

## Neue Technologie der HTS-Sequenzierung am ZIS

S. Arcioni, T. von Känel, Zentralinstitut der Spitäler, Spital Wallis, Sion

### Genetische Analysen: verschiedene Technologien

Die Hochdurchsatz-Sequenzierung (High Throughput Sequencing, HTS; auch NGS) ermöglicht die Sequenzierung vieler Genomregionen bei mehreren Patienten gleichzeitig. In den letzten Jahren sind die Sequenzierkapazitäten weiter gestiegen und die Sequenzierung des Exoms (d.h. aller Genomregionen, die für Proteine codieren; sogenanntes Whole Exome Sequencing oder WES) bei der Analyse der für seltene Erkrankungen verantwortlichen Gene ist zur Routinearbeit geworden. Doch trotz dieser Entwicklungen ist die Exom-Sequenzierung nicht bei allen genetischen Untersuchungen die erste Wahl (Abb. 1): Es bleibt z.B. schwierig, Extensionen von Repeats mittels HTS zu erkennen, so dass etwa die Diagnose des Fragilen-X-Syndroms oder von Chorea Huntington mit dieser Technik nicht möglich ist. Da die Kosten der HTS noch immer beachtlich sind (in der Regel über 3000,- CHF pro Analyse), ist die Exom-Sequenzierung bei Analysen einzelner pathogener Varianten («Mutationen»), die z.B. Thrombophilien hervorrufen (Faktor-V-Leiden und Prothrombin), nicht indiziert. Schliesslich lassen sich bestimmte Exom-Regionen mit der WES-Technik nur schwer sequenzieren und sind infolgedessen nur schlecht abgedeckt. In diesem Fall ist die gezielte Hochdurchsatz-Sequenzierung von fraglichen Genen in der Regel sensibler als die WES-Analyse, da die Reduzierung der zu untersuchenden Regionen (einige Dutzend Gene statt alle 20.000 Gene des Exoms) eine zielgerichtete und sorgfältige Untersuchung der zu analysierenden Regionen ermöglicht.

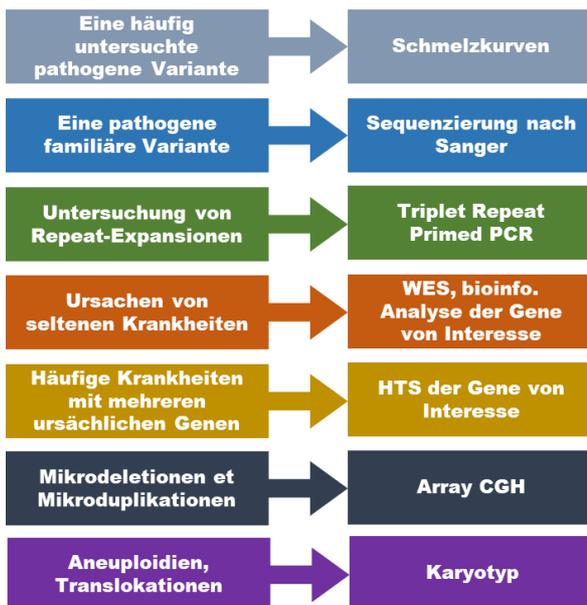


Abb. 1: Verschiedene genetische Analysen bei verschiedenen klinischen Fragestellungen (vereinfachende und nicht umfassende Auflistung). Quelle: Zentralinstitut der Spitäler

### Neuer HTS-Ansatz

Eine der am häufigsten im genetischen Labor angefragten Analysen ist die Sequenzierung von Genen, die mit einer Krebs-Prädisposition in Verbindung gebracht werden (siehe Caduceus Express 09/2016 und 11/2017). Die Zahl der Anfragen spricht für die Entwicklung eines zielgerichteten HTS-Panels für diese Analyse. Die zu analysierenden Prädispositionen und Gene sind in den letzten Jahren nicht dieselben geblieben: So sind z.B. die Anfragen zur Untersuchung auf Prädisposition für Prostatakrebs oder Melanom häufiger geworden, was auch die Wahl der zu analysierenden Gene beeinflusst. Dies ist einer der Gründe, die das genetische Labor des ZIS dazu bewogen haben, das Panel zu erneuern und dabei auch die letzten medizinischen (Sequenzierung von 43 statt 27 Genen; Tabelle 1) und technischen (QIaseq-Technologie statt Ampli-con) Entwicklungen zu berücksichtigen.

Die QIaseq-Technologie der Firma Qiagen [1] beruht auf einer DNA-Fragmentierung mit Hinzufügung einer Sequenz, die den Adapter, einen eindeutigen molekularen Index und einen Barcode zur Identifizierung des Patienten beinhaltet. Im Anschluss wird eine Extension mit spezifischen Teilstücken der fraglichen Regionen auf beiden Seiten der Komplementärsequenz des Adapters durchgeführt. Schliesslich werden die

auf diese Weise präparierten Fragmente erweitert, um Libraries zu erzeugen, die sich mit einem MiSeq-Gerät der Firma Illumina sequenzieren lassen. Die Einführung der eindeutigen molekularen Indizes (UMI-Technologie) ermöglicht die Erkennung und damit Entfernung von PCR-Duplikaten bei der HTS, was die Zuverlässigkeit der erhaltenen Daten erhöht.

Diese Technologie wurde aus verschiedenen Gründen ausgewählt:

- Sehr hohe Sensibilität nicht nur bei der Erkennung von Punktmutationen und kleinen Insertionen/Deletionen, sondern auch bei grösseren Rearrangements wie den copy number variants.
- Sehr hohe Spezifität dank der Eindämmung von Hintergrundgeräuschen bei der Sequenzierung.
- Möglichkeit, dem Panel mit Boostern neue Gene hinzuzufügen.
- Möglichkeit, Analysen an zirkulierender DNA durchzuführen.
- Leichte Handhabung (nur ein Reaktionssetup pro Patient).
- Verarbeitung der Daten am HVS (kein Cloud-Service für die bioinformatische Analyse).

Bei der Validierung des neuen Panels wurden diese theoretischen Vorteile bestätigt und ihre Nützlichkeit bewiesen. Das Labor freut sich, diese neue Technologie ab Januar 2022 in der Routine nutzen zu können. Diese Technologie wird derzeit auch für andere Analysen validiert, wie z.B. für Panels auf fixiertem Gewebe in der Pathologie.

ACD	CDK4	<u>MSH6</u>	<u>PTEN</u>
APC	CDKN2A	<u>MUTYH</u>	<u>RAD51C</u>
ATM	<u>CHEK2</u>	NBN	<u>RAD51D</u>
AXIN2	<u>EPCAM</u>	<u>NTHL1</u>	<u>RNF43</u>
BAP1	GALNT12	<u>PALB2</u>	<u>RPS20</u>
<u>BARD1</u>	<u>GREM1</u>	<u>PMS2</u>	<u>SMAD4</u>
<u>BMPR1A</u>	HOXB13	<u>POLD1</u>	<u>STK11</u>
<u>BRCA1</u>	MITF	<u>POLE</u>	TERF2IP
<u>BRCA2</u>	<u>MLH1</u>	POT1	TERT
<u>BRIP1</u>	<u>MSH2</u>	PRKAR1A	<u>TP53</u>
<u>CDH1</u>	<u>MSH3</u>	PRSS1	

Tabelle 1: Die 43 bei den Analysen auf Krebs-Prädispositionen sequenzierten Gene. Die Auswahl der analysierten Gene («virtuelles Panel») ändert sich je nach Typ der gesuchten Prädisposition: Die Gene, die mit einer Brustkrebs-Prädisposition in Verbindung gebracht werden, sind kursiv gesetzt, die Eierstockkrebs-Gene unterstrichen und die Gene für Krebs der Verdauungsorgane fett gedruckt. Die Gene für die anderen Prädispositionen, die mit dem neuen Panel analysiert werden können (Prostata, Pankreas, Melanom), sind nicht hervorgehoben.

### Genetische Beratung und Interpretation der Varianten

Zwei wichtige Aspekte einer jeden HTS-Analyse bleiben von dieser Technologie unberührt:

Einerseits spielt der klinische Genetiker angesichts dieser Entwicklungen weiterhin eine entscheidende Rolle. Ein Termin in der genetischen Beratung vor und nach dem Gentest wird gesetzlich empfohlen. So können mit dem Patienten die Auswirkungen seiner genetischen Diagnose auf ihn selbst und seine Angehörigen besprochen werden. Dabei ist auf die Grenzen des Tests sowie die Möglichkeit der Erkennung von Varianten mit unklarer Bedeutung und unerwarteter Ergebnisse hinzuweisen [2].

Andererseits ist die Interpretation der identifizierten Varianten (siehe Caduceus Express 10/2019) noch immer genauso anspruchsvoll wie früher. In der Tat ist die Zahl der ermittelten und infolgedessen zu interpretierenden Varianten gestiegen. Der Aufwand wird aber durch bioinformatische Tools stark erleichtert.

### Quellennachweis

- 1) Chang et al.: Correlation of genomic alterations between tumor tissue and circulating tumor DNA by next-generation sequencing. J Cancer Res Clin Oncol. 2018 Nov;144(11):2167-2175
- 2) Filges et al.: Entwicklung der genetischen und genomischen Medizin in der Schweiz. Schweiz Ärztsztg. 2018;99(41):1418-1420

### Ansprechpartner

Séverine Arcioni [severine.arcioni@hopitalvs.ch](mailto:severine.arcioni@hopitalvs.ch)  
(Biologin—technische Verantwortliche)  
Thomas von Känel, PhD [thomas.vonkaenel@hopitalvs.ch](mailto:thomas.vonkaenel@hopitalvs.ch)  
(FAMH-Spezialist in medizinischer Genetik)  
Genetische Beratung am ZIS [ich.genetique@hopitalvs.ch](mailto:ich.genetique@hopitalvs.ch)