



## Noch etwas zu früh

Jeder Mensch ist einzigartig. Diese Allerweltsfeststellung erfährt im Zeitalter der Molekularbiologie eine digitale Präzisierung: Jeder Mensch erhält bei der Geburt seine ganz persönliche, aus drei Milliarden Buchstaben bestehende „Bauanleitung“ mit auf den Weg, die sich im Lebenslauf durch äußere und innere Einflüsse – von Virusinfektionen über maligne Entartung bis zu traumatischen Erlebnissen – offenbar ständig ändert.

In ihrer vollen Tragweite ist diese Erkenntnis noch jung und erfährt dank immer besserer Sequenzierungstechniken fast täglich Erweiterungen und Modifikationen. Wir versuchen, den Stand des Wissens einmal aus medizinischem Blickwinkel darzustellen, auch wenn es dafür noch etwas früh ist. Die Haupteinsatzgebiete liegen nach wie vor in der biochemischen Grundlagenforschung. Aber seit etwa fünf Jahren werden die Geräte handlicher, die Preise sinken und die Auswerteprogramme können auch von Nicht-Informatikern bedient werden.

Unser ursprüngliches Ziel war es, eine tabellarische Übersicht zu den Einsatzgebieten der neuesten Gerätegeneration für medizinisch-diagnostische Fragestellungen zu publizieren. Doch bei näherem Hinsehen wurde rasch klar, dass noch etwa ein Jahr ins Land gehen dürfte, ehe die Protokolle, Zertifikate und Vermarktungskonzepte der Hersteller stehen.

Verschoben ist aber nicht aufgehoben, und auf S. 246-247 erhalten Sie schon einmal einen Vorgeschmack. Mit Dr. med. Hanns-Georg Klein konnten wir einen erfahrenen Autor gewinnen, der die medizinisch-diagnostischen Einsatzmöglichkeiten des *Next Generation Sequencing* aus Sicht eines genetischen Labors mit der gebotenen Vorsicht darstellt.

em

## NGS-Applikationen für die medizinische Diagnostik<sup>1</sup>

# Verhaltene Euphorie

**Ultraschnelle Verfahren der Gensequenzierung eröffnen der Diagnostik viele neue Perspektiven, vor allem bei komplexen Krankheiten. Noch sind aber einige Hausaufgaben zu erledigen.**

Unter dem Begriff *Next Generation Sequencing* (NGS) werden Verfahren zusammengefasst, die auf der gleichzeitigen Sequenzierung von DNA-Fragmenten in einem einzigen Lauf beruhen – nicht zehn oder hundert, sondern Millionen. Sie erlauben es erstmals, auch schwer zugängliche erbliche und onkologische Krankheitsbilder auf der Ebene der Gene zu verstehen.

Dabei kann man drei Stufen der Komplexität unterscheiden. Den höchsten Aufwand erfordert die Sequenzierung kompletter Genome (*Whole Genome Sequencing*), also die Ablesung aller codierenden und nicht codierenden Basen. Beim *Human Genome Project* beanspruchte dies noch über zehn Jahre, dank NGS dauert es heute weniger als zehn Tage. Solch aufwendige Analysen sollen vor allem bei Krebserkrankungen helfen, individualisierte, auf das Mutationsmuster der Tumorzellen abgestimmte Therapien auszuwählen.

Bei der Exom-Sequenzierung werden dagegen nur jene rund drei Prozent der DNA sequenziert, welche die eigentlichen proteincodierenden Gene repräsentieren.

Damit will man individuelle Genotypen identifizieren, die krankmachende Phänotypen charakterisieren.

Zur dritten Stufe gehört die gezielte Re-Sequenzierung (*Targeted Resequencing*) von Genen oder Gengruppen, die bekanntermaßen mit Erbkrankheiten wie Muskeldystrophie oder Brustkrebs assoziiert sind. In die Gruppe geringer Komplexität fallen ferner die molekulare Zytogenetik bei der Pränataldiagnostik und Keimidentifizierung in der Mikrobiologie und Virologie.

### Zukunftsoptionen

Alle bisher genannten Anwendungen beziehen sich ausschließlich auf DNA. Als Einsatzgebiete mit Zukunftspotenzial, aber ohne aktuellen Umsetzungsbedarf in der Routine, gelten Sequenzierungen von RNA im Rahmen der funktionellen Genomik, also der Genexpression (mRNA) und Genregulation (miRNA, piRNA, nicht-codierende RNA etc.). Diese NGS-Applikationen haben Zukunftspotenzial in der klinischen Forschung, um Biomarker für Volkskrankheiten zu entdecken – etwa

<sup>1</sup>Dieser Beitrag basiert auf einer Publikation der DGKL e. V. ([www.dgkl.de](http://www.dgkl.de)): Kotschote, Wagner, Marschall, Mayer, Hirv, Kerick, Timmermann, Klein: Translation of Next Generation Sequencing into molecular diagnostics. *J Lab Med* 2010; 34: 311-318. DOI 10.1515/JLM 2010.054

vergleichbar den Biochips früherer Jahre. Auf dem Sprung von der Forschung in die Diagnostik befinden sich schließlich DNA-Methylierungsmuster: Man fand bereits vier Gen-Loci in zirkulierenden Tumorzellen, die als epigenetische Marker für die Metastasierung von Brustkrebs dienen können.

### Hausaufgaben

So aussichtsreich die ultraschnelle Gensequenzierung aus medizinischer Sicht sein mag, aus Laborsicht ist „verhaltene Euphorie“ angezeigt. Noch müssen Hausaufgaben wie die Vereinfachung und Standardisierung der zahlreichen Verfahrensschritte sowie die Integration von Automationsmodulen von der Probenaufbereitung bis zur Ergebnisauswertung erledigt werden.

Ohne Frage sind die Kosten heute im Vergleich zum früheren Goldstandard der Sanger-Sequenzierung um mehrere Zehnerpotenzen gefallen, und gleichzeitig schwoll die Datenflut in derselben Größenordnung an. Aber ähnlich wie in der Computerbranche ist noch längst kein Ende der Fahnenstange in Sicht. Fortschritte erwarten wir zum Beispiel von kleineren, auf klinische Fragestellungen zugeschnittenen Plattformen, die nicht das volle Spektrum der NGS-Kapazität bieten, oder auch von einer Parallelisierung der Probenverarbeitung, wie sie bei den Mehrkanalanalysatoren der Klinischen Chemie selbstverständlich ist.

### Gezielte Anreicherung

Als aktuell viel diskutiertes Beispiel für eine Ausrichtung auf klinische Erfordernisse sei die Kombination von NGS mit der sogenannten Zielregion-Anreicherung (*Target Enrichment*) etwas eingehender beschrieben. Dabei fokussiert man sich auf diejenigen genetischen Varianten, die mit komplexen Krankheiten (siehe Kasten) assoziiert sind.

Es gibt zwei unterschiedliche Ansätze, um die interessierenden DNA-Segmente anzureichern, nämlich einerseits die Amplifikation (PCR) und andererseits die Bindung an komplementäre Gensonden (Hybridisierung). Beide Verfahren haben ihre Vorteile, doch speziell die Hybridisierung in flüssigem Milieu mit biotinylierten cRNA-Sonden scheint für diagnostische Zwecke besonders effizient und robust, skalierbar und gut reproduzierbar zu sein.

### Praktische Beispiele

Das Hauptziel ist es derzeit, nach Einsatzgebieten für dieses Verfahren zu fahnden, die mit herkömmlichen diagnostischen Methoden nicht gut abgedeckt werden können. Komplexität spielt hierbei mit Sicherheit die entscheidende Rolle. Das gilt beispielsweise für angeborene Herzrhythmusstörungen, Epilepsien oder Bindegewebserkrankungen, bei denen mehrere große Gene sequenziert werden müssen.

So können Syndrome mit ventrikulärer Tachykardie, hypertropher Kardiomyopathie, QT-Verlängerung usw., die gehäuft zum plötzlichen Herztod führen, durchaus die Sequenzierung von 30 bis 40 Genen mit 500 Exons erforderlich machen. Auch bei der Differenzierung von HLA-Mustern zur Erkennung von Autoimmunkrankheiten oder zur Prüfung der Gewebeverträglichkeit vor Organtransplantationen könnte die NGS eines Tages die Methode der Wahl werden. Bei der Leukämitherapie bietet NGS die Möglichkeit, auch Spuren nicht erfasster Zellen (*Minimal Residue Disease*) zu entdecken, und bei schlecht heilenden Wunden kann das komplette Keimspektrum (Metagenom) analysiert werden.

Kontraproduktiv sind dagegen kommerziell beworbene *Whole Genome* Sequenzierungen zum Screening von Gesunden. Sie decken stets Millionen von Mutationen mit fragwürdiger klinischer Relevanz auf, die lediglich zur Verunsicherung von Arzt und Patient führen und ihr Geld nicht wert sind – gleichgültig wie weit die Preise für NGS noch fallen werden. 🌸



Dr. med. Hanns-Georg Klein

[www.medizinische-genetik.de](http://www.medizinische-genetik.de)

Sektion Molekulare Diagnostik der DGKL

## Beispiele komplexer genetischer Erkrankungen, bei denen sich der Einsatz von NGS lohnen wird

Bindegewebsschwäche	Gene	Exons
Marfan-Syndrom u. ä.	4	148
Ehlers-Danlos-Syndrom	14	512
Aortenaneurysma	8	226

Ein gestörter Aufbau des Bindegewebes führt insbesondere zu Störungen an Haut und Gelenken, Herz und Gefäßen sowie den Augen.

Epilepsie	Gene	Exons
Idiopathische Epilepsie	16	266
Kindliche Epilepsie	5	53
Adoleszente Epilepsie	4	59

Krampfanfälle kommen durch Übererregbarkeit von Hirnzellen zustande. Diese kann organische oder genetische Ursachen haben.



Einfacher Test für das Marfan-Syndrom: Beim Schließen der Faust ragt die Daumenspitze heraus. Weitere Symptome sind u. a. Herzklappenfehler, Zerreißbarkeit der Hauptschlagader, Wirbelsäulenverformung und Lockerung der Augenlinse. Häufigkeit etwa 1 : 5.000.