

Spezifische Verwendungsmöglichkeiten des „Whole Genome Sequencing“ (WGS)

Targeted-Resequencing.

Mit der NGS-Technologie können neben der oben erwähnten Analyse ganzer Genome auch „Targeted-Resequencing“-Ansätze gefahren werden, was speziell für die molekulargenetische Diagnostik von Bedeutung ist. Dabei wird nicht das komplette Genom sequenziert, sondern nur die für die jeweilige Fragestellung relevanten Bereiche.

Aufgrund des enormen Durchsatzes können in solch einem Ansatz beispielsweise mehrere Dutzend Gene mehrerer Patienten gleichzeitig analysiert werden. Die **parallele Analyse mehrerer Gene**, die für ein bestimmtes klinisches Krankheitsbild ursächlich sind (z. B. Gene für Neuropathien oder Tumorsuppressorgene), senkt sowohl die Kosten als auch die Bearbeitungszeit im Vergleich zur herkömmlichen Sanger-Sequenzierung beträchtlich. Für die Vorselektion der entsprechenden Gene stehen dabei mehrere Methoden zur Verfügung. So kann beispielsweise nach einer Anreicherung der für Gene kodierenden DNA-Abschnitte (Exons, mit flankierenden intronischen Bereichen) eine „Whole-Exome“-Analyse gefahren werden, was im Vergleich zum gesamten Genom nur einen Bruchteil an erzeugten Daten verursacht (ca. 5%).

Whole-Transcriptome-Analyse. Weitere Anwendungen des NGS stellt die „Whole-Transcriptome“-Analyse dar.

Hierbei werden im Gegensatz zum „Whole-Genome-Sequencing“ nur die tatsächlich in der RNA transkribierten Sequenzen sequenziert. Dies ermöglicht u. a. den Vergleich der Genexpression in verschiedenen Geweben (z. B. Tumor- gegen Normalgewebe).

Die Analyse des Transkriptoms per NGS ermöglicht außerdem die sensitive und kostengünstige quantitative Bestimmung der Genexpression mittels „Serial Analysis of Gene Expression“ (SAGE) im großen Maßstab, was u. a. für die Analyse neuer, alternativ gespleißter Gen-Isoformen von Bedeutung ist.

Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme sind Enzyme, die **sequenzspezifisch** doppelsträngige **DNA** spalten.

Liegen sich die Schnittstellen in den beiden DNA-Strängen unmittelbar gegenüber, entstehen sog. „**Blunt Ends**“. Sind die Schnittstellen um einige Nukleotide gegeneinander versetzt, entstehen überhängende Enden, sog. „**Sticky Ends**“. Die Erkennungssequenz ist für jedes Restriktionsenzym spezifisch, die Längen variieren zwischen 4 und 10 Basenpaaren.

Eines der bekanntesten Restriktionsenzyme wurde aus dem Bakterium *E.coli* isoliert und trägt daher den Namen **EcoRI**. Bakterien benutzen ihre Restriktionsenzyme, um z. B. durch Phagen importierte DNA zu zerstören.

Restriktionsenzyme erkennen also bestimmte Sequenzabfolgen und durchtrennen in einem **Hydrolyseschritt** den DNA-Doppelstrang an dieser Stelle. Schneidet man die DNA z. B. mit den oft schneidenden Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *BamHI* und *HindIII*, so entstehen ca. 1 Million Fragmente unterschiedlicher Länge.

Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe nach ihrer Länge zu ordnen, werden sie mittels der Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei diesem Verfahren wird ein Gemisch aus DNA-Fragmenten in die Vertiefungen (Slots) eines **Agarose-** oder **Acrylamidgels** pipettiert. Das Gel befindet sich in einer Salzlösung, und mithilfe von Elektroden wird ein Spannungsfeld aufgebaut. Die DNA-Fragmente tragen negative Ladungen, was im elektrischen Feld dazu führt, dass sie sich in Richtung der Kathode bewegen. Der ungehinderten Bewegung steht jedoch die Agarose im Wege.

Kleine DNA-Fragmente werden ihren Weg durch das Gel schneller finden als die großen DNA-Fragmente. Die Fragmente werden also im elektrischen Feld entsprechend ihrer **Länge** aufgetrennt (Abb. 1.48).

Die Sichtbarmachung der DNA-Fragmente erfolgt über interkalierende fluoreszierende Substanzen (z. B. Ethidiumbromid, s. S. 70, Abb. 1.31) oder durch radioaktive Markierung und anschließende Detektion der DNA.

Southern-Blot-Hybridisierung

Die Southern-Blot-Hybridisierung wurde Mitte der 70er-Jahre von E. M. Southern entwickelt und stellte die erste Methode zur Analyse genomischer DNA mittels **Hybridisierung** dar.

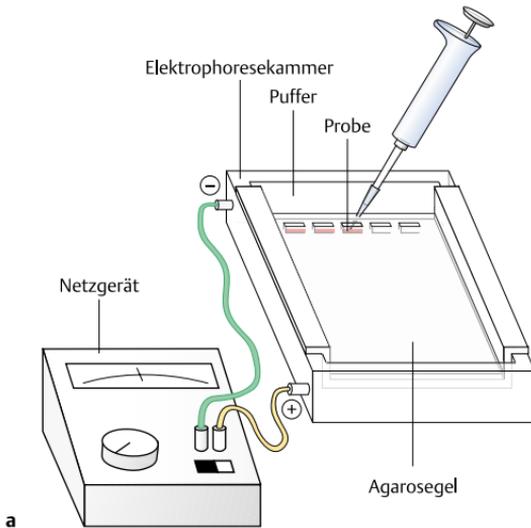
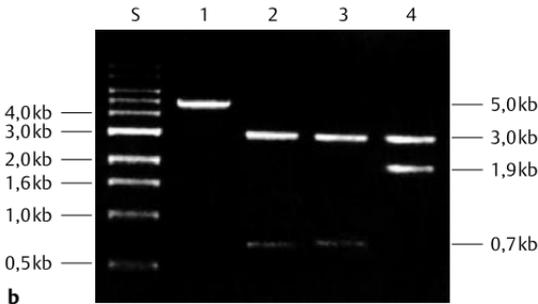


Abb. 1.48 Verfahren der Gelelektrophorese.

a Gelkammer zur Durchführung einer Gelelektrophorese. **b** Gelaufenes Gel mit den durch Ethidiumbromid sichtbar gemachten DNA-Banden verschiedener Größe.



Ziel der Southern-Blot-Hybridisierung ist es, mithilfe eines kurzen, radioaktiv markierten DNA-Fragments einer bekannten Sequenz (**DNA-Sonde**) entsprechende komplementäre genomische **DNA-Abschnitte** aufzufinden.

Aus Zellkernen isolierte genomische DNA muss man sich wie ein unordentliches Knäuel Wolle vorstellen. Wenn man sich für ein bestimmtes Gen interessiert, benötigt man eine Methode, diesen Faden zu entwirren und mit laborchemischen Methoden in „handliche Abschnitte“ zu sortieren. Eine Möglichkeit ist, mithilfe von **Restriktionsenzymen** (s. o.) den DNA-Faden in **Fragmente** zu zerschneiden und diese per Gelelektrophorese (s. o.) der Länge nach aufzutrennen.

Für den Hybridisierungsschritt muss nun die durch Gelelektrophorese aufgetrennte DNA auf ein **Filterpapier** gebunden werden. Hierzu wird die Agarose

auf ein Pufferreservoir gelegt, auf die Agarose legt man das Filterpapier und durch **Kapillarkraft** oder durch **Elektroblotting** (mithilfe einer angelegten Spannung) werden die DNA-Fragmente aus der Agarose auf das Filterpapier transportiert (**geblottet**). Die Poren dieses Filterpapiers sind so eng, dass die DNA-Fragmente darauf hängen bleiben. Das Filterpapier wird anschließend zur Fixierung der genomischen DNA im Ofen getrocknet (**gebacken**).

Bei der Hybridisierungsreaktion wird die auf dem Filter gebundene DNA mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde in einer Hybridisierungslösung inkubiert. Innerhalb von mehreren Stunden Reaktionszeit sucht sich das markierte DNA-Fragment die zu ihm komplementäre DNA-Sequenz auf dem Filterpapier und bindet an diese, indem ein DNA-Doppelstrang ausgebildet wird.

Zur Detektion legt man einen unbelichteten Film auf das Filterpapier und lässt diesen durch die radioaktiv markierte Sonde belichten (Abb. 1.49). Mit dieser Methode kann also die Frage beantwortet werden, ob in der genomischen DNA eines Individuums oder Patienten ein bestimmtes Gen oder ein bestimmter Genabschnitt vorhanden ist.

In der molekulargenetischen Diagnostik findet das Verfahren der Southern-Blot-Hybridisierung z. B. bei der Diagnostik der **fazio-scapulo-humeralen Muskeldystrophie** Anwendung. Die Erkrankung weist eine Häufigkeit von ca. 3:100 000 auf. Sie beginnt im Jugend- oder jungen Erwachsenenalter mit einer Schwäche der Gesichts- oder Schultergürtelmuskulatur. Charakteristisch ist die Unfähigkeit zu pfeifen oder durch einen Strohhalm zu trinken. Die Zungen- und Schlundmuskulatur ist nicht betroffen, sodass keine Schluckstörungen auftreten. Bei zwei Drittel der Patienten liegt eine Innenohrschwerhörigkeit vor, die Hälfte der Patienten leidet an einer vaskulären Retinopathie.

Die Erkrankung wird durch eine Deletion im subtelomeren Bereich von Chromosom 4 verursacht. In diesem Bereich findet sich eine Abfolge von mehreren 3,2 kb langen repetitiven Sequenzblöcken, von denen im Krankheitsfall einige deletiert sind. Da in diesem Bereich keine zu transkribierenden Gene lokalisiert sind, liegt als Pathomechanismus vermutlich ein Positionseffekt zu Grunde. Durch Southern-Blot-Hybridisierung kann die Deletion bei einem Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollperson identifiziert werden.

Analog zum Southern-Blotting wird beim **Northern-Blotting mRNA** durch den Einsatz von radioaktiven Sonden untersucht.

Das **Western-Blotting** funktioniert ebenfalls nach dem gleichen Prinzip. Hier wird ein gesuchtes **Protein** durch radioaktive oder Farbstoff-/Fluoreszenz-markierte Antikörper nachgewiesen.

1.6.2 Verfahren zum Nachweis unbekannter Mutationen

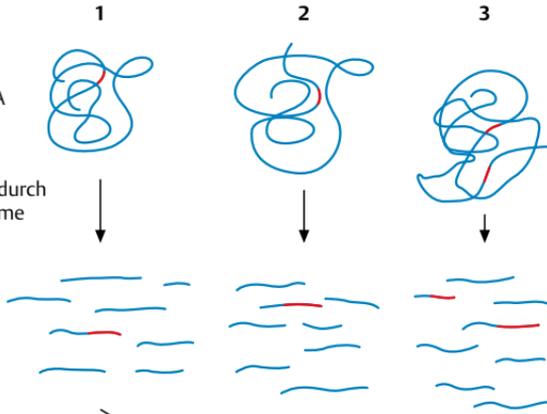
In der molekulargenetischen Diagnostik muss zwischen dem Nachweis einer bekannten und einer unbekanntem Mutation bei einem bestimmten Krankheitsbild unterschieden werden. Bei vielen erblichen Erkrankungen weiß man zwar, welches Gen eine Mutation trägt, man weiß aber nicht, wo sie im Gen lokalisiert

1

Reaktion

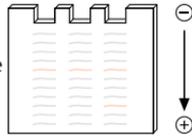
genomische DNA

Verdau der DNA durch Restriktionsenzyme

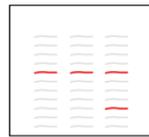


Transfer der aufgetrennten DNA auf Nitrocellulose-Membran oder Nylonfilter

Agarose-Gelelektrophorese



Hybridisierung der DNA mit ³²P-markierter DNA-Sonde



Detektion der Banden über einen Röntgenfilter

Achtung: Erst hier werden die Banden sichtbar! Auf Gel und Filter ist noch nichts zu erkennen.

— gesuchte Sequenz

Abb. 1.49 **Verfahren des Southern-Blot.** Zunächst wird die genomische DNA durch Restriktionsenzyme in Fragmente gespalten. Diese Fragmente werden durch eine Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und danach auf einen Filter transferiert. Auf diesem Filter findet die Hybridisierungsreaktion mit der radioaktiv markierten Sonde statt, die durch Aufbringen eines strahlungssensitiven Films nachgewiesen werden kann.

ist. Dazu kommt, dass viele Erkrankungen genetisch heterogen sind, das heißt, die krankheitsverursachende Mutation kann in mehreren oder vielen verschiedenen Genen liegen.

Ein Beispiel für eine **monogene Erkrankung** ist die **Neurofibromatose Typ 1** mit einer sehr spezifischen klinischen Symptomatik. Hier liegt die Mutation im NF1-Gen, sodass nur dieses Gen in der Diagnostik berücksichtigt werden muss. Ein Beispiel für eine **heterogene Erkrankung** ist die **frühkindliche Epilepsie** mit einer unspezifischen klinischen Symptomatik, denn eine elektrophysiologische Imbalance der Neuronen kann durch Mutationen in vielen verschiedenen Genen verursacht werden, sodass man in der Diagnostik mehrere oder sogar viele Gene berücksichtigen muss.

Grundsätzlich gibt es zwei Sequenzierverfahren, um unbekannte Mutationen in Genen zu suchen. Die Sanger-Sequenzierung und das „Next Generation Sequencing“ (NGS). Die Sanger-Sequenzierung (S. 106) kommt bei der Analyse einzelner Gene noch zum Einsatz, da diese Technologie im Analyseumfang sehr beschränkt ist. In der klinisch genetischen Diagnostik kommt heute praktisch nur noch **Next Generation Sequencing** mit der Illumina Technologie (S. 108) zum Einsatz.

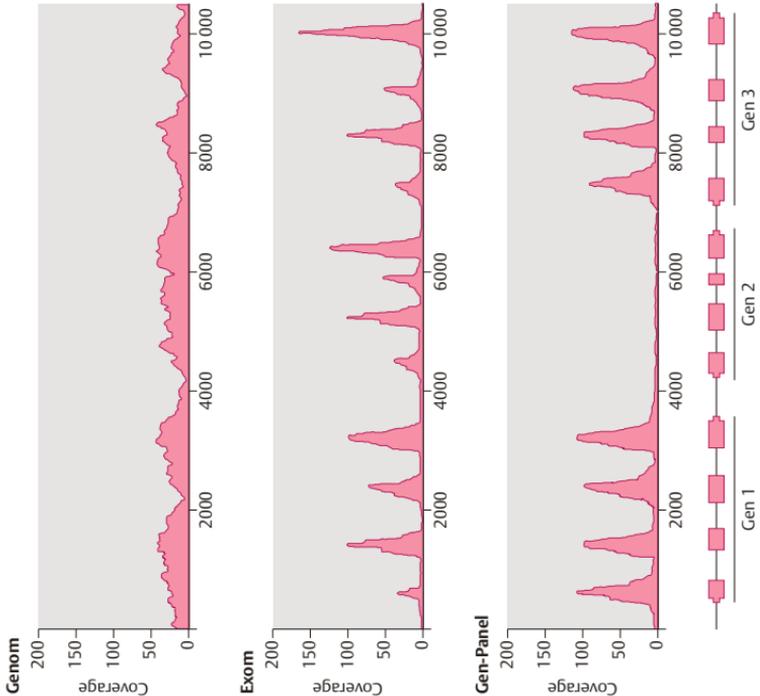
Das technische Vorgehen hängt hierbei von der klinischen Fragestellung ab. Es können ein diagnose-bezogenes NGS-Panel, ein phänotyp-bezogenes NGS-Panel, ein klinisches Exom NGS-Panel oder eine whole Exom NGS-Panel analysiert werden. Im Gegensatz zum whole Exom NGS-Panel, in dem alle bekannten Gene enthalten sind, enthält das klinische Exom NGS-Panel nur Gene, die in Assoziation mit genetischen Erkrankungen beschrieben sind. Die Analyse in ihrer Funktion unbekannter Gene in einem whole Exom NGS-Panel ist im Rahmen einer klinisch diagnostischen Fragestellung nicht sinnvoll, dies fällt in den Bereich der Forschung.

Qualitätskriterien für Next Generation Sequencing

Die diagnostische Tiefe ist beim NGS-Verfahren durch die Parameter „Abdeckung“ und „Coverage“ definiert (Abb. 1.50) Die Abdeckung gibt an, ob alle Bereiche des Gens bei der Analyse erfasst werden, die Coverage gibt an, wie oft ein bestimmtes Nukleotid in einem Gen in der Analyse sequenziert wurde. Je nach klinischer Fragestellung werden unterschiedliche Stufen der diagnostischen Tiefe (Qualitätsstufen A-C; siehe „Guidelines for diagnostic next generation sequencing“, EuroGentest, 2014) angewendet:

Typ-A-Diagnostik. Diese stellt den höchsten mittels NGS erreichbaren Qualitätsstandard dar. Diese Qualität der Analyse ist für bekannte, hochpenetrante Gene für klar umschriebene Krankheitsbilder (z. B. BRCA1, BRCA2, Muskeldystrophie Duchenne/Becker-Kiener ID 20.00 und Hereditäres Nicht-Polypöses Kolorektales Karzinom/Lynch-Syndrom ID 99.00) zu fordern. Komplettiert wird die Diagnostik

Gene	analysierte Nukleotide	mittlere Sequenzier-tiefe	min. erreichte Coverage	Varianten für eine relative Auswertung)
~ 22 000 (kodierende und nicht kodierende Sequenzen)	3000 Mb	~ 10-fach	N. A	~ 3 300 000 (~ 15 000 sind selten [$< 1\%$] und funktionell)
~ 22 000 (kodierende Sequenzen)	64 Mb	~ 120-fach	20-fach bei 98% der ROI*	(~ 400 sind selten [$< 1\%$] und funktionell)
~ 2 – 200 (kodierende Sequenzen)	5 – 500 kb	~ 300 – 600-fach	30-fach bei 98% der ROI*	(~ 10 – 80 sind selten [$< 1\%$] und funktionell)



*ROI (region of interest; dt.: Bereich von Interesse): Für die Auswertung der Varianten relevanter Bereich.

◀ Abb. 1.50 Whole Genome Sequencing, Whole Exome Sequencing and Gene Panel Sequencing.

mit einer Analyse auf genomische Deletionen und Duplikationen mittels MLPA sowie ggf. weiteren Analysen (z.B. Homopolymer-Analysen, spezifische Long-Range PCR).

Typ-B-Diagnostik. Analysen dieser Kategorie umfassen Multi-Gen-Panels, die mit einer >99,9%igen Detektionsgenauigkeit sequenziert werden. Die Information, welche Bereiche individuell unzureichend abgedeckt sind, sollte in einer Tabelle dargestellt werden. Eine Komplettierung einzelner oder mehrerer Gene per Sanger-Sequenzierung und ein MLPA-Deletionsscreening (falls verfügbar) ausgewählter Gene kann bei gegebener klinischer Indikation erfolgen.

Typ-C-Diagnostik. Unter diese Qualitätskategorie fallen Analysen wie z.B. das klinische Exom (enthält alle mit Krankheiten assoziierten Gene), das „Schwere rezessive Erkrankungen“-Panel (Kingsmore Panel) und „Whole Exome Sequencing“ (enthält alle bekannten Gene). Die diagnostischen Kriterien erfordern auch hier, dass eine Sequenziertiefe von über 20 Sequenzen pro Base in mindestens 98% der untersuchten Bereiche gesichert ist. Die Information, welche Bereiche individuell unzureichend abgedeckt sind, kann angefordert werden, wird aber nicht standardmäßig im Befund angegeben.

Vorgehen in Abhängigkeit von der Fragestellung

Das jeweilige Vorgehen (diagnose-bezogenes NGS-Panel, phänotyp-bezogenes NGS-Panel oder klinisches Exom NGS-Panel) sowie die diagnostische Tiefe (Qualitätsstufen) hängen von der klinischen Fragestellung ab:

- **Diagnose-bezogenes NGS-Panel:** Besteht der klinische Verdacht auf eine **definierte genetische Erkrankung**, für die nur eine **begrenzte Anzahl von Genen** verantwortlich sein kann? Dann zunächst Analyse der mit dieser Verdachtsdiagnose assoziierten Gene (Diagnose-bezogenes NGS-Panel mit Qualität Typ A), damit die wichtigsten klinischen Verdachtsdiagnosen sicher bestätigt oder auch sicher ausgeschlossen werden können (Abb. 1.50). Ein Beispiel für dieses Vorgehen ist die Diagnostik bei Verdacht auf eine erbliche Brustkrebserkrankung; hier werden im diagnostischen Ansatz ca. 12 Gene analysiert. In der weiteren Abklärung ist in der Regel ein phänotyp-bezogenes Panel sinnvoll.
- **Phänotyp-bezogenes NGS-Panel:** Handelt sich um eine **seltene Erkrankung** mit einem **klinischen Phänotyp**, der durch **Veränderungen in mehreren Genen** verursacht sein kann? Hier ist ein Phänotyp-bezogenes Panel sinnvoll (Qualität Typ B). In der differenzialdiagnostischen Abklärung kann es notwendig werden, ein weiteres phänotyp-bezogenes Panel zu analysieren oder mit einem

klinischen Exom-Panel weiterzumachen. Bei Letzterem wird auf krankheits-assoziierte Gene fokussiert, die in der Human Gene Mutation Database (HGMD) beschrieben sind. Ein Beispiel ist die Abklärung einer frühkindlichen Myoklonusepilepsie, die durch eine Mutation in ca. 15 Genen verursacht werden kann, wobei differenzialdiagnostisch aber auch eine andere Form der Epilepsie in Frage kommt, deren genetische Ursachen in einer umschriebenen Anzahl anderer Gene liegen kann.

- **Klinisches Exom NGS-Panel:** Es kann auch die primäre Analyse eines klinischen Exom-Panels indiziert sein, z. B. wenn bereits **viel Diagnostik im Vorfeld** gelaufen ist oder der klinische Phänotyp **keiner Verdachtsdiagnose** zugeordnet werden kann, die auf eine kleinere Anzahl von Genen eingrenzbar ist.

Die Zusammensetzung der Gene wird sich abhängig von neuen Erkenntnissen immer wieder ändern. Findet man z. B. bei einem Kind mit einer frühkindlichen Epilepsie keine genetische Ursache und sind andere Ursachen wie z. B. Stoffwechselerkrankungen ausgeschlossen, ist es u.U. sinnvoll die genetische Diagnostik nach 1–2 Jahren zu wiederholen, vor allem wenn neue Erkenntnisse zu genetischen Ursachen in anderen Genen gewonnen wurden, die zum Zeitpunkt der vorausgehenden Diagnostik nicht vorlagen. Die genetische Diagnosesicherung ist für den Patienten wichtig, da auch für genetisch determinierte Erkrankungen immer häufiger therapeutische Optionen aus diesen Ergebnissen ableitbar sind.

1.6.3 Verfahren zum Nachweis bekannter Mutationen

Eine Reihe von Erkrankungen wird durch ganz bestimmte, immer wieder auftretende Mutationen verursacht. Ein Beispiel ist die erhöhte **Thrombophilieneigung** durch die **Faktor-V-Mutation** pArg506Gln. Ein weiteres Beispiel ist die **Achondroplasie** (S.285). Bei dieser autosomal dominanten Erkrankung findet sich die Mutation im **FGFR3-Gen** (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) immer an **Position 1138**, wobei es entweder zu einem Austausch von G nach A oder von G nach C kommt. Beide Veränderungen führen zur gleichen Aminosäuresubstitution G308R (Glycin nach Arginin). In der Mehrzahl der Fälle tritt die Mutation neu auf, und die Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens steigt mit dem Alter des Vaters (S.80).

Zum Nachweis solcher spezifischer Mutationen sind Verfahren entwickelt worden, die die gezielte Analyse eines oder weniger Nukleotide zulassen. Eine anschließende Sequenzanalyse ist hier nicht notwendig.

Verfahren zum Nachweis bekannter Mutationen sind:

- Restriktionsenzym-Spaltung
- allelspezifische Polymerase-Ketten-Reaktion
- Primer-Extension-Reaktion
- Oligonukleotidligierung
- TaqMan, Real Time PCR
- Mikro-Array: Minisequencing, SNP-Array
- Mikro-Array: Primer-Extension, SNP-Array

Restriktionsenzym-Spaltung

Wie oben bereits erwähnt, spalten Restriktionsenzyme sequenzspezifisch doppelsträngige DNA (s. S. 116).

Führt eine Mutation zum **Verlust** oder zur **Entstehung** einer Restriktionsschnittstelle, so kann dies zum Mutationsnachweis genutzt werden.

In der Praxis wird der DNA-Abschnitt, der die Mutation trägt, amplifiziert. Anschließend wird eine Restriktionsenzym-Spaltung durchgeführt. Wurde durch die Mutation eine neue Spaltstelle generiert, so werden sich in der Gelelektrophorese nach der Restriktionsspaltung zwei DNA-Fragmente nachweisen lassen. Geht durch die Mutation eine Spaltstelle verloren, so wird die Spaltung des PCR-Produktes ausbleiben.

Allelspezifische Polymerase-Ketten-Reaktion

Allelspezifische Oligonukleotide können auch als **Primer** in der PCR verwendet werden. In diesem Falle muss der Primer so gewählt sein, dass das **letzte Nukleotid** am **3'-Ende** des Primers zur **Mutation** komplementär ist. Eine vollständige Anlagerung des Primers ist also nur möglich, wenn die mutierte Sequenz vorliegt. Da die DNA-Synthese in der PCR ausgehend von dem 3'-Ende des Primers – also von dem letzten Nukleotid aus – erfolgt, ist dies nur möglich, wenn das 3'-Ende an den komplementären DNA-Strang hybridisiert. Es kann eine DNA-Synthese mit einem für die Mutation spezifischen Primer daher nur auf der mutierten Sequenz erfolgen.

Ist ein PCR-Primer zur **mutierten DNA-Sequenz** komplementär, so entsteht nur bei **vorhandener Mutation** ein PCR-Produkt. Das Vorhandensein eines PCR-Produktes deutet also darauf hin, dass die zu analysierende Mutation vorliegt.