

[Pathologie](#)

Die Zukunft hat schon begonnen: Next Generation Sequencing in der Pathologie

Kirsten D. Mertz, Aino Paasinen Sohns, Gieri Cathomas

Institut für Pathologie, Kantonsspital Baselland, Liestal

Die personalisierte Medizin oder Präzisionsmedizin mit individuell auf den Patienten zugeschnittenen Therapieansätzen ist ein verheissungsvoller Ausblick auf die Vorbeugung, Diagnose und Behandlung von Erkrankungen. Ein wesentlicher Bestandteil der personalisierten Medizin ist die schnelle und zuverlässige Erfassung von angeborenen oder im Laufe des Lebens erworbenen Genveränderungen durch neue molekularpathologische Methoden.

In der Pathologie von Tumorerkrankungen spielt der Nachweis genetischer Veränderungen eine entscheidende Rolle, weil dadurch die Wirksamkeit von zielgerichteten Therapien abgeschätzt und die Differentialdiagnose von schwer diagnostizierbaren Erkrankungen unterstützt werden kann. Somit komplementiert die molekularpathologische Analyse von Genveränderungen (Mutationen, Amplifikationen, Deletionen, Genfusionen) die morphologische Diagnose, die auf klassischen Techniken beruht, wie z.B. makroskopische und mikroskopische Begutachtungen von Geweben, sowie Immunhistochemie [1]. Die Anzahl der molekularen Marker in malignen Erkrankungen mit diagnostischer und prognostischer Relevanz ist in den letzten Jahren rasant gestiegen, und eine zunehmende Anzahl von Tumorentitäten werden heute sogar ausschliesslich durch spezifische molekulare Veränderungen definiert. Die Molekularpathologie ist daher ein Gebiet von zunehmender Bedeutung im Armentarium des Pathologen, denn sie trägt zum besseren Verständnis komplexer molekularer Veränderungen in Tumorerkrankungen bei [2].

Die Entstehung und das unkontrollierte Wachstum von soliden Tumoren werden durch die Aktivierung von proliferationsfördernden oder apoptosehemmenden Signalwegen verursacht. Dies kann verschiedene molekulare Ursachen haben: Chromosomale Aberrationen wie beispielsweise Genamplifikationen oder Gentranslokationen, Punktmutationen oder epigenetische Modifikationen des Erbguts. Die Molekularpathologie bietet ein breites Spektrum von Methoden zur Identifi-

kation von Genvariationen durch die Analyse einzelner Genabschnitte auf der Ebene von Nukleinsäuren. Die DNA-Sequenzierung erfolgt klassischerweise durch die Sanger-Methode oder durch modifizierte Methoden wie Pyro-Sequenzierung. Bei allen diesen Techniken wird jeder Genabschnitt einzeln analysiert. Die molekularpathologische Untersuchung von Tumoren erfolgt meist an Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe. Diese Fixationsmethode beeinträchtigt die Qualität der Nukleinsäuren (DNA, RNA) und erlaubt deshalb nur die Untersuchung von relativ kurzen Fragmenten. Die Beimischung von Nicht-Tumorgewebe in einem Gewebekblock setzt die Sensitivität der Detektion herab. Schliesslich fokussiert die direkte Sequenzierung auf bekannte Genabschnitte, d.h., unerwartete oder seltene, möglicherweise therapierelevante Zielgene werden ausgeblendet.

Die neuen Sequenzierungstechnologien haben das Potential, die molekulare Diagnostik in der Pathologie und damit auch die medizinische Versorgung grundlegend zu verändern

Die ständig steigende Anzahl an neu entdeckten Veränderungen in bestimmten Tumorentitäten und die damit einhergehende Entwicklung zielgerichteter Therapeutika führen zu einer zunehmenden Bedeutung der molekularpathologischen Diagnostik in der personalisierten Medizin. Beispielsweise war bis vor kurzem das alleinige Ausschlusskriterium für die gezielte Therapie des metastasierten Darmkrebses mit blockieren-



Kirsten D. Mertz

den monoklonalen Antikörpern gegen den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) das Vorliegen einer KRAS-Mutation, weil diese Mutation den Tumor unempfindlich gegen die gegen EGFR gerichtete Therapie macht. Seit einiger Zeit muss jedoch auch der Mutationsstatus des homologen NRAS-Onkogens überprüft werden [3]. Die Molekularpathologie erlaubt hier präzisere Vorhersagen über das Ansprechen auf eine zielgerichtete Therapie und den Krankheitsverlauf. Die zunehmende Anzahl der zu testenden Gene – bisher zumeist stufendiagnostisch durchgeführt – ist allerdings mit einem enormen Zeit- und Kostenaufwand verbunden und mit den bisher eingesetzten Methoden kaum zeitnah zu bewerkstelligen. Zudem steht für eine zunehmende Anzahl an Analysen nur eine begrenzte Menge an isolierter Patienten-DNA, beispielsweise aus kleinen Biopsien, zur Verfügung. Um diesem zunehmenden Zeit- und Ressourcendruck in der Tumordiagnostik zu begegnen, bieten die vor rund zehn Jahren eingeführten, neuen Sequenzierungstechnologien der nächsten Generation (*next generation sequencing*, NGS) einen möglichen Ausweg. Sie haben das Potential, die molekulare Diagnostik in der Pathologie und damit auch die medizinische Versorgung grundlegend zu verändern. NGS-Techniken ersetzen die serielle Technik der klassischen Sanger-Sequenzierung durch eine millionenfache Parallelsequenzierung von

DNA-Fragmenten. Dies ermöglicht eine Erhöhung des Probendurchsatzes bei geringerem Zeitaufwand. Gleichzeitig bieten NGS-Methoden im Vergleich zur klassischen Sanger-Sequenzierung den Vorteil einer erhöhten Sensitivität. Somit kann die NGS-Technik auch noch sehr niedrige Mutationsfrequenzen zuverlässig nach-

NGS-Techniken ersetzen die serielle Technik der klassischen Sanger-Sequenzierung durch eine millionenfache Parallelsequenzierung von DNA-Fragmenten

weisen. Während die Entzifferung des menschlichen Genoms im Rahmen des *Human Genome Project* durch serielle Methoden sehr kostspielig und zeitaufwendig in regelrechten Sequenzierfabriken durchgeführt wurde, kann inzwischen die Analyse von genetischen Alterationen an einem Tischgerät in einem Bruchteil der Zeit erledigt werden. Allerdings ist die Datenerhebung im Gegensatz zu einer Sanger-Sequenzierung stark abhängig von einer komplexen bioinformatischen Auswertung. Daher geht der Trend beim Einsatz von NGS in der Routinediagnostik zu sogenannten «Tumorpanels». Hierbei werden mehrere tumorspezifische Kandidatengene im selben Probendurchlauf parallel sequenziert. Durch die Beschränkung auf Panelsequenzierungen können sowohl entstehende Kosten als auch die generierte Menge an bioinformatischen Daten pro Patient in vertretbaren Grenzen gehalten werden. Trotzdem können viele genetische Nachweisverfahren auf einem NGS-System gleichzeitig eingesetzt werden, während für die heute noch im Einsatz befindlichen, klassischen Methoden mehrere Detektionssysteme parallel betrieben werden müssen. Neben dem offensichtlichen Vorteil, zahlreiche Genveränderungen gleichzeitig analysieren zu können, reichen relativ kleine Mengen von DNA aus Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe oder auch zytologischem Untersuchungsmaterial für die Untersuchungen aus. Damit ist die NGS-Technologie wie geschaffen für den routinemässigen Einsatz in der Pathologie.

Die Anwendung von NGS in der klinischen Routinediagnostik erfordert hochspezialisierte Geräte, die verschiedene NGS-Sequenzierungsmethoden anwenden. Exemplarisch seien hier die Systeme von Ion Torrent® erwähnt wie Ion Personal Genome Machine® (PGM™) System, Ion Proton™ System. Dies sind vergleichsweise kostengünstige, echte Tischgeräte, die ohne markierte Nucleotide und ohne optische Systeme auskommen (Abb. 1). Hier finden die DNA-Sequenzierungsreaktionen auf einem Halbleiterchip in mikroskopisch kleinen Vertiefungen statt, und die Sequenzierung beruht auf dem Aufbau des Komplementärstrangs der zu se-

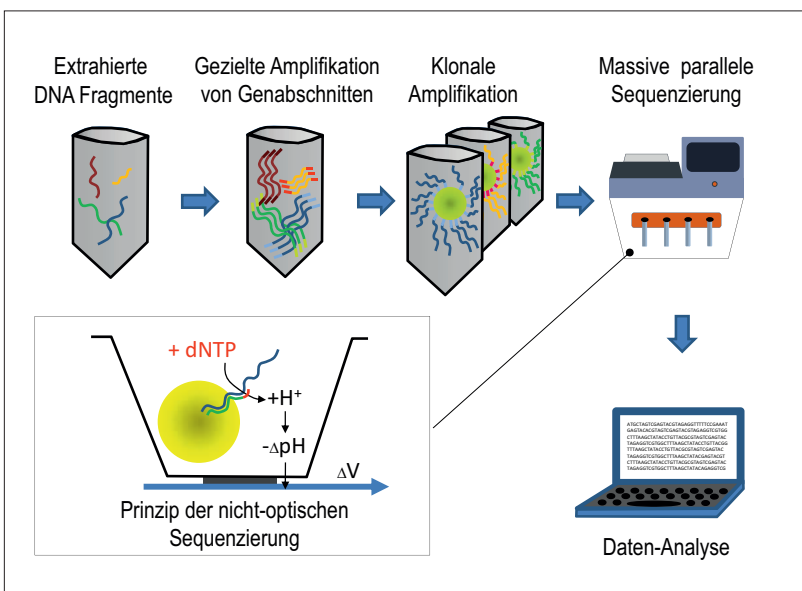


Abbildung 1: Prinzip der Tiefensequenzierung am Beispiel des Ion Torrent®: Die zelluläre DNA wird isoliert, und relevante Genabschnitte werden durch spezifische Primer gezielt amplifiziert. In einer Emulsions-PCR werden individuelle Genfragmente an kleinen Kügelchen amplifiziert, die anschliessend in die Vertiefungen auf einem Halbleiterchip gegeben werden. Hier wird in jeder Vertiefung beim Einbau eines Nucleotids ein Proton abgegeben, das durch den Halbleiter erfasst und als elektronischer Impuls an den Rechner zur Auswertung weitergegeben wird (Ion Torrent® – «das kleinste pH-Meter der Welt»).

quenzierenden DNA. In einem Sequenzierungszyklus für eine Base wird jede der vier Komplementärbasen (Adenosin, Cytosin, Guanosin, Thymin) getestet. Sobald das richtige Nukleotid vorliegt und eingebaut werden kann, werden H⁺-Ionen frei, und dies führt zu einer kleinen messbaren pH-Änderung («das kleinste pH-Meter der Welt»). Da diese Reaktionen in den einzelnen Vertiefungen von nur einem einzelnen DNA-Molekül ausgehen, kann das Verhältnis von mutierter und nicht-mutierter DNA errechnet werden. Dies führt zu einer hohen Sensitivität und zur Quantifizierbarkeit der nachgewiesenen DNA-Veränderungen.

Um den zunehmenden qualitativen und quantitativen Anforderungen in der molekularpathologischen Diagnostik gerecht zu werden, müssen also die Pathologen mit den raschen Fortschritten der NGS-Technologie Schritt halten. Sie übernehmen heutzutage zunehmend eine Führungsrolle bei der Etablierung dieser neuen Technologie und machen sie für die Routinediagnostik praktisch anwendbar. Allerdings sehen sich die Pathologen hierbei auch mit unerwarteten Herausforderungen konfrontiert. Sie generieren enorme Datenmengen und finden dabei oft komplexe und individuell variable molekulare Tumorprofile. Um aus diesen Daten individuelle Therapieansätze vorzuschlagen, sollten interdisziplinäre molekulare Tumorboards unter Einbezug verschiedener Disziplinen wie

Humangenetik, Molekularbiologie, Klinische Chemie, Immunologie und Bioinformatik ein wesentlicher Bestandteil im klinischen Management der Patienten werden [4, 5]. Dabei kommt den Pathologen eine zentrale Rolle zu, denn sie können gewebebasierte morphologische Diagnostik mit Ergebnissen der tumorassoziierten Genomanalyse ergänzen. Die personalisierte Genommedizin ist eine Herausforderung, der sich die gesamte Medizin stellen muss, wenn man diese neuen Strategien in die medizinische Praxis integrieren möchte. Die Pathologie hat dabei die entscheidenden Weichen in Richtung Zukunft gestellt.

Disclosure statement

Die Autoren haben keine finanziellen oder persönlichen Verbindungen im Zusammenhang mit diesem Beitrag deklariert.

Literatur

- 1 Moch H, Blank PR, Dietel M, Elmberger G, Kerr KM, Palacios J, Penault-Llorca F, Rossi G, Szucs TD. Personalized cancer medicine and the future of pathology. *Virchows Archive*. 2012;460(1):3–8.
- 2 Gabrielson E, Berg K, Anbazhagan R. Functional genomics, gene arrays, and the future of pathology. *Mod Pathol*. 2001;14(12):1294–99.
- 3 Dahabreh JJ, Terasawa T, Castaldi PJ, Trikalinos TA. Systematic review: Anti-epidermal growth factor receptor treatment effect modification by KRAS mutations in advanced colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2011;154(1):37–49.
- 4 Schwaederle M, Parker BA, Schwab RB, Fanta PT, Boles SG, Daniels GA, Bazhenova LA, Subramanian R, Coutinho AC, Ojeda-Fournier H, Datnow B, Webster NJ, Lippman SM, Kurzrock R. Molecular tumor board: the University of California-San Diego Moores Cancer Center experience. *Oncologist*. 2014;19(6):631–6.
- 5 Erdmann J. All aboard: Will molecular tumor boards help cancer patients? *Nat Med*. 2015;21(7):655–6.

Korrespondenz:
PD Dr. med. Kirsten D. Mertz
Institut für Pathologie
Kantonsspital Baselland
CH-4410 Liestal
kirsten.mertz[at]ksbl.ch
www.ksbl.ch