

Next-Generation Sequencing (NGS)

Die neue Methodik in der diagnostischen Molekulargenetik

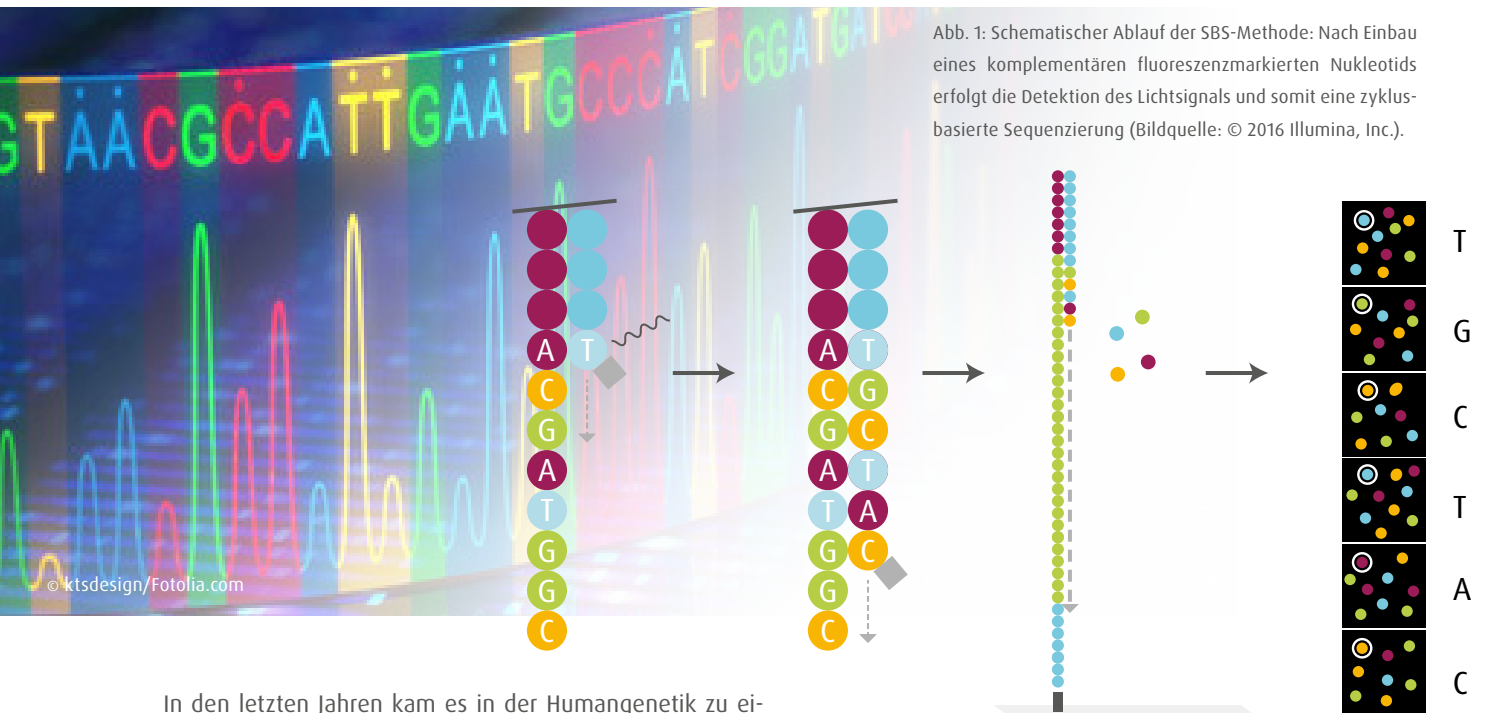


Abb. 1: Schematischer Ablauf der SBS-Methode: Nach Einbau eines komplementären fluoreszenzmarkierten Nucleotids erfolgt die Detektion des Lichtsignals und somit eine zyklus-basierte Sequenzierung (Bildquelle: © 2016 Illumina, Inc.).

In den letzten Jahren kam es in der Humangenetik zu einer rasanten Entwicklung bezüglich neuer Verfahren zur Sequenzierung von Genen, die unter dem Begriff Next-Generation Sequencing (NGS) zusammengefasst werden. Hierbei handelt es sich um die Möglichkeit einer parallelen Sequenzierung von sehr vielen DNA-Fragmenten in einem einzigen Sequenzierlauf. Zunächst wurde NGS in der Forschung, beispielsweise für die Identifizierung neuer krankheitsassoziierter Gene, eingesetzt. Mittlerweile hat die Anwendung der NGS-Analytik Einzug in die molekulargenetische Routinediagnostik gehalten.

Insbesondere bei Störungen mit ausgeprägter genetischer Heterogenität löst die NGS-Analytik zunehmend die klassische Stufendiagnostik mittels Sanger-Sequenzierung („Gen für Gen“-Analyse) ab.

Vorteile NGS

Die Vorteile der NGS-basierten Diagnostik gegenüber der konventionellen Sequenzierung mittels Sanger zeigen sich vor allem bei der extrem hohen Sequenzierkapazität gleich mehrerer krankheitsrelevanter Gene in einem Ansatz (Genpanels). Durch die klonale Sequenzierung einer Vielzahl einzelner Moleküle kann eine kostengünstigere Bearbeitung und eine höhere diagnostische Sensitivität erzielt werden.

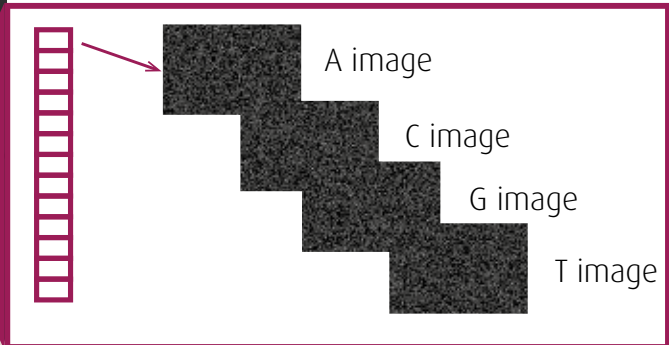
Ablauf der NGS-basierten Diagnostik

Um die Sequenzierung eines krankheitsrelevanten Genpanels durchführen zu können, muss eine Vorbereitung der Patientenproben zur Erstellung einer sog. probenspezifischen DNA-Bibliothek erfolgen. Diese stellt dann für die eigentliche Sequenzierreaktion am Gerät die notwendige Grundlage (Template-DNA) dar. In unserem molekulargenetischen Labor kommt für die NGS-basierte Sequenzanalytik die „Sequencing-By-Synthesis“ (SBS)-Methode zur Anwendung (Schema siehe Abb. 1). Bei dieser Methode wird die zuvor aus dem Blut der Patienten isolierte, darauf folgend amplifizierte und durch Sonden-Hybridisierungen selektierte DNA über spezifische Adaptoren kovalent an einen Glasobjekträger (Fließzelle oder engl. "FlowCell") gebunden, auf dem dann die eigentliche Sequenzierreaktion stattfindet.

Von einem auf dieser Fließzelle gebundenen Startmolekül ausgehend werden durch einen PCR-ähnlichen Schritt namens „Bridge-Amplification“ sehr viele Cluster gebildet. Ein Cluster ist eine Gruppe von nebeneinander auf der Fließzelle befindlichen DNA-Sequenzabschnitten und enthält tausende



Abb. 2: Detektion einzelner Nukleotide während der Sequenzierreaktion: Im linken Teil der Abbildung ist die Fließzelle (Fa. Illumina®) dargestellt, auf der die SBS-Sequenzierreaktion stattfindet. Beim Einbau der passenden komplementären Nukleotide des zum kovalent an die Fließzelle gebundenen Fragmentes erfolgt gleichzeitig die photographische Detektion der Basenreihenfolge (SBS-Technologie). Ein heller Punkt auf dem für die jeweiligen Nukleotide separat aufgenommenen Bildern entspricht einem Cluster mit einem Durchmesser von ca. 1–3µm auf der Fließzelle.



Bildquelle: © 2016 Illumina, Inc; modifiziert

DNA-Fragmente der gleichen Sequenz. Nachdem die Cluster aus ausreichend vielen DNA-Fragmenten bestehen, erfolgt die eigentliche Sequenzierung.

Bei der Sequenzierung werden zeitgleich alle vier, an jeweils unterschiedliche Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelte, Nukleotide über die Glasplatte gespült und somit der Polymerase zur Strangsynthese angeboten. In jedem Sequenzierzyklus wird genau ein Nukleotid komplementär zu der Template-DNA eingebaut. Nach Einbau einer passenden komplementären Base werden die Farbstoffe für jedes Nukleotid photographisch detektiert. Es wird also während des Einbaus ein Bild für jedes einzelne Nukleotid generiert – daher der Begriff „Sequencing By Synthesis“ (siehe Abb. 2: Detektion einzelner Nukleotide während der Sequenzierreaktion). Die übrigen nicht eingebauten Nukleotide werden durch darauffolgende Waschschriffe entfernt.

Derzeit kommen mehrere Sequenzierinstrumente in der molekulargenetischen NGS-basierten Diagnostik zur Anwendung, bei denen die oben beschriebene SBS-Methode zur Sequenzanalyse genutzt wird. In unserem Labor erfolgen die NGS-Analysen auf einem MiSeq der Firma Illumina®. Die Durchsatzrate dieses Gerätes liegt je nach verwendetem Reagenzienkit und Probenanzahl bei etwa 4 bis 15 Gigabasen (das entspricht einem Output von 4–15 x 10⁹ einzelnen Basen). Während einer Sequenzierreaktion im Gerät können bis zu 50 Millionen einzelne Cluster analysiert werden.

Nach der Sequenzierung der krankheitsrelevanten Genpanel erfolgt eine umfassende bioinformatische Aus-

wertung der erhaltenen großen Menge an Sequenz-Daten sowie die Erstellung eines humangenetischen Gutachtens.

Benötigtes Material

Für die NGS-basierte molekulargenetische Analyse benötigen wir ein kleines EDTA-Röhrchen (2,7 ml), einen Laborüberweisungsschein mit Angabe der zu untersuchenden Gene und die Einwilligungserklärung gemäß GenDG des Patienten.

Analysedauer

Die Bearbeitungszeit des Untersuchungsauftrages beträgt i.d.R. vier bis sechs Wochen.

Wir freuen uns auf Ihre Einsendung.

Ihr Team der Molekulargenetik.

Ihre Ansprechpartner:
Dr. rer. nat. Barbara Thamm
Fachhumangenetikerin GfH
 E-Mail: b.thamm@labor-leipzig.de
 Telefon: +49 341 6565-791

M.Sc. Jana Meyer
Leitung NGS
Abteilung Humangenetik
 E-Mail: j.meyer@labor-leipzig.de
 Telefon: +49 341 6565-792