus; selten ändern sich allerdings Splicing-Motive und es kann auch zu schweren Phänotypen kommen.
Missense-Veränderung (nicht synonyme Veränderung)	Leichte – schwere Veränderung	Sie führen wegen einer Basenveränderung im Codon zu einem Aminosäureaustausch
Nonsense-Veränderung	Meist schwere Veränderung	Durch Basenveränderung entsteht ein vorzeitiges Terminationssignal (Stopp-Codon) und die Polypeptidsynthese wird vorzeitig beendet.
Splicing-Veränderung	Meist schwere Veränderung	Sie erzeugen oder zerstören Signalsequenzen für das Spleißen von Exons und Introns.
Indel mit Leserahmenverschiebung (Frameshift-Mutation)	Normalerweise schwere Mutation	Frameshift-Veränderungen können durch Deletion oder Insertion von wenigen Basen oder durch Fehler beim Spleißen entstehen.

Um die klinischen Konsequenzen einzuschätzen zu können, wird in den humangenetischen Befunden gerne eine eindeutige Aussage hinsichtlich Pathogenität gesehen. Doch dies ist häufig, insbesondere durch die Zunahme an Datenmengen, nicht möglich.

Somit wird bei einer Befundung grob in drei Gruppen kategorisiert, auf welche weiterführend noch detaillierter eingegangen wird.

- Unauffälliger Befund
Keine Sequenzveränderung bzw. lediglich hochfrequente Polymorphismen nachweisbar.
- Auffälliger Befund
Eine pathogene Mutation konnte identifiziert werden. Dies ist einerseits durch die Auswirkungen auf das Genprodukt gegeben bzw. durch rezente Literaturstellen mit weiterführenden funktionellen Überprüfungen belegbar.
- Unklarer Befund
Nachweis von Sequenzveränderungen deren klinische Relevanz nicht eindeutig beurteilbar ist, da der funktionelle Effekt der Variante nicht exakt vorhergesagt werden kann.

Da die Sequenzierkosten deutlich gesunken sind, werden deutlich mehr molekulargenetische Analysen durchgeführt, häufig auch Gene sequenziert, welche bisher eher untergeordneten Stellenwert einnahmen. Insbesondere für diese Gene sind häufig noch keine Daten vorhanden, womit im generellen eine Zunahme von Varianten unklarer Signifikanz (VUS) oder auch unklassifizierte Varianten (UV) bezeichnet, zu verzeichnen ist. Da dies international eine eindeutige Befundung und damit einhergehende Vergleichbarkeit erschwert, wird versucht eine Kategorisierung dieser VUS vorzunehmen. Hierzu sind bereits verschiedene Vorgehensweisen publiziert, wobei sich derzeit überwiegend eine Klassifizierung in fünf Gruppen durchgesetzt hat:

- VUS 1 nicht pathogen bzw. ohne klinische Signifikanz
- VUS 2 mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht pathogen bzw. ohne klinische Signifikanz (< 5 %)
- VUS 3 unklare Variante
- VUS 4 wahrscheinlich pathogen (Irrtumswahrscheinlichkeit < 5 %)
- VUS 5 definitiv pathogene Variante (< 0,1 %) (55-58)

Da insbesondere die Arbeit von Thompson et al. großen Einfluss auf die Befundung des Kardiopanelns genommen hat, soll die veröffentlichte Kategorisierung nachfolgend dargestellt werden.

Tabelle 4: Klassifizierung nach Thompson et al.

Class 5 Pathogenic:	Class 4 Likely pathogenic:	Class 3 Uncertain:	Class 2 Likely not pathogenic:	Class 1 Not pathogenic:	
Nonsense/frameshift	Canonical splice site, untested for splicing OR PP 0.95-0.99 OR 2 points of evidence: Abrogated function or CMMRD or different background haplotypes OR Co-segregation with disease (~LR 5:1) OR ≥2 tumors with LS molecular phenotype	PP 0.05-0.949 OR Insufficient evidence to classify	AF ≥1% in specific ethnic group	AF ≥1% in control reference groups	
OR			OR	OR	OR
Large deletion			PP 0.001-0.049	PP 0.001-0.049	PP <0.001
OR			OR	OR	OR
Large duplication confirmed to encode a frameshift leading to NMD			2 points of evidence if proficient function, otherwise 3 points of evidence required:	2 points of evidence if proficient function, otherwise 3 points of evidence required:	3 points of evidence if proficient function, otherwise 4 points of evidence required:
OR			Proficient function or co-occurrence with no CMMRD	Proficient function or co-occurrence with no CMMRD	Proficient function or co-occurrence with no CMMRD
Full inactivation of variant allele by splicing aberration			AF 0.01-1%	AF 0.01-1%	AF 0.01-1%
OR			No co-segregation with disease (~LR 0.01:1)	No co-segregation with disease (~LR 0.01:1)	No co-segregation with disease (~LR 0.01:1)
PP >0.99			≥3 MSS CRC or inconsistent IHC tumors	≥3 MSS CRC or inconsistent IHC tumors	≥3 MSS CRC or inconsistent IHC tumors
OR			Odds Ratio with upper 95% CI <4 in case-control studies	Odds Ratio with upper 95% CI <4 in case-control studies	Odds Ratio with upper 95% CI <4 in case-control studies
4 points of evidence:					
Abrogated function or CMMRD or different background haplotypes					
Co-segregation with disease (~LR 10:1)					
≥2 tumors with LS molecular phenotype					
Absence in 1000 genomes					

Insbesondere im Zeitraum der Etablierung des Kardiopanelns hatten auch die 2008 publizierte ACMG Guidelines Einfluss auf die Klassifizierung der identifizierten Varianten. Diese unterscheiden sich primär durch eine andere Anordnung der Gruppierung. Hier werden pathogene Varianten der Gruppe 1 zugeordnet (58).

Tabelle 5: ACMG-Klassifizierung (mod. nach Richards et al.)

ACMG-Klasse	ACMG-Klassifikation	Beispiele	Wahrscheinlichkeit der Kausalität	Beschreibung
1	Sequenzvariante ist zuvor berichtet und eine anerkannte Ursache der Erkrankung	Mutation in Datenbank / Literatur	> 99%	Sehr sicher kausale Genvariante bzw. Genomvariante
2	Sequenzvariante ist zuvor nicht berichtet , ist aber von einer Art , von der erwartet werden kann, die Erkrankung zu verursachen	Mutation im ATG oder Stopcodon, Stopmutation, Frameshiftmutation, Splicemutation	> 95%	Wahrscheinlich kausale Genvariante bzw. Genomvariante
3	Sequenzvariante ist zuvor nicht berichtet und ist von einer Art, die für die Erkrankung möglicherweise kausal oder nicht kausal ist	Mutation in Splice Consensussequenz, neue kryptische Splicesite, Missensemutation (konservierte AA), in frame Deletion/Insertion	5-95%	Unknown variant (UV) bzw. Variant of uncertain significance
4	Sequenzvariante ist zuvor nicht berichtet und ist wahrscheinlich nicht ursächlich für die Erkrankung	Stille Mutationen (ohne neuer potentieller kryptischer Splicesite), tief intronische Mutationen, sonstige Datenlage die gegen eine Kausalität spricht (z.B. eigene Frequenzdaten)	< 5%	Wahrscheinlich neutrale Genvariante bzw. Genomvariante ("Polymorphismus")
5	Sequenzvariante ist zuvor berichtet und ist eine anerkannte neutrale Variante	SNP > 1% MAF	< 1%	Sehr sicher neutrale Genvariante bzw. Genomvariante ("Polymorphismus")
6	Sequenzvariante ist zuvor berichtet aber nicht von einer Art, von der erwartet werden kann, die Erkrankung zu verursachen, aber mit einer klinischen Präsentation assoziiert	Hinweise in der Literatur auf eine Assoziation mit einer Erkrankung	< 1% für Kausalität aber hoch für Assoziation	Wahrscheinlich mit der Erkrankung assoziiert aber nicht kausale Genvariante bzw. Genomvariante ("assoziierter Polymorphismus") z.B. aus GWAS

Für eine valide Befunderstellung müssen klinische Informationen in die Befundung einfließen. Dies ist im Einzelfall durch eine enge Zusammenarbeit der Molekularbiologen und den Fachärzten für Humangenetik bzw. den klinisch tätigen Kollegen (insbesondere Erwachsenen- und Kinderkardiologie) gegeben. Allerdings sollte im Rahmen dieser Dissertation eine Vergleichbarkeit von Daten, auch das klinische Spektrum betreffend, angestrebt werden. Somit wurde versucht die klinische Ausprägung in drei Schweregrade zu unterteilen:

Tabelle 6: Schweregrad der klinischen Ausprägung

+++	Erkrankung klinisch diagnostiziert (z.B. durch die Erfüllung klinischer Scores – Schwartz-Score bei LQT)
++	Klinisch hoher Verdacht für das Vorliegen einer Erkrankung (Einfluss nimmt neben den klinischen Befunden auch die Familienanamnese)
+	Genetische Komponente für eine Erkrankung möglich

3. Resultate

3.1. Etablierung

Für den Einsatz im diagnostischen Bereich ist eine umfassende Evaluierung und Validierung erforderlich. Diese wurde auch für das Kardiopanel durchgeführt.

Aus diesem Grund wurden für die ersten Sequenzierläufe neben Proben mit bekannten Veränderungen auch CEPH-Proben herangezogen. Hierbei handelt es sich um eine Referenz-DNA, die sich aus mehreren hundert Individuen weltweit zusammensetzt. Sie umfasst eine hohe Anzahl an SNPs und eignet sich daher als ideale Vergleichsprobe.

Die im Rahmen dieser Läufe generierten Daten (Sequenzveränderung – in erster Linie SNPs) wurden weiterführend mit Whole Genome Sequencing Daten (WGS) abgeglichen. Da große Datenmengen vorliegend sind, erfolgt dieser Schritt primär bioinformatisch. Inkongruente Ergebnisse werden einer weiterführenden visuellen Kontrolle unterzogen. Dies ermöglicht die Errechnung der Sensitivität und Spezifität auf das jeweils erstellte Design. Die in der Tabelle 7 und 8 zusammengefassten Ergebnisse weisen auf eine hochqualitative Untersuchung hin.

Tabelle 7: Validierungsergebnisse vor visueller Kontrolle

Statistics before visual inspection: <u>Sensitivität: 0,977867203</u> <u>Spezifität: 0,999929621</u>					
	Alleles:				
		true positive (TP)	true negative (TN)	false positive (FP)	false negative (FN)
Positions: 660956					
Ref mismatch: 397					
WGS called: 356					
SureCall called: 397					
Both called: 348					
-Hom 138		276			
-Het 210		210	210		
WGS only: 8					
-Hom 2					4
-Het 5			5		5
-Complex 1					2
Surecall only: 49					
-Hom 44				88	
-Het 5			5	5	
Both called Wildtype: 660551			1321102		
	Summen	486	1321322	93	11

Tabelle 8: Validierungsergebnisse nach visueller Kontrolle

Statistics after visual inspection: Sensitivität: 0,995934959 Spezifität: 0,999998486

	Alleles:				
Positions: 660956		true positive (TP)	true negative (TN)	false positive (FP)	false negative (FN)
Both called: 351					
-Hom 138		276			
-Het 213		213	213		
WGS only:1					
-Hom 0					
-Het 1			1		1
-Complex 0					
Surecall only: 1					
-Hom 1				2	
-Het 0					
WGS hom; SureCall het 1		1			1
Both considered Wildtype: 660602			1321204		
	Summen	490	1321418	2	2

Neben Sensitivität und Spezifität nimmt bei Untersuchungen im diagnostischen Bereich, wie bereits erwähnt, die Coverage einen großen Stellenwert ein. Das Design wurde so konzipiert, dass alle Exons plus 10 flankierende Basen eines jeden Gens durch Amplicons abgedeckt werden. Damit wurde für die Version 1 des Kardiopanel eine Größe von ~ 411 kb erreicht. Die durchgeführten Evaluierungsläufe zeigten für dieses Design eine Coverage > 50x von 393 kb, was einer prozentuellen Abdeckung von 95,64 % gleichkommt.

Durch die im Haus entworfenen Programme waren weiterführende Auswertungen möglich. Einerseits kann für jeden Lauf, als auch für jeden Patienten, die Coverage über das gesamte Panel ermittelt werden. Hierbei wird in drei Kategorien unterteilt (siehe Abb. 24):

- % > 50x
- % 30x – 50x
- % < 30x

Dieselbe Analyse kann auch indikationsspezifisch durchgeführt werden, um exaktere Aussagen zu den spezifisch relevanten Fragestellungen zu erhalten. Zudem können diese Informationen auch über mehrere Patienten gemittelt

berechnet werden. Insgesamt kann durch dieses Vorgehen eine generelle Qualitätsbeurteilung vorgenommen werden.

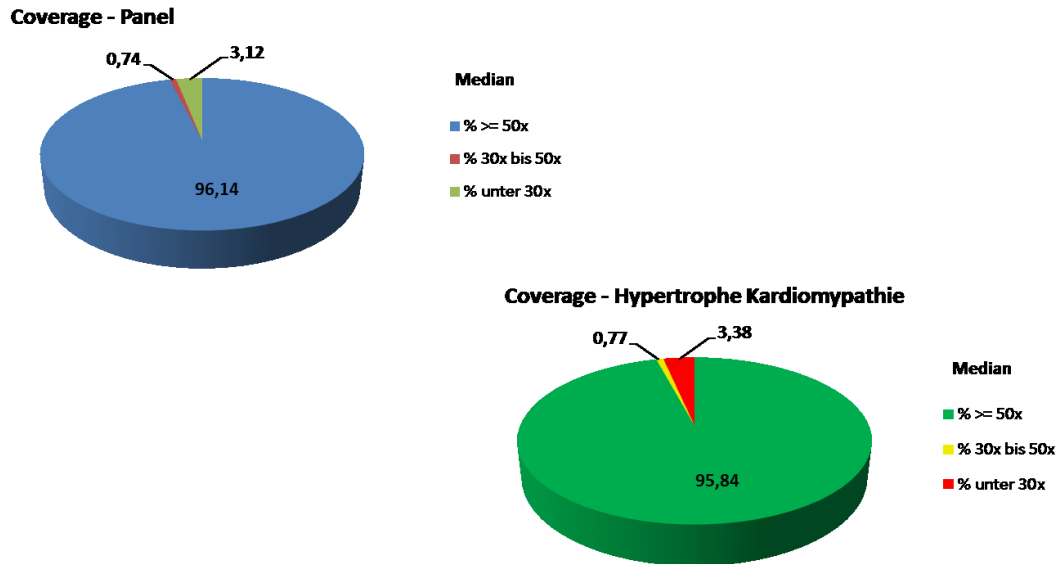


Abbildung 24: Graphische Darstellung Coverage

Weiterführend kann mit Hilfe dieser Programme die Coverage für jedes einzelne Gen aus Mittelwerten berechnet werden. Die nachfolgende Abbildung zeigt dies exemplarisch an den Daten von fünf Patienten.

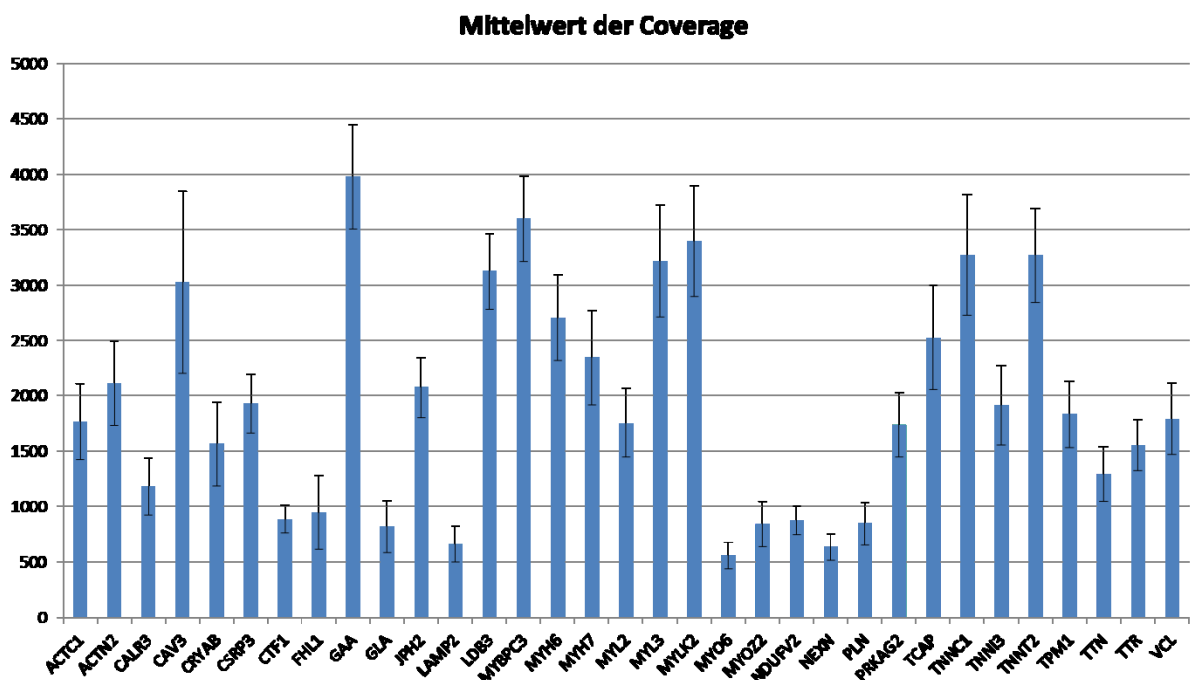


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Coverage mittels Mittelwerten

Zudem kann durch Verwendung dieser Skripten die exakte Anzahl jener Basen eruiert werden, welche im jeweiligen Gen < 50x gecovert wurden. Eine Berechnung, als auch graphische Darstellung, ist einerseits für den einzelnen Patienten möglich, kann aber auch über mehrere Datensätze gemittelt werden.

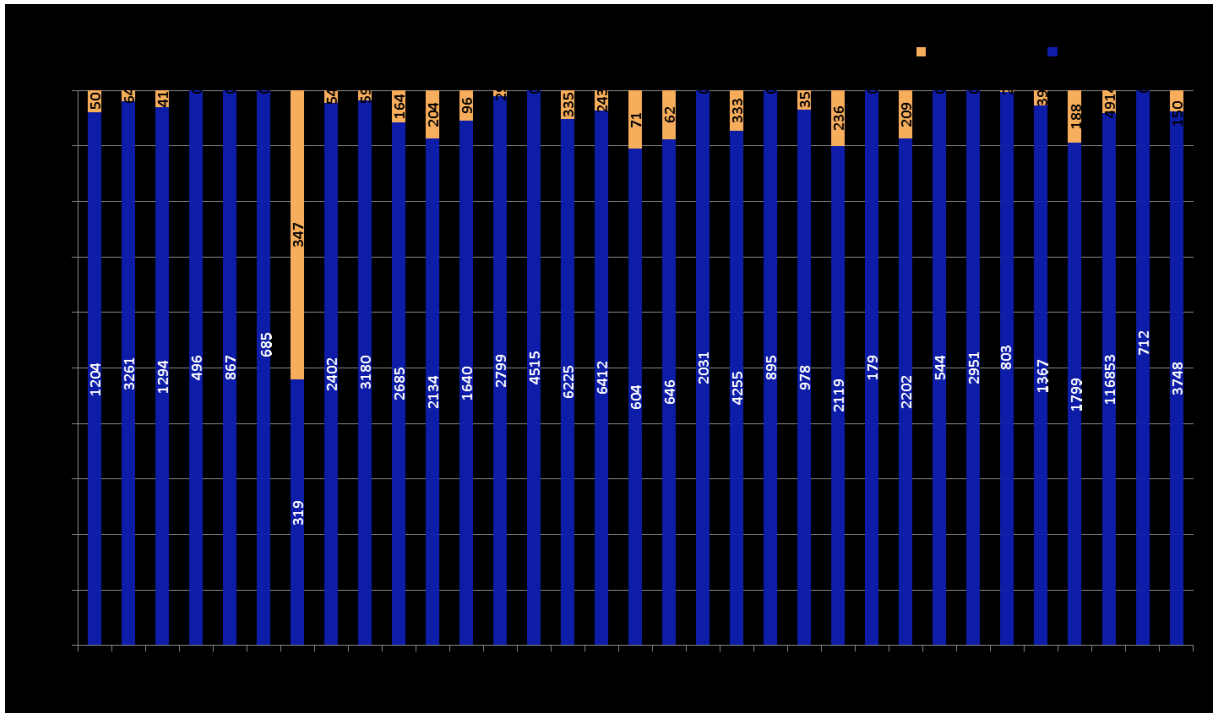


Abbildung 26: Graphische Darstellung der Coverage mittels Median

Für das Procedere in der diagnostischen Anwendung ist es von enormer Bedeutung zu wissen, welche Regionen häufig < 50x gecovert werden. Dies bestimmt die Anzahl der Nachsequenzierungen und hat somit unmittelbaren Einfluss auf die Kostenplanung. So ist es auch von Interesse, ob es sich hierbei wiederkehrend um die gleichen Positionen oder um divergente Regionen handelt. Dies konnte mittels der im Haus entworfenen Pipeline ebenso erhoben werden. Die nachfolgende Abbildung zeigt dies beispielhaft, indem fünf Patienten herangezogen wurden. Jedes „Kästchen“ stellt ein Exon dar. In der zweiten Spalte ist die Anzahl der Exons des spezifischen Gens zu entnehmen. Die Farbskalierung folgt folgender Interpretation:

- Grün keine einzelne Base in diesem Exon in den gemittelten Daten (hier fünf Patienten) fehlt
- Gelb fehlende Basen bei einem von fünf Patienten in diesem Exon
- Orange fehlende Basen bei zwei von fünf Patienten

statistische Analyse das Alter betreffend, würde verzerrte Daten nach sich ziehen. Dies ist beispielsweise in einer sehr guten Kooperation mit der Kinderkardiologie Graz begründet, weswegen verhältnismäßig viele Kinder einer molekulargenetischen Diagnostik mittels des Kardiopaneln zugeführt werden. Von wesentlicher Bedeutung ist, dass bei allen eingeschlossenen Patienten zuvor eine humangenetische Beratung erfolgte, welche neben einer ausführlichen Aufklärung des Patienten auch die Erhebung klinischer Daten, sowie die Durchführung einer Stammbaumanalyse ermöglichte. Damit war die Option gegeben, vor allem jene Patienten zu untersuchen, bei welchem die empirische Mutationswahrscheinlichkeit als deutlich erhöht anzusehen ist. Dies ist einerseits auf die Familienanamnese zurück zu führen, andererseits beispielsweise auf den Schweregrad der Erkrankung.

Wie in Abbildung 28 ersichtlich, wurden 41 Patienten mit einer strukturellen Herzerkrankung eingeschlossen, bei 24 Patienten war klinisch der Verdacht einer rhythmologischen Erkrankung gegeben. In drei Fällen war es nicht möglich, explizit zwischen rhythmologisch und strukturell zu unterscheiden.

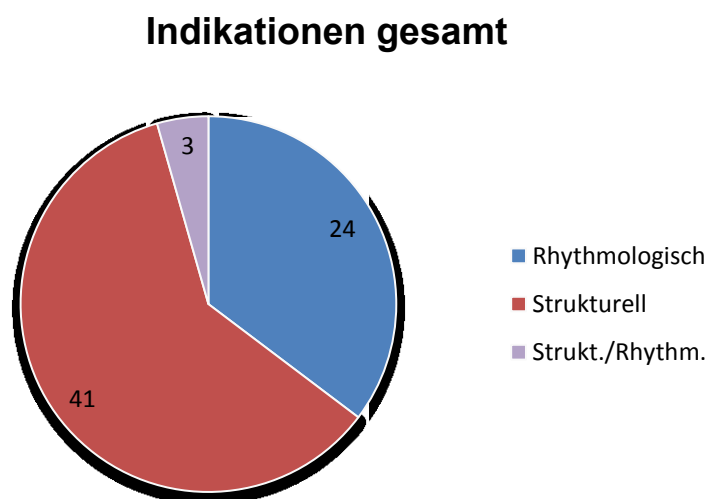


Abbildung 28: Überblick über die Anzahl der Indikationen rhythmologisch / strukturell

In Abbildung 29 wurde das untersuchte Kollektiv hinsichtlich ihrer spezifischen Indikation untergliedert. Bei diesen Darstellungen sind jeweils nur Indexpatienten berücksichtigt. Weiterführende Segregationsanalysen bzw. die Testung von

Familienangehörigen bei einem positiven Mutationsnachweis wurden hier nicht dargestellt.

Spezifische Indikation

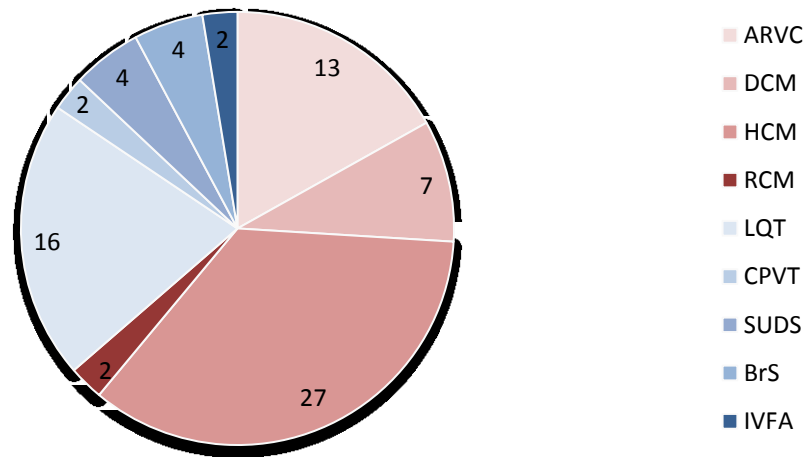


Abbildung 29: Anzahl spezifischer Indikationen

Bereits zu diesem Zeitpunkt kann von einer sehr hohen Detektionsrate gesprochen werden, was wiederum auf die Identifizierung guter Einschlussparameter zurückzuführen ist. Somit konnte in 33,82 % der Fälle (n=23) eine eindeutig krankheitsverursachende Veränderung, welche bereits in der Literatur beschrieben wurde bzw. eine oder mehrere Veränderungen die aufgrund weiterführender Daten mit hoher Wahrscheinlichkeit als krankheitsverursachend einzustufen sind, nachgewiesen werden. In ebenso 33,82 % der untersuchten Personen (n=23) wurden Veränderungen identifiziert, die aufgrund ihrer Position, Konservierung, der betroffenen Domäne, dem Vorliegen von benachbarten Veränderungen bzw. die Kenntnis eines alternativen Basenaustausches, der bereits als krankheitsverursachend beschrieben wurde, durchaus für die Entstehung des Phänotyps ursächlich sein könnten. Damit kann in dieser Konstellation von wahrscheinlich gelösten Fällen ausgegangen werden. Dies wird in den folgenden Graphiken einerseits das gesamte Kollektiv betreffend, andererseits entsprechend den einzelnen Indikationen, abgebildet. Hierbei wurden nur jene Indikationen beachtet, welche eine bestimmte Kollektivgröße aufweisen. Die weiterführende tabellarische Auflistung beinhaltet wiederum alle klinisch-kardiologischen Fragestellungen.

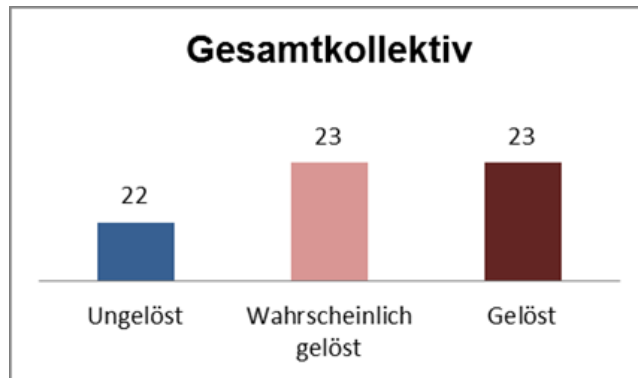


Abbildung 30: Detektionsrate Gesamtkollektiv

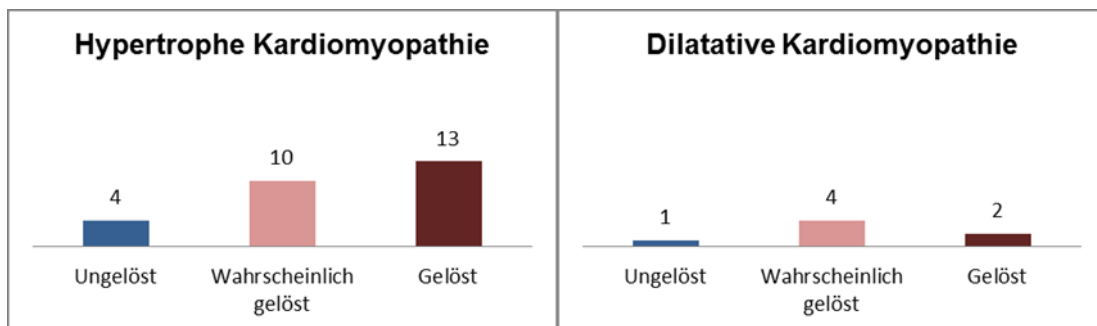


Abbildung 31: Detektionsrate strukturelle Erkrankungen (Beispiel)

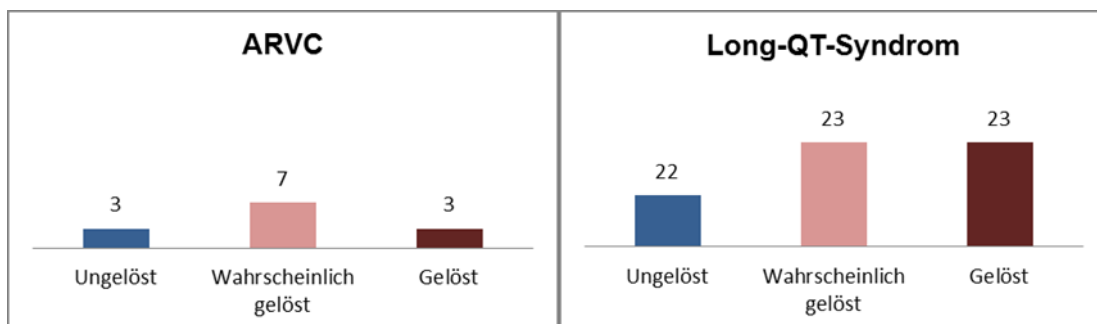


Abbildung 32: Detektionsrate ARVC / LQT

Tabelle 9: Indikationsspezifische Auflistung der Detektionsrate

		Ungelöst	Wahrscheinlich gelöst	Gelöst
Gesamt	n=68	22	23	23
		32,35%	33,82%	33,82%
HCM	n=27	4	10	13
		14,81%	37,04%	48,15%
DCM	n=7	1	4	2
		14,29%	57,14%	28,57%
RCM	n=2	0	1	1
		0,00%	50,00%	50,00%
ARVC	n=13	3	7	3
		23,08%	53,85%	23,08%
LQT	n=17	7	4	6
		41,18%	23,53%	35,29%
SUDS	n=4	2	1	1
		50,00%	25,00%	25,00%
CPVT	n=2	0	0	2
		0,00%	0,00%	100,00%
BrS	n=4	3	1	0
		75,00%	25,00%	0,00%
IVFA	n=2	2	0	0
		100,00%	0,00%	0,00%

Da die klinischen Zuweisungen aufgrund eines nicht exakt zuzuordnenden klinischen Bildes immer wieder Doppelanforderungen enthalten, spiegelte sich diese Mehrfachnennung auch in den deskriptiven Zahlen wieder. Durch die molekulargenetische Analyse kann jedoch in vielen Fällen eine eindeutige Diagnose gestellt werden.

Im Rahmen der Datenanalyse ist weiters das Mutationsspektrum von Interesse. Hierbei wurde die graphische Auflistung hinsichtlich „gelöster Fälle“ und „wahrscheinlich gelöster Fälle“ untergliedert. Eine Splittung entsprechend der klinischen Indikationen wäre in dieser Darstellung sehr unübersichtlich, weshalb darauf verzichtet wurde. Diesbezüglich wird auf Tabelle 10 verwiesen.

Mutationsspektrum - gelöster Fälle

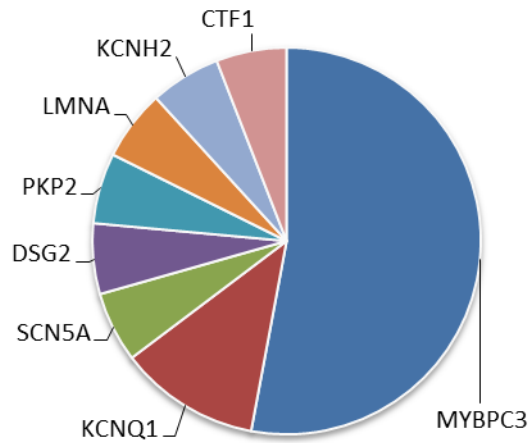


Abbildung 33: Mutationsspektrum gelöster Fälle

Mutationsspektrum - wahrscheinlich gelöster Fälle

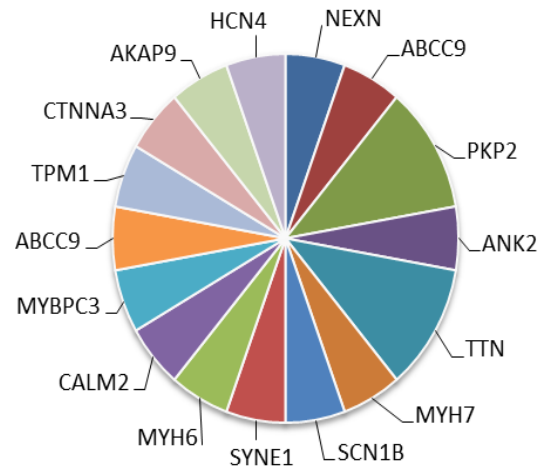


Abbildung 34: Mutationsspektrum wahrscheinlich gelöster Fälle

Tabelle 10: Relevante Ergebnisse von 68 Patienten

ID	Status	Sex	Alter b. Testung	Rhythm. / Struct.	Indikation	Klinik	H / S	Gen	Pos. (hg19)	ExAC (allele s)	ExAC (all allele)	%	NM	Variante	Protein- Austausch	Effekt	Referenz		
1	likely	F	13	Struct.	HCM / RCM	+++	M? UV	4 3	S S	NEXN TTN	1:78408275 2:179433654	NA 100	- 120660	- 0,08	NM_144573 NM_133378	c.1789 G>A c.69501 G>A	p.Glu597Lys p.Val23167=	missense ilent - splice	novel / highly conserved rs55857909
2	likely	M	14	Rhythm.	LQT	++	M?	4	S	ABCC9	12:21981968	NA	-	-	NM_020297	c.3593T>A	p.Met1198Lys	missense	novel / highly conserved
3	likely	M	45	Struct.	ARVC	+++	UV	2	H	DSP	6:7582993	1145	121034	0,95	NM_004415	c.5498 A>T	p.Glu833Val	missense	novel / highly conserved
4	solved	M	52	Struct.	HCM	+++	M? M	4 5	S H	RYR2 MYBPC3	1:237732523 11:47369407	NA 1	- 23204	- 0,00	NM_001035 NM_000256	c.3502 A>G c.821+1 G>A	p.Met1168Val -	missense splice	novel / conserved Niimura (1998) N Engl J
5	solved	F	3	Struct.	RCM	+++	M?	4	S	CSRP3	11:19207879	9	121404	0,01	NM_003476	c.298 C>T	p.Arg100Cys	missense	novel / highly conserved (1 different mutations affecting same p.)
6	unsolved	M	13	Rhythm.	IVFA	++	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	solved	M	13	Rhythm.	SUDS / LQT	+++	M?	4	H	RYR2	1:237804283	NA	-	-	NM_001035	c.7202 G>C	p.Arg2401Pro	missense	novel / highly conserved (2 different mutations affecting same c.)
8	likely	M	40	Struct.	HCM / ARVC	++	M? M? UV	4 4 3	H S	PKP2 MYO6 TTN	12:33031360 6:76564916 2:179439486	NA NA 8	- - 119714	- - 0,01	NM_004572 NM_004999 NM_133378	c.454 C>T c.1139 G>T c.63669 T>G	p.Pro152Ser p.Gly380Val p.Leu21223=	missense missense ilent - splice	novel / highly conserved novel / highly conserved rs56245285
9	solved	M	26	Struct.	HCM	+++	M	5	H	MYBPC3	11:47369407	1	23204	0,00	NM_000256	c.821+1 G>A	-	splice	Niimura (1998) N Engl J
10	unsolved	M	13	Rhythm.	LQT	++	UV	3	S	AKAP9	7:91632379	NA	-	-	NM_005751	c.3148 G>A	p.Val1050Met	missense	novel / weak
11	unsolved	F	41	Struct.	HCM	+	UV	2	S	TTN	2:179544685	1325	120372	1,10	NM_133378	c.29781_29783 dupAG	p.Tyr9929i	insertion	rs368327166
12	solved	M	45	Struct.	HCM	+++	M UV UV	5 3 3	H S S	MYBPC3 PRKAG2 TTN	11:47369975 7:151329159 2:179599719	3 19 2	76868 71488 38398	0,00 0,03 0,01	NM_000256 NM_016203 NM_133378	c.772 G>A c.618 C>T c.11205-4 G>A	p.Glu258Lys p.Asp206=	missense ilent - splice	rs397516074 - Niimura (1998) N Engl J Med 338: 1248, Vignier (2009) Circ Res 105: 239 rs201735117
13	solved	M	31	Struct.	HCM	+++	M UV	5 2	H S	MYBPC3 TTN	11:47364570 2:179477267	NA 1863	- 116128	- 1,60	NM_000256 NM_133378	c.1351+2 T>C c.42281 A>C	- p.Asn14094Thr	splice missense	novel / splicing tested rs36043230
14	unsolved	F	13	Rhythm.	LQT	+	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

15	unsolved	M	79	Struct.	HCM	+	UV	3	H	MYBPC3	11:47371414	299	106940	0,28	NM_000256	c.565 G>A	p.Val189Ile	missense	rs11570052
							UV	3	H	MYBPC3	11:47364588	3	112410	0,00	NM_000256	c.1338 C>G	p.Thr446=	ilent - splice	novel / base not conserved
							UV	2	S	TTN	2:179578703	615	119606	0,51	NM_133378	c.22950 G>A	p.Pro7650=	ilent - splice	rs142812510
16	solved	F	46	Struct.	HCM	++	M	5	H	MYBPC3	11:47356632	NA	-	-	NM_000256	c.2864_2865 delCT	.Pro955Argfs*9	frameshift	Niimura (1998) N Engl J Med 338: 248
							UV	3	S	TTN	2:179425397	9	119946	0,01	NM_133378	c.65632 C>T	p.Leu22805=	silent - splice?	rs189768015 / base conserved
							UV	3	S	TTN	2:179437523	107	120568	0,09	NM_133378	c.77758 G>A	p.Val26847Ile	missense	rs377264123
							M?	4	S	TTN	2:179612313	NA	-	-	[NM_133379]	[c.14814 G>A]	[p.Met4938Ile]	missense	novel / conserved
17	likely	F	4 weeks	Struct.	DCM	+++	UV	3	S	TTN	2:179632598	533	121252	0,44	NM_133378	c.9359 G>A	p.Arg3120Gln	missense	rs72647894
							M?	4	S	TTN	2:179596901	NA	-	-	NM_133378	c.13063 C>A	p.Ala4355Ser	missense	novel / highly conserved
							UV	3	S	TTN	2:179567340	500	120680	0,41	NM_133378	c.26542 C>T	p.His8848Tyr	missense	rs72650011 - HGMD - ARVC ???
							UV	3	S	TTN	2:179404550	488	120648	0,40	NM_133378	c.90538 C>T	p.Arg30180Cys	missense	rs72648272
18	solved	M	9	hythm./Struct	PVT / ARVC / LQ	+++	M?	4	S	KCNJ2	17:68171391	NA	-	-	NM_000891	c.211 G>C	p.Asp71His	missense	novel / highly conserved (2 different mutations affecting same p. position in HGMD)
							-	1	H	DSG2	18:29104714	8291	120730	6,87	NM_001943	c.877 A>G	p.Ile293Val	missense	rs2230234 - HGMD - DM?
							M?	4	H	DSP	6:7569486	3	121410	0,00	NM_004415	c.1487 C>T	p.Thr496Met	missense	rs374283517 / highly conserved
							M?	4	H	JUP	17:39913991	NA	-	-	NM_002230	c.1819 C>A	p.Val607Leu	missense	novel / highly conserved
							UV	2	H	RYR2	1:237730059	853	120764	0,71	NM_001035	c.3407 C>T	p.Alal136Val	missense	rs72549415
19	unsolved	M	33	Rhythm.	BrS	++	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	solved	F?	7	Rhythm.	LQT	+++	M	5	H	KCNQ1	11:2591893	NA	-	-	NM_000218	c.513 C>A	p.Tyr171Ter	stop	Piippo (2001) J Am Coll Cardiol 37, 562
							M	5	H	SCN5A	3:38674747	39	119630	0,03	NM_198056	c.52 C>T	p.Arg18Trp	missense	Tester (2005) Heart Rhythm 6, 1297
							UV	3	S	CACNA1C	12:2595418	7	119398	0,01	NM_000719	c.906 G>A	p.Glu302=	ilent - splice	rs367860917 / base not conserved
							UV	3	S	KCNJ2	17:68171597	4	121412	0,00	NM_000891	c.417 C>A	p.Thr139=	ilent - splice	novel / base not conserved
21	solved	M	21	Struct.	ARVC / DCM	+++	M	5	H	DSG2	18:29099830	1	120680	0,00	NM_001943	c.146 G>A	p.Arg49His	missense	rs121913006 - Awad (2006) Am J Hum Genet
							-	1	H	DSG2	18:29104714	8291	120730	6,87	NM_001943	c.877 A>G	p.Ile293Val	missense	rs2230234 - HGMD - DM?
							M?	4	H	PKP2	12:32994074	18	121218	0,01	NM_004572	c.1576 T>C	p.Thr526Ala	missense	novel / conserved (1 different mutations affecting same p. position in HGMD)
22	solved	M	16	Struct.	ARVC	+++	M	5	H	PKP2	12:33003699	NA	-	-	NM_004572	c.1378+1 C>G	-	splice	Fressart (2010) Europace
23	likely	F	12	hythm./Struct	LQT / ARVC	++	M?	4	S	ANK2	4:114276002	45	121154	0,04	NM_001148	c.6228 G>T	p.Lys2076Asn	missense	rs144848998 / conserved
24	unsolved	F	12	Rhythm.	LQT	++	UV	3	H	SCN5A	3:38645378	519	120592	0,43	NM_198056	c.1715 C>A	p.Ala572Asp	missense	rs36210423 - Paulussen (2003) Genet Test 7:57
25	unsolved	M	30	Struct.	HCM	++	UV	3	S	TTN	2:179462345	221	120008	0,18	NM_133378	c.49760 G>A	p.Arg16587Lys	missense	rs72646833
							UV	2	S	TTN	2:179424558	1068	119708	0,89	NM_133378	c.78597 G>A	p.Lys26199=	ilent - splice	rs56310931
							UV	2	S	TTN	2:179395874	1072	120766	0,89	NM_133378	c.97764 G>A	p.Pro32588=	ilent - splice	rs55806007
							UV	3	S	TTN	2:179616207	60	121112	0,05	[NM_133379]	c.10920 T>C	p.Ser3640=	ilent - splice	rs142585268

26	solved	M	74	Struct.	HCM	+++	M	5	H	MYBPC3	11:47369975	3	76868	0,00	NM_000256	c.772 G>A	p.Glu258Lys	missense	rs397516074 - Niimura (1998) N Engl J Med 338: 1248, Vignier (2009) Circ Res 105: 239
							UV	3	S	TTN	2:179586756	244	120418	0,20	NM_133378	c.18902 G>A	p.Arg6301Gln	missense	rs72648969
27	likely	M	10 months	Struct.	DCM	+++	UV	3	S	VCL	10:75863580	308	121398	0,25	NM_014000	c.2025 G>A	p.Val675=	ilent - splice	rs140766884
							M?	4	S	TTN	2:179602869	NA	-	-	NM_133378	c.10579 T>C	p.Thr3527Ala	missense	novel / conserved
28	solved	M	36	nythm./Struct	HCM / LQT	++ / ++	M	5	H	KCNQ1	11:2591915	NA	-	-	NM_000218	c.535 G>A	p.Gly179Ser	missense	rs199473394 - HGMD:DM Splawski (2000) Circulation 102, 1178
							UV	3	S	TTN	2:179413657	21	120670	0,02	NM_133378	c.84992 T>C	p.Ile28331Thr	missense	rs373727636
							M?	4	S	TTN	2:179424124	16	120650	0,01	NM_133378	c.79028_79030 delCTT343	Gly26344del	deletion	rare / conserved
29	likely	M	48	Struct.	HCM	++	UV	3	S	TTN	2:179433654	100	120660	0,08	NM_133378	c.69501 G>A	p.Val23167=	ilent - splice	rs55857909
							M?	4	S	TTN	2:179547469	2	120722	0,00	NM_133378	c.29317 G>A	p.Glu9773Lys	missense	rare / highly conserved
30	likely	M	62	Struct.	HCM	++	M?	4	H	MYH7	14:23885294	2	121410	0,00	NM_000257	c.4872 G>T	p.Glu1624Asp	missense	rare / highly conserved
							UV	3	S	TTN	2:179523008	NA	-	-	NM_001267550	[c.37702 G>A]	p.Alal2568Thr	missense	novel / weak conservation
31	unsolved	F	49	Struct.	ARVC	+++	UV	3	H	PKP2	12:33031440	NA	-	-	NM_001005242	c.374 G>A	p.Arg125Lys	missense	novel / weak conservation
							-	1	H	DSG2	18:29104714	8291	120730	6,87	NM_001943	c.877 A>G	p.Ile293Val	missense	rs2230234 - HGMD - DM?
32	solved	M	43	Struct.	HCM	+++	M	5	H	MYBPC3	11:47369975	3	76868	0,00	NM_000256	c.772 G>A	p.Glu258Lys	missense	rs397516074 - Niimura (1998) N Engl J Med 338: 1248, Vignier (2009) Circ Res 105: 239
							-	1	H	TNNT2	1:201330429	6159	121398	5,07	NM_001001432	c.740 A>G	p.Lys247Arg	missense	HGMD:DM HCM / dbSNP Benign Garcia-Castro (2003) Clin Chem 49, 1279
							UV	3	S	TTN	2:179613179	235	119822	0,20	[NM_133379]	[c.13948 C>T]	[p.Pro4650Ser]	missense	rs149748934
33	solved	F	41	Struct.	DCM	+++	M	5	H	LMNA	1:156105812	NA	-	-	NM_005572	c.1057 C>A	p.Gln353Lys	missense	rs267607623 - HGMD: DM DCM Gupta (2010) Basic Res Cardiol 105, 365
							M?	4	S	DMD	X:32404551	NA	-	-	NM_004006	c.4550 C>T	p.Ser1517Phe	missense	novel / highly conserved
							UV	3	S	EYA4	6:133783796	NA	-	-	NM_172103	c.618 T>C	p.Ser206=	ilent - splice	novel / base not conserved
34	unsolved	F	55	Struct.	ARVC	++	UV	3	S	TTN	2:179478846	4	119304	0,00	NM_133378	c.41577 A>G	p.Alal3859=	ilent - splice	rare / base not conserved
							UV	2	H	DSG2	18:29122618	6263	120764	5,19	NM_001943	c.2137 G>A	p.Glu713Lys	missense	rs79241126 - HGMD: DM? Basso (2006) Eur Heart J
35	solved	M	47	Struct.	HCM	++	M	5	H	MYBPC3	11:47369975	3	76868	0,00	NM_000256	c.772 G>A	p.Glu258Lys	missense	rs397516074 - Niimura (1998) N Engl J Med 338: 1248, Vignier (2009) Circ Res 105: 239
							UV	3	S	TTN	2:179588272	134	119182	0,00	NM_133378	c.17823 C>A	p.Ile5941=	ilent - splice	rs201155967
							UV	3	S	TTN	2:179415701	104	112462	0,00	NM_133378	c.83856 A>G	p.Asp27952=	ilent - splice	rs202185465
36	solved	M	16	Rhythm.	LQT	+++	UV	3	S	TTN	2:179428168	90	120490	0,00	NM_133378	c.74987 G >A	p.Alal24996Val	missense	rs55634791
							M?	4	H	KCNQ1	11:2594127	NA	-	-	NM_000218	c.832T>G	p.Tyr278Asp	missense	rs199472731 - novel (1 different mutations affecting same p. position in HGMD)
							UV	3	H	SCN5A	3:38603996	94	116968	0,08	NM_000335	c.3870G>A	p.Leul290=	ilent - splice	rs41313033
							UV	3	S	KCNE1	21:35821849	438	120954	0,36	NM_000219	c.84 C>T	p.Ser28=	ilent - splice	rs17173510

37	unsolved	M	59	Struct.	DCM	++	UV	3	H	MYBPC3	11:47367871	509	92442	0,55	NM_000256	c.977G>A	p.Arg326Gln	missense	rs34580776
							UV	2	S	DSG2	18:29122618	6263	120764	5,19	NM_001943	c.2137 G>A	p.Glu713Lys	missense	rs79241126 - HGMD: DM? Basso (2006) Eur Heart J 27, 1847
							UV	3	S	TNNC1	3:52486792	NA	-	-	NM_003280	c.25-263 G>A	-	splice?	novel ? / base not conserved
38	unsolved	M	7	Rhythm.	LQT	++	UV	3	H	SCN5A	3:38592925	1	121412	0,00	NM_198056	c.4941 G>A	p.Leu1647=	ilent - splice	rare / base not conserved
39	likely	M	38	Rhythm.	BrS	+++	M?	4	S	SCN1B	19:35523473	NA	-	-	NM_001037	c.82 A>G	p.Thr28Ala	missense	rs376848705 - Thr28Ile c.83C>T p.T28I DM Epilepsy, idiopathic Klassen (2011) Cell 145, 1036
							UV	3	S	ABCC9	12:22015964	42	120288	0,03	NM_005691	c.2262 T>C	p.Tyr754=	ilent - splice	rs145561881
40	likely	M	55	Struct.	DCM / ARVC	++	M?	4	S	SYNE1	6:152638089	1	121102	0,00	NM_033071	c.16392 G>A	p.Met5464Ile	missense	rs371674670 / highly conserved
							-	1	H	DSG2	18:29104714	8291	120730	6,87	NM_001943	c.877 A>G	p.Ile293Val	missense	rs2230234 - HGMD - DM?
							M?	4	S	MYH6	14:23858227	2	119822	0,00	NM_002471	c.4016 C>T	p.Arg1339Gln	missense	rare / highly conserved
							UV	3	S	LDB3	10:88476505	66	90780	0,07	NM_001080114	c.1323 C>T	p.Cys441=	ilent - splice	rs45581435
41	likely	M	35	Struct.	HCM	++	UV	4	S	TTN	2:179408197	1	119870	0,00	NM_133378	c.88793 C>T	p.Gly29598Glu	missense	rare / highly conserved
							M?	4	S	TTN	2:179421844	1	118608	0,00	NM_133378	c.80333 A>T	p.Asp26778Val	missense	rs374741129 / highly conserved
							UV	3	S	TTN	2:179611825	24	120396	0,02	[NM_133379]	[c.15302 A>G]	[p.Glu5101Gly]	missense	rs142973956
42	unsolved	M	33	Rhythm.	IVFA	+	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	likely	M	8 months	Rhythm..	LQT	+++	M?	4	S	CALM2	2:47389664	NA	-	-	NM_001743	c.172 G>C	p.Ala58Pro	missense	novel, highly conserved
44	unsolved	M	37	Rhythm.	SUDS	++	UV	2	H	SCN5A	3:38601665	924	105014	0,88	NM_198056	c.4218 G>A	p.Gly1406=	ilent - splice	rs41311123
45	unsolved	M	37	Rhythm.	BrS	NA	UV	3	S	ABCC9	12:22005422	431	121036	0,36	NM_005691	c.2523 C>T	p.Ala841=	ilent - splice	rs386471932
46	solved	M	43	Struct.	HCM	+++	M	5	H	MYBPC3	11:47369407	1	23204	0,00	NM_000256	c.821+1 G>A	-	splice	Nimura (1998) N Engl J Med 338: 248
47	unsolved	M	10	Rhythm.	LQT	NA	UV	3	-	CACNA1C	12:2690927	23	117946	0,02	NM_000719	c.2067 C>T	p.Phe689=	ilent - splice	rs112170830
48	unsolved	M	14	Rhythm.	LQT	NA	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	likely	F	22	Struct.	HCM	+++	M?	4	H	MYBPC3	11:47359095	NA	-	-	NM_000256	c.2449 C>T	p.Arg817Trp	missense	novel / highly conserved
							M?	4	S	ABCC9	12:22070007	3	121338	0,00	NM_005691	c.437 T>A	p.Ile146Asn	missense	rs149325742 - conserved
							UV	3	S	TTN	2:179428049	48	120470	0,04	NM_133378	c.75106G>A	p.Gly25036Ser	missense	rs199929362
							UV	3	S	TTN	2:179584889	1	120502	0,00	NM_133378	c.19748T>C	p.Val6583Ala	missense	novel / conserved
							-	1	S	DSG2	18:29104714	8291	120730	6,87	NM_001943	c.877 A>G	p.Ile293Val	missense	rs2230234 - HGMD - DM?
							UV	3	S	DSP	6:7542000	NA	-	-	NM_004415	c.-149C>G	-	regulatory?	novel? / base conserved in mammals
							UV	3	S	SYNE1	6:152658141	- ?	-	-	NM_033071	c.12149_12150 delTCinsCA	p.Lys4050Ser	missense	comb. of 2 SNPs
							UV	3	S	SYNE1	6:152746682	342	121226	0,28	NM_033071	c.5122 G>T	p.Ala1708Ser	missense	rs149758808
							UV	3	S	SYNE1	6:152804316	1	121396	0,00	NM_033071	c.1275 G>C	p.Leu425=	ilent - splice	rare / base not conserved
							UV	3	S	SYNE2	14:64498017	186	119952	0,16	NM_182914	c.7163 A>G	p.Glu2388Gly	missense	rs45590135
51	unsolved	M	23	Rhythm.	SUDS	++	UV	3	H	RYR2	1:237863718	6	116000	0,01	NM_001035	c.9318 T>A	p.Ser3106=	ilent - splice	rare / base not conserved
							UV	2	H	MYH7	14:23886409	906	121412	0,75	NM_000257	c.4472 C>G	p.Ser1491Cys	missense	rs3729823 - HGMD:DM? HCM Zeller (2006) J Mol Med 84, 682
							UV	3	S	VCL	10:75877786	1	121344	0,00	NM_014000	c.3264 A>G	p.Thr1088=	ilent - splice	rare / base not conserved
52	likely	?	58	Struct.	HCM	++	M?	4	S	ACTN2	1:236917313	2	120946	0,00	NM_001103	c.1906 G>A	p.Glu636Lys	missense	rare / highly conserved

53	likely	M	62	Struct.	HCM	+++	UV	3	S	MYH6	14:23857430	212	121406	0,17	NM_002471	c.4293 G>A	p.Met1431Ile	missense	rs201016285
							UV	3	S	VCL	10:75871722	1472	121310	1,21	NM_014000	c.2801 C>T	p.Ala934Val	missense	rs16931179 - HGMD: DM? dbSNP: benign
							UV	3	S	TTN	2:179395298	5	120696	0,00	NM_133378	c.98340 C>A	p.Asn32780Lys	missense	rs145560044 / conserved
							M?	4	S	TTN	2:179430142	1	120544	0,00	NM_133378	c.73013 G>A	p.Arg24338Gln	missense	rs536183519 / highly conserved
							M?	4	S	TTN	2:179453673	1	117678	0,00	NM_133378	c.55075 C>T	p.Arg18359Cys	missense	rare / highly conserved
							UV	3	S	TTN	2:179578766	5	119530	0,00	NM_133378	c.22887 C>A	p.Asp7629Glu	missense	rare / conserved
54	unsolved	F	55	Struct.	ARVC	+++	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	solved	F		Rhythm.	LQT	NA	M	5	H	KCNH2	7:150644528	NA	-	-	NM_000238	c.3040 C>T	p.Arg1014Ter	stop	HGMD:DM Splawski (2000) Circulation 102, 1178
							M?	4	S	ANK2	4:114286207	332	121274	0,27	NM_001148	c.10901 T>A	p.Val3634Asp	missense	rs66785829 - HGMD: DM Cardiac arrhythmia Mohler (2007) Circulation 115: 432
							UV	3	S	CACNA1C	12:2797746	431	119912	0,36	NM_000719	c.5918 G>A	p.Arg1973Gln	missense	rs112414325 - uncertain sign.
56	unsolved	M	51	Struct.	HCM	++	UV	3	S	CTF1	16:30913865	6	10934	0,05	NM_001330	c.*5 C>A	-	regulatory?	rs397516644
							UV	2	S	TTN	2:179406044	84	22462	0,37	NM_133378	c.90056 G>A	p.Arg30019His	missense	rs55704830
57	solved	M	6	Struct.	HCM	++	M?	4	H	MYBPC3	11:47363546	7	26698	0,03	NM_000256	c.1786 G>A	p.Gly596Arg	missense	rs199728019 - highly conserved, adjacent mutation
							M?	4	S	TCAP	17:37822174	2260	115404	1,96	NM_003673	c.316 C>T	p.Arg106Cys	missense	rs45578741 - HGMD: DM - aber eher nichts
							UV	3	S	TTN	2:179497691	9	120438	0,01	NM_133378	c.35463 C>T	p.Ser11821=	silent - splice	rs375780439
							M?	4	S	TTN	2:179536822	NA	-	-	NM_133378	c.31200 A>T	p.Glu10400Asp	missense	novel / highly conserved
							UV	3	S	TTN	2:179595442	21	119936	0,02	NM_133378	c.14086 T>C	p.Cys4696Arg	missense	rs374882815
58	likely	M	55	Struct.	HCM	++	UV	3	H	MYH7					NM_000257	c.3337-3 dubC	-	splice?	
							M?	4	S	LDB3	10:88446830	549	120546	0,46	NM_001080116	c.349 G>A	p.Asp117Asn	missense	rs121908338 - HGMD: DM - DCM Vatta (2003) J Am Coll Cardiol 42: 2014 PubMed: 14662268
							M?	4	S	TTN	2:179475987	NA	118928	-	NM_133378	c.43165 A>T	p.Ile14389Phe	missense	novel / highly conserved / other change: rs372013419
59	solved	M?	14	Rhythm.	CPVT	NA	M?	4	H	RYR2	1:237551435	NA	-	-	NM_001035.2	c.725 A>G	p.Asp242Gly	missense	novel, known mutation at same pos. (HGMD:c.725A>T p.D242V; DM CPVT Hayashi (2009) Circulation 119, 2426)
							M?	4	H	RYR2	1:237813291	NA	-	-	NM_001035.2	c.7627 T>C	p.Ser2543Pro	missense	novel / conserved
							UV	3	H	RYR2	1:237875040	55	57822	0,10	NM_001035.2	c.10231-5 C>T	-	splice?	rs186326951

60	solved	F	72	Struct.	HCM	++	M?	4	H	MYBPC3	11:47354770	NA	-	-	NM_000256	c.3305 T>G	p.Val1102Gly	missense	novel / highly conserved
							M	[5]	S	CTF1	16:30913528	NA	-	-	NM_001330	c.274 G>A	p.Ala92Thr	missense	rs2234933 - HGMD:DM DCM - Erdmann (2000) Hum Mutat 16, 448
61	likely	M	47	Struct.	HCM	+++	M?	4	H	TPM1	15:63336013	NA	-	-	NM_001018007	[c.223 G>C]	[p.Glu75Gln]	missense	alt. Isoform / conserved
							UV	3	S	TTN	2:179430996	44	120708	0,04	NM_133378	c.72159 G>A	p.Thr24053=	ilent - splice	rs186402008
							UV	3	S	TTN	2:179472292	NA ?	120548	-	NM_133378	15418_45418 delAAins	p.Lys15140Val	indel	comb. of 2 SNPs
							UV	3	S	TTN	2:179588279	42	119164	0,04	NM_133378	c.17816 G>A	p.Cys5939Tyr	missense	rs189951108
							UV	3	S	TTN	2:179595389	28	120490	0,02	NM_133378	c.14139 A>T	p.Gln4713His	missense	rs181067357
62	likely	M	51	Struct.	ARVC	+++	M?	4	H	PKP2	12:33031360	NA	-	-	NM_004572	c.454 C>T	p.Pro152Ser	missense	novel / highly conserved
63	unsolved	M	65	Struct.	Amyloidosis	+++	-												
64	unsolved	M		Rhythm.	BrS		-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	likely	M		Struct.	ARVC		M?	4	S	CTNNA3	10:68535275	NA	-	-	NM_013266	c.1055 T>A	p.Lys352Ile	missense	novel / conserved
66	likely	F		Rhythm.	LQT		M?	3	S	AKAP9	7:91726527	105	119148	0,09	NM_005751.4	c.10254G>C	p.Gln3418His	missense	rare / highly conserved
							M?	4	H	MYBPC3	11:47359119	NA	-	-	NM_000256.3	c.2425G>C	p.Glu809Gln	missense	novel / conserved (adjacent mutations)
							UV	3	S	FHL1	X:135290127				NM_001449.4	c.501+7T>G	-	splice?	
							UV	3	S	TTN	2:179590708				NM_133378.4	c.16609G>A	p.Glu5537Lys	missense	rs72648958
							UV	3	S	TTN	2:179542499				NM_133378.4	c.30408A>G	p.Glu10136=	ilent - splice	rs147418835
							UV	3	S	TTN					NM_133378.4	0408insGGAAGAGGAAAGTTCTACCTGA		insertion	rs397517548
							UV	3	S	TTN	2:179429936				NM_133378.4	c.73219C>T	p.Pro24407Ser	missense	novel /
							UV	3	S	TTN	2:179411212				NM_133378.4	c.87142C>T	p.Leu29048=	ilent - splice	rs72648255
68	likely	F		Rhythm.	SUDS		M?	4	S	HCN4	15:73615786	892	101748	0,88	NM_005477.2	c.2648C>G	p.Pro883Arg	missense	rs148398509 - HGMD: DM Sinus bradycardia & myocardial noncompaction Schmittner (2014) J Am Coll Cardiol
							UV	3	H	SCN5A	3:38645412	247	120546	0,20	NM_198056.2	c.1681C>T	p.Leu561=	ilent - splice	rs45522138

Daneben konnten zahlreiche Sequenzveränderungen (>75) nachgewiesen werden, deren klinische Wertigkeit derzeit nicht exakt eingestuft werden kann. Bei diesen Veränderungen wird formal von sogenannten unklassifizierten Varianten (UV's) gesprochen. Einen weiteren Aufschluss hinsichtlich der klinischen Relevanz können in diesem Zusammenhang unter Umständen Segregationsanalysen (die Untersuchung weiterer betroffener bzw. nicht-betroffener Familienmitglieder) bzw. weiterführende funktionelle Analyse (z.B. mRNA-Analysen) bieten. Um einen klar nachzuvollziehenden Vergleich zu ermöglichen, wurden alle Sequenzveränderungen entsprechend Thompson et al. bzw. Richards et al. unterteilt (56,57). Abbildung 35 stellt eine Auflistung der Gene dar, in welchen Varianten gefunden wurden.

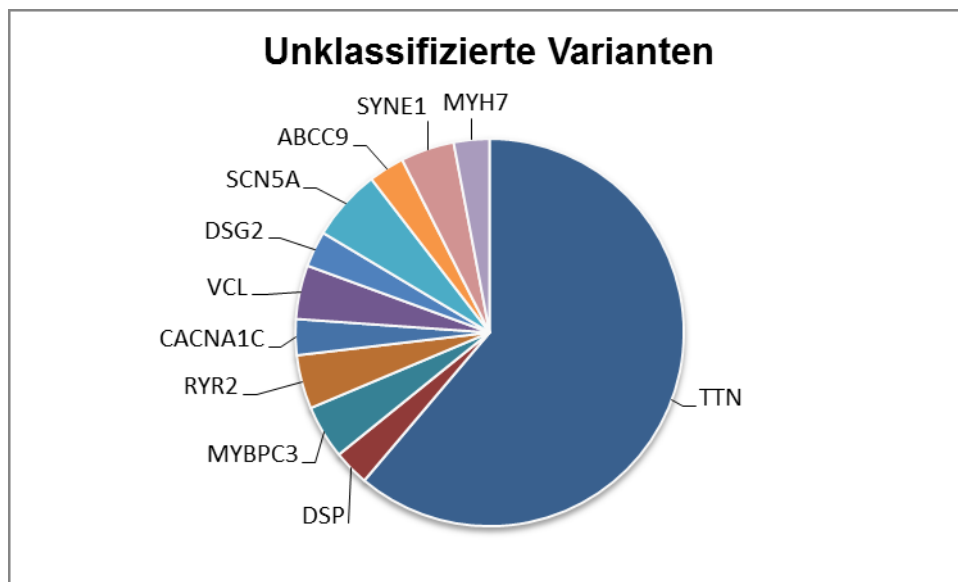


Abbildung 35: Spektrum, in welchem UV's nachgewiesen wurden

3.3. Ausgewählte Fallbezogene Resultate

Fall A Long-QT-Syndrom

Klinik:

Der 17jährige Patient musste sich aufgrund seiner Tätigkeit im Leistungssport (Volleyball), einer sportärztlichen Untersuchung unterziehen. Diese erfolgte an der Kinderklinik Graz und erbrachte erstmals den Verdacht auf das Vorliegen eines LQT-Syndroms.

EKG-Befunde:

Ruhe-EKG: QTc-Zeit von 0,44 – 0,47

24-h-EKG: gering verlängerte Zeiten (siehe Ruhe-EKG) auch hier nachweisbar

Ergometrie: QTc unter Belastung 0,48 – 0,5
in Erholung rückläufig auf 0,46 – 0,48

Patient bisher beschwerdefrei, keine kardiale Anamnese, uneingeschränkte Leistungsfähigkeit.

Zuweisung zur humangenetischen Untersuchung zur weiteren Verifizierung der klinischen Verdachtsdiagnose.

Stammbaumanalyse:

Bruder, 12 Jahre: beschwerdefrei, keine klinische Manifestation

Vater, 51 Jahre: keine kardiale Anamnese, selbst im Leistungssport tätig

Mutter, 51 Jahre: entsprechend eigener Angaben wohl grenzwertige QTc-Zeit bekannt, zum Zeitpunkt der Erstvorstellung kein aktuelles EKG vorliegend, ehemals Leistungssport betrieben

Väterliche Linie: keine Fälle von plötzlichen Herztod bzw. kardiale Erkrankungen zu erheben

Mütterliche Linie: keine Fälle von plötzlichen Herztod bzw. kardiale Erkrankungen zu erheben

Molekulargenetische Ergebnisse:

Indikationsspezifische Analyse bei Verdacht auf ein LQT-Syndrom (13 Gene)

Identifizierte Sequenzvarianten:

- KCNQ1 c.832T>G, heterozygot, p.Tyr278Asp
Diese Veränderung führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz des Genproduktes. Sie wurde in der Literatur bzw. den internationalen Datenbanken (HGMD, ExAC, dbSNP, ESP) bisher nicht beschrieben. Allerdings wurde an der gleichen Position eine andere Veränderung (c.832T>G, p.Y278H) bereits als krankheitsverursachend für ein LQT-Syndrom gelistet (59).
Damit kann molekulargenetisch die Verdachtsdiagnose mit hoher Wahrscheinlichkeit gesichert werden. Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 4.
- SCN5A c.3870G>A, heterozygot, p.Leu1290=
Diese Variante verändert die Aminosäuresequenz nicht, allerdings ist sie nur in sehr geringer Frequenz (0,2 %) in den entsprechenden Datenbanken gelistet. Ein Einfluss auf das Splicing kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 3.
- KCNE1 c.84C>T, heterozygot, p.Ser28=
Diese Variante verändert die Aminosäuresequenz nicht, allerdings ist sie nur in sehr geringer Frequenz (0,5 %) in den entsprechenden Datenbanken gelistet. Ein Einfluss auf das Splicing kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 3.

Segregationsanalyse:

Beim Indexpatienten konnten de novo Mutationen ausgeschlossen werden.

Die Variante im KCNQ1-Gen und die Veränderung im KCNE1-Gen konnten auch bei der Mutter nachgewiesen werden. Die Sequenzveränderung im SCN5A-Gen stammt vom Vater.

Therapeutische Konsequenzen:

Mit den molekulargenetischen Ergebnissen, welche mit den klinischen Befunden (verlängerte QTc-Zeit, veränderte T-Wellen Morphologie → Schwartz-Score 3-4) eine hohe Korrelation aufweisen, muss vom Vorliegen eines LQT-Syndroms ausgegangen werden. Dem Patienten wurde die Einnahme eines Betablockers (Inderal 2 x 40 mg) verordnet, ferner musste eine Kontraindikation hinsichtlich des Leistungssportes ausgestellt werden. Zudem sollte die Einnahme QT-verlängernder Medikamente vermieden werden. Dies führte zu einem Schulwechsel, womit der angedachte Beruf des Leistungssportlers nicht mehr angestrebt werden kann. Damit stellt die klinische und molekulargenetische Befundung eine gravierende Veränderung im Leben des Ratsuchenden dar.

Humangenetische Beratungssituation:

Hierbei handelte es sich um eine sehr komplexe Situation mit weitreichenden Konsequenzen, weswegen wiederholte Beratungsgespräche erfolgten. Die Eltern des Patienten waren sehr aufgeklärt und auch interessiert, dennoch viel es Ihnen schwer, die Interpretation der Daten zu akzeptieren. In diesem Fall war es durch das Fehlen evidenter Literatur nicht möglich, eine der nachgewiesenen Veränderungen eindeutig als pathogen (Klasse 5) einzustufen. Dennoch sprechen die vorliegenden Ergebnisse in Zusammenschau mit der Klinik für die Bestätigung der Verdachtsdiagnose, explizit eines LQT Syndrom Typ 1. Insbesondere die Mutter suchte nach anderen Erklärungen für die klinische Manifestation der QTc-Verlängerung wie beispielsweise eine Medikamenteneinnahme. Zudem kam erschwerend hinzu, dass die hochverdächtige Variante im KCNQ1-Gen auch bei der Mutter nachweisbar war, welche, ihren Angaben entsprechend, bisher kaum – keine Symptomatik aufweise. Doch gerade beim LQT-Syndrom sind ausgeprägte Penetranzschwankungen bekannt, hierauf wird im Rahmen der Diskussion noch weiter eingegangen. Ferner kann nicht beurteilt werden, inwiefern das Zusammentreffen mehrerer Varianten den Schweregrad des Phänotyps beeinflusst. Da aufgrund dieses Befundes, auch nach Rücksprache mit Kollegen im deutschsprachigen Raum, von klinischer Seite ein Attest zur weiteren Teilnahme an Bewerbungen nicht ausgestellt werden konnte, kritisierten

die Eltern wiederholt den juristischen Standpunkt der Kliniker – „es wolle lediglich niemand die Verantwortung übernehmen“.

Damit ist ein Beispiel vorliegend, welches auch bei umfassender Aufklärung die Komplexität unklassifizierter Varianten widerspiegelt.

Fall B

Andersen-Tawil-Syndrom

Klinik:

Dieser Patient wurde erstmals im Alter von drei Jahren an der Endokrinologie der Kinderklinik Graz aufgrund einer Wachstumsverzögerung vorgestellt. Im Rahmen eines Kontrolltermins wurden 2013 EKG-Veränderungen (arrhythmische Herzaktion) identifiziert, worauf eine Zuweisung an die Kinderkardiologie erfolgte.

Hierbei wurden folgende Befunde erhoben:

Selbstlimitierende, nicht anhaltende polymorphe VT's, ventrikuläre Extrasystolen (Bigeminus, Trigeminus, Couplets), QTc-Zeit zwischen 413 – 442 msec.

Umfassende neuropädiatrische Untersuchung erbrachte nachfolgende Besonderheiten:

Minderwuchs, geringer Mikrocephalus, tiefsitzende Ohren, breite Nasenwurzel, Syndaktylie Zehe II – III bds., Klinodaktylie, geringer Hypertelorismus

Die durchgeführten kardialen Untersuchungen erbrachten den Verdacht auf das Vorliegen einer CPVT bzw. einer ARVC, weswegen eine molekulargenetische Untersuchung hinsichtlich dieser Indikationen initiiert wurde. Um die Rhythmusstörungen zu kontrollieren wurde Seloken und Aristocor verschrieben.

Stammbaumanalyse:

Bruder, 5 Jahre: beschwerdefrei, keine entspr. Anamnese

Mutter, 36 Jahre: beschwerdefrei, keine phänotypischen Auffälligkeiten

Vater, 40 Jahre: nach Angaben der Mutter gesund

Mütterliche Linie: Vater sei im Alter von 54 Jahren am plötzlichen Herztod verstorben.

Die Tochter einer Cousine väterlicherseits weist ähnliche Auffälligkeiten (Minderwuchs etc.) auf, molekulargenetische Untersuchung

hinsichtlich verschiedener Syndrome hätten bisher unauffällige Befunde erbracht. Weiterführende Informationen konnten nicht erhoben werden.

Väterliche Linie: keine Fälle von plötzlichen Herztod bzw. kardiale Erkrankungen zu erheben

Molekulargenetische Ergebnisse:

Indikationsspezifische Analyse bei Verdacht auf ein CPVT (3 Gene) bzw. ARVC (8 Gene)

Identifizierte Sequenzvarianten:

- KCNJ2 c.211G>C, heterozygot, p.Asp71His
Diese Veränderung führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz des Genproduktes. In der Mutationsdatenbank HGMD werden an der gleichen Aminosäureposition bereits zwei andere Veränderungen (p.Asp71Asn und p.Asp71Tyr) als krankheitsverursachend für das autosomal-dominant vererbte Andersen-Tawil Syndrom beschrieben. Damit kann molekulargenetisch mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Andersen-Tawil Syndrom bestätigt werden. Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 4.
- RyR2 c.3407C>T, heterozygot, p.Ala1136Val
Diese Veränderung führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz und wird in den Frequenzdatenbanken (ESP, dbSNP) mit sehr niedriger Allelfrequenz gelistet (< 0,4 %). Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 2.
- DSG2 c.877A>G, heterozygot, p.Ile293Val
Diese Veränderung wird in der Mutationsdatenbank HGMD als krankheitsverursachend für CPVT gelistet. Sie liegt jedoch in der Allgemeinbevölkerung bei etwa 16 % vor, was gegen eine hohe Krankheitsrelevanz spricht. Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 1.
- DSP c.1487C>T, heterozygot, p.Thr496Met
Diese Veränderung führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz und wird in den Frequenzdatenbanken (ESP, dbSNP) mit sehr niedriger

Allelfrequenz gelistet (< 0,1 %). Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 3.

- JUP c.1819C>A, heterozygot, p.Val607Leu

Diese Veränderung führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz und wird in den Frequenzdatenbanken wurde diese Veränderung bisher nicht beschrieben, sodass von einer sehr seltenen Variante auszugehen ist. Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 3.

Segregationsanalysen:

Die Veränderung im KCNJ2-Gen stellt eine de novo Mutation dar. Hingegen konnten die Sequenzvarianten im DSP-, DSG2-, JUP- und RyR2-Gen bei der Mutter des Indexpatienten nachgewiesen werden. Die Veränderung im DSG2-Gen fand sich ebenso beim Vater.

Therapeutische Konsequenzen:

Mit dem genetischen Ergebnis konnten nun die vorliegenden klinischen Symptome einer Diagnose zugeordnet werden. Nicht nur die kardialen, auch die phänotypischen Auffälligkeiten sind mit dem Bild eines Andersen-Tawil Syndroms in Einklang zu bringen (60). Um eine fundierte Risikoeinschätzung zu ermöglichen wurden weitere Untersuchung beispielsweise die Kaliumbestimmung im 24-h-Stunden Harn bzw. ein Long-Exercise-Test initiiert. Hierbei konnten unauffällige Ergebnisse erhoben werden. Aufgrund des Befundes erfolgte eine Umstellung der medikamentösen Therapie auf Flecainid 2 x 50 mg und Metoprolol ret. 2 x 23,75 mg. Der Patient sprach sehr gut auf die neue Therapie an. Die zuvor angedachte ICD-Implantation aufgrund der malignen Rhythmusstörungen steht derzeit nicht mehr im Raum. Ferner wurde mit der Mutter besprochen, auf eine Kaliumreiche Ernährung zu achten. Sollte der Kaliumwert < 3 mmol/l absinken, sollte Kalium oral substituiert werden. Zudem besteht eine Kontraindikation für die Verschreibung von Diuretika die einen Kaliumverlust nach sich ziehen. Außerdem sollte auf Leistungssport verzichtet werden.

Humangenetische Beratungssituation:

Die Mutter war sehr an einer Klärung der Symptomatik ihres Sohnes interessiert und dementsprechend einer molekulargenetischen Analyse aufgeschlossen. Da in ihrer Familie ein weiteres Kind phänotypische Auffälligkeiten zeigt, war ihre Familie bereits mit der Humangenetik in Kontakt, womit die Zuständigkeit / Tätigkeit von Fachärzten für Medizinische Genetik bereits vertraut waren. Die Identifizierung der Mutation, welche für das Vorliegen eines Andersen-Tawil-Syndroms spricht, wurde von der Mutter als „positives Ergebnis“ aufgenommen. Sie argumentierte damit, dass die klinischen Auffälligkeiten ja ohnehin bestünden, nun könne ihrem Sohn gegebenenfalls besser geholfen werden. Dies hat sich in der klinischen Umsetzung bestätigt, da der Patient einen großen Benefit aus der Therapieumstellung gezogen hat. Das Vorliegen weiterer unklassifizierter Varianten wurde nach ausführlicher Aufklärung neutral aufgefasst, eine zusätzliche Verunsicherung sei nach Angaben der Mutter nicht eingetreten.

Fall C **Long-QT-Syndrom**

Klinik:

7-jähriger Patient wird aufgrund des Verdachtes einer IgA-Nephritis stationär (Klinikum Wels-Grießkirchen) aufgenommen. Er teilte den Kollegen mit, seit dem Vortag Schmerzen, als auch einen dunklen Harn zu haben. Eine vor einigen Tagen diagnostizierte Pharyngitis wurde durch den Hausarzt antibiotisch behandelt. Therapeutisch wurde erneut eine Antibiose mit Oспен eingeleitet. Im Rahmen des stationären Aufenthaltes wurde als Zusatzbefund einer verlängerte QTc-Zeit nachgewiesen (0,48 – 0,5). Zu Synkopen sei es bisher nicht gekommen, Palpitationen seien verspürt worden. Es folgte eine Zuweisung an eine kinder-kardiologische Abteilung in Linz, welche wiederum eine molekulargenetische Analyse veranlasste.

Stammbaumanalyse:

Nicht vorliegend, da lediglich eine Blutprobe zur molekulargenetischen Analyse versandt wurde.

Es erfolgte eine telefonische Kontaktaufnahme mit dem zuweisenden Kollegen, um möglicherweise relevante Informationen zur Familienanamnese zu erheben. Hierbei wurde mitgeteilt, dass wohl ein Onkel mütterlicherseits jung verstorben sei. Weiterführende Informationen konnten nicht erhoben werden.

Molekulargenetische Ergebnisse:

Indikationsspezifische Analyse bei Verdacht auf ein LQT-Syndrom (13 Gene)

Identifizierte Sequenzvarianten:

- KCNQ1 c.513C>A, heterozygot, p.Tyr171*

Diese Veränderung führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese (sog. Stopp-Mutation) und wurde bereits in der Literatur als krankheitsverursachend beschrieben (61). Damit kann der Verdacht auf das Vorliegen eines Long-QT-Syndroms Typ 1 molekulargenetisch bestätigt werden. Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 5.

- SCN5A c.52C>T, heterozygot, p.Arg18Trp
Diese Veränderung führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz des Genproduktes und wird in der Literatur ebenso bereits als krankheitsverursachend gelistet (62). Damit liegt molekulargenetisch zusätzlich eine Mutation vor, die dem Long-QT-Syndrom Typ 3 zuzuordnen ist. Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 5.
- CACNA1c c.906G>A, heterozygot, p.Glu302=
Es kommt zu keiner Veränderung des Genproduktes, allerdings liegt diese Variante in sehr geringer Allelfrequenz in den internationalen Datenbanken vor (< 0,1 %). Damit kann eine Krankheitsrelevanz nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 3.
- KCNJ2 c.417C>A, heterozygot, p.Thr139=
Es ist kein Einfluss auf die Aminosäuresequenz des Genproduktes gegeben, jedoch wurde diese Variante in den internationalen Datenbanken und der Literatur bisher nicht dokumentiert. Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 3.

Segregationsanalysen:

Eine Testung von weiteren Familienmitgliedern ist bisher nicht erfolgt. Die betreuenden Kollegen wurden jedoch bereits über die Relevanz einer Testung von Angehörigen ausführlich informiert.

Therapeutische Konsequenzen:

Nach telefonischer Rücksprache mit den betreuenden Kollegen wird derzeit versucht, eine adäquate Dosierung einer Betablocker-Therapie zu finden. Ferner wurde darauf hingewiesen keine QT-verlängernden Medikamente einzunehmen. Zudem musste ein Sportverbot (intensive körperliche Belastung) ausgesprochen werden. Die kardiologischen Kontrollen erfolgen derzeit in sehr engem Intervall.

Humangenetische Beratungssituation:

Ein humangenetisches Beratungsgespräch durch einen Arzt für Medizinische Genetik fand nicht statt. Die Aufklärung hinsichtlich des Stellenwertes, der Bedeutung und der Konsequenzen einer molekulargenetischen Untersuchung wurde durch den klinisch tätigen Kollegen (Facharzt für Innere Medizin, Kardiologie) übernommen. Dies ist im spezifischen Fachgebiet nach der aktuellen Gesetzeslage durchaus möglich.

Nach Fertigstellung der Befunde wurde der betreuende Kollege telefonisch über die besondere Situation des Vorliegens zweier pathogener Veränderungen informiert. Ferner wurde auf die Relevanz und Besonderheiten bei Testung von Familienmitgliedern hingewiesen (unbedingt Prüfung beider pathogenen Mutationen).

Fall D Hypertrophe Kardiomyopathie

Klinik:

Ein 79jähriger multimorbider Patient wurde bei dringendem Verdacht auf das Vorliegen einer Hypertrophen Kardiomyopathie von den kardiologischen Kollegen zugewiesen. Im Zuge der Eigenanamnese war eine IDC-Implantation bei synkopalen Kammertachykardien vor einigen Jahren zu erheben. Zudem war das Vorliegen einer Koronaren Herzerkrankung, einer proxymalen Vorhofflimmerarrhythmie, sowie eine Hepatitis C Infektion bekannt.

Stammbaumanalyse:

Sohn, 50 Jahre: den Informationen des Ratsuchenden entsprechend liege eine Herzerkrankung vor. Weiterführende Angaben konnten nicht erhoben werden.

Tochter, 49 Jahre: gesund

Sie habe drei Söhne im Alter zwischen 23 – 26 Jahren, das Vorliegen einer Muskelerkrankung wird vom Patienten vermutet

Bruder, 22 Jahre: im Krieg gefallen

Mutter, 81 Jahre: an den Folgen einer Herzschwäche verstorben

Vater, 57 Jahre: an einer Herzerkrankung verstorben

Molekulargenetische Ergebnisse:

Indikationsspezifische Analyse bei Verdacht auf ein HCM (37 Gene).

Identifizierte Sequenzvarianten:

- MYBPC3 c.565G>A, heterozygot, p.Val189Ile

Diese Variante führt zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz und wird in den Frequenzdatenbanken mit sehr niedriger Allelfrequenz (0,2 %) gelistet. Damit kann eine Krankheitsrelevanz nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 3.

- MYBPC3 c.1338C>G, heterozygot, p.Thr446=

Diese Veränderung nimmt keinen Einfluss auf die Aminosäureabfolge, allerdings wurde sie in der Literatur und den entsprechenden Datenbanken bisher nicht gelistet. Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 3.

Bei diesen beiden Veränderungen wäre es von Relevanz, inwiefern diese in cis bzw. in trans vorliegend sind.

- TTN c.22950G>A, heterozygot, p.Pro7650=

Es ist kein Einfluss auf die Aminosäuresequenz des Genproduktes gegeben, jedoch wurde diese Variante in den internationalen Datenbanken nur in niedriger Allelfrequenz (0,2 %) beschrieben. Die Veränderung entspricht in der Klassifizierung nach Thompson einer Variante Klasse 3.

Konsequenzen:

Leider ist der Patient vor Fertigstellung der Befunde an den Folgen seiner Grunderkrankungen verstorben. Derzeit war es noch nicht möglich Angehörige hinsichtlich des Befundes zu informieren. Dies stellt eine ethisch und moralisch sehr komplexe und schwierige Situation dar. Auf diesen Aspekt wird im Rahmen der Diskussion noch weiter eingegangen werden.

4. Diskussion

Mit der Technik des Next Generation Sequencings ist es nun auch möglich, komplexe und heterogene Erkrankungen, beispielsweise kardiale Krankheitsbilder, kosten- und zeiteffektiv zu untersuchen. Das bisherige traditionelle Vorgehen basierte darauf zunächst jene Gene hintereinander zu untersuchen, welche mit besonders hohen Frequenzzahlen beschrieben wurden. Konnte in diesen keine Veränderung nachgewiesen werden die den klinischen Phänotyp zu erklären vermochte, standen weiterführende Untersuchungen oft in keiner Kosten/Nutzen Relation. Das Next-Generation Sequencing ermöglicht es zahlreiche Gene gleichzeitig, mit deutlich geringerem Zeit- und Kostenaufwand zu analysieren. Somit können für gezielte Fragestellungen, wie hereditäre kardiale Erkrankungen, Guidelines entwickelt werden, die ein verbessertes klinisches Management und die adäquate Durchführung einer genetischen Testung gewährleisten.

Die Untersuchung kardiologischer Erkrankungen auf molekulargenetischer Ebene in dem in der vorliegenden Arbeit präsentierten Umfang, kann derzeit in Österreich lediglich am Standort Graz, am Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz, durchgeführt werden. Damit stellt die Etablierung der Kardiogenetik ein Alleinstellungsmerkmal dar, welches nicht nur im Bereich der Forschung, sondern auch im diagnostischen Setting einen bedeutenden Stellenwert einnimmt. Sie bietet eine relevante Untersuchungstechnik, die deutlich zur Verbesserung der österreichischen Patientenversorgung beiträgt.

Die umfassend vorgenommene Etablierung zeigt nicht nur die Qualität und auch Grenzen der evaluierten Untersuchungsmethode. Im Zuge dieser Überlegungen kristallisierte sich ein Workflow heraus, der zudem in zahlreichen Fragestellungen Einfluss auf das klinische Vorgehen nimmt. Wie bereits mehrfach geschildert, werden international im Bereich der Diagnostik breite Sequenzieransätze, beispielsweise das Whole Exome Sequencing, nur mit einigen Vorbehalten angewandt. Typischerweise werden eher, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, Paneluntersuchungen herangezogen. Im Zuge der zeitaufwendigen Etablierungsphase konnte eine SOP erstellt werden, die ein strukturiertes Bearbeiten von Proben auf hohem Qualitätsniveau ermöglicht. Die damit einhergehende Definierung aller einzelnen Arbeitsschritte, wie auch aus

Abbildung 36 ersichtlich, ließ zudem das Festlegen einer Turn-around-Time von 8 – 12 Wochen zu. Dies stellt einen bedeutenden Parameter für zuweisende Kollegen dar, da damit die Dauer der molekulargenetischen Analysen in der Patientenversorgung (z.B. Kontrolltermine, Befundbesprechungen etc.) berücksichtigt werden kann.

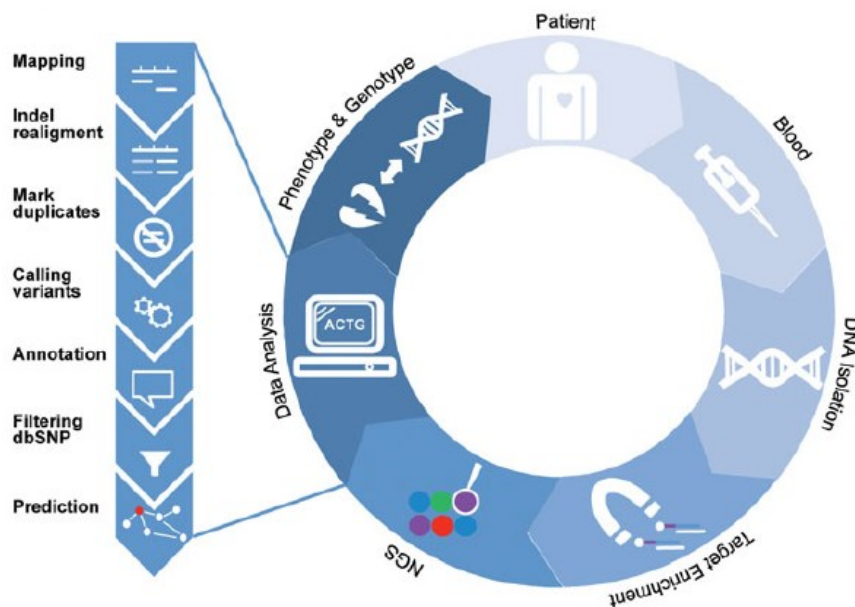


Abbildung 36: Workflow – Kardiopanel
(nach Haas J. et al.)

Doch bereits die intensive Phase der Etablierung konnte zeigen, dass eine enge Kooperation zwischen klinisch tätigem Kollegen und dem „molekulargenetischen Team“ unerlässlich ist. Als ein Punkt wäre hier beispielsweise der Einschluss von Patienten zur molekulargenetischen Diagnostik zu nennen, wobei in diesem Zusammenhang sicherlich relevanter Input von Seiten des klinischen Kollegen gefordert ist. Gerade die Frage, welches Kollektiv einer genetischen Untersuchung zugeführt werden soll, nimmt Einfluss auf die zu erwartenden Untersuchungsergebnisse, welche wiederum mit der weiteren Patientenversorgung interagieren. Einen sehr hilfreichen Anhaltspunkt stellen hierbei die internationalen Empfehlungen dar, die regelmäßig durch ein Expertenteam überarbeitet werden (64,65).

Bereits die Ergebnisse der Etablierung konnten zeigen, dass mit dem Kardiopanel in seiner vorliegenden Form, Untersuchungsergebnisse auf qualitativ hohem Niveau erzielt werden können. Um diese Qualität weiterhin zu gewährleisten werden kontinuierlich Anpassungen vorgenommen. Dies betrifft einerseits die Berücksichtigung aktueller Forschungsergebnisse (z.B. Aufnahme neuer Gene ins Design), aber auch Adaptierungen die technische Seite betreffend, wie beispielsweise eine Optimierung des Kits. Zudem werden wiederholt Vergleiche verschiedener Plattformen durchgeführt, um gegebenenfalls auch in diesem Punkt rasch auf vielversprechende Entwicklungen reagieren zu können.

Die Richtigkeit dieses Vorgehens hat sich bereits in den bisherigen Erfahrungen bestätigt. So gab es beispielsweise in der Aufbauphase relativ lange die Überlegung, zwei Designs – einmal für strukturelle, einmal für rhythmologische Erkrankungen zu erstellen. Schlussendlich hat sich jedoch die Erstellung eines Panels durchgesetzt, womit nicht nur ökonomischen Aspekten Rechnung getragen wurde. Dies bezieht sich primär auf die Haltbarkeit chemischer Reagenzien, womit gleichzeitig ein Qualitätsparameter gegeben ist. Insbesondere die praktische Tätigkeit konnte zeigen, dass eine klare Abgrenzung der klinischen Krankheitsbilder nicht immer eindeutig möglich ist. Diese Überlappungen sind wie bereits häufig bekannt, unter anderem bei strukturellen Erkrankungen – HCM/DCM - zu sehen. So kann die gleiche genetische Ursache verschiedene Phänotypen bedingen. Umgekehrt kann jedoch auch der idente Phänotyp durch unterschiedliche Genotypen verursacht werden. Dieses Kenntnis ist jedoch wichtig für die Klassifikation von Kardiomyopathien, der Einschätzung von Prognosen, als auch für das Screening von Familienmitgliedern (38,63). Diese Überlappung zeigt sich aber auch mit Charakteristiken bisher nicht berücksichtigter Erkrankungen. So können beispielsweise Patienten mit einem LQT-Syndrom durchaus auch strukturelle Veränderungen, im Sinne einer subklinischen Kardiomyopathie aufweisen, die auf abnorme Kontraktionsabläufe durch eine Dysfunktion von Ionenkanälen zurückzuführen sind (66). Die Möglichkeit einer weiteren Konstellation wurde uns im Rahmen unserer praktischen Tätigkeit aufgezeigt. Ein Kind wurde zur genetischen Testung bei Verdacht auf ein Long-QT-Syndrom zugewiesen. Im Zuge der Familienanamnese konnte beim Vater das klinische Vorliegen einer Hypertrophen nicht obstruktiven Kardiomyopathie erhoben werden. Die molekulargenetischen Untersuchungsergebnisse dieses Indexpatienten lieferten eine pathogene Mutation, welche für ein LQT-Syndrom beschrieben ist, als

auch eine krankheitsverursachende Veränderung die HCM betreffend. Dieses Ergebnis stellt einerseits relevante Information zur Betreuung des Patienten bzw. der Familie dar. Andererseits zeigte es uns erneut die Wertigkeit einer detaillierten Familien- und Stammbaumanalyse im Rahmen einer humangenetischen Beratung, als auch die Möglichkeit des Ausmaßes von „klinischen Überlappungen“.

Dies stellt bereits einen Einblick in die aktuellen Entwicklungen, denn wie weit sich die strikte Abgrenzung einzelner Erkrankungen zukünftig noch verändern wird, insbesondere durch die Genetik, ist zum derzeitigen Zeitpunkt kaum abzusehen.

In diesem Zusammenhang wird auch immer häufiger ersichtlich, dass die lange durchgeführte Fokussierung auf einen autosomal dominanten Erbgang bei kardialen Erkrankungen nicht immer zulässig ist. Gerade die dilatative Kardiomyopathie folgt zu nicht geringen Anteilen dem autosomal rezessiven (16 %) bzw. dem X-chromosomal (10%) Erbgang (67,68).

Die sicherlich größte Herausforderung, die mit den Hochdurchsatzverfahren einhergeht, ist die Interpretation von Daten, insbesondere von Varianten unklarer klinischer Signifikanz. So ist es relativ einfach klassische Polymorphismen mit hoher Frequenz, im Abgleich mit verschiedenen Datenbanken, zu detektieren. Deutlich schwieriger wird die Beurteilung bzw. Differenzierung von Mutationen bzw. den sogenannten unklassifizierten Varianten (UV / VUS). Hierbei handelt es sich um Veränderungen deren klinische Wertigkeit entweder noch nicht gänzlich einzuordnen ist bzw. zu welcher keinerlei oder auch diskrepante Daten vorliegend sind. Dies erschwert zum einen das Erstellen von Befunden, zum anderen beeinflusst es jedoch auch in hohem Maße die Beratungssituation bzw. den Stellenwert des humangenetischen Beratungsgesprächs.

Wie bereits mehrfach diskutiert, wird international versucht Guidelines zur Klassifizierung von Sequenzveränderungen zu entwickeln. Rein der Tatsache entsprechend, dass es hier bereits verschiedene, anerkannte Vorschläge gibt, spiegelt die Relevanz der Thematik im internationalen Raum wieder. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit finden die Empfehlungen von Thompson et al., sowie die ACMG-Richtlinien Anwendung. Eine wesentliche Differenz dieser beiden Ansätze liegt in der Kategorisierung. So gelten nach Thompson Veränderung der Klasse 5 als pathogen, in den ACMG Kriterien entsprechen diese Varianten der Klasse 1 (56,57). Bei beiden

genannten Klassifizierungssystemen wird versucht relevante Parameter zu berücksichtigen. Hierzu zählen neben Literatur, Allelfrequenz, Position, Domäne und Predictionprogramme auch Informationen aus Segregationsanalysen bzw. weitere Angaben aus internationalen Datenbanken. Trotz dieses „Leitfadens“ ist es sichtlich schwer eine einheitliche Beurteilung zu erreichen, da hierbei in vielen Fällen auch die Erfahrung des Befunders mit einfließt.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse haben uns gezeigt, welchen hohen Stellenwert die Erstellung einer genomischen Datenbank die österreichische Population betreffend, einnehmen würde. So ist es nicht selten, dass bestimmte Veränderungen in einer Region häufiger zu beobachten sind, in anderen Ländern jedoch kaum bis gar nicht nachgewiesen wurden. Diese Information würde großen Einfluss auf die Beurteilung einer Sequenzveränderung ausüben. Wie dieses Beispiel zeigt, könnte eine Datenbank, welche auf genomische Information von österreichischen Bürgern fokussiert, einen spezifischeren Abgleich der identifizierten Varianten ermöglichen und damit sicherlich zur Verbesserung der Dateninterpretation beitragen. Da die Analyse kardiogenetischer Fragestellungen bisher in Österreich noch nicht durchgeführt wurde, und somit lediglich am Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz erfolgt, ist es umso relevanter zumindest in house eine strukturierte Bearbeitung sowie wissenschaftliche Aufarbeitung der Daten zu verfolgen.

Die Untersuchung von Österreichern bietet jedoch nicht nur im Zusammenhang mit der Dateninterpretation wertvolle Informationen. So kann durchaus auch für bestimmte Erkrankungen ein eventuell abweichendes Mutationsspektrum erwartet werden. Dies zeigen beispielsweise die bereits vorliegenden Daten zur Hypertrophen Kardiomyopathie. In der internationalen Fachliteratur wird wiederholt darauf hingewiesen, dass bei Patienten mit der klinischen Diagnose HCM, primär in den Genen MYBPC3, MYH7, TNNI3 und TNNT2 pathogene Veränderungen identifiziert werden (69-71). In dem in Graz bisher untersuchten Kollektiv mit klinischen Verdacht auf das Vorliegen einer Hypertrophen Kardiomyopathie wurden zwar bereits zahlreiche Mutationen im MYBPC3-Gen nachgewiesen, jedoch konnte lediglich bei einem Patienten eine Veränderung im MYH7-Gen dokumentiert werden. Damit scheint es diesbezüglich doch ein Abweichen vom zu erwartenden Mutationsspektrum zu geben. Rückblickend wäre dieses Wissen im Zusammenhang

mit der Sanger-Sequenzierung und einer damit einhergehenden Untersuchungsreihenfolge von Relevanz gewesen.

Nimmt im Zuge der Datenanalyse eine Variante den Stellenwert einer VUS ein, so wird für jeden einzelnen Fall versucht, eine weitere Interpretation zu ermöglichen. Bei diesen Überlegungen kommt der Durchführung einer Segregationsanalyse große Bedeutung zu. Sollte eine Variante bei Betroffenen in einer Familie nachweisbar sein, bei Gesunden jedoch nicht, ist durchaus von einer höheren Wertigkeit auszugehen. Da wir häufig kinder-kardiologische Fragestellungen bearbeiten, ist es nicht verwunderlich, dass insbesondere die Testung der Eltern bevorzugt verfolgt wird. Eine UV, welche bei einem Kind mit klinischen Merkmalen, erstmals neu aufgetreten ist, wird eher als ursächlich zu bezeichnen sein, als Veränderungen, welche auch bei einem Elternteil vorliegend sind.

Ein weiteres Tool, das zur Interpretation von Daten immer wieder herangezogen wird, sind sogenannte Predictionprogramme. Sie errechnen anhand spezifischer Parameter, wie beispielsweise die Konservierung, die Domäne, den Basenaustausch etc. die Auswirkungen auf das Protein. Hierbei handelt es sich lediglich um *in silico* Analysen, womit keine direkte Umlegung auf *in vivo* Effekte möglich ist. Somit ist immer von Annäherungen auszugehen. Zwischenzeitlich steht eine Vielzahl solcher Programme zur Verfügung. Allen gemeinsam ist meist die Darstellung der Pathogenität. Je näher dieser Wert an 1 heranreicht, umso wahrscheinlicher ist ein pathogener Einfluss. Welches Tool schlussendlich herangezogen wird ist zum Teil vom klinischen Krankheitsbild, von der Benutzerfreundlichkeit aber überwiegend von den Erfahrungen des Befunders abhängig (72). Wie neuere Studien zeigen, sollte von dieser Vorgehensweise immer mehr Abstand genommen werden. So wurde zwischenzeitlich eine Arbeit publiziert, welche auf die Relevanz der Kombination einiger Predictionprogramme in Abhängigkeit vom zugrundeliegend Gen hinweist. Leong et al. zeigten in ihrer Arbeit beispielsweise, dass die Pathogenität von Veränderungen im KCNQ1-Gen mittels der Programme PROVEAN, SNPs&GO, sowie SIFT am besten einzuschätzen sind. Damit kann eine Sensitivität von über 93 % erreicht werden. Die Spezifität wurde sogar mit 100 % angegeben. Demgegenüber stellt für Veränderungen im SCN5A-Gen SNAP und PROVEAN die zuverlässigste

Kombination dar (73). Dies lässt auch erkennen, dass auf allen Ebenen der Dateninterpretation intensiv geforscht wird.

Sollte es sich bei den identifizierten unklassifizierten Varianten um Sequenzveränderungen handeln, deren Auswirkungen das Splicing beeinträchtigen könnten, wird im Regelfall eine mRNA-Analyse angeschlossen. Da dies nicht selten der Fall ist, hat die Bearbeitung von mRNA-Proben deutlich zugenommen. Der damit immer wieder erzielte Informationsgewinn unterstützt dieses Vorgehen jedoch eindeutig. Der Stellenwert dieser Analysen wird zurzeit auch in der wissenschaftlichen Literatur intensiv diskutiert (74).

Aufgrund zahlreicher Parameter, nicht zuletzt der Vielzahl an unklassifizierten Varianten, nimmt das humangenetische Beratungsgespräch eine zentrale Rolle ein. Die praktischen Erfahrungen zeigen, dass der Umgang mit möglichen Ergebnissen besser bewerkstelligt werden kann, wenn im Rahmen eines intensiven Aufklärungsgesprächs (alle) viele mögliche Szenarien durchgesprochen werden. Nicht selten haben Patienten keine Vorstellung davon, welche Bedeutung humangenetische Untersuchungen haben bzw. welche Konsequenzen dies für die einzelne Person bzw. die Familie nach sich ziehen kann. Doch auch immer öfter ist zu beobachten, dass Betroffene sich intensiv mit Überlegungen nach der Ursache Ihrer Erkrankung beschäftigen. Die Frage nach dem „was hätte ich anders machen können / müssen“ ist häufig auch noch Jahre nach der Diagnosestellung in den Köpfen von Patienten verankert. Somit kann eine molekulargenetische Analyse auch durchaus großen Beitrag zur Ursachenklärung beisteuern. Doch nicht selten wird, nachdem die Auswirkungen einer Keimbahnmutation, insbesondere auf die nächste Generation, erkannt werden, Formen von Schuld thematisiert. Hier kommt dem Berater die entscheidende Rolle zu, den hier fehlenden Einfluss der einzelnen Person ins richtige Licht zu rücken. Doch gerade die praktische Erfahrung zeigt, wie unterschiedlich Menschen mit dieser Frage, als auch mit dem Vorliegen von Mutationen bzw. unklassifizierten Varianten umgehen. So kann das Wissen über pathogene Mutationen in einer Familie für den Einen Belastung und gleichzeitig für den Anderen Entlastung bedeuten. So können UV's für eine Person Besonderheiten darstellen, während andere selbe oder ähnliche Konstellationen mit ständiger Angst vor Erkrankungsmanifestation bzw. –verschlechterung in Verbindung bringen. Damit

ist es unter anderem die Aufgabe des Aufklärungsgespräches gemeinsam mit dem Ratsuchenden ein vernünftigen Umfang bzw. den „richtigen Zeitpunkt“ einer molekulargenetischen Testung zu ermitteln.

Mit der Einführung des Next-Generation Sequencings in die Diagnostik hat dies sicherlich einen noch größeren Stellenwert bekommen. So wird zwar derzeit durch Panelansätze eine auf spezifische Fragestellung fokussierte Untersuchung angestrebt, dennoch kann das Erheben von Zusatzbefunden nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Damit muss auch über diesen Punkt gesprochen bzw. ein mögliches Procedere für das weitere Vorgehen bei Eintreten dieses Szenarios vor Einleitung einer Analyse diskutiert werden.

Ein weiterer Aspekt, welcher nicht nur Patienten, sondern auch klinisch und molekulargenetisch tätige Ärzte vor große Herausforderungen stellt, ist beispielsweise die Penetranzschwankung. So ist es für zahlreiche Ratsuchende nur schwer vorzustellen, dass ein und dieselbe genetische Veränderung nicht zwangsweise denselben klinischen Phänotyp bzw. denselben Schweregrad auslösen muss. Somit kann eine Person in der Familie völlig asymptomatischer Anlageträger sein, während ein anderes Familienmitglied das Vollbild einer Erkrankung entwickelt. Im Rahmen der Beratungssituation wird versucht, Einflüsse auf die Penetranz zu erklären. Allerdings sind hier valide Daten nur zu wenigen Erkrankungen vorliegend. In vielen Fällen muss lediglich von Hypothesen gesprochen werden. Ein Krankheitsbild für welches bereits einige Parameter bekannt sind, ist das LQT-Syndrom. So wurde in mehreren Arbeiten beschrieben, dass neben genetischen Faktoren auch Geschlecht, Alter, Gesundheitszustand (z.B. Fieber) oder auch verschiedene Medikamente den klinischen Phänotyp beeinflussen (75). Immer mehr wird aber auch angenommen, dass nicht nur das Zusammenspiel von Genetik und Umwelt diesbezüglich relevant ist, sondern auch sogenannte Gen-Gen-Interaktionen. In der Studie von Lopes et al. wird unter anderem darauf hingewiesen, dass für die Hypertrophe Kardiomyopathie durchaus auch Gene, die nicht für das Sarkomer kodieren, einen Modifier-Effekt auf das klinische Bild ausüben können (76).

Diese Erkenntnisse stellen unterstützende Elemente in der Betreuung von Patienten dar. Dennoch ist es für alle Beteiligten immer wieder schwer, die Auswirkungen einer Variante und die damit einhergehenden Konsequenzen einzuschätzen. So kann eine molekulargenetische Testung wie im Beispiel A – Long-QT-Syndrom bei einem Sportler – durchaus das weitere Leben verändern. In diesem Fall ist die Ausprägung

der Penetranzschwankungen ersichtlich. Niemand kann mit Sicherheit sagen, inwiefern das Weiterführen der intensiven sportlichen Betätigung lebensbedrohlich sein wird, doch verständlicherweise ist kein Mediziner gewillt, diesbezüglich die Verantwortung zu übernehmen.

Doch die parallele Sequenzierung bringt nicht nur Hürden mit sich. Für immer zahlreichere Krankheitsbilder wird das Auftreten von Doppelmutationen beschrieben (77). Dies hat große Wertigkeit für die Beratung bzw. Testung von Familien. Da somit nicht nur eine pathogene Mutation weitervererbt werden kann, muss auch das Vorliegen einer weiteren ausgeschlossen bzw. nachgewiesen werden, um das weitere klinische Management festzulegen. Gerade in diesem Zusammenhang ist die Wahrscheinlichkeit eine pathogene Mutation geerbt zu haben natürlich höher, als wenn nur eine Veränderung in der Familie vorliegend ist. Doch gerade in der klinischen Betreuung von Doppelmutationsträgern sind noch kaum praktische Erfahrungen vorhanden. Muss im Fall C – Kind mit zwei pathogenen Mutationen für das LQT-Syndrom – eine andere Therapie als bisher üblich bei LQT eingesetzt werden? Würde dieser Patienten von einer Kombinationstherapie profitieren? Mit diesen und ähnlichen Fragen müssen sich, seit dem vermehrten Einsatz von molekulargenetischen Analysen, Kliniker immer häufiger auseinandersetzen.

Doch die Technik des Next-Generation Sequencings findet mittlerweile nicht nur im Bereich der klinischen Patientenversorgung Einsatz. Sie wird vermehrt auch für pathologische Fragestellungen herangezogen, womit sich ein neues Feld, der sogenannten molekularen Autopsie, eröffnet. Bereits jetzt liegen Publikationen vor, bei welchen durch postmortem Analysen der wichtigsten Gene für LQT und CPVT im untersuchten Kollektiv (SUDS) in 30% der Fälle krankheitsverursachende Mutationen identifiziert werden konnten (78). Eine positive genetische Testung klärt nicht nur die Todesursache, sondern kann direkten Einfluss auf die Risikostratifizierung, sowie das klinische Management bzw. Überleben der Familienmitglieder nehmen. Positive getestete Angehörige sollten eine multidisziplinäre Betreuung, sowohl durch klinische, insbesondere kardiologische, als auch genetische Spezialisten, erhalten. Dass diese Konstellationen in der Betreuung von Patienten durchaus eintreten, zeigt auch Beispiel D.

Damit hierfür ein optimales Procedere gefunden werden kann, müssten Richtlinien entwickelt werden, welche die Notwendigkeit bzw. den Umfang einer molekulargenetischen Untersuchung bei Fällen von plötzlichem Herztod definieren.

Ferner wirft die Aufnahme der molekularen Autopsie in die Routinediagnostik weitere sozialpolitische Fragen auf, die eine intensive Auseinandersetzung benötigen. Die Entscheidung zur Testung, deren Bezahlung und das Recht auf die erhobenen Daten seien nur einige Genannte.

Somit skizziert das Schlagwort „Molekulare Autopsie“ eine komplexe Thematik die medizinische, molekulargenetische, als auch ethische und sozial-rechtliche Aspekte umfasst, deren Bearbeitung jedoch gegebenenfalls eine bessere Klassifizierung des plötzlichen Herztodes ermöglicht.

Mit der Etablierung der Kardiogenetik in Österreich, welche den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit darstellt, konnte nicht nur ein großer Beitrag zur Patientenversorgung gewährleistet werden. Durch die vorliegenden Daten können sicherlich auch wissenschaftliche Erkenntnisse abgeleitet werden. Doch gleichzeitig haben die Hochdurchsatzverfahren eine Reihe weiterer Fragen aufgeworfen, deren Beantwortung wohl nur durch enge Kooperationen verschiedener Disziplinen und weiterführender Forschung in diesem Feld zu bewerkstelligen ist.

5. Literaturverzeichnis

1. Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001 Feb 16;291(5507):1304-51
2. Lander ES, Linton LM, Birren B et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921
3. Nair AJ. *Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering*. Infinity Science Press, 2008
4. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 1977, Bd. 74, 5463–5467
5. Lafer I. *Vererbbare metabolische Störungen in der Ernährungsmedizin – klinische Relevanz und diagnostische Optionen [Masterthese]*. Graz: Medizinische Universität; 2015
6. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 1986, Bd. 321, Nr. 6071, pp. 674-679
7. Swerdlow H, Wu SL, Harke H, Dovichi NJ. Capillary gel electrophoresis for DNA sequencing. Laser-induced fluorescence detection with the sheath flow cuvette. *J Chromatogr*. 1990, Bd. 516, Nr. 1, pp. 61-67
8. Hunkapiller T, Kaiser RJ, Hood BF, Hood L. Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science*. 1991, Bd. 254, Nr. 5028, pp. 59-67
9. Mullis K, Faloona F, Scharf S et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986, Bd. 51, pp. 263-273
10. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010 Jan;11(1):31-46
11. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE et al. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*. 2013 Sep 26;155(1):27-38
12. Goldstein DB, Allen A, Keebler J, Margulies EH et al. Sequencing studies in human genetics: design and interpretation. *Nat Rev Genet*. 2013 Jul;14(7):460-70
13. Genomes Project C. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010;467:1061–1073

14. Mardis, Elaine R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in genetics* . 2008:133-141
15. International Cancer Genome Consortium (2010). "International network of cancer genome projects." *Nature* 464(7291): 993-998
16. Lopes LR, Elliott PM. A straightforward guide to the sarcomeric basis of cardiomyopathies. *Heart*. 2014;100(24):1916-23
17. Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Bäse K et al. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*. 1993;261(5117):50-8
18. Maron BJ, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 2013 Jan 19;381(9862):242-55
19. Zumhagen S, Stallmeyer B, Friedrich C. et al. Inherited long QT syndrome. Clinical manifestation, genetic diagnostics and therapy. *Herzschr Elektrophys*. 2012;23:211-219
20. Ho CY. Hypertrophic cardiomyopathy in 2012. *Circulation*. 2012;125:1432-1438
21. Webber SA, Lipshultz Se, Sleeper LA et al. Outcomes of restrictive cardiomyopathy in childhood and the influence of phenotype: a report from the Pediatric Cardiomyopathy Registry. *Circulation*. 2012;126(10):1237-44
22. http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=DE&Expert=54260
[uploaded 14.05.2015, 11:10]
23. Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 2010;375:752-62
24. Herman DS, Lam L, Taylor MR et al. Truncations of Titin Causing Dilated Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2012;366:619-28
25. Mestroni L, Maisch B, McKesna WJ et al. Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. *Eur Heart J*. 1998;20:93-102
26. Asimaki A, Tandri H, Huang H. et al. A new diagnostic test for Arrhythmogenic right ventricular Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2009;360:1075-84
27. Basso C, Corrado D, Marcus FI et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet*. 2009;95:1409-14
28. Herold G und Mitarbeiter. *Innere Medizin*. Herold Verlag, 2014
29. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C et al. Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348:1866-1874

30. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2001;103:89-95
31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1289/> [uploaded 14.05.2015, 17:40]
32. <http://www.omim.org/entry/609620> [uploaded 14.05.2015, 18:00]
33. Berne P, Brugada J. Brugada Syndrome 2012. *Circ J*. 2012;76:1563-1571
34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1517/> [uploaded 14.05.2015, 19:16]
35. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL et al. Heart Disease and Stroke Statistics – 2013 Update. A report from the American heart Association. *Circulation*. 2013;127:143-152
36. Chugh SS, Reinier K, Teodorescu C et al. Epidemiology of Sudden Cardiac Death: Clinical and Research Implications. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2008;51(3):213-28
37. Eckart RE, Shry EA, Burke AP et al. Sudden death in young adults: an autopsy-based series of a population undergoing active surveillance. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:1254-1261
38. Ute Moog, Olaf Rieß. *Medizinische Genetik für die Praxis: Diagnostik, Beratung, Fallbeispiele*. Georg Thieme Verlag, 2014
39. Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E. *Taschenlehrbuch Humangentik*. 7. Auflage Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2007:227-229
40. <https://www.ris.bka.gv.at> [uploaded 13.10.2014]
41. http://bmg.gv.at/cms/home/attachments/4/6/0/CH1053/CMS1362400994960/genetischeanalysen_20130320.pdf [uploaded 13.10.2014]
42. HaloPlex Target Enrichment System for Illumina Sequencing Protocol. Version D.4, May 2013
43. Adessi C, Matton G, Ayala G et al. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms, *Nucleic Acids Res*. 2000, 28, p. E87
44. Fedurco M, Romieu A, Williams S et al. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res*. 2006, Bd. 34, Nr. 3, p. e22
45. Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The Spliceosome: Design Principles of Dynamic RNP Machine. *Cell*. 2009;136:701-718
46. Graveley BR. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet*. 2001;17:100-107

47. Ulahannan D, Kovac MB, Mulholland PJ et al. Technical and implementation issues in using next generation sequencing of cancers in clinical practice. *Br J Cancer*. 2013;109(4):827-35
48. Sims D, Sudbery I, Illott NE et al. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2014 Feb;15(2):121-32
49. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*. 2013;14:178-192
50. <http://genome.ucsc.edu/index.html> [uploaded 24.05.2014; 15:10]
51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP> [uploaded 24.05.2015; 16:45]
52. <http://evs.gs.washington.edu/EVS> [uploaded 24.05.2015; 17:05]
53. Kumar P, Henikoff S, Ng P. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*. 2009. 8:4;1073-1082
54. <http://www.hgvs.org> [uploaded 25.05.2015; 17:10]
55. Plon SE, Eccles DM, Easton D et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat*. 2008;29(11):1282-91
56. Thompson BA, Spurdle AB, Plazzer JP et al. Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. *Nat Genet*. 2014 Feb;46(2):107-15
57. Richards S, Aziz N, Bale S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-23
58. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genet Med*. 2008 Apr;10(4):294-300
59. Choi G, Kopplin LJ, Tester DJ et al. Spectrum and Frequency of Cardiac Channel Defects in Swimming-Triggered Arrhythmia Syndromes. *Circulation*. 2004;110:2119-2124
60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1264/> [uploaded 20.02.2015, 11:30]
61. Piippo K, Swan H, Pasternack M et al. A Founder Mutation of the Potassium Channel KCNQ1 in Long QT Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:562-8

62. Tester DJ, Will ML, Haglund CM et al. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2005 May;2(5):507-17
63. Haas J, Frese KS, Peil B. et al. Atlas of the clinical genetics of human dilated Cardiomyopathy. *Eur Heart J* (2015) 36, 1123–1135
64. Priori SG, Wilde AA, Horie M. et al. HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm*. 2013 Dec;10(12):1932-63
65. Ackermann MJ, Priori SG, Willems S. et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm*. 2011 Aug;8(8)
66. Haugaa KH, Johnson JN, Bos JM et al. Subclinical cardiomyopathy and long QT syndrome: an echocardiographic observation. *Congenit. Heart Dis*. 2013;8(4):352-359
67. Mestroni L, Rocco C, Gregori D et al. Familial dilated cardiomyopathy: Evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. *J AM Coll Cardiol* 1999; 34:181-90
68. Charron P, Arad M, Arbustini E et al. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* (2010) 31, 2715–2728
69. Richard P, Charron P, Carrier L et al. Hypertrophic cardiomyopathy. Distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003;107:2227-32
70. Curila K, Benesova L, Penicka M et al. Spectrum and clinical manifestations of mutations in genes responsible for hypertrophic cardiomyopathy. *Acta Cardiol*. 2012 Feb;67(1):23-9
71. Mogensen J, Van Tintelen P, Fokstuen S et al. The current role of next-generation DNA sequencing in routine care of patients with hereditary cardiovascular conditions: a viewpoint paper of the European Society of

Cardiology working group on myocardial and pericardial diseases and members of the European Society of Human Genetics. *Eur Heart J* (2015) 36, 1367–1370

72. Riuro H, Campuzano O, Berne P et al. Genetic analysis in silico prediction and family segregation in long QT syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2015 Jan;23(1):79-85
73. Leong US, Stuckey A, Lai D et al. Assessment of the predictive accuracy of five in silico prediction tools, alone or in combination, and two metaservers to classify long QT syndrome gene mutations. *BMC Medical Genetics* (2015) 16:34
74. Weeland CJ, van den Hoogenhof MM, Beqqali A. Insights into alternative splicing of sarcomeric genes in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Apr;81:107-13
75. Amin AS, Pinto YM, Wilde A. Long QT syndrome: beyond the causal mutation. *J Physiol* 591.17 (2013) pp 4125–4139
76. Lopes LR, Syrris P, Guttman OP, et al. *Heart* 2015;101:294–301
77. Kapplinger JD, Tester DJ, Salisbury BA et al. Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION® long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* 2009;6:1297–1303
78. Kumar S, Peters S, Thompson T et al. Familial cardiological and targeted genetic evaluation: Low yield in sudden unexplained death and high yield in unexplained cardiac arrest syndromes. *Heart Rhythm* 2013;10:1653–1660

6. Anhang

Tabelle 11: Reaktionsansatz für PCR

Menge	Reagenz
6 µl	HotStarTaq Master Mix (Qiagen)
+ 5 µl	Wasser
+ 0,5 µl	DNA-Template (10 ng/µl Verdünnung aus dem Originaltube)
+ 0,5 µl	Primer (10 µM; forward und reverse)
12 µl	

Tabelle 12: Temperaturprofil der PCR

Schritte	Temperatur	Zeit
Aktivierung der Polymerase	95 °C	15 Minuten
1. Denaturierung	95 °C	45 Sekunden
2. Annealing	57 °C	45 Sekunden
3. Elongation	72 °C	45 Sekunden
1. – 3. 34 mal wiederholt (insgesamt 35 Zyklen)		
Finale Elongation	72 °C	5 – 10 Minuten
Kühlung	8 °C	∞

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die Sequenzierung

Menge	Reagenz
7 µl	Wasser
+ 1 µl	BigDye® Sequencing Master Mix (enthält Puffer, Polymerase, dNTP, ddNTPs)
+ 1 µl	5x Sequenzierpuffer
+ 0,5 µl	Primer (Forward- u. Reverse-Primer in getrennten Reaktionen, 10 µM)
0,5 µl	PCR-Produkt
10 µl	

Tabelle 14: Temperaturprofil für die Sequenzierung

Schritte	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	96 °C	30 Sekunden
2. Annealing	50 °C	15 Sekunden
3. Synthese	60 °C	4 Minuten
1. – 3. 34 mal wiederholt (insgesamt 35 Zyklen)		
Kühlung	8 °C	∞