

Schnelle und kostengünstige Nanoporen-basierte Amplikon-Gensequenzierung bei seltenen Erkrankungen am Beispiel von Familiärer Hypercholesterinämie (FH) und Hypertropher Kardiomyopathie (HCM)

M. Soufi¹, V. Ruppert², B. Kurt¹, T. Nickolaus¹, Y. Sharkova¹, G. Klaus³ und J.R. Schaefer¹

¹Zentrum für seltene und unerkannte Erkrankungen (ZusE), ²Klinik für Kardiologie und ³Kinderklinik des Universitätsklinikums Gießen-Marburg GmbH, Standort Marburg, D-35033 Marburg

Abstrakt

Man geht davon aus, dass 80% aller seltenen Erkrankungen genetisch bedingt sind. Daher spielt die genetische Diagnostik eine große Rolle. Allerdings sind der apparative Aufwand und dadurch auch die Kosten der traditionellen Sequenzierung nicht gering. Als kleine Arbeitsgruppe haben wir uns daher um die Etablierung kostengünstiger, schneller und auch für kleinere Labors einsetzbare Sequenzier-Techniken bemüht. Nanoporen-Sequenzierung ist eine Technik die eine Vielzahl von molekularbiologischen Fragestellungen beantworten kann (u.a. Genomics, Metagenomics, Epigenetics und Transcriptomics). Hier beschreiben wir ein einfaches Verfahren für eine Kandidatengen-Panel-Analyse am Beispiel zweier seltener Erkrankungen, nämlich der homozygoten familiären Hypercholesterinämie (FH; ICD-10-GM-2023: E78.0) und der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM; ICD-10-GM-2023: I42.1).

Hintergrund

Familiäre Hypercholesterinämie (FH)

Homozygote Familiäre Hypercholesterinämie (FH) ist eine sehr seltene autosomal dominant vererbte Störung des Cholesterinstoffwechsels mit einer Prävalenz von 1/1.000.000. Betroffene Patienten fallen in der Kindheit durch kutane Xanthome an Händen und Strecksehnen auf. Im späteren Verlauf der Erkrankung manifestieren sich dann atherosklerotische Komplikationen (Karotis und Aortenklappenstenosen). Die molekulare Ursache für FH sind einzelne oder kombinierte Varianten in vier Genen, welche den Abbau von Plasma-LDL innerhalb des LDL-Rezeptor Stoffwechselweges (LDLR-Pathway) regulieren¹⁻³.

- 1) Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor (LDLR).
- 2) Apolipoprotein B (APOB).
- 3) Protein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (PCSK9).
- 4) LDL receptor adaptor protein 1 (LDLRAP1).

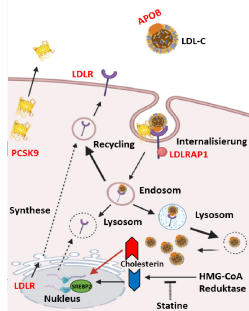


Abb. 1. Interaktion von LDLR, ApoB, PCSK9 und LDLRAP1 im LDLR-Pathway².

Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine autosomal-dominante vererbte Erkrankung die mit einer Prävalenz von etwa 1/2000 in der Allgemeinbevölkerung vorkommt. Bei der hypertrophen Kardiomyopathie kommt es meistens zu einer Verdickung der Muskulatur des linken Ventrikels (> 12 bis 15 mm diastolisch) ohne begleitende Dilatation. In 15 bis 17 % findet sich eine assoziierte rechtsventrikuläre Hypertrophie. Ursächlich für HCM sind Mutationen in > 8 Genen die für Strukturproteine des Sarkomers codieren⁴.

- 1) Myosinbindendes Protein (MYBPC3).
- 2) Schwere Myosinkette (MYH7).
- 3) Kardiales Muskeltroponin (TNNT2).
- 4) Troponin1 Typ 3 (TNNI3).
- 5) Leichte Myosinkette 2 (MYL2).
- 6) Leichte Myosinkette 3 (MYL3).
- 7) Tropomyosin 1 (TPM1).
- 8) Alpha Kardiales Aktin (ACTC1).

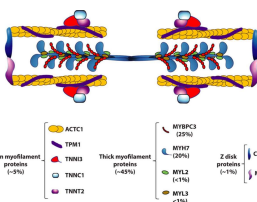


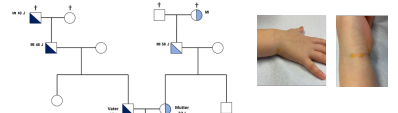
Abb. 2. Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine Erkrankung der Sarkomerproteine. Die Abbildung zeigt die Struktur eines Sarkomers und die an der HCM beteiligten Proteinbestandteile⁴.

Ergebnisse

FH-Panel: Kombinierte LDLR/PCSK9-Variante

A.

Patient	Alter	Chol. (mg/dl)	LDL (mg/dl)	Gendefekt
Vater	37	409	326	PCSK9 (het.)
Mutter	33	292	202	LDLR (het.)
Kind	3	956	787	PCSK9/LDLR (het.)



B.

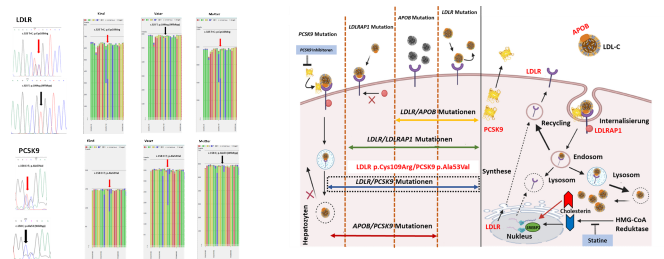
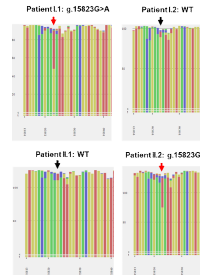


Abb. 4. A. Lipidstatus und klinische Daten der untersuchten FH-Familie. B. Nachweis eines doppelt heterozygoten Defektes von LDLR und PCSK9 beim betroffenen Kind der FH-Familie.

HCM-Panel: MYH7, MYBPC3-Varianten

A.

MYH7 (p.Arg870His)



B.

MYBPC3 (p.Val896Met)

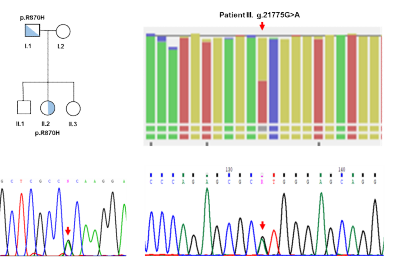
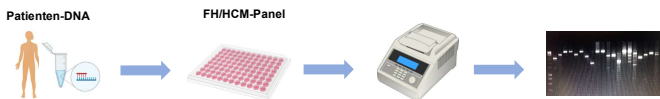


Abb. 5. A. Nachweis einer heterozygoten MYH7 p.Arg870His Variante in einer betroffenen HCM-Familie. B. Nachweis einer MYBPC3 p.Val896Met Variante in einem betroffenen Patienten mit HCM.

Methoden

I. DNA-Isolierung/Long amp PCR



II. Nanoporen-Sequenzierung



III. Bioinformatik (Read mapping to RefSeq)



IV. Annotation/SNP prediction

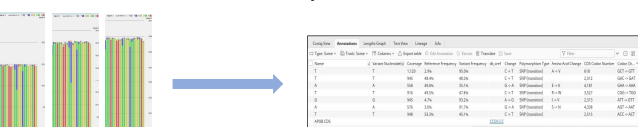


Abb. 3. Graphische Darstellung des kompletten Workflows der FH/HCM Diagnostik mittels Nanoporen-Sequenzierung³.

Diskussion

Unsere Studie zeigt, dass es möglich ist, die Nanoporen-Sequenzierung für schnelle Gentests bei seltenen Krankheiten einzusetzen. Der Arbeitsablauf ist skalierbar und ermöglicht eine kosteneffiziente und zeitnahe Analyse, was die Methode zu einer attraktiven Technologie für jedes klinische Diagnostiklabor macht. Sie kann auf jedes Kandidatengen angewandt werden und ist daher für komplexe genetische seltene Erkrankungen sehr gut geeignet.

Literatur

1. Goldstein JL, Brown MS. Molecular medicine. The cholesterol quartet. *Science*. 2001;18;292:1310-2.
2. Kamar A, Khalil A, Nemer G. The Digenic Causality in Familial Hypercholesterolemia: Revising the Genotype-Phenotype Correlations of the Disease. *Front Genet*. 2021;11:572045.
3. Soufi M, Bedenbender S, Ruppert V, Kurt B, Schieffer B, Schaefer JR. Fast and Easy Nanopore Sequencing Workflow for Rapid Genetic Testing of Familial Hypercholesterolemia. *Front Genet*. 2022;13:836231.
4. Ali J, Marian. Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation Research* 2017;121:749-770.