

Next-Generation-Sequenzierung

Ein Quantensprung in der Aufklärung genetischer Erkrankungen

Anita Rauch

University of Zurich, Institute of Medical Genetics, Schwerzenbach



Seit der Veröffentlichung der Sequenz des menschlichen Genoms vor nunmehr zehn Jahren verzeichnen wir einen exponentiellen Anstieg in der Aufklärung der zugrunde liegenden Gendefekte genetischer Erkrankungen. Aktuell sind die molekularen Ursachen für ca. 3000 Erkrankungen bereits bekannt. Dies entspricht jedoch nur der Hälfte der derzeit definierten genetischen Erkrankungen, und täglich werden neue Krankheitsentitäten entdeckt, was aufgrund der vermuteten Genzahl von ca. 22 000 nicht verwundern sollte. Die Aufklärung der Krankheitsursachen genetischer Erkrankungen ist in mehrfacher Hinsicht sowohl für die betroffenen Patienten als auch für den medizinischen Fortschritt wichtig. Die Kenntnis der molekularen Ursache ermöglicht eine ätiologische Diagnostik bei klinisch komplexen Erkrankungen, welche wiederum aus der Kenntnis des jeweilig zu erwartenden Krankheitsverlaufs eine Optimierung der Behandlung zulässt. Ferner ermöglicht das Verständnis der molekularen Pathomechanismen die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

Ätiologische Diagnoseklärung verbessert therapeutisches Management

So kann zum Beispiel eine frühkindliche Innenohrschwerhörigkeit ein isolierter Defekt des Ohres sein, welcher durch ein Cochlearimplantat adäquat behandelt ist. Hinter einer Innenohrschwerhörigkeit kann sich jedoch auch eine komplexere Ionenkanalerkrankung verbergen, welche mit klinisch schwer diagnostizierbaren kardialen Reizleitungsanomalien und dem Risiko für einen plötzlichen Herzstillstand einhergeht. Oder die Innenohrschwerhörigkeit stellt das erste Symptom einer langsam fortschreitenden Stoffwechselerkrankung dar, welche unerkannt und unbehandelt zu weiteren Organschäden und Intelligenzminderung führt.

Daneben gibt es zahlreiche weitere Entitäten, die als Krankheitsursache in Frage kommen. Ähnliches gilt für viele heterogene Krankheitsgruppen, wie zum Beispiel die geistige Behinderung, Klein- oder Grosswuchs, Erkrankungen des Bindegewebes und vieles andere mehr. Aufgrund der grossen klinischen und molekularen Heterogenität ist die Diagnosestellung aber oft schwierig und häufig von einer leidvollen Odyssee geprägt. Der Nachweis eines bekannten Gendefektes ermöglicht in der Regel eine klare Diagnosestellung mit entsprechender Klarheit über zu erwartenden Krankheitsverlauf, Komplikationsspektrum und therapeutische Optionen. Ferner ist die Kenntnis über die molekularen Mechanismen definierter Krankheitsentitäten die Vorausset-

zung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze. Besonders eindrücklich ist dies bei Krankheitsgruppen, die bislang als völlig unheilbar galten, wie z.B. bei der geistigen Behinderung. Beim Fragilen-X-Syndrom, der bislang häufigsten und am besten erforschten monogenen Form der geistigen Behinderung, liegt eine vermehrte Signaltransduktion eines synaptischen Glutamat-rezeptors vor. Für diesen Glutamat-rezeptor steht ein relativ spezifischer Antagonist zur Verfügung, welcher im Tierversuch zu einer deutlichen Besserung der Symptomatik führte. Dieser Wirkstoff ist auch beim Menschen gut verträglich und wird derzeit in klinischen Studien in Tablettenform an Patienten mit Fragilem-X-Syndrom verabreicht und in seiner Wirksamkeit zur Verbesserung der kognitiven und adaptiven Fähigkeiten überprüft.

Limitationen bisheriger diagnostischer Verfahren

Fehlt ein klarer klinischer Verdacht auf eine bestimmte Krankheit oder kommen zahlreiche Gene als Krankheitsursache in Frage, stösst die genetische Diagnostik mit den klassischen Techniken jedoch schnell an ihre Grenzen. Lediglich für neurokognitive Erkrankungen und komplexe Fehlbildungssyndrome, bei denen häufig Chromosomenanomalien ursächlich sind, steht seit kurzem mit der hochauflösenden molekularen Chromosomenanalyse mittels «Array-CGH» ein effektives Werkzeug zur Verfügung, das zu einem wirtschaftlichen Preis erlaubt, genomweit Hunderte von verschiedenen bekannten Chromosomenerkrankungen mit einem einzigen Test zu diagnostizieren. Dennoch bleibt auch hierbei ein beträchtlicher Teil der Erkrankungen ungeklärt.

Next-Generation-Sequenzierung – ein Quantensprung

Der klassische Weg der erstmaligen Identifizierung eines Krankheitsgens führte über die Entdeckung eines Genlokus (durch eine wegweisende Chromosomenveränderung bei einem Schlüsselpatienten oder durch eine Kopplungsanalyse in grossen Familien) zum Mutationsnachweis mittels der klassischen Sequenzierung nach der Sanger-Technik. Letztere ist zeitaufwendig und teuer, so dass nur die Einengung auf wenige potentielle Kandidatengene innerhalb des mutmasslichen Genlokus einen Mutationsnachweis erlaubte. Aus diesem Grund wurden bislang vor allem solche Erkrankungen aufge-



Anita Rauch

Funded by Novartis for clinical trial in Fragile X syndrome.

klärt, die einen ganz charakteristischen Phänotyp aufweisen oder für die Familien mit mehreren Betroffenen für eine Kopplungsanalyse zur Verfügung standen. Sporadische Erkrankungen und solche, die sehr heterogen und klinisch schwer gruppierbar sind, konnten bislang hingegen nur vereinzelt aufgeklärt werden. Hier hat die Etablierung der neuen Sequenzierverfahren, die als *massive parallel*, *ultra-deep* oder *next generation* bezeichnet werden, im Verlaufe des letzten Jahres eine Trendwende eingeleitet. Mit diesen im Folgenden als NGS abgekürzten Verfahren gelingt es innerhalb von wenigen Wochen, ein gesamtes menschliches Genom zu sequenzieren. Schwierig ist derzeit jedoch noch die Interpretation dieser häufig auch noch sehr fehlerbehafteten Datenfülle, insbesondere da bislang vor allem Kenntnisse zu kodierenden Genvarianten vorliegen. Diese für Eiweisse kodierenden Gene machen nur ca. 1,5% unseres Genoms aus. Deshalb und aus Gründen der Zeit- und Kostenersparnis sowie der Generation zuverlässiger Daten wird derzeit vor allem die Sequenzierung des menschlichen «Exoms» angewendet, das heisst eben dieser Regionen, die für Gene kodieren. Mit der Exomsequenzierung lassen sich nunmehr auch krankheitsverursachende Gene bei sehr seltenen oder extrem heterogenen Erkrankungen aufklären [1–4].

Dieses Verfahren ermöglicht jedoch nicht nur einen Quantensprung in der Aufklärung bislang unerforschter Krankheitsentitäten, sondern auch bei der Diagnostik bereits aufgeklärter, heterogener Erkrankungen. So werden derzeit vielerorts fokussierte Sequenzierprotokolle etabliert, bei denen jeweils zahlreiche Gene, die als Krankheitsursache eines bestimmten Symptoms, wie z.B. Schwerhörigkeit, Netzhauterkrankungen oder Epilepsie, bekannt sind, mit einem Sequenzierdurchgang analysiert werden können. Es bleibt allerdings abzuwarten, ob es am Ende nicht doch einfacher und wirtschaftlicher ist, bei allen Fragestellungen eine komplette Exomsequenzierung durchzuführen und dann jeweils nur die Gengruppe zu analysieren, die für die jeweilige Problematik in Frage kommt. Da derzeit die Funktion der allermeisten Gene noch gar nicht bekannt ist, hätte eine Exomsequenzierung zudem den Vorteil, dass bei Bekanntwerden neuer krankheitsspezifischer Gene die bereits erhobenen Daten einfach nur neu analysiert werden müssten und nicht ständig ein neuer krankheitsspezifischer Assay durchgeführt werden müsste. Ob jedoch Qualität und Handhabung der bei der Exomsequenzierung generierten grossen Datenmengen wirklich der gezielten Analyse von krankheitsspezifischen Gengruppen vorzuziehen ist, wird sich künftig zeigen müssen.

Die Datenanalyse nimmt derzeit auch weit mehr Kapazität in Anspruch als deren Generierung. Pro Individuum werden nämlich bei der Exomsequenzierung ca. 20000 Sequenzvarianten detektiert, wovon die allermeisten harmlose Polymorphismen darstellen. Die Kunst besteht nun darin, die relevanten Veränderungen zu erkennen und für den jeweiligen medizinischen Kontext richtig zu interpretieren. Andererseits fürchten manche Gruppen, die Fülle der Informationen könnte dem einzelnen Individuum eine zu grosse Bürde auferlegen. Eine fachkundige Aufklärung über mögliche Zu-

fallsbefunde und über das Recht auf Nichtwissen im Vorfeld solch einer Analyse ist daher unerlässlich. Da die meisten bislang vorliegenden Erkenntnisse mit hohem prädiktivem Wert sich jedoch auf seltene Erkrankungen beschränken, ist die Gefahr derzeit noch gering, dass bei solch einem Gentest eine Fülle von prädiktiven Zufallsbefunden erhoben wird.

Dass solche Zufallsbefunde jedoch auch positive Auswirkungen haben können, wurde in einer Podiumsdiskussion an der kürzlich in Montreal stattgefundenen internationalen Humangenetiktagung veranschaulicht. Hierbei wurden drei der ersten Menschen, die ihr Genom zur individuellen Sequenzierung und Veröffentlichung zur Verfügung gestellt hatten, über ihren Umgang damit befragt. Wie zu erwarten, war der Erkenntnisgewinn bei diesen gesunden Individuen, welche alle drei selbst Genetiker waren, aufgrund unseres limitierten Wissens noch gering. Der berühmte Entdecker der DNA-Struktur, James Watson, berichtete jedoch, dass bei ihm eine Veranlagung zu langsamer Verstoffwechslung bestimmter Medikamente vorliege. Hätte er dies früher gewusst, hätte man die schwere Arzneimittelreaktion verhindern können, die nach Behandlung seines Sohnes mit solchen Medikamenten aufgetreten war. Seong-Jin Kim, Leiter eines koreanischen Sequenzierlabors, schlug hingegen fröhlich Nutzen aus der an sich unerfreulichen Erkenntnis, dass bei ihm Risikofaktoren für Altersblindheit aufgrund einer Makuladegeneration festgestellt wurden. Mit diesem Argument habe er nämlich seine Frau überzeugen können, den alten Fernseher durch einen neuen LED-Fernseher zu ersetzen, weil dieser die Augen schonere und deshalb bei dieser Veranlagung empfohlen werde. Ein weiteres Anwendungsgebiet für NGS ist das Heterozygotenscreening bei Paaren mit Kinderwunsch. Viele jeweils seltene, aber schwere frühkindliche Erkrankungen folgen einem autosomal rezessiven Erbgang und treten deshalb in der Regel nur dann auf, wenn beide Eltern heterozygote Überträger sind. In der Ashkenazi-jüdischen Bevölkerung, innerhalb derer eine bestimmte Gruppe von solchen Erkrankungen besonders häufig vorkommt, ist es deshalb schon länger gang und gäbe, vor Umsetzung des Kinderwunsches oder gar schon vor der Hochzeit einen Test auf Anlageträgerschaft für diese häufigen Erkrankungen durchführen zu lassen. Nur wenn beide Eltern Anlageträger für die gleiche Erkrankung sind, besteht ein erhöhtes Risiko für die Nachkommen. Je nach individuellen Wertvorstellungen und Lebenskonzepten führt dies dann zur Wahl eines anderen Partners, Verzicht auf eigene Kinder oder Durchführung einer gezielten vorgeburtlichen Diagnostik auf diese Erkrankung. Hierdurch wurde in den letzten 40 Jahren z.B. die Häufigkeit der in der Regel frühkindlich letalen Tay-Sachs-Erkrankung in dieser Bevölkerung von ursprünglich 1:3600 um 90% reduziert. Die Arbeiten von Bell und Kollegen [5] erweiterten dieses Konzept des präkonzeptionellen Heterozygotenscreenings jüngst auf die Allgemeinbevölkerung. In dieser ersten Pilotstudie, bei der 104 Personen auf 448 schwere frühkindliche Erkrankungen untersucht wurden, waren die Probanden im Schnitt Überträger von 2,8 (0–7) solcher Erkrankungen. Bevor solche Screeningtests in der Praxis Anwendung finden können, müssen jedoch erst deren effektiver

Nutzen und die damit einhergehenden gesellschaftlichen und ethischen Implikationen geklärt werden.

Fazit

Mit der Einführung der *Next-Generation*-Sequenzierung werden sowohl Forschung als auch Diagnostik auf eine neue Ebene gehoben, die für die nahe Zukunft einen enormen Erkenntnisgewinn und eine ungeahnte Verbesserung und Effektivitätssteigerung der diagnostischen Möglichkeiten bringen wird. Die Verwendung dieser potenten Werkzeuge im diagnostischen Bereich bedarf aber eines entsprechenden Verantwortungsbewusstseins mit entsprechender Schulung von Ärzten und Patienten.

Korrespondenz:

Prof. Dr. med. Anita Rauch
Universität Zürich
Institut für Medizinische Genetik
Schorenstrasse 16
CH-8603 Schwerzenbach
[anita.rauch\[at\]medgen.uzh.ch](mailto:anita.rauch[at]medgen.uzh.ch)

Literatur

- 1 Bick D, Dimmock D. Whole exome and whole genome sequencing. *Curr Opin Pediatr.* 2011;23(6):594–600.
- 2 Ostrer H. Changing the game with whole exome sequencing. *Clin Genet.* 2011;80(2):101–3.
- 3 Singleton B. Exome sequencing: a transformative technology. *Lancet Neurol.* 2011;10(10):942–6.
- 4 Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature.* 2011;478(7367):57–63.
- 5 Bell CJ, Dinwiddie DL, Miller NA, et al. Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Sci Transl Med.* 2011;3(65):65ra4.