

In einer Woche zur Exom-Sequenz

Das Exom bezeichnet die Gesamtheit aller Exons, also der DNA-Abschnitte, die für Proteine und andere funktionelle Produkte kodieren. Damit macht das Exom nur etwa ein Prozent des menschlichen Genoms aus, beinhaltet aber die überwiegende Mehrheit aller krankheitsverursachenden Mutationen. Die Exom-Sequenzierung spielt somit besonders bei der Diagnostik genetischer Erkrankungen und von Krebs eine große Rolle, da es durch seine geringere Größe sehr viel schneller untersucht werden kann als das komplette Genom. Der GATC Biotech AG aus Konstanz ist es nun gelungen, mit InView™ 1-Week Exome Diagnostic eine neue Anwendung zur Exom-Sequenzierung mit der bisher schnellsten Lieferzeit weltweit zu entwickeln.

Das menschliche Genom umfasst mehr als drei Milliarden Basenpaare, wogegen das Exom im Vergleich klein erscheinen mag. Doch mit seinen immerhin etwa 30 Millionen Basenpaaren ist dessen Sequenzierung immer noch recht aufwendig. Mit der etablierten Next-Generation-Sequencing-(NGS)-Technologie dauerte es bisher etwa vier bis acht Wochen, bis die Sequenz bekannt war. „Diese lange Zeit ist für Patienten, die auf eine Diagnose warten, natürlich eine Zumutung“, bemerkt Peter Pohl, Geschäftsführer der GATC Biotech AG in Konstanz. „Es gibt daher eine große Nachfrage nach schnelleren Sequenziermethoden.“

Der Sequenzierdienstleister GATC Biotech verfügt bereits über langjährige Erfahrung in der Exom-Sequenzierung. Im Rahmen des International Cancer Genome Consortium (ICGC), einem der weltweit größten interdisziplinären biomedizinischen Großprojekte zur Klärung der molekularen Ursachen von Krebserkrankungen, hat GATC seit 2009 in verschiedenen Projekten bereits über 1.000 Exome untersucht. Nun galt es, die bisherige Methode für eine schnellere Anwendung anzupassen.

Der erste Schritt auf dem Weg zur schnelleren Exom-Sequenzierung war die Anschaffung einer neuen Sequenzierplattform, dem MiSeq-System von Illumina. Dessen „großer Bruder“, Illuminas HiSeq-System, kam bisher für den Großteil aller NGS-Anwendungen zum Einsatz, auch zur Exom-Sequenzierung.

Der HiSeq zeichnet sich durch eine hohe Sequenzier-Leistung von bis zu 6 Milliarden sequenzierten Abschnitten (sogenannten reads) und 600 Gb Daten pro Lauf aus, benötigt dafür allerdings teilweise über eine Woche für einen Sequenzierlauf. Während die MiSeq-Technologie zwar nicht mit diesem Durchsatz mithalten kann, punktet sie vor allem durch ihre Geschwindigkeit. „Der MiSeq eignet sich dadurch vor allem für die schnelle Sequenzierung kleinerer Mengen“, erklärt Pohl. In den Dimensionen der heutigen Sequenziertechnologien fällt auch das menschliche Exom unter diese Definition.



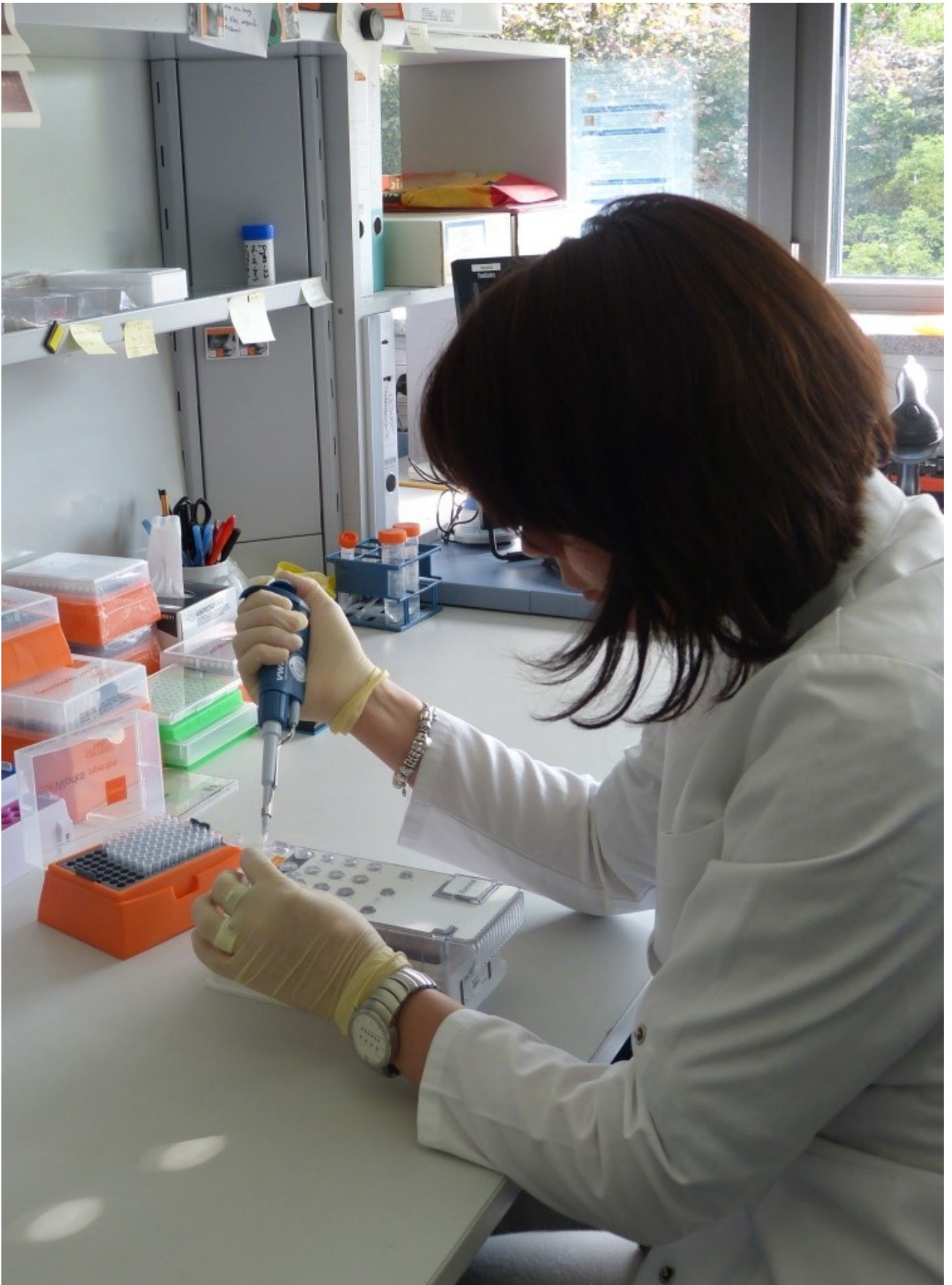
Peter Pohl, Geschäftsführer der GATC Biotech AG in Konstanz, erläutert die einfache Bedienung des neuen MiSeq-Sequenzierroboters.
© BioLAGO

Bekannte Anwendung in neuem System

Da MiSeq und HiSeq das gleiche Datenformat und Gesamtkonzept nutzen, musste die für den HiSeq etablierte Exom-Sequenzierung lediglich auf den MiSeq übertragen und nicht erst von Grund auf neu entwickelt werden. „Wir mussten nur zuerst sehen, welche Anwendungen mit dem MiSeq möglich sind“, erläutert Dr. Kerstin Stangier, Leiterin der Abteilung für Next Generation Sequencing bei der GATC Biotech. Nach Anpassungen in der Probenpräparation und der Bioinformatik wurde die neue Anwendung validiert, um eine ISO-Zertifizierung dafür zu erhalten.

Der Arbeitsablauf bei der Exom-Sequenzierung beinhaltet prinzipiell zuerst eine gezielte Anreicherung des Exoms, um anschließend nur diesen Teil des Genoms für die Sequenzierung weiter zu verwenden. Dazu wird das gesamte Exom in kleinen Abschnitten von jeweils etwa 350 bis 400 Basenpaaren amplifiziert, um ausreichend Material für die anschließende Sequenzierung zu haben. Jeder dieser DNA-Abschnitte wird mehrfach sequenziert, um eventuelle Sequenzierfehler auszugleichen. Durch die so erreichte höhere Abdeckung (Coverage) des Exoms kann die korrekte Sequenz von der Mehrzahl der sequenzierten Abschnitte abgelesen werden, selbst wenn an einzelnen Stellen ein Fehler auftritt. „Für die InView™ 1-Week Exome Diagnostic beträgt die Abdeckung 30-120, was bedeutet, dass jeder Abschnitt 30- bis 120-fach sequenziert wird“, schildert Dr. Stangier. Die Qualität oder Zuverlässigkeit der Ergebnisse leidet daher nicht unter der Schnelligkeit der Anwendung.

Von der Mutation zur Diagnose



Bei der anschließenden Analyse der Sequenzen werden sowohl Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang (single nucleotide polymorphisms, SNPs) als auch kleinere Insertionen und Deletionen erkannt. Dazu werden die sequenzierten DNA-Abschnitte mit den entsprechenden Abschnitten eines Referenz-Humangenoms verglichen, um Veränderungen gegenüber diesem Standard zu finden.

Welche Auswirkungen eine so detektierte genetische Veränderung hat, muss in einer anschließenden Analyse geklärt werden. „Dabei wird unter anderem überprüft, in welchem Gen sie sich befindet und inwiefern sich die Veränderung der Basensequenz dieses Gens auf die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins auswirkt“, erklärt Dr. Stangier.

Bestenfalls kann es sich um eine stumme Mutation handeln. Es kann aber auch ein Stopcodon entstanden sein, das die Proteinsynthese abbricht, so dass kein vollständiges Protein produziert werden kann. „Außerdem ist für manche SNPs bereits bekannt, dass sie mit einer bestimmten Krankheit im Zusammenhang stehen“, ergänzt Dr. Stangier.

Die weitergehende Interpretation stellt somit noch eine große Herausforderung dar, die bisher nur von Humangenetikern mit dementsprechendem Spezialwissen, nicht aber von jedem Allgemeinmediziner bewältigt werden kann. „Dieses Wissen entwickelt sich erst. Doch es wird sicherlich eine Generation von Bioinformatik-Tools entstehen, die bei der medizinischen Einschätzung und Interpretation der Veränderungen helfen“, prognostiziert Pohl.

Personalisierte Medizin als Standard der Zukunft

Die Nachfrage nach einer Exom-Sequenzierung ist schon heute groß und wächst immer weiter. Dadurch eröffnete Möglichkeiten zur personalisierten Medizin können beispielsweise bei Krebserkrankungen entscheidend sein, um eine auf die spezifische Krebsart angepasste Therapie auszuwählen. „Auf diese Weise würde nicht nur dem Patienten eine unnötige Belastung erspart, auch für das Gesundheitssystem kommt eine Exom-Sequenzierung günstiger als etwa eine vermeidbare Chemotherapie oder Bestrahlung“, erklärt Dr. Stangier.

Die Informationsbreite der Exom-Sequenzierung hat außerdem den großen Vorteil, dass auch beim Verdacht auf eine bestimmte genetische Erkrankung nicht nur ein als ursächlich angenommenes Gen untersucht wird, sondern auch alle anderen Gene, deren Expression das Krankheitsgen beeinflussen können. Dabei kann es sich um Transkriptionsfaktoren oder andere Modulatoren aller Art handeln. So können auch untypische oder synergistisch wirkende Veränderungen erkannt werden. „Eine einzelne Mutation in einem Gen bedeutet oft nur ein erhöhtes Risiko für eine Erkrankung. Das tatsächliche Eintreten der Krankheit hängt dann aber noch von vielen anderen Faktoren ab“, erklärt Dr. Stangier.

Die ständig neuen Möglichkeiten, die die neuen Sequenzieretechnologien eröffnen, werden auch in Zukunft zur wachsenden Bedeutung der genetischen Diagnostik beitragen. „Es handelt sich hier um den Beginn einer Ära mit neuen Konzepten, neuen Unternehmen und neuen Werkzeugen. Ich bin überzeugt, dass die Exom-Sequenzierung in ein paar Jahren medizinischer Standard für Diagnostik und Personalisierung der Medizin wird“, erwartet Pohl.

Fachbeitrag

12.08.2013

Bettina Baumann

BioLAGO

© BIOPRO Baden-Württemberg GmbH

Weitere Informationen

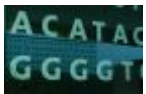
GATC Biotech AG

Jakob-Stadler-Platz 7

78467 Konstanz

Tel.: +49 (0) 7531 81 60 0

Der Fachbeitrag ist Teil folgender Dossiers



Gendiagnostik: Technik stößt an Grenzen des medizinisch Sinnvollen

