

Next Generation Sequencing – High Speed-Diagnostik in der Krankenversorgung



Abb. 1: Der MiSeq Bench-Sequenzier

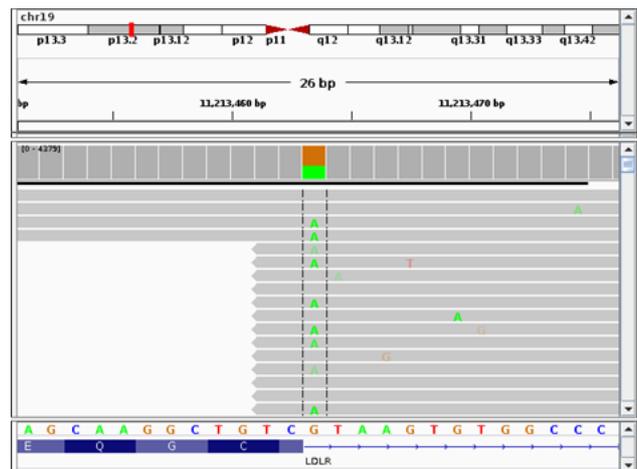


Abb. 2: Die Anwendung des NGS Lipid Panels erbrachte eine pathogene Splice Site Mutation im LDLR Gen eines Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie

Angesichts der enorm hohen Kosten der DNA-Sequenzierung war es bislang undenkbar, mehr als ca. 5 Gene diagnostisch zu untersuchen. Der Einsatz von Next-Generation-Sequenzierung (NGS) hat den Preis pro sequenzierter Base gegenüber dem bisher üblichen Verfahren nach Sanger mehr als 10.000-fach reduziert. Damit eröffnen sich ungeahnte Möglichkeiten für die molekulargenetische Diagnostik in der Krankenversorgung.

Bei der herkömmlichen DNA-Sequenzierung nach Sanger handelt es sich um eine Methode aus den 1970er Jahren, bei der nur einzelne DNA-Abschnitte eines Gens nach Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR) sequenziert werden können. Dies ermöglichte nur die Mutationsanalyse weniger Gene bei betroffenen Patienten, da die Untersuchung aller infrage kommenden Gene oft Kosten im fünfstelligen Bereich bedeutet.

Die NGS-Technologie ermöglicht hingegen die schnelle, parallele Untersuchung von bis zu einigen hundert Genen.

Die zu sequenzierenden Genabschnitte werden hier entweder durch Multiplex-PCR amplifiziert oder durch Hybridisierung von entsprechenden Sonden angereichert. Im Jahr 2010 wurde erstmalig die erfolgreiche Verwendung von NGS bei der Suche nach krankheitsrelevanten Mutationen demonstriert, indem ein bislang unbekanntes Krankheitsgen durch die gleichzeitige Untersuchung aller proteinkodierenden Gene nach Anreicherung identifiziert werden konnte.

Im Vergleich zu der herkömmlichen Technologie nach Sanger bietet die NGS eine vergleichbare Sensitivität bei einem deutlich niedrigeren zeitlichen Aufwand. Dank kontinuierlich sinkender Kosten und der Einführung von kleineren Sequenziergeräten (siehe Abb. 1) in den letzten zwei Jahren, kann das NGS nun ebenfalls für die Krankenversorgung im Rahmen der so genannten Genpanel-Diagnostik eingesetzt werden. Unter der Genpanel-Diagnostik versteht man den Einsatz der NGS-Technologie zur Untersuchung von bis zu einigen hundert Genen, die alle mit einem ähnlichen klinischen Krankheitsbild





assoziiert sind. Zurzeit etablieren wir im Labor Berlin GenPanels zum Einsatz in der Diagnostik zahlreicher Krankheiten. Hierzu zählen beispielsweise die Kardiomyopathie, die Schwerhörigkeit, Erkrankungen des Lipidstoffwechsels, bestimmte Immundefekte, Erkrankungen des Bindegewebes, Skeletterkrankungen und familiäre Aortenerkrankungen. Nach der Ermittlung der DNA-Sequenz in den Exons dieser Gene sowie aller Sequenzabweichungen (Varianten) wird mithilfe verschiedener bioinformatischer Verfahren nach krankheitsrelevanten Mutationen in den im Panel repräsentierten Genen gesucht.

Beispiel: Lipid Panel

Mutationen in den Genen für APOB, LDLR, LDLRAP1, und PCSK9 können familiäre Hypercholesterolämie verursachen. Mutationen in einer Reihe weiterer Gene sind mit anderen hereditären Störungen des Lipidstoffwechsels assoziiert. Unter Umständen kann die Identifikation einer Mutation, in einem von den genannten Genen, Einfluss auf die indizierte Therapieform haben. Zum Beispiel kann bei Hypercholesterinämie in der Regel von einer guten Wirksamkeit der Statin-Therapie ausgegangen werden. Die Wirksamkeit dieser Therapie ist jedoch bei Patienten mit homozygoter oder doppelt heterozygoter

Mutationen im LDLR-Gen herabgesetzt. Stattdessen ist bei diesen Patienten eine Lipid-Apherese zu erwägen. Das Lipid-Panel deckt Gene, in denen Mutationen mit monogenen Lipidstoffwechselstörungen assoziiert sind sowie zusätzlich Gene, in denen Veränderungen das Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten modifizieren und damit die Therapieziele mitbestimmen (z.B. LPA und APOE) ab. Der Nachweis einer bekannten genetischen Ursache für die familiäre Hypercholesterolämie kann von großer Bedeutung für die frühe Identifizierung von ebenfalls betroffenen Verwandten ersten Grades sein – je früher mit einer Lipid-senkenden Therapie begonnen werden kann, umso besser die Prognose. Abb. 2 zeigt eine heterozygote Mutation in einem Exon des LDLR-Gens.

Weitere Informationen:

Prof. Dr. Peter Robinson

Dr. Tomasz Zemojtel

Fachbereich Humangenetik

Tel.: +49 (30) 450-525141

peter.robinson@laborberlin.com

tomasz.zemojtel@laborberlin.com



Das Wichtigste auf einen Blick

Die Genpanel-Diagnostik durch NGS erbringt:

- umfassende Untersuchung aller seltenen und häufigen Varianten mit Bezug zur gegebenen Symptomatik
- Zeitersparnis
- Einfluss auf die gewählte Therapie

Literatur

1) Robinson PN, Krawitz P, Mundlos S. Strategies for exome and genome sequence data analysis in disease-gene discovery projects. *Clin Genet.* 2011 Aug; 80(2):127-32.

2) Robinson PN. Whole-exome sequencing for finding de novo mutations in sporadic mental retardation. *Genome Biol.* 2010; 11(12):144.

3) Krawitz PM, Schweiger MR, Rödelsperger C, Marcellis C, Kölsch U, Meisel C, Stephani F, Kinoshita T, Murakami Y, Bauer S, Isau M, Fischer A, Dahl A, Kerick M, Hecht J, Köhler S, Jäger M, Grünhagen J, de Condor BJ, Doelken S, Brunner HG, Meinecke P, Passarge E, Thompson MD, Cole DE, Horn D, Roscioli T, Mundlos S, Robinson PN.

Identity-by-descent filtering of exome sequence data identifies PIGV mutations in hyperphosphatasia mental retardation syndrome. *Nat Genet.* 2010 Oct; 42 (10): 827-9.

4) Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet.* 2013 Apr; 14 (4): 295-300.

Impressum

Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH, Sylter Straße 2, 13353 Berlin
Tel. +49 (30) 405 026-100 • E-Mail bulletin@laborberlin.com
Verantwortlicher im Sinne des Medienrechts: Florian Kainzinger
Redaktion: Prof. Dr. Robinson, Dr. Tomasz Zemojtel
Veröffentlicht: Berlin, 25.04.2013