

PD Dr. Ludger Klein-Hitpass (Biochip-Labor, IFZ Essen)

Massiv paralleles Sequenzieren in der Diagnostik von Tumoren und erblichen Syndromen

Unter den molekularbiologischen Methoden zur Erforschung der molekularen Ursachen von Krebserkrankungen und erblichen Syndromen spielten bis vor wenigen Jahren sogenannte Genchip-Technologien eine überaus wichtige Rolle. Diese Methoden erlauben u. a. die gleichzeitige Bestimmung der Aktivität der ca. 30.000 Gene des Menschen und damit eine genomweite Untersuchung ihrer Ausprägung in Tumoren- und Normalgewebe. Die Verwendung eines anderen Typs von Genchips ermöglicht darüber hinaus die Identifizierung von chromosomalen Veränderungen, die bei Tumoren und anderen genetischen Erkrankungen auftreten. Bei Tumoren stellen der Verlust von sog. Tumorsuppressor-Genen und die Vervielfältigung sog. Onko-Gene wichtige Schritte im Mehrstufenmodell der Krebsentstehung dar (s.a. frühere Beiträge). Die Identifizierung einzelner Basenaustausche in der Zellkern-DNS (Punktmutation), die ebenfalls zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen oder zur Aktivierung von Onko-Genen führen können, waren allerdings mittels Genechips genomweit nicht zu untersuchen. Möglich ist dies seit fast zwei Jahrzehnten durch die sogenannte Sanger-Sequenzierung, mit Hilfe derer die Sequenz von bis zu 800 Basenpaaren langen DNS-Abschnitten gezielt bestimmt werden kann. Da die Protein-kodierenden Bereiche der Gene in sog. Exons unterteilt sind, die durch lange Intron-Bereiche voneinander getrennt sind, ist bereits die Bestimmung der kompletten Sequenz eines einzelnen Gens mittels Sanger-Sequenzierung mit relativ großem Aufwand verbunden. Eine systematische Untersuchung der Sequenz aller bekannten und die Identifizierung noch unbekannter Tumorsuppressor- und Onkogene sind - auch wegen der damit verbundenen hohen Kosten- bei Routine-Anwendungen nicht möglich.

Überwunden werden diese Limitierungen durch die Entwicklung neuer Sequenzieretechnologien, die auch als „Next Generation Sequencing“ oder kurz NGS-Technologien bezeichnet werden. Sie ermöglichen die Bestimmung und Auswertung der kompletten Sequenz eines menschlichen Genoms, also von ca. 3 Milliarden Basenpaaren, innerhalb von wenigen Tagen. Da die Kosten für die Sequenzierung eines kompletten Genoms trotz der erreichten Fortschritte noch bei ca. 8-10.000 Euro liegen, beschränkt man sich in den meisten Studien darauf, nur die Bereiche der Gene anzureichern und zu sequenzieren, die nach der Ablesung der Gene in der reifen Boten-RNA repräsentiert sind und die Proteinsequenz zu bestimmen. Eine Video, in dem das hierfür bei uns eingesetzte Sequenzierungsverfahren näher beschrieben wird, steht im Internet unter

<http://www.youtube.com/watch?v=I99aKKHcxC4> zur Verfügung, Erste Ergebnisse von Anwendungsbeispiele stellen wir mit folgenden zwei Abbildungen vor.

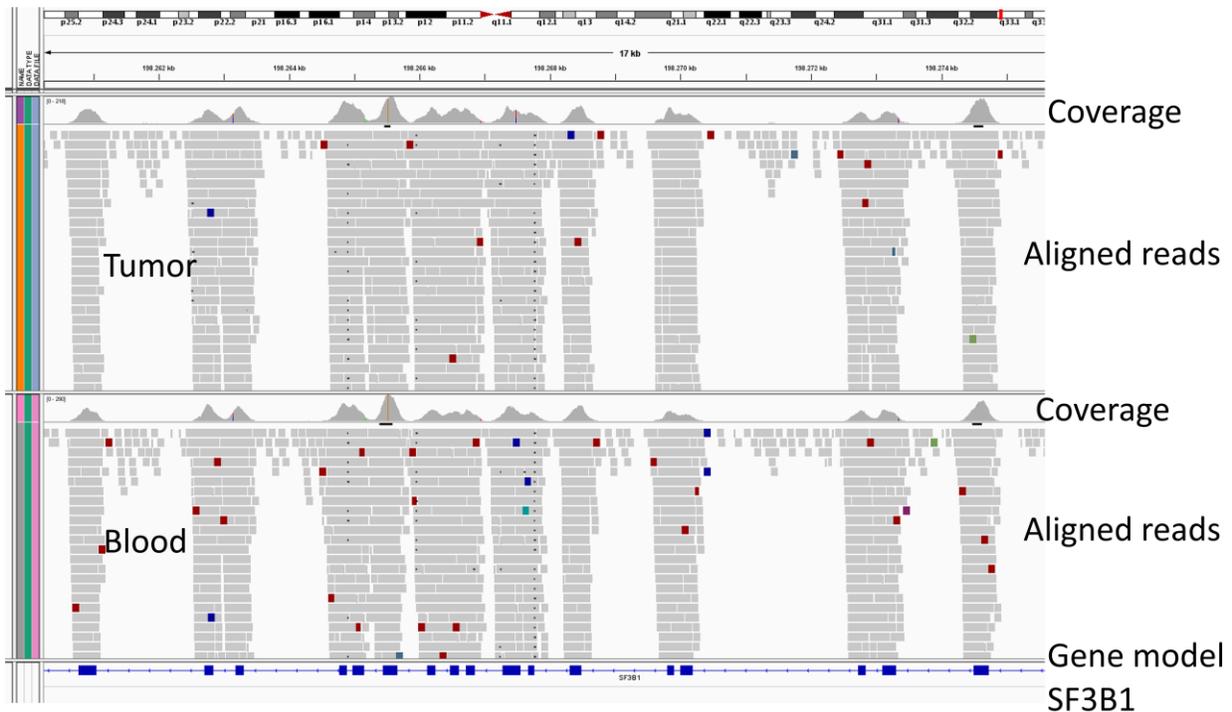


Abb. 1 Darstellung einer Exom-Sequenzierung mittels NGS in einem Genome Browser. Im „Coverage“-Fenster wird die Abdeckung der individuellen Genom-Position dargestellt. Darunter die individuellen Sequenz-Reads (graue Balken), die der Referenzsequenz zugeordnet werden konnten. Unten ist in Blau das Gen-Modell des SF3B1-Gens dargestellt. Die blauen Kästchen stellen die Exons dar, während die dünne Linie die Intron-Abschnitte kennzeichnen. Deutlich ist zu sehen, daß die Exon-Sequenzen gegenüber den Intron-Sequenzen durch Exon-Capturing angereichert wurden. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Michael Zeschnigk, Institut für Humangenetik, zur Verfügung gestellt (s.a. Referenz).

Die Suche nach Stellen im Genom, die Abweichungen von der Referenzsequenz aufweisen, erfolgt nach dem Alignmentschritt durch spezielle Programme, die diverse Parameter bei der Bewertung der Sequenz-Abweichung berücksichtigen und bereits bekannte nicht-pathogene Abweichungen sowie unbekannte Varianten identifizieren und ihre Konsequenzen für die Proteinsequenz beurteilen. Treten Sequenzvarianten nur im mütterlichen oder im väterlichen Allel auf, so weisen natürlich nur etwa 50% der sequenzierten Moleküle eine Sequenzvariante auf. Bei Tumoren, die zum Teil erhebliche Anteile von Normalzellen (Lymphozyten, Blutgefäße) aufweisen, aber auch bei sogenannten Mosaiken kann der Anteil der Sequenzvarianten noch deutlich niedriger liegen.

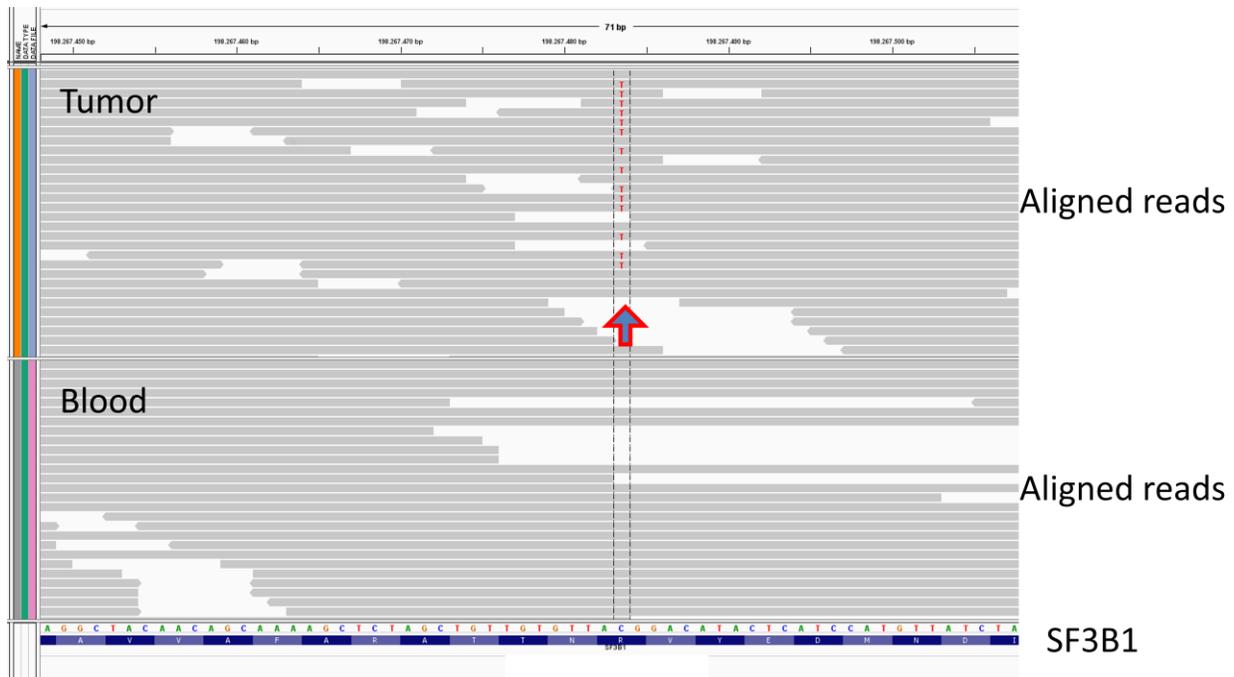


Abb. 2 Darstellung einer heterozygoten Mutation (Pfeil) des SF3B1-Gens, die zu einem Austausch der Aminosäure 625 (Arginin>Histidin) führt. Unten ist die Referenzsequenz sowie die Aminosäuresequenz dargestellt. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Michael Zeschmick, Institut für Humangenetik, Essen, zur Verfügung gestellt (s.a. Referenz).

Eine derartige Suche nach Sequenzvarianten oder Mutationen, die spezifisch in Tumoren auftreten, erfordert - wie in Abb. 1 und 2 gezeigt - einen Vergleich mit der DNS aus Normalgeweben, in der Regel Blut-DNS. Bei Syndrompatienten, bei denen die verantwortliche Mutation in allen Körperzellen vorkommen kann, ist dies nicht möglich und man verfolgt der Regel nur Varianten, die in einer ausreichend großen Stichprobe nicht gefunden werden oder man untersucht parallel die DNS der beiden Eltern. Die gefundenen Varianten/Mutationen werden meist mittels konventioneller Sequenzieretechnologie (Sanger Sequenzierung) überprüft, um Artefakte/Fehler, die bei der NGS-Sequenzierung auftreten können, auszuschließen.

Zusammenfassend sei hervorgehoben, dass molekulare Untersuchungen mittels massiv paralleler Sequenzierung zu einem immer wichtigeren Bestandteil der Erforschung von Krebserkrankungen und erblichen Syndromen werden. Sie liefern u.a. wichtige Hinweise auf genetische Ursachen von Tumoren, wichtige Hinweise auch für die Wahl der bestmöglichen Behandlung eines Krebspatienten.

Referenzen

Martin M, Maßhöfer L, Temming P, Rahmann S, Metz C, Bornfeld N, van de Nes J, Klein-Hitpass L, Hinnebusch AG, Horsthemke B, Lohmann DR, Zeschnigk. Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3. Nat Genet. 2013 Jun 23