



Deutscher Ethikrat
Donnerstag, 22.03.2012

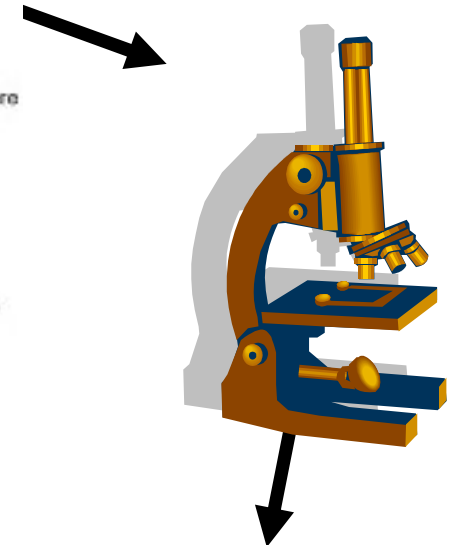
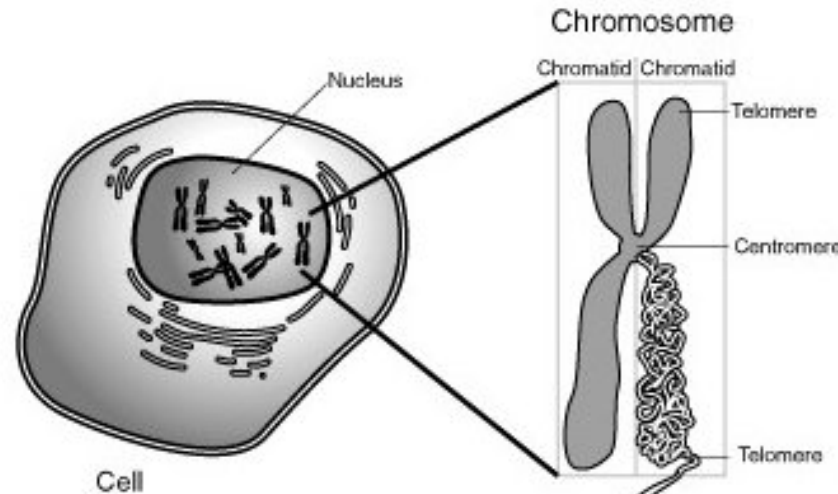
Neue Möglichkeiten der genetischen Diagnostik am Beispiel der Zystennieren und anderer Zilienerkrankungen

Carsten Bergmann

carsten.bergmann@bioscientia.de

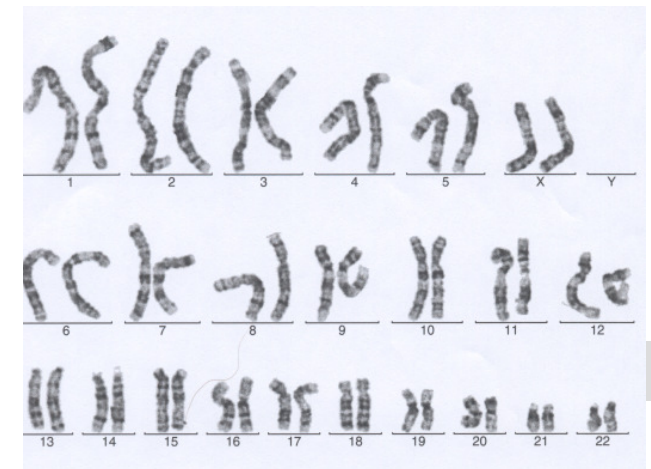
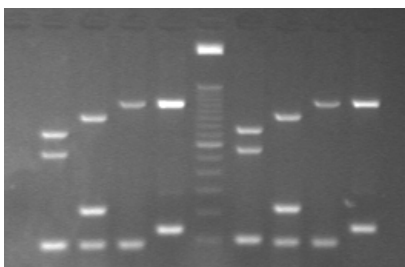
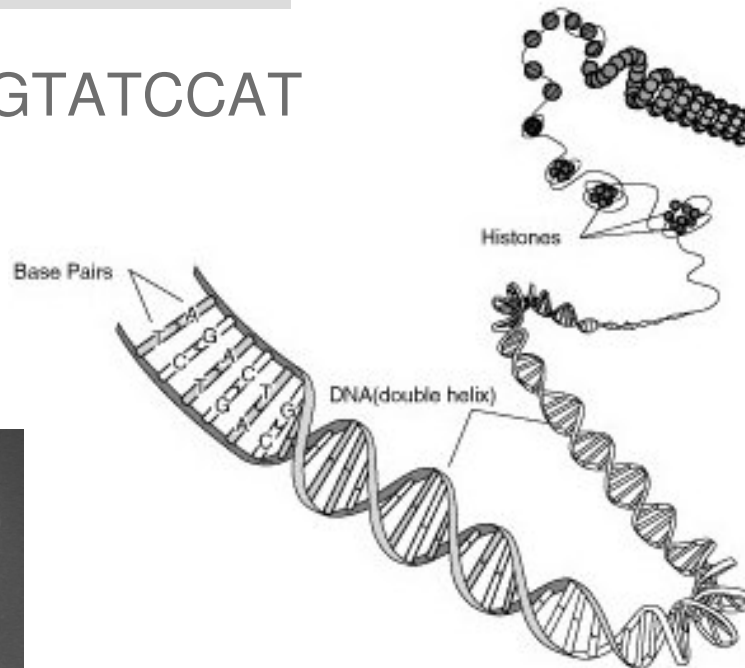
Strukturierte Vorgehensweise in genetischer Diagnostik: Was untersuche ich und was kann ich mit der jeweiligen Methode erreichen?

Zytogenetik



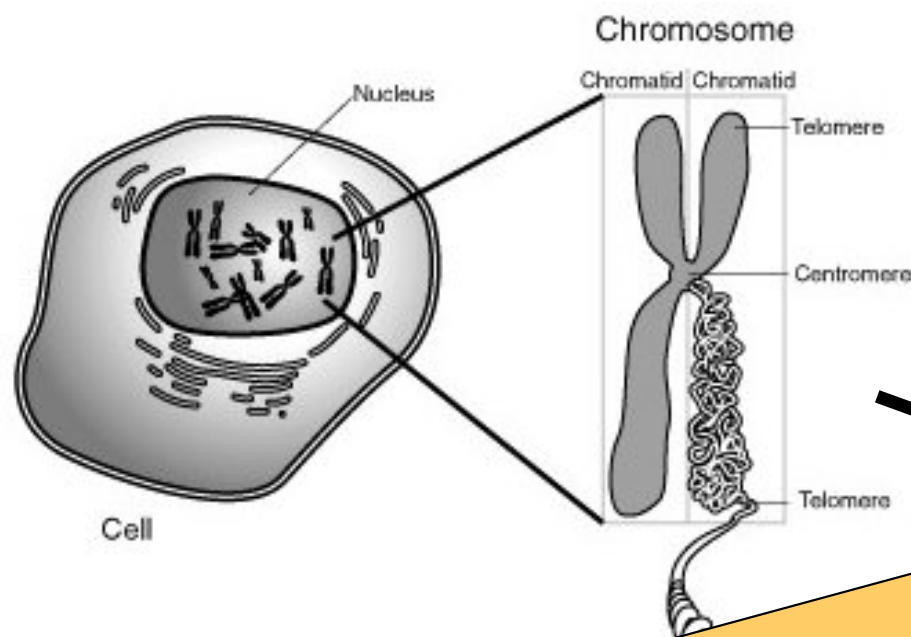
Molekulargenetik

GGCTTTA**A**GTATCCAT





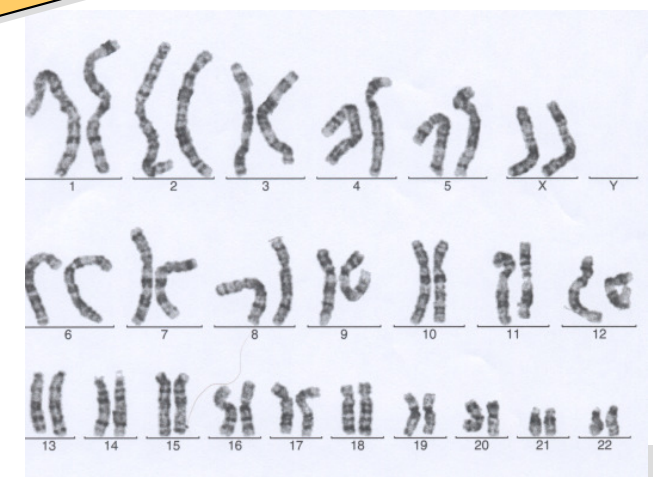
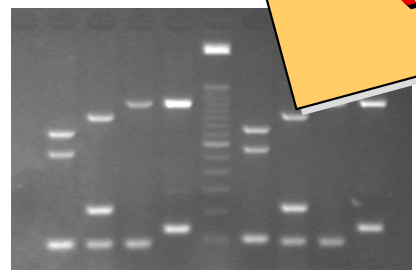
Zytogenetik



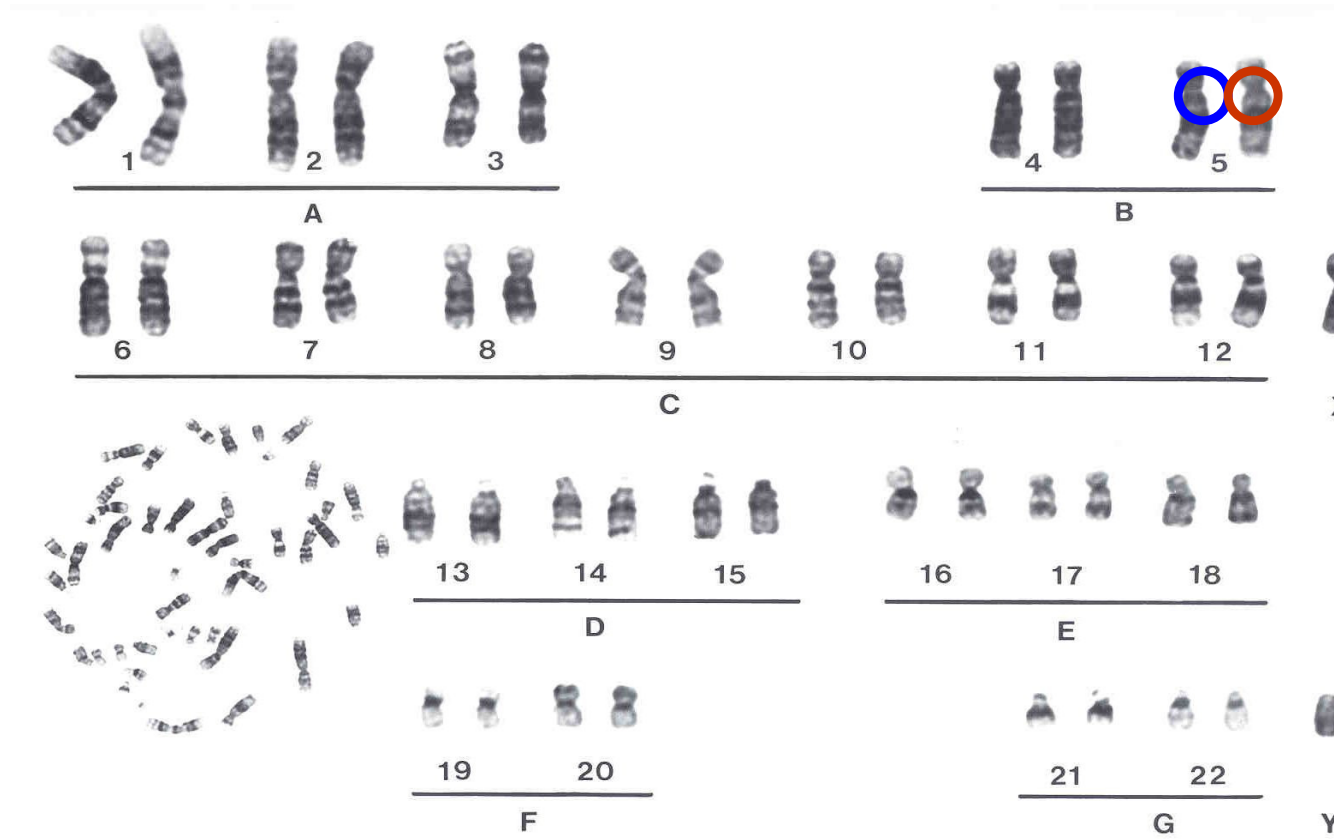
Molekulargenetik

GGCTTTAAGTATCC

**Klinische Informationen essentiell
(Interdisziplinäre Zusammenarbeit)**



Mensch 20.000-25.000 Gene

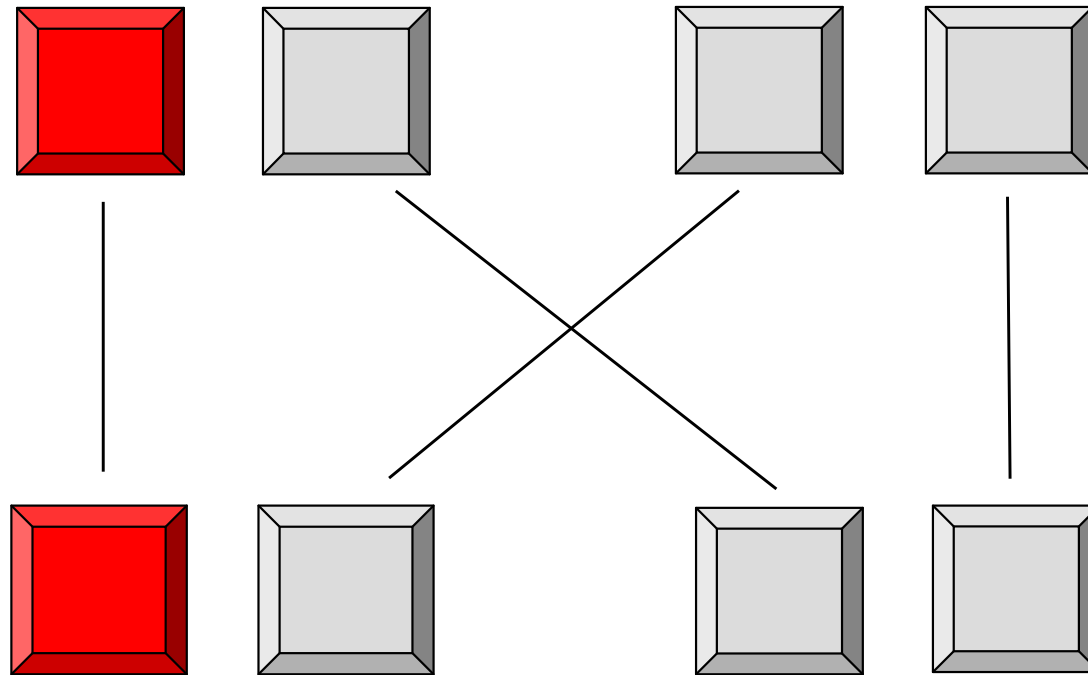


In der Regel
paarige
Erbanlagen



Autosomal dominante Vererbung

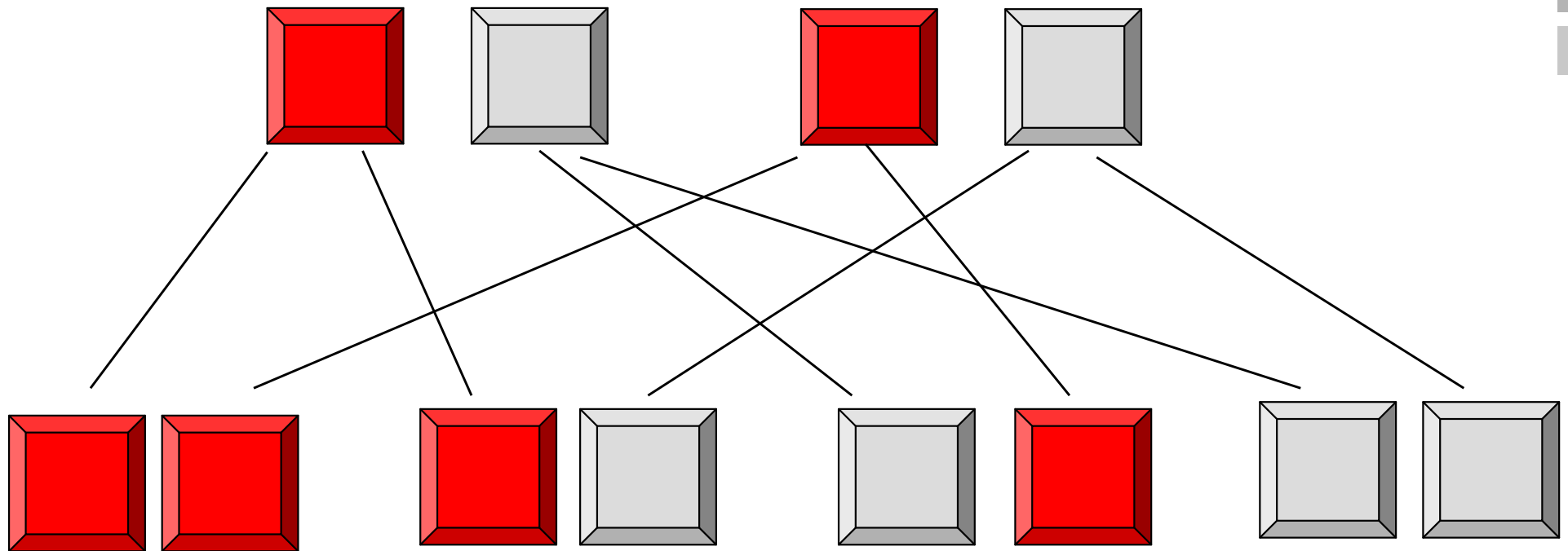
Ein Elternteil in der Regel
Anlageträger und krank



Kinder 50%iges Risiko „ungünstige“ Anlage zu erben

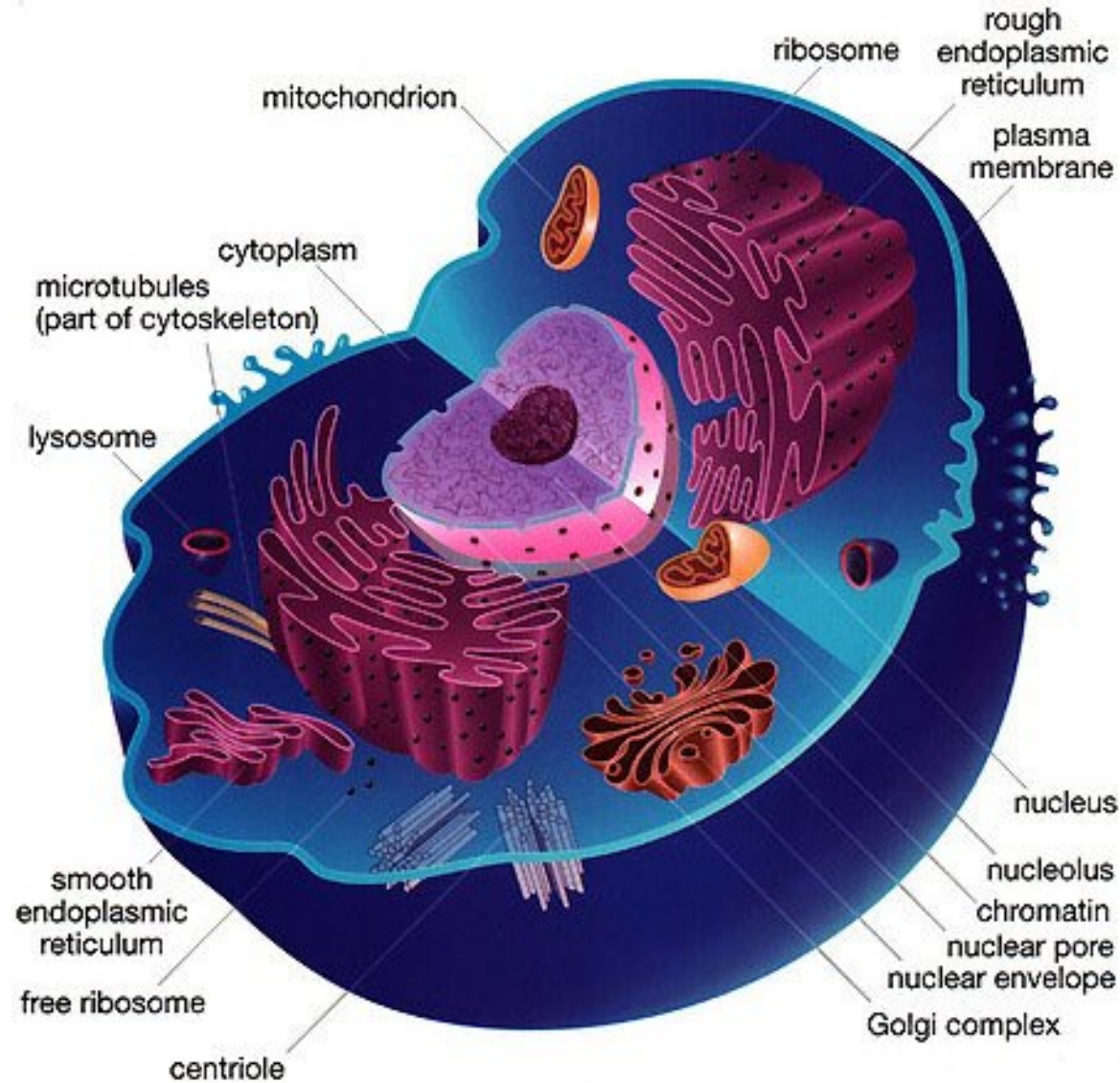
Autosomal rezessive Vererbung

Vater und Mutter jeweils gesund und mischerbige (heterozygote) Anlageträger

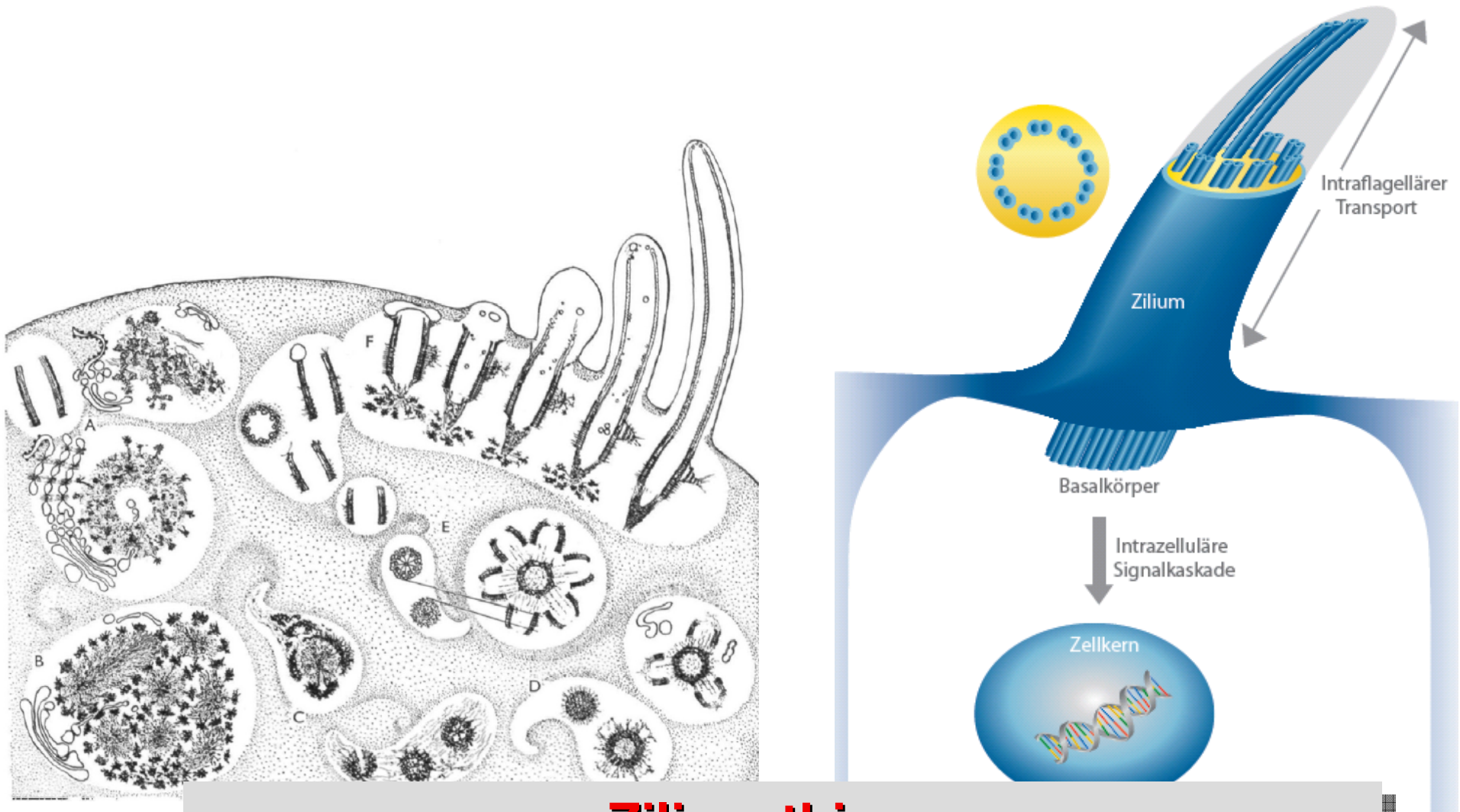


Kinder 25%iges Risiko beide „ungünstigen“ Anlagen zu erben

Menschliche Zelle und ihre Organellen



Zilien auf Oberfläche nahezu jeder Zelle

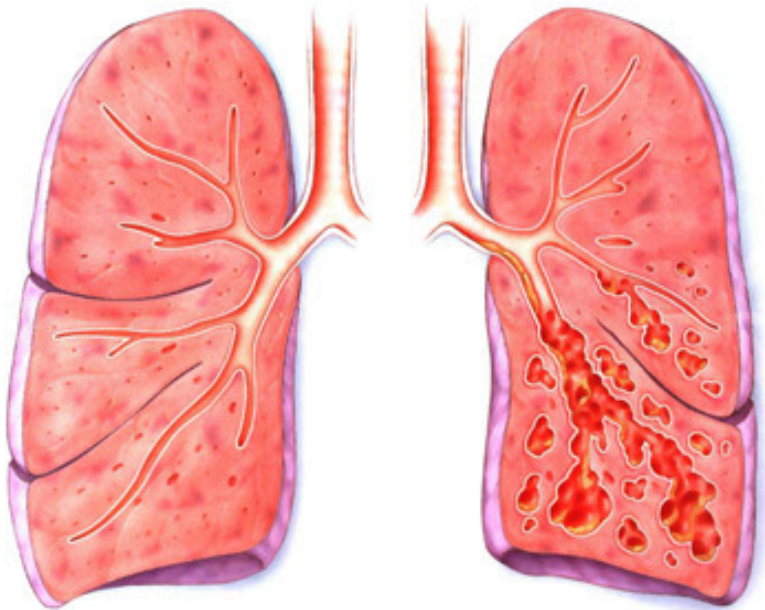


Barr FA, J C

**Ziliopathien -
Neues Ordnungsprinzip für breites Spektrum
genetischer Erkrankungen**

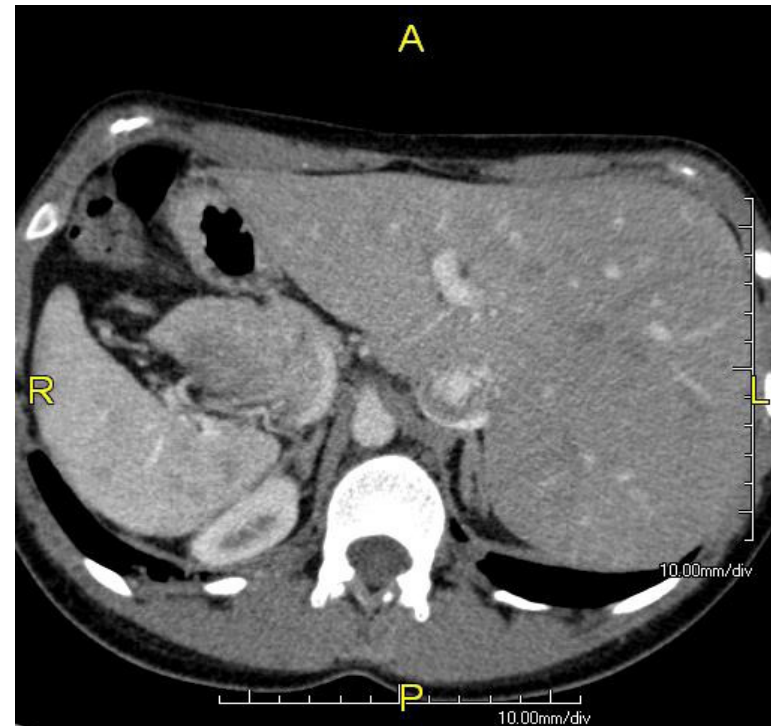
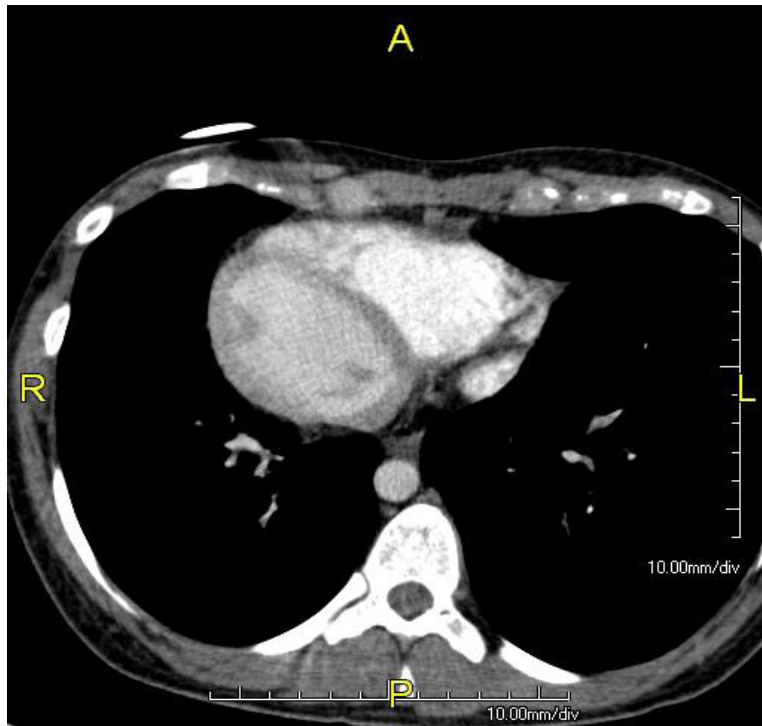
Primäre ziliäre Dyskinesie (PCD)

- Defekt motiler respiratorischer Zilien
 - ⇒ Beeinträchtigte mukoziliäre Clearance
 - ⇒ Bronchiektasen



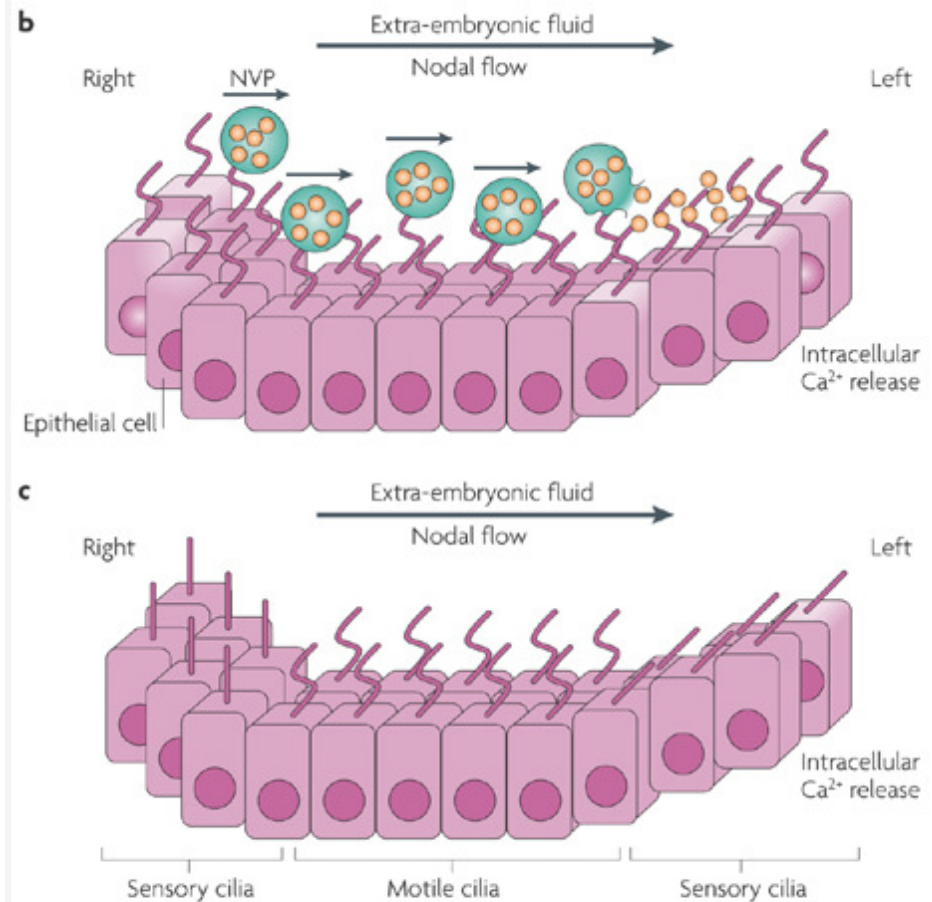
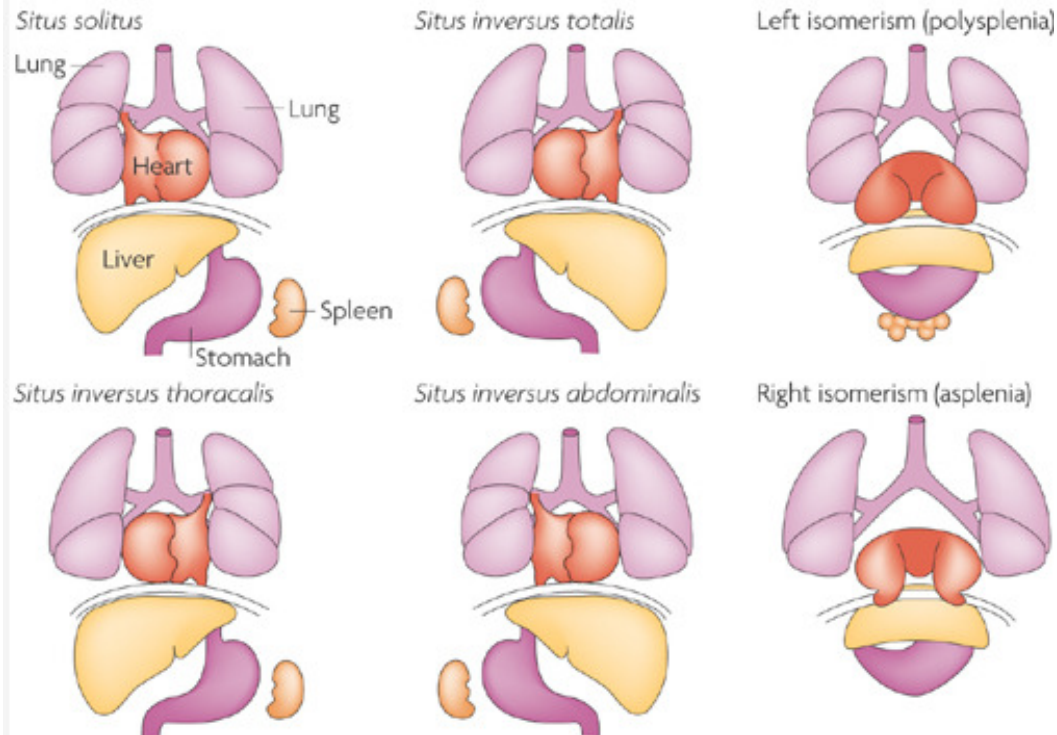
Primäre ziliäre Dyskinesie (PCD)

- Situs inversus bei 50% aller PCD-Patienten (Kartagener-Syndrom)
- Fertilitätsstörungen



Einige PCD-Patienten zeigen weitere Heterotaxie-Merkmale

a Laterality defects

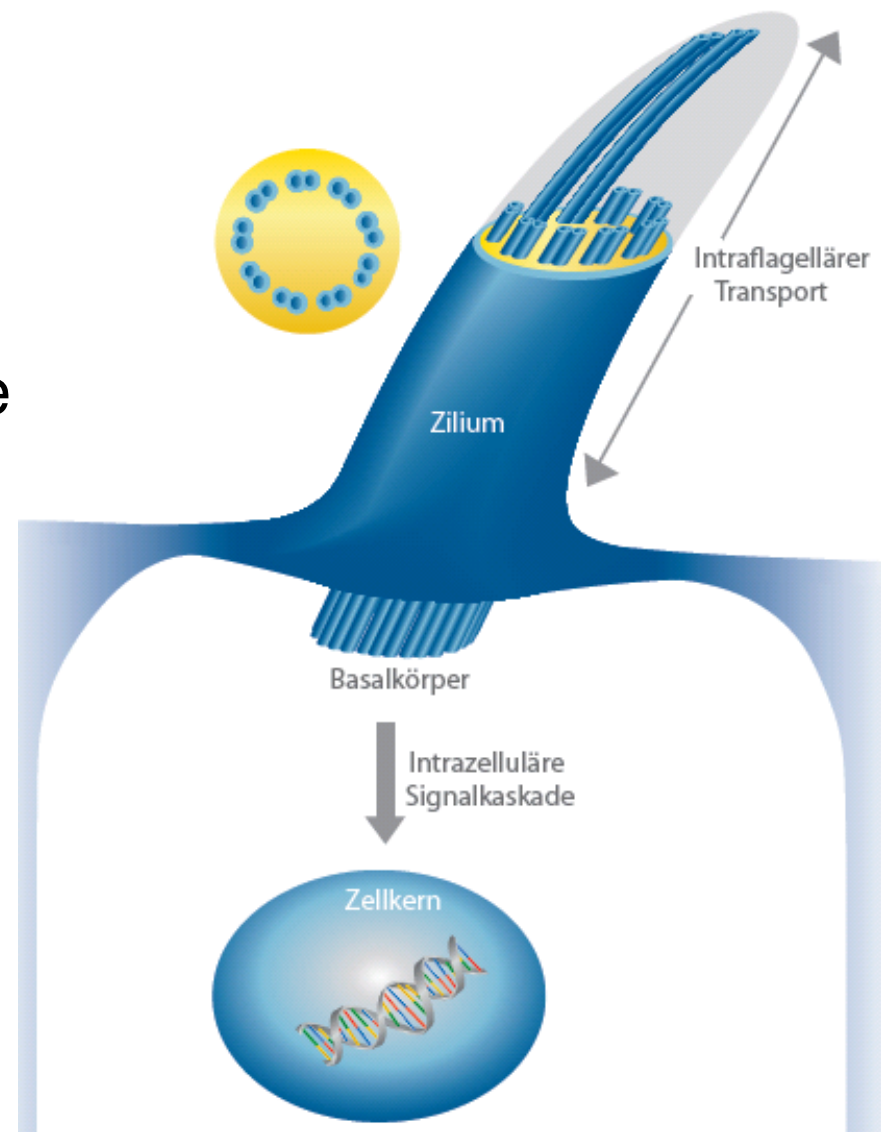


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

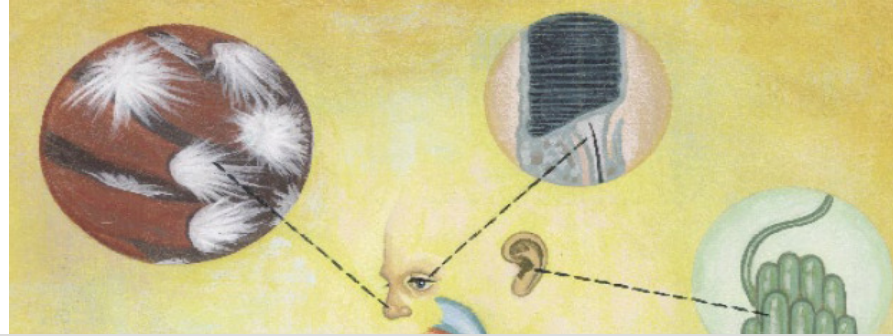
Fliegau et al.,
Nat Rev Mol Cell Biol 2007

Zilienfunktionen

- Links-Rechts-Achsenbildung
- Detektion sensorischer Reize
- Kontrolle zahlreicher Signalwege
- Zellteilungsprozesse



Breites klinisches Spektrum bei Zilienerkrankungen



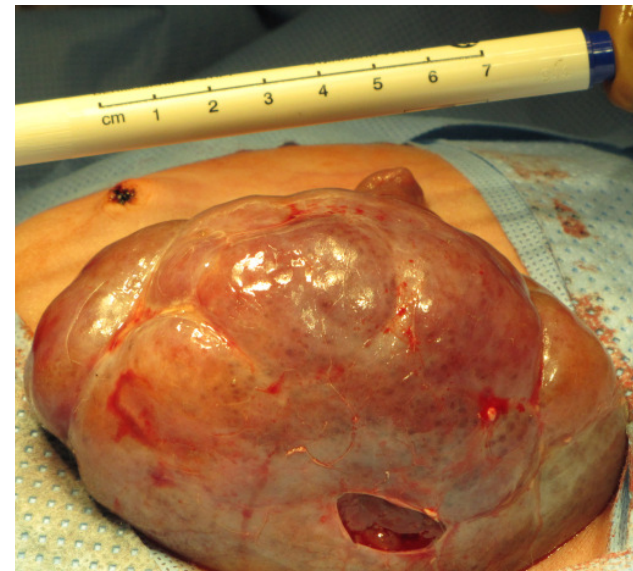
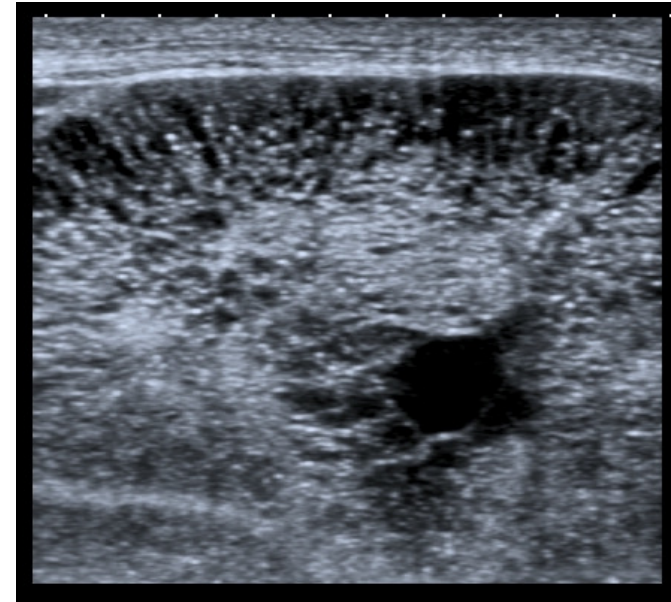
**Zystennieren:
Vorreiterrolle in der Aufklärung der Ziliopathien**



Gardiner MB, *HHMI* 2005
(Illustration by David Brinley)

Autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD/ PKHD1)

- Manifestation meist perinatal
- Häufig Potter-Sequenz
- Vergrößerte hyperechogene Nieren
- Pädiatrische Erkrankung, aber auch Erwachsene betroffen

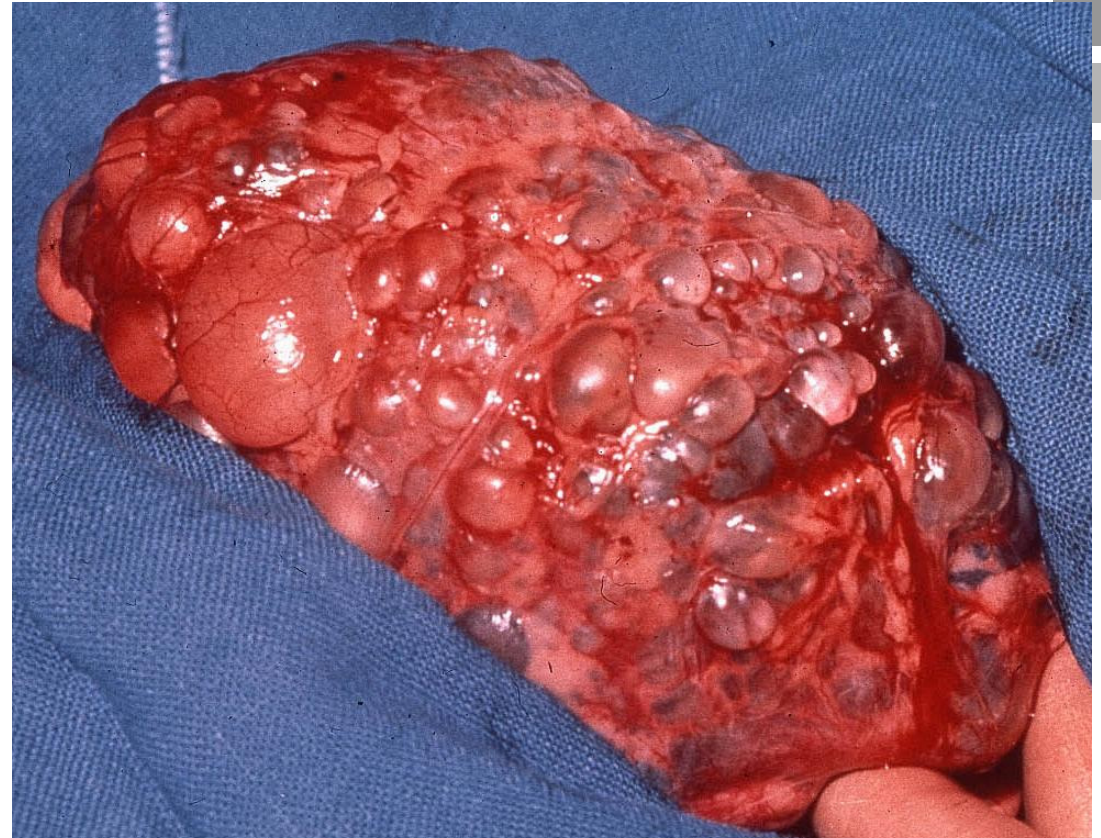


Fotos freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:
Anja Büscher, Rainer Büscher, Udo Vester, Steffi Weber
(Unikinderklinik Essen)

**Rezessive polyzystische Nieren (ARPKD):
Klinische Überlappung zur
dominanten Zystennieren-Form (ADPKD)**

Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)

- Prävalenz 1:500-1000
- Klinische Merkmale i. A. erst in 3./4. Lebensdekade
- Extrarenale Manifestationen
 - Leberzysten
 - Intrakranielle Aneurysmen
- PKD2 milder als PKD1 (Nierenversagen 74 J. vs. 54 J.)
- Große klinische Variabilität (selbst intrafamiliär)

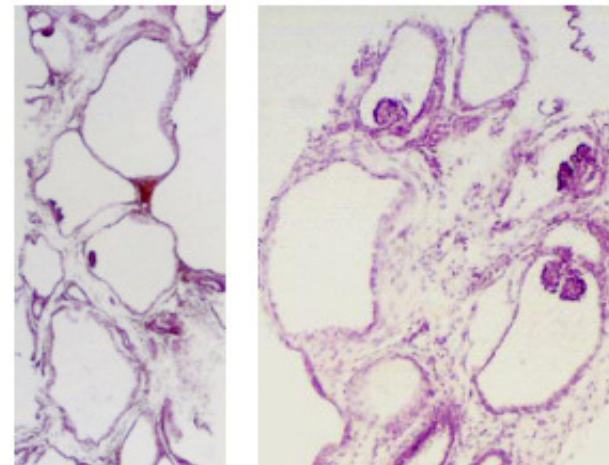
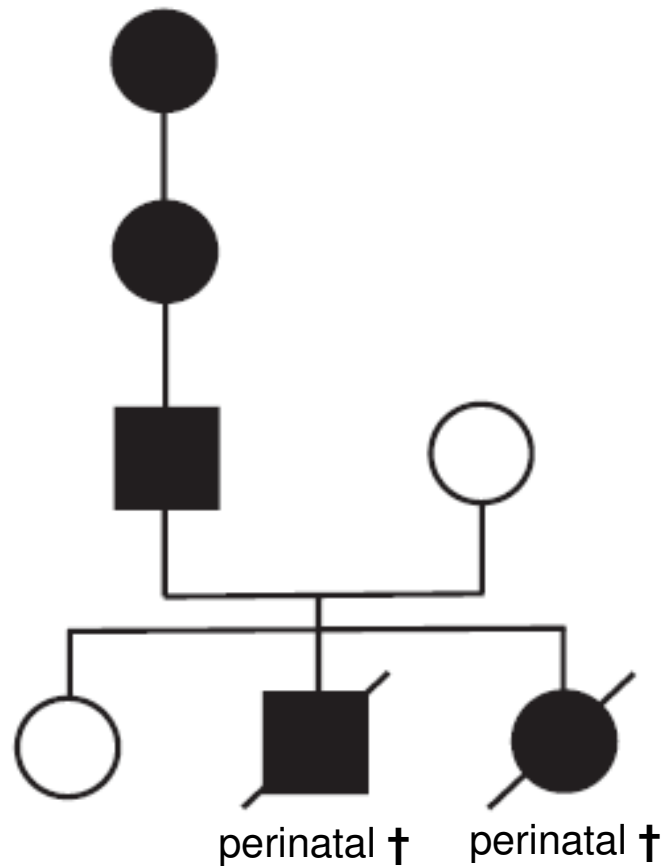


Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)

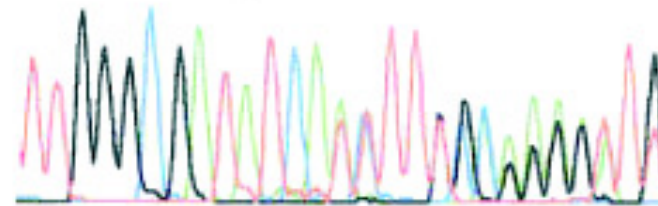
- Prävalenz 1:500-1000
- Klinische Merkmale i. A.
 - erst nach 40 Jahren
 - ~ 2% der Patienten sehr schwere, frühmanifeste (u. U. pränatale) Verlaufsform
 - ⇒ **Wichtigste Differenzialdiagnose der ARPKD**
 - Intrakranielle Aneurysmen
- PKD2 milder als PKD1
(Nierenversagen 74 J. vs. 54 J.)
- Große klinische Variabilität
(selbst intrafamiliär)



Frühe und schwere Formen bei dominanten Zystennieren



c.1934_1935delACinsT
p.Asn645fs



Mut TTGGGCGATATCATTTTGCAGAGATTG
WT TTGGGCGATATCAACTTTGCAGAGATT

**Intrafamiliäre phänotypische Variabilität
spricht klar gegen eine Genotyp-Phänotyp Korrelation
allein basierend auf Art und Lokalisation der familiären
Keimbahnmutation in *PKD1* oder *PKD2***

Klinische Variabilität („variable Expressivität“)

Modifizier

Gleiche
Mutation(en)



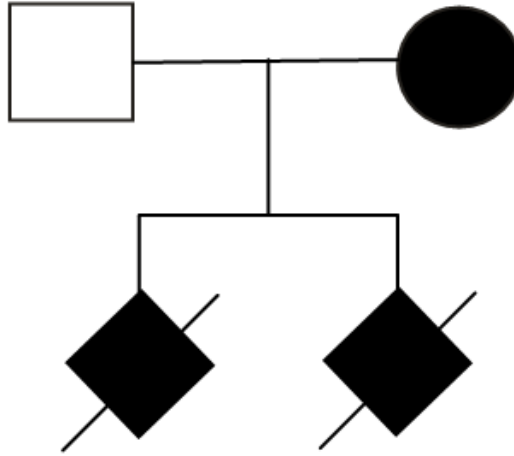
Unterschiedliche Schwere
der Erkrankung

**Epistase („Oligogenie“) -
Einfluss weiterer Gene auf klinisches Bild**

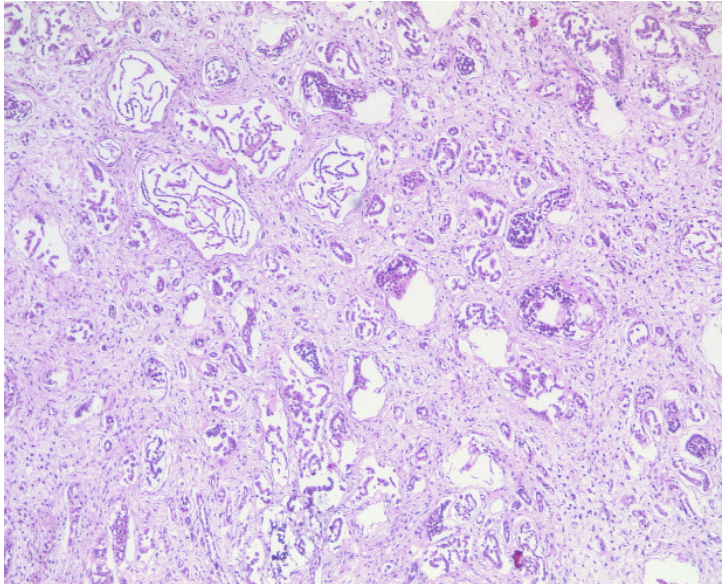
Frühe und schwere Formen der Zystennieren

Familien mit Zystennieren,
bei denen nur die schwer betroffenen Familienmitglieder
weitere PKD-Mutationen ergänzend zur
bekannten familiären Mutation tragen

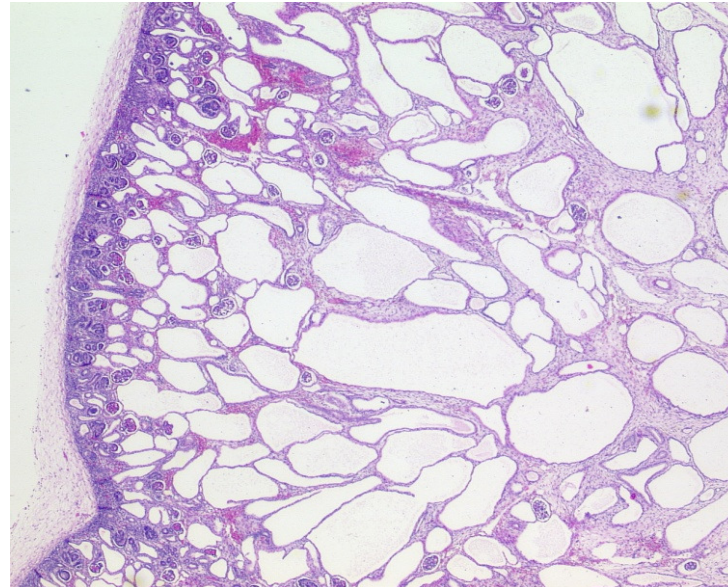
Zystennieren



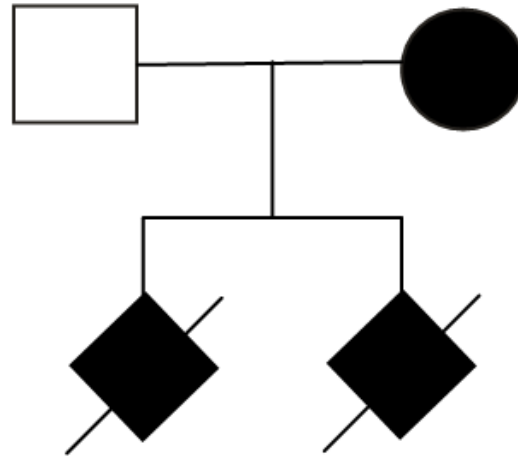
Fetus 1



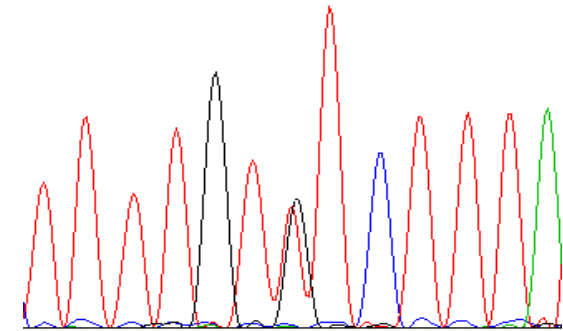
Fetus 2



Zystennieren

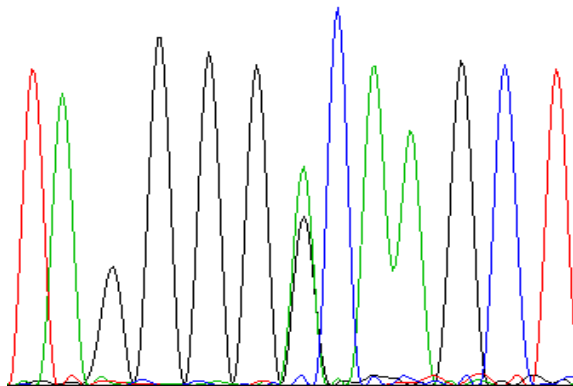


Nur Mutter und schwerer betroffener Fet 2



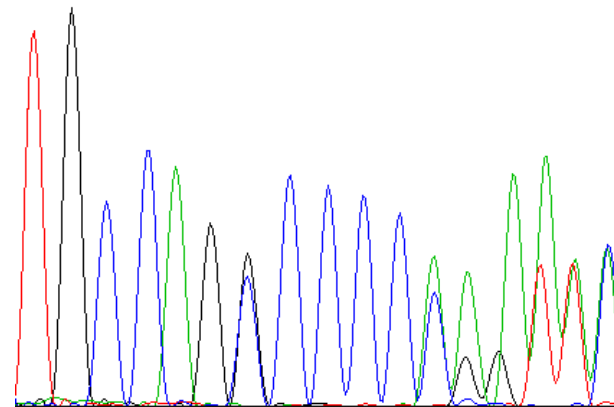
PKD2
c.1444T>G (p.Phe482Val)

T A G G G G A C A A G C T



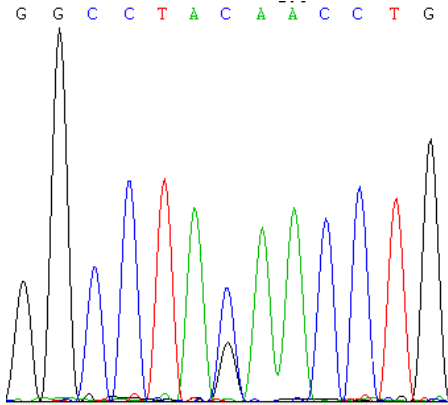
PKHD1
c.5912G>A
(p.Gly1971Asp) (P)

T G C C A G S C C C C M A A W W M

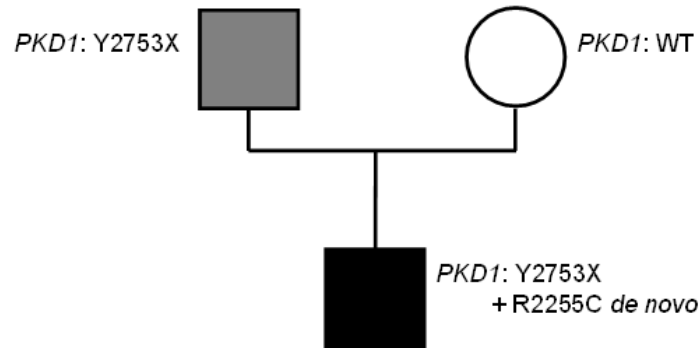


PKHD1
c.3761_3762delCCinsG
(p.Ala1254fs) (M)

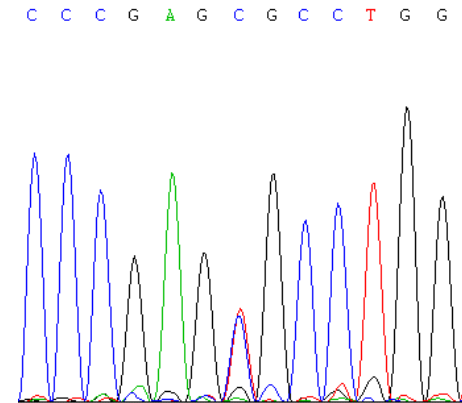
Frühmanifeste, schwere Verläufe bei ADPKD



PKD1:
c.8259C>G (p.Y2753X) (P)



Zusätzlich *de novo* PKD1 Mutation nur beim schwer betroffenen Kind



PKD1:
c.6763C>T (p.R2255C) *de novo*

R2255C

Human	2238	DTPLTQSIQANVTVAPERLVPIIEGGSYRVWSDTRDLVLD
Dog	2239	DTPLARSIQANVTVPERLVPIVEGGSYRVWSDTQDLVLD
Mouse	2234	DTPLARSIQANVTVAAERLVPIIEGGSYRVWSDTQDLVLD
Rat	2223	DTPLARSIQANVTVAAERLVPIIEGGSYRVWSDTQDLVLD
Chicken	2207	DTPLSKSIFANVTMIPSKLVPIIDGGSYRVWSNTQDLILD
Xenopus	1839	DTPLSRNSFANVTMMPSKLVPIIDGGSYRVWSKSRDLMLD
Fugu	2310	NVPLKKAACLQIGVMAARLMPPIEGGTYRVWSRTQDLQLS

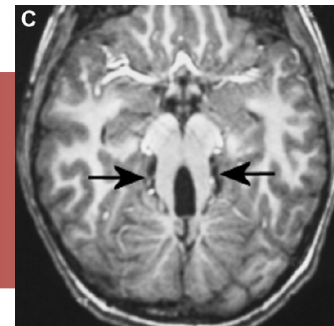
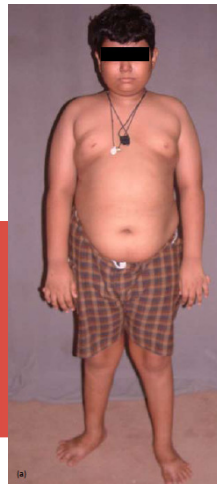
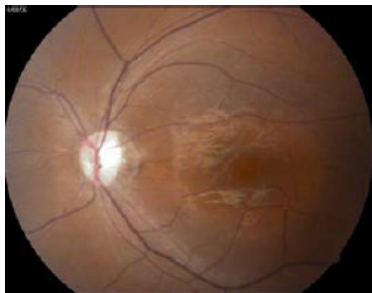
Variant	SIFT		PolyPhen		AlignGVGD		Consensus	Comment
	GD	VS	MG	VS	MG	VS	MG	
R2255C	178	0	HLP	2,43	HLP	C55	HLP	Novel

Klinische Variabilität (“variable Expressivität”) bei Ziliopathien

Mutationen im gleichen Gen



Unterschiedliche Schwere der Erkrankung



Breites klinisches Spektrum mit Überlappungen und fließenden Übergängen zwischen unterschiedlichen Zilienerkrankungen

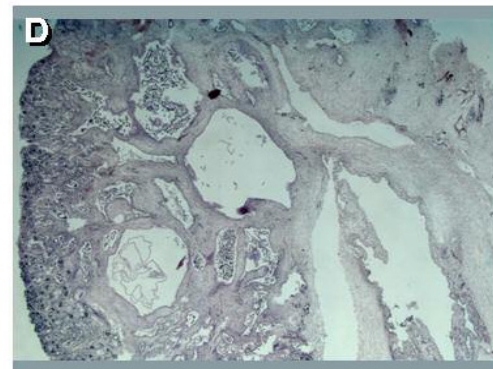
Ziliopathien – Mutationen im gleichen Gen lösen unterschiedliche Krankheitsbilder aus

Mutations of the *CEP290* Gene Encoding a Centrosomal Protein Cause Meckel-Gruber Syndrome

Valeska Frank,¹ Anneke I. den Hollander,² Nadina Ortiz Bröchle,¹ Marijke N. Zonneveld,² Gudrun Nürnberg,^{3,4} Christian Becker,^{3,4} Gabriele Du Bois,⁵ Heide Kendziorra,⁶ Susanne Roosing,² Jan Senderek,¹ Peter Nürnberg,^{3,7} Frans P.M. Cremers,² Klaus Zerres,¹ and Carsten Bergmann^{1*}

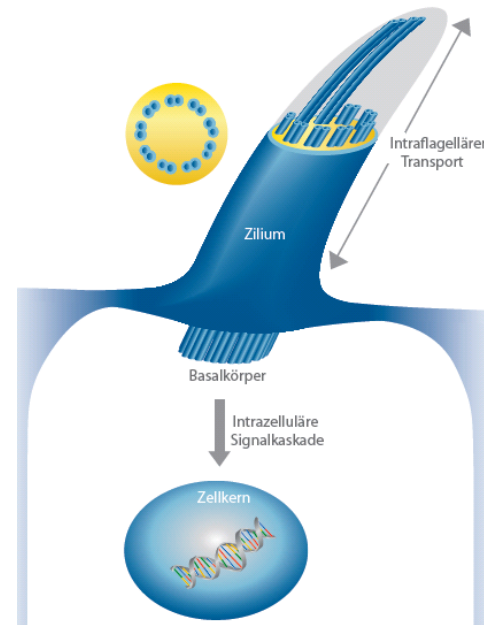
Mutations in the *CEP290* (*NPHP6*) Gene Are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis

Anneke I. den Hollander,* Robert K. Koenekoop,* Suzanne Yzer, Irma Lopez, Maarten L. Arends, Krysta E. J. Voesenek, Marijke N. Zonneveld, Tim M. Strom, Thomas Meitinger, Han G. Brunner, Carel B. Hoyng, L. Ingeborgh van den Born, Klaus Rohrschneider, and Frans P. M. Cremers



Klinische Variabilität (“variable Expressivität”) bei Ziliopathien

Keine überzeugenden Genotyp-Phänotyp Korrelationen



Mutationen in weiteren Genen des Zilien-Netzwerkes führen zur Aggravierung des Phänotyps (“Mutationslast-Theorie”)

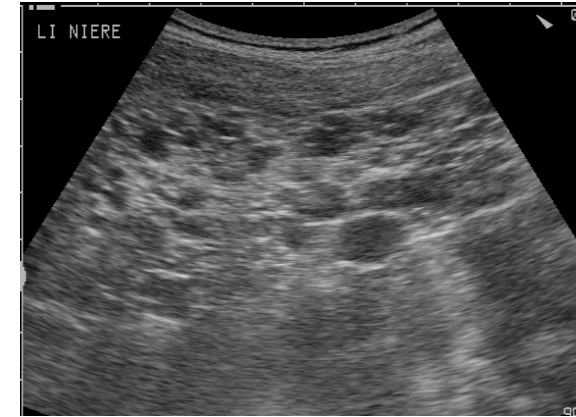
“Modell-Ziliopathie“: Bardet-Biedl Syndrom



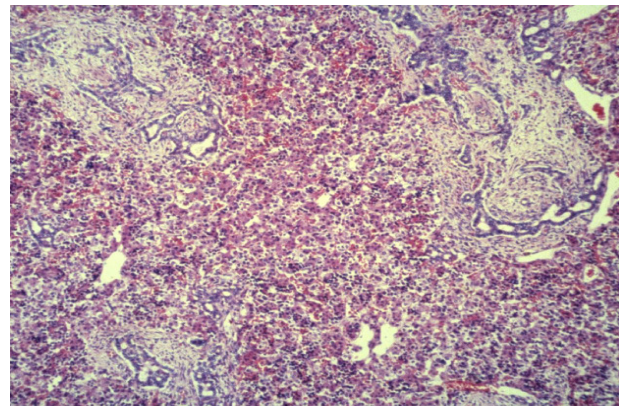
Adipositas u. Polydaktylie



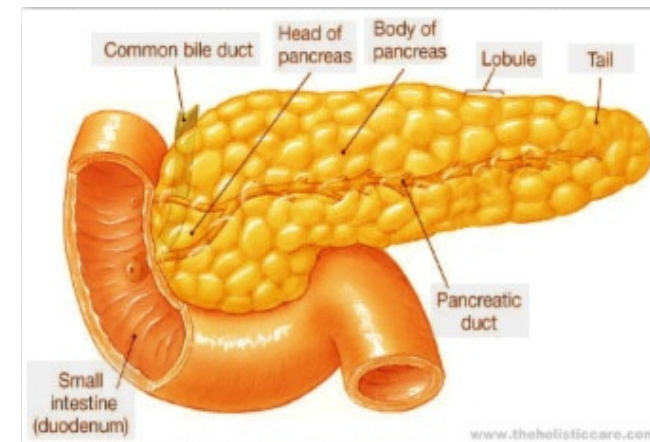
Retinitis pigmentosa



Zystische Nierenveränderungen



Kongenitale Leberfibrose

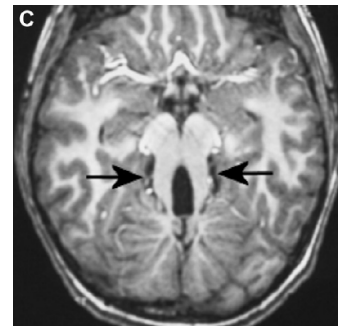
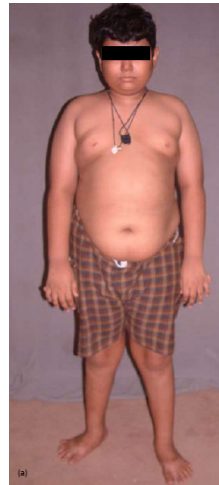
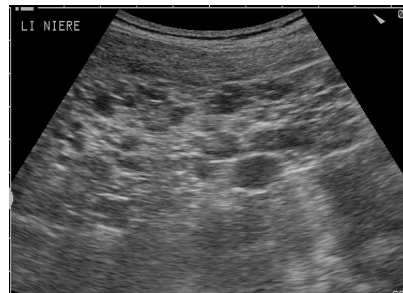
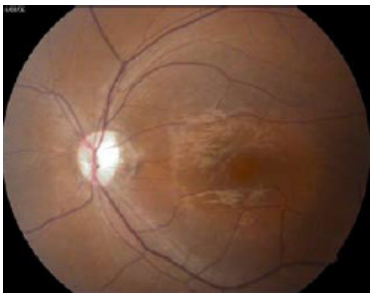


Diabetes mellitus u. andere endokrinologische Auffälligkeiten

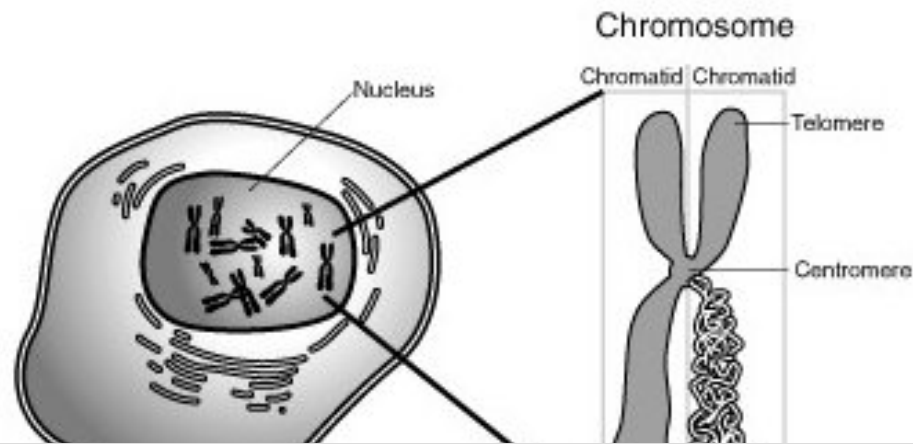
Entwicklungsverzögerung/mentale Retardierung

Eindeutige klinisch-genetische Diagnosestellung häufig schwierig

Klinische und genetische Heterogenie der Zilienerkrankungen

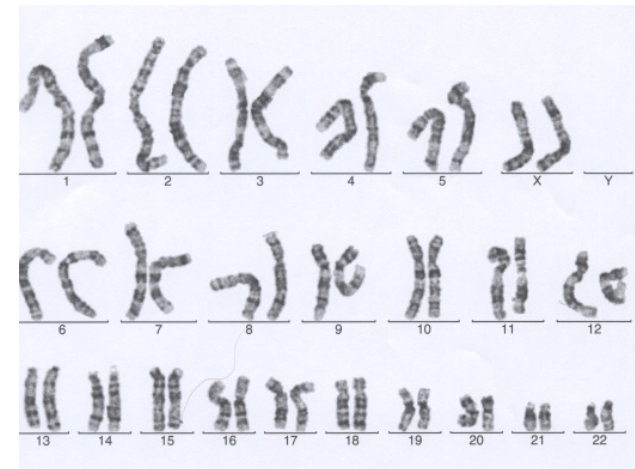
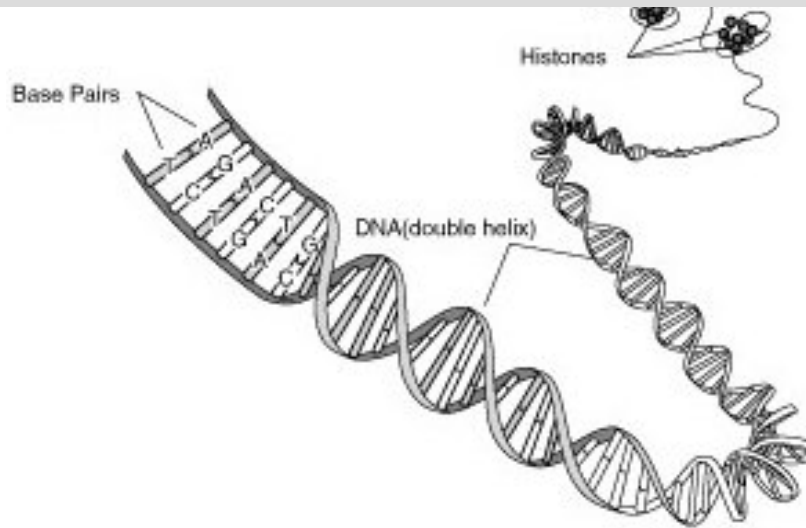


**Eher Regel als Ausnahme, dass viele, häufig Dutzende
verschiedener Gene in Frage kommen**

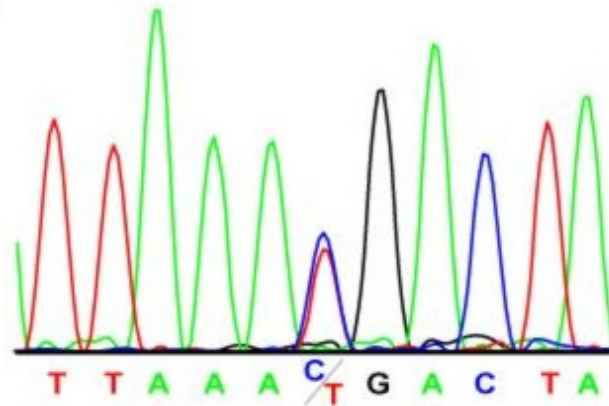


Heterogenie des Bardet-Biedl-Syndroms

16 Gene z. Zt. bekannt (*BBS1-16*)



Analyse mittels herkömmlicher Sanger-Sequenzierung i. A. zunehmend ausgeprägter Heterogenie nicht zu leisten



Neue Sequenziertechnologien „Next-Generation Sequencing (NGS)“

Sequencing technologies — the next generation

Michael L. Metzker

Never has the state of DNA sequencing technology been in greater flux than today. The steadfast approach of fluorescence-based Sanger sequencing appears to have reached its limit for technological improvements. It is being replaced by emerging technologies that promise faster and cheaper sequence information in far greater volumes than ever before. These next generation methodologies push back the limits of possibility, enabling research that would be impractical and too expensive using the Sanger paradigm. With this

transition come new possibilities in the field of large-scale genomic science, coupled with new challenges in data storage and analysis. Here, the technical details of commercially available, next generation sequencing platforms are highlighted, along with their advantages and disadvantages. Gone are the days of a single platform capable of addressing the needs of most researchers. Investigators must now identify, from several DNA sequencing approaches, the one platform — or combination thereof — that best serves their application.

Metzker ML, *Nat Rev Genet* 2010

Gute Bioinformatik bei „Next-Generation Sequencing (NGS)“ essentiell



**Neue Sequenziertechnologien
„Next-Generation Sequencing (NGS)“
in der Diagnostik**

Next-Generation Sequencing (NGS) Panel für alle bekannten Zilienerkrankungen

**Breites klinisches Spektrum mit
Überlappungen und fließenden Übergängen zwischen
unterschiedlichen Zilienerkrankungen**

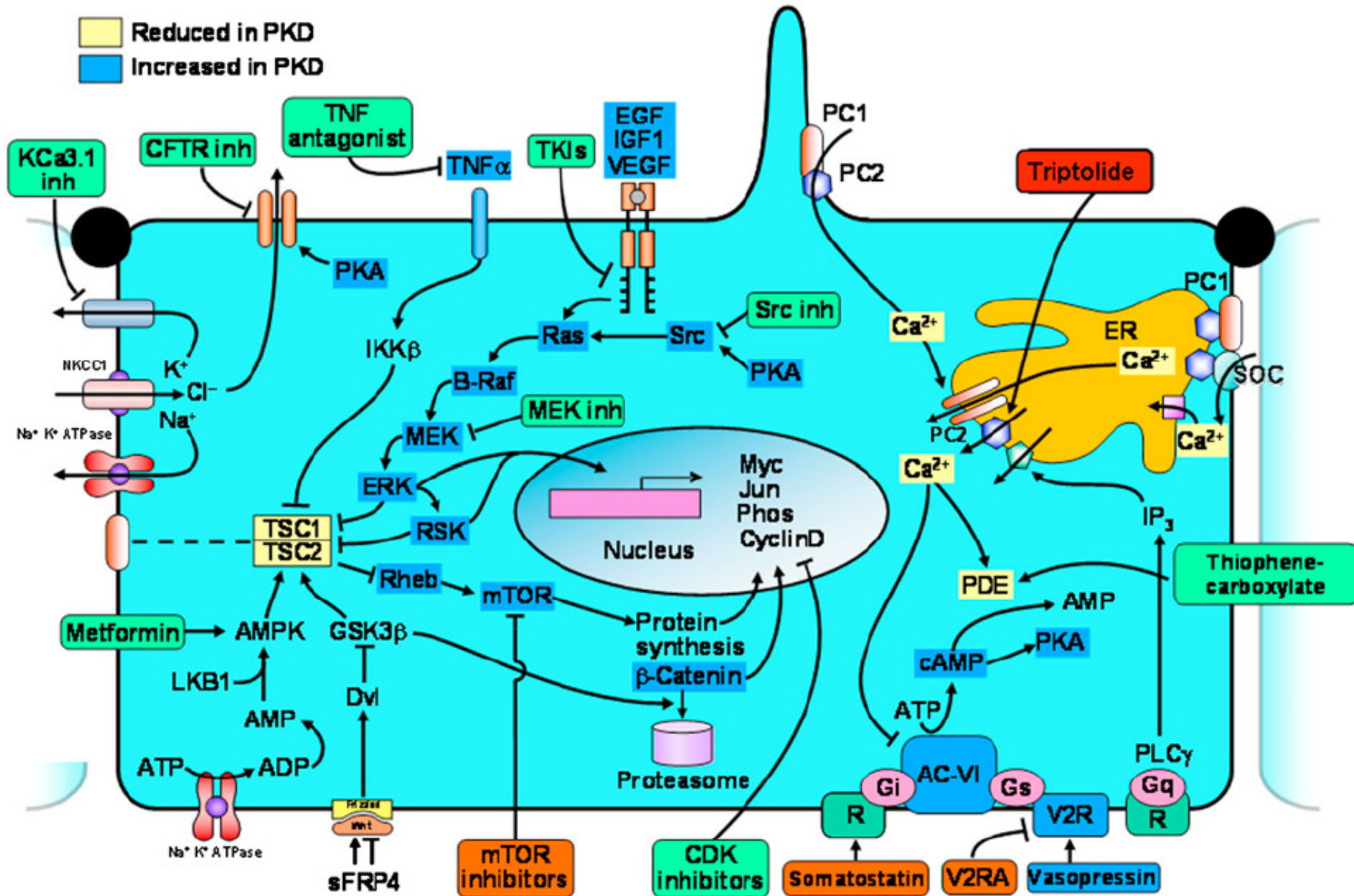
„Zilien“-Panel

131 Gene

2412 Exons

Zielsequenz 644 Kilobasen (kb)

Therapieansätze bei Zystennieren



Zusammenfassung

- Häufiges Phänomen in der Humangenetik:
Breites klinisches Spektrum mit Überlappungen und fließenden Übergängen zwischen verschiedenen Krankheitsbildern
(Beispiele: Zystennieren, Ziliopathien, etc.)
- Ein Erklärungsansatz für klinische Variabilität sind zusätzliche Mutationen, die zu schwererem Phänotyp beitragen
(Mutationslast bestimmt klinisches Bild mit)
- Deutlich verbesserte Analysemöglichkeiten durch NGS
(Next-Generation Sequencing, massively parallel sequencing)
- Gezielte parallele Untersuchung einer Vielzahl von Krankheitsgenen mittels definierter NGS-Panels möglich



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit !

carsten.bergmann@bioscientia.de

