

Exom-Sequenzierung zur Identifizierung von Krankheitsgenen

Identifizierung von monogenen (Mendel'schen) Krankheitsgenen

Der Identifizierung von neuen Krankheitsgenen, genauer gesagt von krankheitsverursachenden Gendefekten, gehört aus vielen Gründen eine besondere Aufmerksamkeit in der Humangenetik [30]. Sie ermöglicht nicht nur eine genetische Diagnose, sondern auch eine genetische Beratung eines Patienten oder von dessen Familie und kann Einblicke in die physiologische Rolle der betroffenen Gene und zugrunde liegender pathogenetisch relevanter Signal- und Stoffwechselwege geben. Hierdurch können langfristig eine bessere Patientenversorgung und Therapie im Sinne einer personalisierten Medizin resultieren.

Klassische Gen-Identifizierung

Die Identifizierung von Krankheitsgenen hat schon immer von der Entwicklung und Anwendung neuester Technologien profitiert. Hierzu zählen klassischerweise die Karotypisierung, die Kopplungsanalyse, das Homozygotie-Mapping und die CNV-Analysen („copy number variations“, Detektion von Mikrodeletionen und -duplikationen). Obwohl alle diese Technologien sehr erfolgreich angewandt wurden und werden, haben sie dennoch den Nachteil, dass eine Genkartierung üblicherweise in mehreren (aufwendigen) Schritten erfolgt. Der erste Schritt ist hierbei die Kartierung eines Gen-Locus. Dies ist in vielen Fällen schon problematisch, z. B.

durch Mangel an geeigneten (möglichst großen) zu untersuchenden Familien. Ein anderes Problem kann sein, dass eine Eingrenzung in einem zu großen Kandidatenlocus resultiert und es immer noch schwierig bleibt, in diesem das krankheitsverursachende Gen zu finden. Hat man allerdings das Gen eingrenzen können, so muss in einem weiteren Schritt die ursächliche Mutation (Punktmutation, Indel, CNV, Repeat-Expansion) im Krankheitsgen identifiziert werden.

Neue Art der Gen-Identifizierung

„Next-generation sequencing“ (NGS, auch „massively parallel sequencing“, MPS, genannt) beschreibt eine neue Ära des Sequenzierens, die sowohl für die Gen-Identifizierung als auch für die molekulare Diagnostik eine große Wichtigkeit erlangen wird. Der Begriff „NGS“ umfasst dabei viele verschiedene neue Sequenziermethoden [19, 20], die alle einen viel größeren Durchsatz aufweisen als die alte Standard-Methode der „Sanger-Sequenzierung“. Im Moment sind mehr als 20 verschiedene NGS Geräte von verschiedenen Herstellern in der Entwicklung oder bereits kommerziell erhältlich. Die jeweils zugrunde liegenden Techniken und Chemikalien unterscheiden sich teilweise erheblich, was zu unterschiedlichen Kapazitäten, Fehlerraten und Leselängen führt. Während eine Genidentifizierung mittels der klassischen Sanger-Sequenzierung oft Jahre dauerte, ist es

mittlerweile mittels NGS möglich, ein gesamtes humanes Genom innerhalb einer Woche für weniger als 5000 EUR zu sequenzieren. Dies ist allerdings noch sehr aufwendig und daher nicht im Hochdurchsatz möglich, und daher wird im Moment die Sequenzierung nach Anreicherung („target enrichment“) immer mehr die Methode der Wahl für Forschung und Diagnostik. Dabei ermöglichen NGS-basierte Tests grundsätzlich die Identifizierung (fast) aller genetischer Veränderungen, SNVs, kleiner oder großer Insertions- und Deletions-Varianten (Indels, [23]), CNVs [34] und Translokationen [13] in nur einem Experiment. Eine Ausnahme stellen zurzeit noch Repeat-Expansionserkrankungen dar, allerdings gibt es auch hier bereits erste positive Beispiele [29].

Sequenz-Anreicherung – „target enrichment“

Im Unterschied zur Sanger-Sequenzierung, bei der – zumindest in der Diagnostik – mit spezifischen Oligonukleotiden gearbeitet wird, von denen ausgehend zuvor durch PCR amplifizierte DNA-Fragmente sequenziert werden, ist die Hochdurchsatz-Sequenzierung prinzipiell immer ein Schrottschuss-Verfahren, in dem viele zufällig generierte Fragmente parallel abgelesen werden. Beim NGS kann die Spezifität ebenfalls durch eine vorherige PCR von genomischen Abschnitten erreicht werden, was aber nur dann effi-

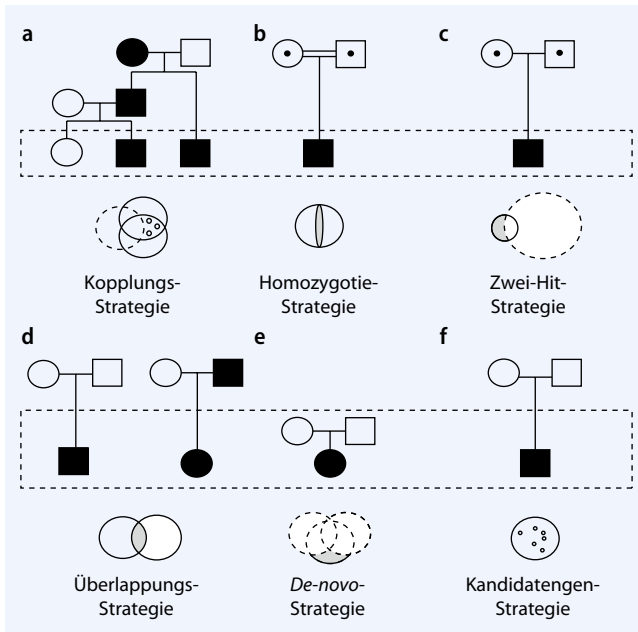


Abb. 1 ▲ Strategien zur Krankheitsgen-Identifizierung mittels Exom-Sequenzierung. Anhand der illustrierten Stammbäume sind die im Text beschriebenen Strategien (a, b, c, d, e, f) dargestellt. Die gestrichelte Linie umzirkelt die Individuen, bei denen eine Exom-Sequenzierung durchgeführt wurde. Die schematischen Kreisdiagramme unterhalb der Stammbäume repräsentieren die durch Exom-Sequenzierung identifizierten Varianten. Kreise mit durchgezogenen Linien stellen Varianten von erkrankten, gestrichelte Linien Varianten von gesunden Personen dar

zient ist, wenn dies durch eine einfache und robuste Multiplex-PCR geschieht. Momentan gebräuchlicher ist die Anreicherung der gewünschten DNA-Regionen durch Hybridisierungstechniken [18]. Hierbei erfolgt eine Anreicherung über einen DNA-Mikroarray oder mit Hilfe von Sonden in Lösung. Man kann entweder komplette genomische Regionen anreichern, man kann sich entscheiden, nur die kodierenden Bereiche von bestimmten Genen anzureichern, oder man kann sogar alle kodierenden Bereiche aller humanen Gene (das sog. Exom) anreichern. Besonders Letzteres hat als erste genomweite Detektionsmethode für Punktmutationen in den letzten 2 Jahren enorme Popularität erreicht und für eine Revolution der Identifizierung von Krankheitsgenen gesorgt.

Exom-Sequenzierung – Herausforderung der Dateninterpretation

Zu einer erfolgreichen Analyse eines Exoms gehören normalerweise die fol-

genden Schritte: die Anreicherung des Exoms, das Sequenzieren der angereicherten DNA, das Mapping der Reads, das Detektieren der Varianten („variant calling“) und schließlich die Annotation und Interpretation der Varianten. Während die meisten dieser wichtigen Schritte bereits durch kommerzielle Produkte abgedeckt werden können, bleibt die Priorisierung und Interpretation der Daten noch sehr schwierig. Daher wollen wir uns im Folgenden auf diese Schritte konzentrieren.

Die Varianten, die bei der Exom-Sequenzierung identifiziert werden, umfassen theoretisch alle SNVs („single nucleotide variants“) und Indels (Insertionen und Deletionen), in denen sich die zu untersuchende DNA von einem Referenz-Genom unterscheidet. Die Anzahl dieser Veränderungen kann jedoch stark variieren. Dies hängt von mehreren Faktoren ab:

- dem Exom-Anreicherungs-Kit,
- der Sequenzierplattform sowie
- den benutzten Algorithmen („read mapping“ und „variant calling“).

Normalerweise findet man 20.000–50.000 Varianten in einem Exom-Experiment [9, 11]. Um die Anzahl der falsch-positiven Varianten zu reduzieren, werden in der Regel verschiedene Qualitätskriterien angewandt. So kann man z. B. fordern, dass eine echte Variante in mindestens fünf voneinander unabhängigen Reads zu sehen sein muss. Außerdem sollte eine heterozygote Variante in mehr als 20% aller Reads und eine homozygote Variante in mehr als 80% aller Reads vorhanden sein. Eine individuelle Variante sollte außerdem eine ausreichend gute Qualität aufweisen. Hinzu kommt ein Schwellenwert für die Zahl der Reads, die den betreffenden Abschnitt abdecken („Coverage“). Von einer für die Auswertung guten Coverage kann bei den heutigen Methoden gesprochen werden, wenn etwa 30 Fragmente vorhanden sind, die die jeweilige Position enthalten.

In den meisten Fällen werden anschließend Varianten priorisiert, die innerhalb des kodierenden Bereiches und innerhalb der Spleißstellen liegen. Von diesen bekommen nichtsynonyme Varianten (also Aminosäure verändernde Varianten) eine höhere Priorität zugewiesen als synonyme Veränderungen. Die meisten Laboratorien schließen außerdem Varianten aus, die bereits bekannt sind (z. B. aus dbSNP, publizierten Studien [7], <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> oder internen Datenbanken). Dieser Schritt reduziert die Anzahl der möglicherweise relevanten Veränderungen um einen Faktor von >90% auf typischerweise 150–500 seltene, nichtsynonyme oder Spleißstellen-Varianten [3, 9, 15, 16, 24, 25, 26, 33], die sog. „privaten Varianten“. Die krankheitsverursachende Mutation ist dann in der Regel unter diesen privaten Varianten zu suchen. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die hier beschriebene sehr stringente Priorisierung ggf. krankheitsverursachende Mutationen ausschließen kann. Dies geschieht vor allem bei (häufigeren) rezessiven Erkrankungen mit einer gewissen Allel-Trägerfrequenz in der Bevölkerung. Solche Varianten werden auch bei gesunden (Kontroll-)Personen identifiziert und sind daher auch

in Datenbanken wie dbSNP oder internen Datenbanken zu finden. Besonders für rezessive Erkrankungen empfiehlt es sich daher, die Krankheitsfrequenz und die Frequenz aller identifizierten Varianten in die Analyse mit einzubeziehen. Letzteres wird durch die zunehmende Zahl der Exom-Sequenzier-Studien oder durch internationale Kollaborationen wie das 1000-Genom-Projekt mehr und mehr gewährleistet. Eine weitere Gefahr der beschriebenen Priorisierungs-Strategie stellen falsch-positive Varianten in den öffentlichen Datenbanken dar. So beschreiben z. B. Walsh et al. [35], dass eine der von ihnen beschriebenen krankheitsverursachenden Mutationen in dbSNP gelistet war, basierend auf einer einzigen Studie und nicht validiert.

Ausgehend von der Liste der ~150–500 privaten nichtsynonymen Veränderungen pro Exom sind weitere Strategien notwendig, um die krankheitsverursachende(n) Mutation(en) zu identifizieren. Die hier möglichen Vorgehensweisen beschreiben wir im folgenden Abschnitt kurz anhand von Literaturbeispielen (s. auch [Abb. 1](#)). In der Praxis werden häufig nicht nur die einzelnen Strategien selber, sondern auch Kombinationen der dargestellten Strategien verwendet.

a) Kopplungs-/Linkage-Strategie

Bei einer monogenen Erkrankung, die mehrere Familienmitglieder innerhalb einer Familie betrifft, ist es eine gängige Strategie, zwei oder mehr eindeutig erkrankte Personen mittels Exom-Sequenzierung zu untersuchen. Hierbei kann man sich bei der Suche nach der krankheitsverursachenden Mutation ausschließlich auf die Varianten konzentrieren, die bei allen Erkrankten zu finden sind (überlappende Varianten). Wenn möglich, sollten zwei entfernt verwandte Personen sequenziert werden, da diese weniger gemeinsame Varianten tragen als nahe verwandte Personen. Um die Anzahl der Varianten noch weiter zu reduzieren, kann man zusätzlich Exome von nichtbetroffenen Familienmitgliedern sequenzieren, um hierdurch Varianten auszuschließen, die nicht krankheitsrelevant sind. Die-

medgen 2012 · 24:4–11 DOI 10.1007/s11825-012-0313-4
© Springer-Verlag 2012

K. Neveling · A. Hoischen

Exom-Sequenzierung zur Identifizierung von Krankheitsgenen

Zusammenfassung

Neueste Sequenzieretechnologien („next-generation sequencing“) erlauben die gleichzeitige Sequenzierung aller proteinkodierender Sequenzen, das sog. Exom. Die Identifizierung der jeweiligen pathogenen Mutation unter den Tausenden detektierten Varianten stellt dabei eine große Herausforderung dar, und neue Strategien für die Priorisierung von Varianten sind unerlässlich. Die jeweilige Wahl einer Strategie ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig, wie z. B. dem Vorhandensein gut charakterisierter Patienten und deren Familien, von der Art der Vererbung, der Schwere der Krankheit sowie deren Frequenz in der allgemeinen Bevölkerung. In dem vorliegenden Übersichts-

artikel diskutieren wir die heute gebräuchlichen Strategien zur Identifizierung von neuen Krankheitsgenen mittels Exom-Sequenzierung und beschreiben die Lehren der ersten Exom-Studien. Wir glauben, dass die Sequenzierung von Exomen in den folgenden Jahren die am häufigsten angewandte Methode zur Identifizierung von Krankheitsgenen sein wird und dabei gleichzeitig auch ein großes diagnostisches Potenzial aufweist.

Schlüsselwörter

Mendelsche Erkrankungen · Exom · Monogene Erkrankungen · „Next-generation sequencing“ · Kandidatengen-Identifizierung

Disease gene identification by exome sequencing

Abstract

Next generation sequencing can be used to search for Mendelian disease genes in an unbiased manner by sequencing the entire protein-coding sequence, known as the exome. Identifying the pathogenic mutation amongst thousands of genomic variants is a major challenge, and novel variant prioritization strategies are required. The choice of these strategies depends on the availability of well-phenotyped patients and family members, the mode of inheritance, the severity of the disease and its population frequency. In this review we discuss the current

strategies for Mendelian disease gene identification by exome resequencing, and we describe the lessons learned from the first exome sequencing studies. Exome sequencing is likely to become the most commonly used tool for Mendelian disease gene identification for the coming years and bears a great diagnostic potential as well.

Keywords

Mendelian diseases · Exome · Monogenic disorders · Next generation sequencing · Candidate gene identification

se Strategie wurde bei der ersten erfolgreichen Anwendung der Exom-Sequenzierung überhaupt angewandt: für Ng et al. [25] reichten zwei erkrankte Personen aus einer Familie mit der rezessiven Erkrankung des Miller-Syndroms aus, um die Anzahl der Kandidatengen auf neun zu reduzieren. Krawitz et al. [17] haben diese Strategie noch verbessert: Ihre Methode ermöglicht es, nach gemeinsamen Haplotypen von Erkrankten zu suchen. Hierdurch reduzierten sie die Anzahl von Kandidatengen bei einer rezessiven Form eines mentalen Retardierungs-Syndroms von 14 auf 2.

b) Homozygotie-Strategie

Bei einer rezessiven Erkrankung mit gleichzeitiger bekannter Blutsverwandtschaft der (gesunden) Eltern kann man postulieren, dass die krankheitsverursachende Mutation wahrscheinlich eine homozygote Mutation innerhalb eines homozygoten Abschnitts des Erkrankten ist, die beide Eltern heterozygot tragen. Diese homozygoten Regionen können klassisch mittels SNP-Mikroarrays identifiziert werden und dann bei der Interpretation der Exom-Daten verwendet werden [35]. Inzwischen haben Becker et al. [3] gezeigt, dass auch Exom-Daten hierzu direkt verwendet werden können: In ihrer Studie wurden 17 aus 318 „privaten Varianten“ als homozygot identifiziert,

Hier steht eine Anzeige.



und lediglich drei dieser Varianten lagen in großen homozygoten Gebieten. Benutzt man diese Strategie, so kann das Sequenzieren des Exoms eines einzigen Betroffenen ausreichen, um eine krankheitsverursachende Mutation zu identifizieren.

c) 2-Hit-Strategie bei rezessiven Erkrankungen

Auch wenn es sich bei dem Erkrankten um einen sporadischen Fall handelt oder nur DNA eines einzelnen Falls zur Verfügung steht und man von einem rezessiven Krankheitsbild ausgeht, kann es möglich sein, durch die Analyse eines einzelnen Exoms ein neues Krankheitsgen zu identifizieren. Die Anzahl der Kandidaten lässt sich in einem solchen Fall sehr stark reduzieren, indem man die „privaten Varianten“ daraufhin priorisiert, dass sie entweder homozygot oder „compound heterozygot“ sind. Auf diese Weise haben Gilissen et al. [9] bei 2 Erkrankten mit Sensenbrenner-Syndrom aus 139 bzw. 158 Varianten 3 bzw. 4 Kandidatengene gefiltert. Durch Validierung und Kosegregationsanalyse innerhalb der Familien konnte hieraus ein einziges Kandidatengen gefunden werden. Pierce et al. [28] haben mit derselben Strategie aus 207 privaten nichtsynonymen Varianten ein Kandidatengen bei einem Betroffenen mit Perrault-Syndrom identifiziert.

d) Überlappungs-Strategie

Bei Erkrankungen ohne genetische Heterogenität bietet sich die Möglichkeit, bei mehreren nichtverwandten Erkrankten nach privaten Varianten im selben Gen zu suchen. Besonders hilfreich kann diese Strategie bei dominanten Erkrankungen sein, für die keine großen Familien mit mehreren Betroffenen zur Verfügung stehen. Die Anzahl der Kandidatengene, in denen mehrere nichtverwandte Betroffene (private) Varianten tragen, ist hierbei relativ gering. Diese Strategie wurde bereits bei der ersten Proof-of-concept-Studie durch Ng et al. [26] getestet. Seitdem wurde diese relativ robuste Vorgehensweise bei der Identifizierung mehrerer Krankheitsgene erfolgreich angewandt [15, 24]. Bei guter klinischer Diagnose und tatsächlicher Homogenität können so bereits 3 Erkrankte ausreichend sein, um ein

einziges Kandidatengen zu identifizieren [16].

e) De-novo-Strategie

Die unter d) beschriebene Strategie funktioniert lediglich für relativ seltene, monogene Erkrankungen ohne bzw. mit geringer Heterogenität. Bei häufiger vorkommenden Erkrankungen hingegen, die sich durch eine hohe Heterogenität auszeichnen, ist dieser Ansatz nicht zu empfehlen. Dies gilt, da Mutationen in zu vielen verschiedenen Genen den gleichen Phänotyp verursachen können. Man kann hier auch von einem großen „mutational target“ sprechen, und die Chance ist daher relativ klein, 2 Patienten mit Mutationen im gleichen Gen vorliegen zu haben. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine De-novo-Mutation dieses große „mutational target“ trifft ist somit auch größer. Besonders bei Erkrankungen, die meist sporadisch auftreten und mit verminderter Fertilität assoziiert sind, wie z. B. bei geistiger Behinderung, kann man daher spekulieren, dass die hier zugrunde liegende Mutation de novo entstanden sein kann. Vissers et al. [33] haben daher bei mehreren sporadischen Fällen von geistiger Behinderung eine Trio-basierte Exom-Sequenzierung durchgeführt. Durch die Exom-Sequenzierung sowohl von Patienten als auch von deren gesunden Eltern konnten pro Patient 0–3 De-novo-Mutationen identifiziert werden, und in 7 von 10 Fällen könnte eine De-novo-Mutation den Phänotyp erklären. Auch weitere Studien, z. B. über Autismus [27] und Schizophrenie [12], haben gezeigt, dass De-novo-Mutationen mittels Exom-Sequenzierung detektierbar sind und einen relativ hohen Anteil von Erkrankungen mit vermutlichen neurologischen Entwicklungsstörungen erklären könnten. Hierbei ist es jedoch wichtig zu betonen, dass bei der De-novo-Strategie, genauso wie bei den anderen Strategien, Varianten zwar priorisiert werden können, dies allerdings noch kein Beweis der Pathogenität bzw. Kausalität dieser Varianten darstellt und ggf. weitere, z. B. funktionelle Tests nötig sein können. Unter einem technischen Aspekt sei zu erwähnen, dass speziell die Trio-basierte Exom-Sequenzie-

rung sehr hohe Ansprüche an die Qualität und Reproduzierbarkeit der Anreicherung und Sequenzierung stellt. Zudem sei zu erwähnen, dass bei dieser Trio-Strategie pro Patient 3 Exome sequenziert werden müssen, während bei anderen Strategien weniger Exome ausreichend sein können.

f) Kandidatengen-Strategie

Im Fall eines individuellen Patienten mit dominanter Erkrankung, ohne Zugang zu weiteren Familienangehörigen, ist die Analyse schwieriger. Allerdings hat man auch hier mittels Exom- oder Genomsequenzierung erstmals die Möglichkeit, die Gesamtheit der genetischen Information zu erfassen und systematisch zu interpretieren. Anders als bei klassischen Kandidatengen-Strategien untersucht man auf diese Weise nicht nur die möglichen Kandidatengene selbst, sondern auch individuelle Varianten innerhalb dieser Gene. Eine Priorisierung der seltenen oder privaten Varianten kann dann basierend auf dem möglichen Effekt auf die Proteinfunktion erfolgen, d. h. hohe Priorität für Stop- und Frameshift-Mutationen und Mutationen in der „canonical splice site“. Für die große Anzahl der Missense-Mutationen werden momentan vor allem 2 Kriterien herangezogen: der Effekt der Aminosäureveränderung auf das Protein (z. B. Grantham-Wert, HOPE: <http://www.cmbi.ru.nl/hope/home>) sowie die evolutionäre Konservierung der Aminosäure – und zunehmend auch mehr die Konservierung des jeweiligen Nukleotids (z. B. phyloP- oder GERP-Werte). So findet man eine deutlich höhere Konservierung von pathogenen Mutationen im Vergleich zu gutartigen Veränderungen [11, 33]. Dies ist für alle Varianten aus dbSNP132 und HGMD in **Abb. 2** dargestellt. Außerdem sind zahlreiche bioinformatische Prädiktions-Programme für die Interpretation von Missense-Varianten erhältlich, einschließlich Programmen wie PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>) und MutPred (<http://mutpred.mutdb.org/>). Obwohl die Sensitivität und Spezifität der einzelnen

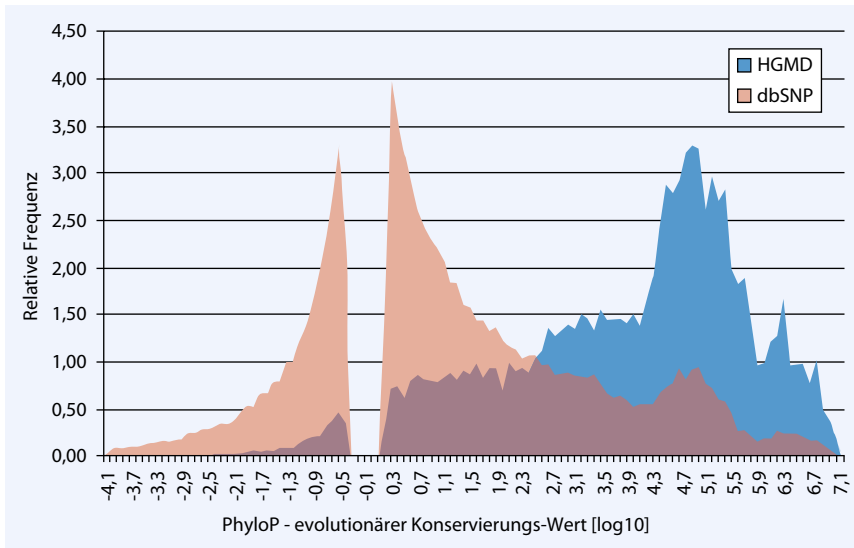


Abb. 2 ▲ Basenpaar-Konservierung von Missense-Varianten. In diesem Histogramm ist die jeweilige Frequenz der PhyloP-Konservierung (46 Vertebraten-Spezies, hg19) von nichtsynonymen Varianten aus dbSNP132 und Missense-Mutationen der Human Genome Mutation Database (HGMD) dargestellt

Programme noch nicht optimal sind, gibt es erste erfolgreiche Anwendungen [31, 36]. So haben z. B. Erlich et al. [8] die Kombination mehrerer Programme gewählt (SUSPECTS, [1]; ToppGene, [5]; Endeavour, [2]) und so erfolgreich Mutationen in *KIFI A* als Kandidaten für eine Form von erblicher spas-tischer Paraparese priorisiert. Dieser Befund wurde zudem bioinformatisch unterstützt durch den Fakt, dass drei unabhängige Programme die Mutation in *KIFI A* als „sehr wahrscheinlich pathogen“, klassifiziert haben. Auch neuere Beispiele zeigen, dass Kombinationen mehrerer dieser Programme eine deutlich höhere Aussagekraft erlangen [23].

Lehren aus den ersten 2 Jahren Exom-Sequenzierung

Zunächst ist festzustellen, dass bislang mehr rezessive Erkrankungen als dominante Erkrankungen mittels Exom-Sequenzierung entschlüsselt wurden [9]. Dies hat vermutlich 2 Gründe:

- Erstens kann die Identifizierung von rezessiven Erkrankungen einfacher sein, und
- zweitens gab es vermutlich bislang eine stärkere Tendenz, Familien und Krankheits-Kohorten mit rezessiven Krankheitsbildern zu untersuchen.

Einfluss der molekularen auf die klinische Diagnose

Eine Lektion der ersten auf Exom-Sequenzierung basierenden Publikationen ist, dass diese Technologie die Diagnose-Möglichkeiten von seltenen Erkrankungen deutlich verbessert. So konnte z. B. schon für manche Krankheit, die klinisch nicht eindeutig identifizierbar war, eine molekulare Diagnose erstellt werden. In einem Beispiel haben Choi et al. [6] bei einem Fall mit initialer Diagnose des Bartter-Syndroms Mutationen in *SLC26A3* identifiziert, wodurch die klinische Diagnose in erbliche Chlorid-Diarrhö verändert werden musste. Worthey et al. [36] berichteten über einen Fall, bei dem die Diagnose der chronisch-entzündlichen Darm-erkrankung erst nach Exom-Sequenzierung und Mutations-Identifikation im *XIAP*-Gen gestellt werden konnte. Beides sind Beispiele, die das diagnostische Potenzial dieser neuen Technologie darstellen, und die in Richtung einer Genotype-first- und Reverse-phenotyping-Anwendung argumentieren. Da die Komplexität der neuen Methoden und die Anzahl der identifizierten Varianten ungleich höher sind, gibt es ohne Zweifel bei der diagnostischen Anwendung der Exom-Sequenzierung Herausforderungen. Grund-

sätzlich kann die Interpretation aber bekannten und etablierten Richtlinien folgen [4]. Außerdem kann z. B. ein Fokus auf bekannte Krankheitsgene die Komplexität der Interpretation verringern bzw. die Informationen über Varianten, die nicht im Bezug zur aktuellen Fragestellung stehen, ausschließen, während der Labortest durch das Exom-Sequenzieren generischer sein kann („In-silico-Anreicherung des Exoms“). Die Etablierung von weltweit organisierten Datenbanken, in denen pathogene Genotypen und Phänotypen enthalten sind, ist sicherlich erstrebenswert. Auf lange Sicht sind vermutlich auch funktionelle Studien zur Interpretation von potenziell pathogenen Missense-Mutationen im Hochdurchsatzverfahren eine wertvolle Interpretationshilfe.

Phänotypische Heterogenität

Genetische Heterogenität, also eine Vererbung einer monogenen Erkrankung durch Mutationen in unterschiedlichen Genen mit mehr oder weniger identischem Phänotyp (z. B. Fanconi-Anämie oder Bardet-Biedl-Syndrom), ist ein lang bekanntes Phänomen der Humangenetik. Für all diese genetisch heterogenen Erkrankungen bietet die Exom-Sequenzierung ein großes diagnostisches Potenzial.

Im Gegensatz hierzu können verschiedene Mutationen im selben Gen komplett unterschiedliche Erkrankungen hervorrufen. Mittels Exom-Sequenzierung konnten inzwischen mehrere Beispiele hierfür beschrieben werden. So haben Sobreira et al. [32] bei einem Patienten mit Metachondromatosis, einer Skelett-Dysplasie, Loss-of-function-Mutationen in *PTPN11* identifiziert. Gain-of-function-Mutationen desselben Gens sind bereits lange als Ursache des Noonan-Syndroms bekannt.

Bedeutung von De-novo-Mutationen bei seltenen und häufigen genetischen Erkrankungen

Seit der Einführung der Exom-Sequenzierung werden mehr und mehr Fälle von De-novo-Mutationen beschrieben. So wurden z. B. heterozygote De-novo-

Mutationen als Ursachen für die seltenen dominanten Krankheiten Schinzel-Giedion-Syndrom [15] und Kabuki-Syndrom [24] identifiziert. Neueste Studien betonen hingegen die Wichtigkeit dieser Mutationen für häufigere Erkrankungen durch neurologische Entwicklungsstörungen wie geistige Behinderung [33], Autismus [27] und Schizophrenie [12]. Auch die Prävalenz von seltenen De-novo-CNVs bei diesen Erkrankungen machen die Bedeutung von De-novo-Mutationen deutlich. Und schließlich wurden De-novo-Mutationen in dominanten Genen auch bei Erkrankungen entdeckt, in denen man in sporadischen Fällen bisher fast immer automatisch von einem rezessiven Vererbungsmodell ausgegangen war [23]. Größere Studien, die die ersten Ergebnisse über De-novo-Mutationen bestätigen, werden zurzeit durch mehrere Gruppen bearbeitet.

Die Wichtigkeit der De-novo-Mutationen verlangt nun, dass wir unser Wissen hierüber stetig verbessern. So sind z. B. Frequenz und Lokalisation von De-novo-Mutationen sowie die Korrelation mit dem Alter der Eltern neue Forschungsgebiete, die erst durch Exom-Sequenzierung und Genom-Sequenzierung neuen Auftrieb erlangen.

Monogene Komponente bei „common diseases“?

Es ist bekannt, dass einige häufig vorkommende Krankheiten (sog. „common diseases“) durchaus eine signifikante monogene Komponente haben bzw. eine Akkumulationen von vielen Mendel'schen Erkrankungen darstellen können. So wird z. B. bei geistiger Behinderung oft von einer „common disease“ gesprochen, obwohl es sich hierbei (zumindest bei vielen Formen der schweren geistigen Behinderung) eher um sehr viele verschiedene monogene Erkrankungen handeln könnte. Dies gibt auch zu denken, ob nicht noch weitere „common diseases“ eine Mendel'sche Krankheitskomponente besitzen, und deren extreme Phänotypen eventuell sogar monogen Vererbungsmustern folgen. Ein erstes Beispiel hierzu lieferte eine Studie, in der Mutationen in *ANGPTL3* bei Personen mit ext-

rem niedrigen LDL-Cholesterol-Werten gefunden wurden [21].

Von Mendel'scher Erkrankung zur Prognose und Therapie

Erste vielversprechende Studien zeigen das diagnostische und sogar potenziell therapeutische Potenzial der neuen Technologien. So haben Haack et al. [14] nach Identifizierung von *ACAD9*-Mutationen bei Patienten mit Komplex-1-Defizienz eine erfolgreiche Riboflavin-Therapie bei ihren Patienten durchgeführt. Ebenso haben Züchner et al. [37] mittels Exom-Sequenzierung *DDHDS*-Mutationen bei Patienten mit Retinitis pigmentosa identifiziert. Dadurch konnte diese Erkrankung mit einer Störung der N-gebundenen Glykosylierung in Verbindung gebracht werden, was wiederum neue Therapiemöglichkeiten bieten könnte. Viele weitere Therapien, die in den nächsten Jahren entwickelt werden, werden entweder gen- oder sogar mutationsspezifisch sein. Die Identifizierung von Mutationen in Krankheitsgenen ist daher ein essenzieller Schritt für die Erkennung und Behandlung monogener Erkrankungen. Dies kann außerdem für Subformen von häufigen Erkrankungen mit einem starken Beitrag von seltenen pathogenen Varianten gelten.

Fazit für die Praxis

Schneller als es jemals zuvor eine andere Methode geschafft hat, hat sich die Exom-Sequenzierung von einer neuen Technologie nahezu zu einer Routine-Methode entwickelt, die in Einzelfällen bereits 2 Jahre nach der ersten Beschreibung diagnostisch angewandt wird. Die Exom-Sequenzierung hat das Forschungsgebiet der Mendel'schen Erkrankungen in den letzten 2 Jahren stark beschleunigt. Die Möglichkeit, erstmals genomweit Mutationen bzw. Varianten bestimmen zu können, hat bereits für über 50 Erkrankungen neue Krankheitsgene identifiziert, in Einzelfällen sogar zur Identifizierung von 50 Krankheitsgenen innerhalb einer Publikation [22]. Die Exom-Sequenzierung stellt somit einen wichtigen ersten Schritt dar, um

- eine molekulare/genetische Diagnose stellen zu können,
- Familien-Beratung zu verbessern,
- Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zu ziehen und
- eventuelle Therapie-Möglichkeiten zu erschließen.

Wir glauben, dass die Sequenzierung von Exomen in den folgenden Jahren die am häufigsten angewandte Methode zur Identifizierung von Krankheitsgenen sein wird und dabei gleichzeitig auch ein großes diagnostisches Potenzial aufweist.

Korrespondenzadresse



K. Neveling
Department of Human Genetics, Radboud University Medical Centre Nijmegen
Geert Grooteplein 10,
6500HB Nijmegen
Niederlande
k.neveling@gen.umcn.nl



A. Hoischen
Department of Human Genetics, Radboud University Medical Centre Nijmegen
Geert Grooteplein 10,
6500HB Nijmegen
Niederlande
a.hoischen@gen.umcn.nl

Danksagung. Die Autoren danken Dr. Christian Gillissen und der gesamten Genomic Disorders Group für deren Hilfe bei der Erstellung dieses Manuskripts. Die Autoren wurden unterstützt durch: Netherlands Organization for Health Research and Development (ZonMW 916.12.095, AH), EU-FP7 Projekt TECHGENE (Health-F5-2009-223143, KN) und das EU-FP6 Projekt AnEUplody (LSHG-CT-2006-37627, AH).

Interessenkonflikt. Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Adie EA, Adams RR, Evans KL et al (2006) SU-SPECTS: enabling fast and effective prioritization of positional candidates. *Bioinformatics* 22:773–774
2. Aerts S, Lambrechts D, Maity S et al (2006) Gene prioritization through genomic data fusion. *Nat Biotechnol* 24:537–544
3. Becker J, Semler O, Gilissen C et al (2011) Exome Sequencing Identifies Truncating Mutations in Human SERPINF1 in Autosomal-Recessive Osteogenesis Imperfecta. *Am J Hum Genet* 88:362–371
4. Bell J, Bodmer D, Sistermans E, Ramsden SC (2007) Practice guidelines for the Interpretation and Reporting of Unclassified Variants (UVs) in Clinical Molecular Genetics. *Clin Mol Genet Society*
5. Chen J, Bardes EE, Aronow BJ et al (2009) ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res* 37:W305–W311
6. Choi M, Scholl UI, Ji W et al (2009) Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19096–19101
7. Durbin RM, Abecasis GR, Altshuler DL et al (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467:1061–1073
8. Erlich Y, Edvardson S, Hodges E et al (2011) Exome sequencing and disease-network analysis of a single family implicate a mutation in KIF1 A in hereditary spastic paraparesis. *Genome Res* 21:658–664
9. Gilissen C, Arts HH, Hoischen A et al (2010) Exome sequencing identifies WDR35 variants involved in Sensenbrenner syndrome. *Am J Hum Genet* 87:418–423
10. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG et al (2011) Unlocking Mendelian disease using exome sequencing. *Genome Biol* 12:228
11. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG et al (2012) Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* (online)
12. Girard SL, Gauthier J, Noreau A et al (2011) Increased exonic de novo mutation rate in individuals with schizophrenia. *Nat Genet* 43:860–863
13. Grossmann V, Kohlmann A, Klein HU et al (2011) Targeted next-generation sequencing detects point mutations, insertions, deletions and balanced chromosomal rearrangements as well as identifies novel leukemia-specific fusion genes in a single procedure. *Leukemia* 25:671–680
14. Haack TB, Danhauser K, Haberberger B et al (2010) Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency. *Nat Genet* 42:1131–1134
15. Hoischen A, Bon BW van, Gilissen C et al (2010) De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. *Nat Genet* 42:483–485
16. Hoischen A, Bon BW van, Rodriguez-Santiago B et al (2011) De novo nonsense mutations in ASXL1 cause Bohring-Opitz syndrome. *Nat Genet* 43:729–731
17. Krawitz PM, Schweiger MR, Rodelsperger C et al (2010) Identity-by-descent filtering of exome sequence data identifies PIGV mutations in hyperphosphatasia mental retardation syndrome. *Nat Genet* 42:827–829
18. Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE et al (2010) Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods* 7:111–118
19. Mardis ER (2011) A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 470:198–203
20. Metzker ML (2010) Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet* 11:31–46
21. Musunuru K, Pirruccello JP, Do R et al (2010) Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *N Engl J Med* 363:2220–2227
22. Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M et al (2011) Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 478:57–63
23. Neveling K, Collin RWJ, Gilissen C et al (2012) Next generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* (in press)
24. Ng SB, Bigam AW, Buckingham KJ et al (2010) Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 42:790–793
25. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C et al (2009) Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 42:30–35
26. Ng SB, Turner EH, Robertson PD et al (2009) Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 461:272–276
27. O’Roak BJ, Deriziotis P, Lee C et al (2011) Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat Genet* 43:585–589
28. Pierce SB, Walsh T, Chisholm KM et al (2010) Mutations in the DBP-deficiency protein HSD17B4 cause ovarian dysgenesis, hearing loss, and ataxia of Perrault Syndrome. *Am J Hum Genet* 87:282–288
29. Renton AE, Majounie E, Waite A et al (2011) A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72:257–268
30. Ropers HH (2010) Single gene disorders come into focus—again. *Dialogues Clin Neurosci* 12:95–102
31. Shearer AE, DeLuca AP, Hildebrand MS et al (2010) Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:21104–21109
32. Sobreira NL, Cirulli ET, Avramopoulos D et al (2010) Whole-genome sequencing of a single proband together with linkage analysis identifies a Mendelian disease gene. *PLoS Genet* 6:1000991
33. Vissers LE, LJ de, Gilissen C et al (2010) A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet* 42:1109–1112
34. Walsh T, Casadei S, Lee MK et al (2011) Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18032–18037
35. Walsh T, Shahin H, Elkan-Miller T et al (2010) Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GSPM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *Am J Hum Genet* 87:90–94
36. Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD et al (2011) Making a definitive diagnosis: Successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med* 13:255–262
37. Züchner S, Dallman J, Wen R et al (2011) Whole-Exome Sequencing Links a Variant in DHDDS to Retinitis Pigmentosa. *Am J Hum Genet* 88:201–206

Gemeinsamer Gerontologie- und Geriatriekongress 2012 12. bis 15. September, Bonn
 Altersforschung: Transnational und translational

Die DGG, DGGG, ÖGGG und SGG SSG richten den Gemeinsamen Gerontologie- und Geriatriekongress 2012 aus. Zentrale Themen des Kongresses von Wissenschaft und Forschung sowie Fort- und Weiterbildung sind:

- COPD beim älteren Menschen
- Interventionelle Kardiologie
- Kardiometabolisches Risiko und Intervention
- Herzinsuffizienz – gibt es eine Evidenz?
- Kardiale Rehabilitation
- Interdisziplinäres Wundmanagement
- Vitamin D- mehr als nur Knochen?
- Sturz und Fraktur – aktuelle Prävention und Therapie
- Sarkopenie – von der Diagnose zur Therapie
- Malnutrition und Dysphagie
- Frailty und Funktion
- Multimedikation – Chancen und Risiken
- Update Impfungen
- Nosokomiale Infektionen
- Zahn- und Mundhygiene
- Ambient Assisted Living
- Schlaf und Schlafstörungen im Alter
- Schmerz und Schmerztherapie
- Chronische Obstipation
- Inkontinenz
- Verhaltensstörungen bei Demenz
- Die drei D’s – Demenz, Depression und Delir
- Demenz im Krankenhaus
- Geriatrie in der der Zentralen Notaufnahme
- Nachwuchsgewinnung und Ausbildung in der Geriatrie
- Translationale Medizin in der Geriatrie
- Fortbildungscurriculum Geriatrie für junge Kollegen und niedergelassene Ärzte

Der Kongress findet im World Conference Center Bonn statt, die Deadline für Abstracts, Symposien und Einzelbeiträge ist der 15.4.2012.

Quelle: www.geriatriekongress2012.de