

Molekulargenetische und zytogenetische Diagnostik

Redaktion: H.-G. Klein

Hochdurchsatz-Sequenzierung in der Humangenetischen Diagnostik

Next-generation sequencing in genetic diagnostics

Saskia Biskup*

Praxis für Humangenetik und CeGaT GmbH, Tübingen, Deutschland

Keywords: diagnostic panels; next-generation sequencing; SOLiD 4 technology.

Zusammenfassung

Die Einführung der Hochdurchsatz-Sequenzierung in die humangenetische Diagnostik erfordert ein Umdenken auf vielen Ebenen mit überwiegend positiven, teilweise sogar revolutionären Aspekten. Diese sollen in diesem Beitrag neben den ebenso wichtigen kritischen Gesichtspunkten dargestellt werden. Die Zeiten, in denen vom Arzt indizierte oder vom Ratsuchenden gewünschte genetische Diagnostik sich über Monate bis Jahre bis zum mitgeteilten Ergebnis hinzog, gehören bereits der Vergangenheit an. Deutschland hat sich mit dem seit Kurzem in Kraft getretenen Gendiagnostikgesetz für die bevorstehende Revolution in der humangenetischen Diagnostik gerüstet. Im Folgenden soll anhand von vier häufigen Erkrankungen mit erblicher Komponente (Demenz, Parkinson-Krankheit, Epilepsie und erbliche Augenerkrankung) ein Ausblick in die greifbare Zukunft der humangenetischen Diagnostik gegeben werden.

Schlüsselwörter: Diagnostik-Panels; Hochdurchsatz-Sequenzierung; SOLiD 4 Technologie.

Abstract

The introduction of next-generation sequencing technologies in human genetic diagnostics is a challenge to many of its aspects. It is mainly positive, even revolutionary, which will be discussed as well as its critical aspects. It used to take several months or years to complete genetic testing. This already belongs to the past. As sequencing technologies are progressing at an extremely high speed, Germany recently introduced the new Gen Diagnostics Law in February 2010. Four common diseases with genetic contribution (dementia, Parkinson syndrome, epilepsy, and hereditary eye diseases) will be used to exemplify the latest development of human genetic testing.

*Korrespondenz: Dr. med. Dr. rer. nat. Saskia Biskup, Praxis für Humangenetik und CeGaT GmbH, Paul-Ehrlich-Str. 17, 72076 Tübingen, Deutschland
Tel.: +49 7071-5654400
Fax: +49 7071-5654422
E-Mail: saskia.biskup@humangenetik-tuebingen.de

Einleitung

Genetische oder molekulargenetische Diagnostik bezeichnet die Untersuchung von einzelnen Genen, die, wenn sie verändert sind, mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Manifestation einer Erkrankung führen oder die Ursache einer Erkrankung sind. Es ist insbesondere dann an eine genetische Ursache zu denken, wenn die Betroffenen in jungem Alter erkranken. Die Gesamtmenge des Erbgutes eines Menschen wird mit ca. 3 Milliarden DNA-Basen angegeben und kodiert für 20 bis 30.000 Gene. Eine Veränderung im Erbgut kann von Generation zu Generation weitergegeben werden oder neu entstanden sein. Man unterscheidet Veränderungen in den Keimzellen, die vererbt werden von somatischen Veränderungen, zum Beispiel in Tumorzellen. Die frühere Bezeichnung Mutation (Veränderung im Erbgut) soll hier durch „Variante“ ersetzt werden, um der Komplexität besser gerecht zu werden. Es gibt „sicher krankheitsauslösende“ Varianten im Erbgut, sogenannte „pathogene“ Varianten, es gibt aber auch Varianten, deren Bedeutung nicht eindeutig geklärt ist. Dazu gehören die „wahrscheinlich pathogenen“, die „wahrscheinlich nicht pathogenen“, die „wahrscheinlich gutartigen“, die „sicher gutartigen“ und zuletzt die zunehmend größer werdende Gruppe der Varianten unklarer Signifikanz (VUS).

Den ersten großen Katalog von Genen, die, wenn verändert mit einer Krankheit assoziiert sind, stellte der amerikanische Humangenetiker Viktor McKusick (1921–2008) in der von ihm ins Leben gerufenen Datenbank OMIM (Online Inheritance In Man) zusammen. Er ist damit zum Begründer der medizinischen Genetik geworden. Die Datenbank wächst in großem Umfang sogar täglich und wird an der Johns Hopkins Universität in Baltimore, USA, gepflegt. Veränderungen in 10% aller menschlichen Gene konnten bislang mit bekannten Phänotypen in Verbindung gebracht werden. Das ist vergleichsweise viel und erklärt dennoch den Großteil der genetischen Variabilität im Menschen nicht.

Eine genetische Diagnostik ist dann sinnvoll, wenn sie Konsequenzen aus therapeutischer oder prophylaktischer Sicht nach sich zieht oder den Ratsuchenden und seine Familie entlastet. Das Recht auf Nichtwissen besteht zu jedem

Zeitpunkt. Darauf sollte in der genetischen Beratung vor der Testung sowie nach der Testung hingewiesen werden. Im Folgenden soll anhand von Beispielen aus der täglichen Praxis erläutert werden, weshalb die Humangenetik den technologischen Fortschritt als Quantensprung für ihre eigene Disziplin, für den Patienten und für das Gesundheitssystem zu Recht erlebt.

Vom Exom zum Diagnostik-Panel

Die Hochdurchsatz-Sequenzierung erlaubt mittels der heute zur Verfügung stehenden Sequenziermaschinen die gleichzeitige Sequenzierung aller menschlichen Gene innerhalb einer Woche. Das wird als Exom-Sequenzierung bezeichnet; das Exom ist die Gesamtheit aller kodierenden Abschnitte im Genom. Die Sequenzierung eines Exoms ist dann sinnvoll, wenn (i) starke Hinweise für eine genetische Erkrankung vorliegen, (ii) alle bekannten Gene zu der vorliegenden Erkrankung ausgeschlossen wurden und (iii) dieser Ansatz im Rahmen eines Forschungsprojektes von Experten auf diesem Gebiet angewendet und ausgewertet wird.

Ein Diagnostik-Panel hingegen ist die gezielte und gleichzeitige Untersuchung einer Liste von bekannten Genen, die als Ursache einer bestimmten Erkrankung bereits beschrieben sind. Bislang war die genetische Diagnostik in diesen Fällen sehr zeitaufwendig und wurde aufgrund der damit verbundenen hohen Kosten oft nicht durchgeführt.

Ein Diagnostik-Panel grenzt sich von dem rein wissenschaftlichen und explorativen Ansatz einer Exom-Sequenzierung deutlich ab. Das Diagnostik-Panel wird vom ein-sendenden Arzt beauftragt. Es werden ausschließlich die mit der Erkrankung in Zusammenhang gebrachten Gene untersucht. Abschließend wird ein Befund erstellt und an den einsendenden Arzt übermittelt. Dieser Befund enthält detaillierte Angaben über gefundene Varianten, die durch Sanger-Sequenzierung validiert und in Bezug auf die vorliegende Erkrankung interpretiert werden.

Die Anwendung eines Diagnostik-Panels auf einem Hochdurchsatz-Sequenzierer der neuesten Generation ist nur dann sinnvoll, wenn mehrere (möglichst große) Gene für die Erkrankung in Betracht kommen. Einige Beispiele sind erbliche Tumorerkrankungen mit den bekannten Brustkrebs verursachenden Genen *BRCA1* und *BRCA2*, Kardiomyopathien, Herzrhythmusstörungen, familiäre Hypercholesterinämien, mentale Retardierung, Epilepsien, erbliche Augenerkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen. Für die Zusammenstellung der Genliste eines Panels und auch für die spätere Interpretation der Daten ist die Zusammenarbeit mit klinischen Experten unabdingbar. Da die Genlisten von zwei bis über hundert Gene lang sein können, ist die klinische Eingrenzung im Vorfeld wichtig. Nachdem der Patient sein schriftliches Einverständnis gegeben hat, wird seine DNA auf alle in der Genliste enthaltenen Gene angereichert und sequenziert. Die klinische Ausprägung der Erkrankung bestimmt dann die Reihenfolge der auszuwertenden Gene.

Bevor ein Diagnostik-Panel auf dem Markt zu Zwecken der Diagnostik angeboten werden kann, muss es zunächst validiert werden. Im Rahmen der Validierung werden Patienten

mit bereits bekannten Veränderungen auf dem neuen Panel „nach“ sequenziert. Die Anforderung dabei ist, dass die bekannten Veränderungen zu 100% mittels des Panels gefunden werden. Weiterhin muss die Anreicherung der genomischen Abschnitte effizient, spezifisch und reproduzierbar sein. Erst dann ist die Anwendung des Diagnostik-Panels für eine klinische Fragestellung möglich.

Ist sie dann auch sinnvoll? Diese Frage soll anhand von drei Beispielen erläutert werden. Dr. Detlef Böhm (CeGaT GmbH), ein Pionier in der Etablierung neuer Methoden in der humangenetischen Diagnostik [2], und die Praxis für Humangenetik in Tübingen haben zusammen mit klinischen Partnern und mit Applied Biosystems/life technologies die erblichen Augenerkrankungen, Epilepsien und neurodegenerative Erkrankungen bei der Entwicklung von Diagnostik-Panels in den Vordergrund gestellt. Das Ziel ist es, die genetische Ursache in betroffenen Familien aufzuklären und damit (i) eine klinische Diagnose zu sichern, (ii) eine zielgerichtete Untersuchung in weiteren Familienmitgliedern anbieten zu können, (iii) eine frühzeitige therapeutische Intervention zu ermöglichen, (iv) eine prognostische Abschätzung des Krankheitsverlaufes zu geben und (v) langfristig die Grundlage für neue therapeutische Ansätze zu legen.

Diagnostik-Panel am Beispiel erblicher Augenerkrankungen

Erbliche Augenerkrankungen betreffen weltweit mehrere Millionen Menschen. Die Erkrankung beginnt meist im Jugendalter und äußert sich häufig initial als Nachtblindheit. Der Sehverlust verläuft dann in der Regel langsam fortschreitend und kann sich über Jahrzehnte hinziehen. Der Sehverlust kann isoliert oder in Verbindung mit anderen Symptomen auftreten. Eine Therapie gibt es in den meisten Fällen nicht. Insgesamt wurden bislang 168 Gene beschrieben, die im defekten Zustand eine erbliche Augenerkrankung hervorrufen können [1]. Die Beschreibung dieser Liste von Genen, die erst innerhalb der letzten Jahre so deutlich gewachsen ist, hat die ersten wesentlichen Hinweise zum Verständnis der Pathogenese der Erkrankung geliefert und damit erheblich zum Verständnis der Erkrankung beigetragen. Das Gen oder sein Produkt ist nicht unmittelbar ausreichend für die Entwicklung eines neuen Medikamentes, aber es ist der zentrale Ausgangspunkt oder auch Angriffspunkt einer Therapie.

Derzeit werden ca. 50% aller familiären Augenerkrankungen genetisch aufgeklärt. Die Diagnostik dauert oft mehrere Jahre und ist bei der Untersuchung vieler großer Gene sehr teuer. Diese Überlegungen sowie das Bedürfnis weitere 50% aufzuklären, haben dazu geführt, die Diagnostik der erblichen Augenerkrankungen in den Hochdurchsatz-Sequenzierbereich zu überführen. Zusammen mit den Augengenetikern Prof. Wolfgang Berger und Dr. John Neidhardt (Universität Zürich, Institut für Medizinische Genetik) und Prof. Bernd Wissinger und Dr. Susanne Kohl (Universität Tübingen, Molekulargenetisches Labor der Augenklinik) wurde das Retina-All-Panel entwickelt. Es enthält alle derzeit bekannten 168 Gene, die in Zusammenhang mit einer erblichen

Augenerkrankung gebracht werden. Die Sequenzierung dieser 168 Gene dauert etwa ein bis zwei Wochen. Gefundene Varianten werden in einer Liste ausgegeben, nach Bedeutung (pathogen, benigne oder VUS) klassifiziert und anschließend über die Sanger-Methode verifiziert. Zuletzt erfolgt die Wertung, Zusammenschau und Interpretation der Ergebnisse. Insgesamt dauert die Diagnostik jetzt nicht mehr länger als zwei bis drei Monate.

Nicht immer ist die gleichzeitige Untersuchung von 168 Genen sinnvoll. Für den Augengenetiker und Kliniker lassen sich diese 168 Gene in kleinere Gruppen einteilen. Somit ist es möglich im Falle einer autosomal dominanten Retinitis pigmentosa 26 Gene, bei autosomal rezessiver Retinitis pigmentosa 28 Gene, bei Usher-Syndrom 10 Gene, bei kongenitaler stationärer Blindheit 11 Gene, bei Bardet Biedl-, Joubert- oder Refsum-Erkrankung jeweils 14, 9 oder 5 Gene gleichzeitig zu untersuchen. Diese Unterteilung der Augenerkrankungen und Beschreibung der assoziierten Gene kann in einem aktuellen und umfassenden Artikel zu diesem Thema nachgelesen werden [1].

Das Retina-All-Panel ist auch für die Forschung auf dem Feld der erblichen Augenerkrankungen eine große Bereicherung. Unter Anwendung des Retina-All-Panels werden deutlich mehr Patienten identifiziert, die eine pathogene Variante in einem der 168 Gene tragen. Der Pool der Betroffenen einer bestimmten Variante wächst so weltweit und ermöglicht durch eine klinische Verlaufsbeobachtung dieser Patienten eine bessere Klassifizierung und Prognoseabschätzung in weiteren Patienten mit dieser Variante. Zukünftig wäre es auch aus therapeutischer Sicht sinnvoll, Patienten vor Prüfung eines neuen Medikaments aufgrund ihres genetischen Hintergrundes zu gruppieren, um positive Effekte und auch Nebenwirkungen besser interpretieren zu können.

Die Next-Generation-Sequenzierung hat auch einen zusätzlichen wissenschaftlichen Aspekt. Rein technologisch ist es ohne Unterschied, ob bei einem Patienten zwei, hundert oder mehrere tausend Gene angereichert und sequenziert werden. Bei einer klaren diagnostischen Fragestellung wäre das ohne Sinn, da Daten generiert werden, die schwierig und sehr zeitaufwendig ausgewertet und validiert werden müssen. Anders verhält sich die Situation, wenn in einer Familie die genetische Ursache in den 168 bekannten Genen nicht gefunden wird. In diesem Fall besteht die Möglichkeit, bislang nicht mit der Erkrankung in Zusammenhang gebrachte Gene erstmals zu untersuchen und als neue Krankheitsursache zu beschreiben. Kandidatengene sind im Falle der Augenerkrankungen Gene, die im Auge eine wichtige Funktion haben, bislang aber noch nicht bei Erkrankten untersucht worden sind. Es sind Kandidaten für die Ursache der Augenerkrankung. Gerade hier ist enormes Potenzial der Next-Generation-Sequenzierung vorhanden, um das Wissen um die Ursachen der erblichen Augenerkrankungen weiter voranzubringen.

Diagnostik-Panel am Beispiel Epilepsie

Epilepsien betreffen 1% bis 3% der Bevölkerung im Verlauf ihres Lebens. Abhängig vom Alter und von der Verlaufsform

unterscheidet man die verschiedenen Ausprägungen der Erkrankung. Der Ausschluss einer symptomatischen Ursache im Rahmen einer Hirnschädigung, eines Tumors, eines Traumas, einer Infektion oder einer Stoffwechselerkrankung macht eine genetische Ursache wahrscheinlich. Auch bei den Epilepsien haben große Familien, in denen die Erkrankung gehäuft auftritt, zur Identifizierung von Genen und damit entscheidend zur Aufklärung der Pathogenese der Erkrankung beigetragen. Zu den identifizierten Genen gehören vor allem spannungsabhängige Ionen-Kanäle und Rezeptoren von Neurotransmittern. Eine Veränderung der Erregungsübertragung von Nervenzelle zu Nervenzelle durch defekte Ionen-Kanäle oder Neurotransmitterrezeptoren passt sich konzeptionell als Ursache eines Krampfleidens ein. Spezifische Therapien, zum Beispiel der gezielte Angriff eines Medikaments an einem defekten Natriumkanal (Valproinsäure, Carbamazepin, Oxcarbazepin und Phenytoin) oder an einem defekten Rezeptor (GABA-Rezeptor, Phenobarbital) ermöglichen eine effiziente Behandlung des Erkrankten. Somit ist hier das Hauptziel, in möglichst vielen Fällen die Ursache molekulargenetisch aufzuklären, um eine individuelle spezifische Therapie der Erkrankung herbeizuführen. Als Ursache für die verschiedenen Formen der familiären Epilepsie wurden zahlreiche Gene beschrieben, die als Kandidatengene für die nicht-familiären Fälle gleichermaßen in Frage kommen. Da insbesondere die Ionen-Kanalgene besonders große Gene darstellen hat sich hier die Entwicklung eines Diagnostik-Panels für den Hochdurchsatz angeboten. Dr. Johannes Lemke, Universität Bern, hat federführend mit den Gruppen um Prof. Holger Lerche und Prof. Ingeborg Krägeloh-Mann (Neurologische und pädiatrische Universitätsklinik, Tübingen) zusammen mit der CeGaT GmbH ein Epilepsie-Panel für die klinische Anwendung entwickelt. Derzeit umfasst die Liste der Gene für rein diagnostische Fragestellungen 55 Gene und wird klinisch unterteilt in die Generalisierten/ Myoklonischen Epilepsien inklusive der Febrile Seizures and Absences (zusammen 24 Gene), der epileptischen Enzephalopathien (zusammen 8 Gene) und der syndromalen Erkrankungen mit Epilepsie (23 Gene). Weitere 450 Kandidatengene befinden sich auf dem Panel, die für Forschungsfragestellungen untersucht werden.

Diagnostik-Panel am Beispiel Parkinson-Krankheit und Demenz

Die Parkinson-Krankheit gehört zusammen mit der Alzheimer-Krankheit zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen weltweit. Beide Erkrankungen treten meist sporadisch auf und manifestieren sich in der Regel bei über 65-jährigen Menschen. Bei stetig steigender Lebenserwartung stellen Parkinson- und Alzheimer-Krankheit eine der größten medizinischen und sozio-ökonomischen Herausforderungen der Zukunft dar. Die Ursache des Nervenzelltodes ist in den meisten Fällen ungeklärt. Ob und wann eine Person vom Untergang der Nervenzellen betroffen sein wird, ist derzeit unmöglich vorherzusagen. Sobald jedoch Symptome auftreten, ist ein Großteil der betroffenen Nervenzellen bereits

abgestorben. Derzeitige Therapiekonzepte greifen deshalb schlecht bis gar nicht, weil der Zeitpunkt der Intervention um Jahre zu spät kommt. Eine molekulargenetische Untersuchung erschließt sich hier nicht unmittelbar. Warum sollte der Ratsuchende wissen wollen, ob er eine Veranlagung für eine neurodegenerative Erkrankung trägt, solange keine Therapien verfügbar sind? Seit knapp über zehn Jahren sind genetische Ursachen für Parkinson- und Alzheimer-Krankheit beschrieben. Diese genetischen Untersuchungen haben bei beiden Erkrankungen entscheidend zum Verständnis des Nervenzelluntergangs beigetragen. Die Genprodukte werden intensiv erforscht, um neue innovative Therapiekonzepte voranzutreiben. Erstmals mit der Identifizierung der veränderten Gene war es möglich, Biomarker, in diesem Fall „genetische Biomarker“, zu beschreiben, die das Auftreten der Erkrankung zu einem in der Zukunft liegenden Zeitpunkt mit hoher Wahrscheinlichkeit voraussagen können. Damit ist ein Personenkreis definierbar geworden, der Zugang zu Therapien Jahrzehnte vor Manifestation der Erkrankung bekommen könnte. Auch wenn diese Therapien derzeit noch nicht verfügbar sind, so kann dennoch behauptet werden, dass die veränderten Genprodukte mit hoher Wahrscheinlichkeit die Angriffspunkte für die Therapien der Zukunft darstellen werden.

Der Schlüssel zu den veränderten Genen waren Familien, in denen Demenz oder Parkinson-Krankheit gehäuft auftraten. Im Falle der Parkinson-Krankheit wurden bis heute 16 Genorte im Erbgut für familiäre autosomal rezessive und dominante Formen beschrieben [3, 4]. Da nur ein kleiner Teil von ca. 5% der familiären Fälle derzeit genetisch aufgeklärt werden kann, ist zu erwarten, dass die Liste der Parkinson-Krankheit-verursachenden Gene wachsen wird. Der Großteil des Wissens, welches wir bis zum heutigen Zeitpunkt über die Pathogenese der Parkinson-Krankheit haben, leitet sich von den Genen ab, die im Zusammenhang mit der Erkrankung beschrieben wurden. Das Gen ist somit der erste Hinweis auf den Ort der Funktionsstörung innerhalb der erkrankten Zelle. Weitere Gene werden wie Puzzleteile das komplexe Bild neurodegenerativer Erkrankungen ergänzen und hoffentlich in naher Zukunft einen entscheidenden weiteren Schritt im Verständnis der Erkrankung ermöglichen.

Das derzeitige Parkinson-Demenz-Panel untersucht im Fall der Parkinson-Krankheit 16 Gene, im Fall von Demenzerkrankungen 19 Gene. Es wurde zusammen mit Prof. Thomas Gasser (Neurologie und Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Universität Tübingen) erstellt. Die Liste der Gene wird rasch wachsen, nicht zuletzt durch die Möglichkeit, Familien, die von der Erkrankung betroffen sind, durch einen hypothesenfreien Ansatz auf Veränderungen im gesamten Genom im Rahmen einer Forschungsfragestellung zu untersuchen.

Wie bei der rein diagnostischen Fragestellung sollte der Ratsuchende auch bei dieser Forschungsfragestellung im Rahmen des Gendiagnostikgesetzes aufgeklärt werden. Dazu gehört insbesondere der Hinweis auf den möglichen Umgang mit Zufallsbefunden, auf die mögliche Vernichtung der Probe nach Abschluss der Untersuchung, auf die Anonymisierung und Verwendung der Probe für weitere Untersuchungen und auf das Recht auf Nichtwissen zu jedem Zeitpunkt.

Ausblick und offene Fragen

Revolutionär aus Sicht der Humangenetik ist die schnelle und kosteneffiziente Sequenzierung von mehreren tausend menschlichen Genen innerhalb weniger Tage. Revolutionär ist zudem der Ausblick in eine personalisierte Medizin, der darauf basiert, dass jeder einzelne Mensch und jeder einzelne Tumor sequenziert werden kann. Die Hoffnung ist es, mit diesem Wissen eines Tages Krankheiten individuell, also wesentlich gezielter als heute, behandeln zu können. Jeder Mensch ist einmalig, jeder Tumor ist einmalig, jede Krankheit ist vor dem jeweiligen individuellen genetischen Hintergrund einmalig. Ein Medikament wirkt daher bei verschiedenen Menschen unterschiedlich. Ein verändertes Gen ist ein wesentlicher Schlüssel zum Verständnis einer Krankheit. Auch wenn die individualisierte Therapie zum Beispiel bei den neurodegenerativen Erkrankungen in weiter Ferne liegt, so wird bereits jetzt die Basis für die Therapien der Zukunft gelegt. Die Tumorgenetik ermöglicht schon seit einiger Zeit teilweise eine gezielte Therapie, weitere Erkrankungen sind gefolgt und weitere werden folgen.

Bei aller Euphorie, die die Genetik seit einiger Zeit durchlebt, ist zu bedenken, dass die Ergebnisse der Hochdurchsatz-Sequenzierung Fragen aufwerfen werden, die zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden können. Dazu gehört die Identifizierung von bislang unbekannten Varianten im Genom eines Ratsuchenden, Varianten von unklarer Signifikanz (VUS). Dazu gehört, dass in vielen Fällen auch trotz Hochdurchsatz-Sequenzierung die Ursache der Erkrankung nicht gefunden wird, sei es, weil keine genetische Ursache vorliegt oder weil die Ursache in den nicht untersuchten Bereichen des Genoms liegt, oder weil erst das Zusammenspiel mehrerer veränderter Gene mit der Umwelt zu der Erkrankung führt, oder weil veränderte Genprodukte (RNA oder Proteine) die eigentliche Ursache der Erkrankung sind.

Die Hochdurchsatz-Sequenzierung oder das „Deep Sequencing“ ist eine Screening-Methode. Das Erbgut wird dabei beleuchtet und es kann vorkommen, dass Veränderungen gefunden werden, die als Zufallsbefunde bezeichnet werden. Der Umgang mit Zufallsbefunden, insbesondere wenn diese schwerwiegende Konsequenzen für den Patienten haben, ist eine große Herausforderung für den Arzt und Ratsuchenden. Der Ratsuchende muss darüber genau wie über das Auffinden von Varianten unklarer Signifikanz im Vorfeld aufgeklärt werden. Das Ergebnis einer genetischen Untersuchung soll im Rahmen einer Beratung mitgeteilt werden. Das Gendiagnostikgesetz, welches seit Februar 2010 in Kraft ist, hat Richtlinien für die Durchführung der genetischen Diagnostik festgelegt, die sich direkt auch für die Hochdurchsatz-Diagnostik anwenden lassen.

Es ist zu hoffen, dass die Hochdurchsatz-Diagnostik in vielen Laboren Einzug erhält und damit nicht nur zu deutlich höheren Aufklärungsquoten von genetisch bedingten Erkrankungen beiträgt, sondern die genetische Diagnostik auch als schnelle, effiziente, kostengünstige und sinnvolle Methode in der Wahrnehmung bei Ratsuchenden, Betroffenen, Ärzten

und Wissenschaftlern etabliert. Diesbezüglich sind die Diagnostik-Panels ein Schritt in die richtige Richtung.

Methodik/Technologie

Next-Generation-Sequencing steht für Hochdurchsatz-Sequenzierung und ermöglicht die Sequenzierung von bis zu 100 Milliarden Basen innerhalb von Tagen. Ein komplettes menschliches Genom kann so mit einer durchschnittlichen Abdeckung von 30 (das heißt jede Base wird 30 Mal gelesen) sequenziert werden. Für die Hochdurchsatz-Sequenzierung sind verschiedene Technologie-Plattformen auf dem Markt, zu den Hauptanbietern gehören Roche, Illumina und Applied Biosystems/life technologies. Während die Roche-Plattform den vergleichsweise geringsten Durchsatz mit 400 Millionen Basen pro Lauf erzielt, hat sie doch Vorteile in Bezug auf die Länge der sequenzierten Fragmente (ca. 400 Basen). Illumina und Applied Biosystems/life technologies erzielen mit bis zu 100 Milliarden Basen weit höhere Durchsätze bei insgesamt aber kürzerer Leselänge (50 bis 100 Basenpaare). Da alle drei Plattformen auf unterschiedlichen Sequenzierungsstrategien beruhen, auf die hier nicht weiter eingegangen werden kann, eignen sie sich jeweils auch für unterschiedliche Fragestellungen. Die „Sequenzierung durch Ligation“- (Sequencing by Ligation) Methode, die Applied Biosystems/life technologies auf ihrer Plattform SOLiD verwendet, liefert bei höchstem Durchsatz die mit Abstand niedrigste Fehlerquote. Das ist insofern für die diagnostischen Anwendungen von großer Bedeutung, da alle Varianten, die in der Hochdurchsatz-Sequenzierung gefunden werden, herkömmlich, das heißt über die Sanger-Methode verifiziert werden, und je geringer die Fehlerquote initial ausfällt, desto praktikabler und zuverlässiger lässt sich die Hochdurchsatz-Sequenzierung in der humangenetischen Praxis einführen.

Vom Ablauf stellt sich die Hochdurchsatz-Sequenzierung wie folgt dar. Genomische DNA eines Patienten wird aus dem Blut oder Gewebe gewonnen und fragmentiert. Die zu sequenzierenden Fragmente werden mit komplementären RNAs, die an Beads gekoppelt sind (SureSelect Methode der Firma Agilent), herausgefischt. Das wird als Anreicherung oder Enrichment bezeichnet. Auch hier gibt es unterschiedliche auf dem Markt verfügbare Technologien, auf die im Detail nicht weiter eingegangen werden kann. Die angereicherte DNA wird anschließend mit Adaptoren versehen und amplifiziert. Um parallel sehr viele Amplifikationen durchführen zu können, wird eine Methode verwendet, die EmulsionsPCR heißt. Die EmulsionsPCR ist eine spezielle Art der PCR, die an Beads in einem Öltröpfchen erfolgt. Beads sind aus Polystyren bestehende magnetische Kügelchen, an denen wiederum Adaptoren angebracht sind. Die angereicherte DNA wird seinerseits über die angebrachten Adaptoren an die Adaptoren der Beads gebunden. Dann wird ein DNA-Fragment mittels PCR in jeweils einem Bead pro Öltröpfchen vervielfältigt. Die neu entstandenen Fragmente binden an weitere Adaptoren desselben Beads. Anschließend werden die Beads, an denen eine PCR erfolgreich stattgefunden hat, aufgrund ihrer Größe und Schwere gegenüber

denen, an denen nichts gebunden hat, durch Zentrifugation getrennt. Etwa 400 Millionen Beads werden dann auf einen Objektträger aufgetragen. Dieser wird in den Hochdurchsatz-Sequenzierer eingespannt. Die Sequenzierung erfolgt durch Detektion von Lichtsignalen, die durch die spezifische Bindung von einem Oktamer (8 Nukleotide mit einem Farbsignal) abgegeben werden. Das Oktamer enthält zwei Nukleotide, die einen Farbstoff kodieren, der sofort nach der Bindung ein Signal abgibt, dass von einer Digitalkamera mit CCD-Sensor aufgenommen wird. Anschließend werden die Farbsignale abgetrennt und ein weiterer Bindungszyklus kann eingeleitet werden, so lange, bis ca. 50 Nukleotide in eine Abfolge von Farbsignalen umgewandelt werden. Dabei entspricht eine Farbe jeweils zwei Nukleotiden. Anschließend werden die Farbsignale wieder in die Nukleotidsequenz umgewandelt, die dann in die weitere Analyse eingeht. Da die Ursprungssequenz in mehreren Schritten versetzt abgelesen wird, ist gewährleistet, dass jede Base mindestens zweimal abgelesen wird. Dadurch entsteht die für das SOLiD-System von Applied Biosystems/life technologies besondere Verlässlichkeit in Bezug auf die Interpretation der Daten. Für den Sequenzierschritt werden 5 bis 7 Tage benötigt. Die anschließende Datenanalyse besteht aus drei Teilschritten: 1. Schritt: Initial liegen die vom Sequenzierer erzeugten Daten als Bilder bestehend aus einzelnen Farbpunkten vor; ein bestimmter Farbpunkt entspricht dabei zwei Nukleotiden. Die Farbpunkte werden von der Software auf Intensität und Qualität überprüft. Beides ist für die eindeutige Bestimmung der Nukleotide notwendig. Eine vom Hersteller mitgelieferte Software wandelt die Farbpunkte in die Abfolge der durch die Farbe kodierten Nukleotide um. Im zweiten Schritt findet der automatische Vergleich mit einer Referenzsequenz statt, in diesem Fall mit dem menschlichen Genom. Die einzelnen 50 Basenpaar-langen Fragmente werden mit der Referenzsequenz verglichen und Nukleotid für Nukleotid nebeneinander dargestellt (Alignment). Die Zwei-Basenpaar-Kodierung des SOLiD-Systems ermöglicht die schnelle und einfache Erkennung von Lesefehlern (Miscalls) und die eindeutige Unterscheidung von Miscalls und echten Sequenzvariationen. Alle echten Abweichungen von der Referenzsequenz werden übermittelt und über die Sanger-Sequenzierung verifiziert. Im letzten und schwierigsten Schritt erfolgt die Interpretation der Daten.

Literatur

1. Berger W, Kloeckener-Gruissem B, Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res* 2010;29:335–75.
2. Boehm D, Herold S, Kuechler A, Liehr T, Laccone F. Rapid detection of subtelomeric deletion/duplication by novel real-time quantitative PCR using SYBR-green dye. *Hum Mutat* 2004; 23:368–78
3. Biskup S, Gerlach M, Kupsch A, Reichmann H, Riederer P, Vieregge P, et al. Genes associated with Parkinson syndrome. *J Neurol* 2008;255(Suppl 5):8–17. Review.
4. Gasser T. Mendelian forms of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:587–96. Epub 2009 Jan 6. Review.