

Massive parallele Sequenzierung in der Diagnostik hereditärer *BRCA1/2*-Mutationen

Hintergrund

Im Jahr 2010 erkrankten in Deutschland 70.340 Frauen erstmals an Brust- und 7790 an Ovarialkrebs, das Lebenszeitrisiko wird mit 12,9 bzw. 1,5% angegeben (Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert-Koch-Institut). Schätzungsweise 5–10% der Brust- und 10–15% der Ovarialkrebs-erkrankungen basieren auf einem hereditären Hintergrund. Mutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* sind die weit-aus wichtigsten und am besten charakterisierten erblichen Risikofaktoren für Brust- und Ovarialkrebs und können in etwa 20–50% der Familien mit familiärem Brust- und Ovarialkrebs detektiert werden. Mutationsträgerinnen haben ein deutlich erhöhtes Lebenszeitrisiko sowohl an Brustkrebs (Lebenszeitrisiko bis zu 85% für *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationsträgerinnen) als auch an einem Ovarialkarzinom (Lebenszeitrisiko bis zu 62% für *BRCA1*- und 23% für *BRCA2*-Mutationsträgerinnen) zu erkranken. Die Identifikation von Mutationsträgerinnen ist für eine individuelle Behandlung von bereits erkrankten Patientinnen und für noch nicht erkrankte Mutationsträger und Mutationsträgerinnen von großer Bedeutung, da spezielle Früherkennungsprogramme für Brustkrebs angeboten werden. Zudem bewirken prophylaktische Operationen (Mastektomie und Salpingoovarektomie) eine Reduktion des Erkrankungsrisikos und können einen positiven Effekt auf das Gesamtüberleben haben [1, 2]. Nach Diagnose eines Mammakarzinoms kann ein Mutationsnachweis noch vor Durchführung der operativen Therapie die Entscheidung der Patientin für eine brusterhaltende Therapie bzw. eine (beidseitige) Mastektomie beeinflussen. Daher ist

auch zunehmend eine schnelle genetische Diagnosestellung wichtig geworden [3]. Es ist zu erwarten, dass nach Zulassung zielgerichteter Therapien in nächster Zeit die Nachfrage nach schneller Diagnostik noch steigen wird. In den letzten Jahren hat der Einsatz der massiven parallelen Sequenzierung (MPS bzw. Next Generation Sequencing, NGS) in der molekulargenetischen Diagnostik von erblichem Brust- und Eierstockkrebs stetig zugenommen. Die Vorteile von MPS – ein wesentlich höherer Probendurchsatz, kürzere Bearbeitungszeiten und niedrigere Kosten – liegen im Vergleich zu den bisher eingesetzten Verfahren auf der Hand. Erleichtert wird die Einführung der MPS in der *BRCA1/2*-Sequenzierdiagnostik durch die kommerzielle Verfügbarkeit von zertifizierten Polymerase-Kettenreaktion(PCR)-Kits für die In-vitro-Diagnostik. Im Folgenden wird der Prozess der Etablierung und Validierung von 2 MPS-Verfahren für die Routinediagnostik im Institut der Autoren beschrieben.

Technik

NGS-Geräte arbeiten nach dem Prinzip des MPS, wobei die zu untersuchenden Bereiche eines Gens nach einer klonalen Amplifikation mehrfach parallel sequenziert werden. Die Anzahl der parallelen Sequenzen (auch als Sequenziertiefe oder „coverage“ bezeichnet) hängt dabei von der Anzahl der zu sequenzierenden Proben und der Kapazität des Gerätes ab. Die durchschnittliche theoretische Sequenziertiefe kann wie folgt berechnet werden: Anzahl der sequenzierten Basen pro MPS-Lauf geteilt durch die Anzahl der zu sequenzierenden Basen der Zielregionen. Die tatsächlich erreichte Sequenzier-

tiefe pro Base, d. h. die Sequenzierhäufigkeit einer bestimmten Base der Zielregion im Sequenzierlauf, unterscheidet sich aber meist erheblich von Amplikon zu Amplikon. Auch innerhalb eines Amplikons kann es diesbezüglich zu enormen Schwankungen kommen. Die Gründe für die starken Unterschiede in der Sequenziertiefe sind vielfältig und werden z. B. durch eine unterschiedliche Effizienz der einzelnen Multiplex-PCR-Reaktionen oder das Verhältnis der Leselänge des verwendeten MPS-Geräts im Vergleich zur Amplikonlänge bestimmt. Bei höherer Proben- bzw. Amplikonanzahl in einem Lauf sinkt die zu erwartende Anzahl der erzeugten Sequenzen (sog. Reads) pro Amplikon. Im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung, bei der bereits fertig synthetisierte PCR-Fragmente der Größe nach aufgetrennt und analysiert werden, wird bei der MPS der Einbau von Nukleotiden in den wachsenden DNA-Strang direkt gemessen. Dies kann durch die enzymatische Erzeugung einer Lichtreaktion (Pyrosequenzierung, z. B. verwendet von der Fa. Roche) oder durch die auftretenden Spannungsänderungen durch Abspaltung von Protonen beim Einbau des Nukleotids (verwendet im Ion-Torrent™-System von der Fa. Life Technologies) geschehen. Diese Methoden haben jedoch den Nachteil, dass in Homopolymerbereichen (Abfolge mehrerer identischer Basen hintereinander) in der UrsprungsdNA das entsprechende homologe Nukleotid mehrfach in den Strang eingebaut wird. Die zugehörige Lichtreaktion oder Spannungsänderung ist jedoch nur bis zu einem bestimmten Grad proportional

Bernd Auber und Kai Heinecke teilen sich die Erstautorenschaft.

zur Anzahl der eingebauten Nukleotide, sodass es bei der Pyrosequenzierung oder dem Ion-Torrent™-System zu falsch-positiven Ergebnissen in Form des vermeintlichen Nachweises einer Deletion kommen kann. Eine Verifizierung von gefundenen Veränderungen mittels einer anderen Technik, wie z. B. Sanger-Sequenzierung, ist daher erforderlich. Eine Möglichkeit, die Schwierigkeit in der Sequenzierung von Homopolymeren zu umgehen, liegt darin, durch chemische Modifizierung den Einbau von mehr als einem Nukleotid pro Zyklus zu verhindern (z. B. verwendet beim MiSeq™-Gerät der Fa. Illumina®). Auch bei dieser Technik ist eine Verifizierung von Veränderungen gegebenenfalls empfehlenswert, da es durch die Vielzahl von enzymatischen Reaktionen zu Artefaktbildungen kommen kann [4]. Eine technische Übersicht über diese und weitere Methoden, die allerdings in der Routinediagnostik bisher so gut wie keine Anwendung finden, wird in [5] gegeben.

Geräteauswahl

Für die Geräteauswahl waren die Anschaffungskosten, die Kapazität und die Verfügbarkeit von abgestimmten Kits ausschlaggebend. Neben möglichst geringen Anschaffungskosten sollte die Kapazität zu dem anfallenden Probenaufkommen passen, damit einerseits eine hohe Auslastung des Geräts und andererseits mindestens einmal pro Woche die Probenanzahl, ab der ein Lauf rentabel wird, erreicht wird, um zeitnah ein Ergebnis zu erzielen. Die Entscheidung fiel im Jahr 2012 zugunsten des GS Junior der Fa. Roche, da dieses Gerät die gesetzten Vorgaben am ehesten erfüllte und zudem für dieses Gerät abgestimmte und zertifizierte Diagnostikkits der Fa. Multiplicom (Belgien) für die *BRCA1/2*-Diagnostik verfügbar waren. Mitentscheidend war außerdem, dass im Deutschen Konsortium für erblichen Brust- und Eierstockkrebs gute erste Erfahrungen mit diesem Vorgehen vorlagen und dass durch die langjährige Expertise des Herstellers im Diagnostikbereich ein kompetenter Ansprechpartner bei Problemen und ein schneller Service zur Verfügung stehen. Vor kurzem wurde jedoch bekannt gegeben, dass die Produktion der 454™-Geräte von Roche im Jahr 2015 ein-

medgen 2014 · 26:255–263 DOI 10.1007/s11825-014-0443-y
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

B. Auber · K. Heinecke · S. Morlot · B. Schlegelberger · D. Steinemann
Massive parallele Sequenzierung in der Diagnostik hereditärer *BRCA1/2*-Mutationen

Zusammenfassung

Die massive parallele Sequenzierung (MPS) findet in der molekulargenetischen Diagnostik erblicher Krebserkrankungen zunehmend Einsatz, hier insbesondere bei Verdacht auf erblichen Brust- und Eierstockkrebs. Die potenziellen Vorteile von MPS im Vergleich zu bisher verwendeten (z. B. Sanger-sequenzbasierten) Methoden sind ein höherer Probendurchsatz, kürzere Bearbeitungszeiten und verminderte Kosten. Der Einsatz in der Routinediagnostik wird durch die Verfügbarkeit von zertifizierten Kits für die Probenvorbereitung vereinfacht. Hier wird die Validie-

rung von 2 verschiedenen MPS-Geräten für die *BRCA1/2*-Diagnostik beschrieben. Bei Verwendung der Technik müssen die jeweiligen Vor- und Nachteile der einzelnen Geräte bedacht werden. Die Ergebnisse der MPS-Sequenzierung entsprechen denen, die mit Sanger-Sequenzierung ermittelt wurden.

Schlüsselwörter

Hochdurchsatznukleotidsequenzierung · Hereditärer Brust- und Eierstockkrebs · *BRCA1* · *BRCA2* · Molekulare Diagnostik

Massively-parallel sequencing in routine diagnostics for hereditary *BRCA1/2* mutations

Abstract

During the past few years, application of massively-parallel sequencing (MPS) in molecular diagnostics of hereditary cancer has increased significantly. The potential advantages of MPS, compared for example to Sanger sequencing-based methods, are higher sample capacities, shorter turnaround times, and decreased costs. Adoption in routine diagnostics is simplified due to the availability of certified kits for sample preparation. Here, the validation of two MPS systems for routine *BRCA1/2* sequencing diagnostics are

describe. Users should keep in mind the technical advantages and disadvantages of the individual sequencing machines. The results achieved with MPS are equal to those from Sanger sequencing.

Keywords

High-throughput nucleotide sequencing · Hereditary breast and ovarian cancer syndrome · *BRCA1* · *BRCA2* · Molecular diagnostics

gestellt, der Support aber bis auf weiteres gewährleistet wird. Gegen den GS Junior spricht, dass die Kosten pro Lauf im Vergleich mit anderen Geräten (z. B. von Illumina®) relativ hoch sind und die Probenvorbereitung signifikant mehr Zeit in Anspruch nimmt.

Der GS Junior arbeitet nach dem Prinzip der Pyrosequenzierung mit den bereits beschriebenen Nachteilen bei der Analyse von Homopolymeren. Für die Analyse von *BRCA1/2* ist aus diesem Grund ein zusätzliches Kit verfügbar, mithilfe dessen die in den untersuchten Genen vorhandenen Homopolymere auf Deletionen oder Duplikationen durch Fragmentanalyse auf einem Sanger-Sequenzierautomaten überprüft werden. Alternativ können Homopolymere, die in der MPS-Analyse auffällig sind, per Sanger-Sequenzierung verifiziert werden.

Bei dem *BRCA1/2*-Multiplicom-Kit (v2) werden zuerst mit 5 Multiplex-PCR-Ansätzen 94 Amplikons generiert, die den gesamten codierenden Bereich der beiden Gene repräsentieren. An die Amplikons werden dabei sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende sog. universelle Adapter – kurze, überhängende Enden mit einer definierten Sequenz – angehängt. Über diese Adapter werden dann in einer 2. PCR patientenspezifische molekulare Barcodes (sog. „multiplex identifier“, MID) sowie die für die folgenden Schritte notwendigen systemspezifischen Adapter angefügt.

Da die Amplikons durch den MID eindeutig dem jeweiligen Patienten zuordenbar sind, können die Amplikons aller Patienten, die in einem Lauf zusammen untersucht werden sollen, gepoolt werden. Bei der Kapazität des GS Junior werden hier pro Lauf maximal 8 Patienten ge-

meinsam untersucht, um die gewünschte 30-fache Mindestsequenziertiefe pro Base sicherstellen zu können. Bei durchschnittlich 35 Mio. sequenzierten Basen pro GS-Junior-Lauf, einer Größe der Zielregion von 18.097 Basen (codierende Sequenz von *BRCA1* und *BRCA2* einschließlich der Exon-/Introngrenzen) und 8 Patientenproben pro Lauf liegt die theoretische Sequenziertiefe pro Base zwar bei über 240. Dennoch ist aufgrund der genannten starken Schwankungen (■ **Tab. 1**) bezüglich der tatsächlich erreichten Sequenziertiefe pro Base eine höhere Probenzahl pro GS-Junior-Lauf nicht sinnvoll.

Im nächsten Schritt wird eine Sequenzierbibliothek („library“) in die klonale Amplifizierung eingesetzt. Bei dem Roche-System benutzt man zur Herstellung der Bibliothek eine Emulsions-PCR (emPCR), ein Wasser-in-Öl-Gemisch, in dem jeder Wassertropfen einen eigenen Bioreaktor darstellt. Dieser enthält alle für eine PCR notwendigen Elemente und außerdem ein Microbead, das mit Oligonukleotiden besetzt ist, die komplementär zu den endständigen Adaptern der Bibliothek sind, sowie genau ein Amplikonmolekül der Bibliothek. Dies wird statistisch durch eine Verdünnung der Bibliothek erreicht. Das Amplikon heftet sich über die Adapter an das Microbead und wird durch die PCR amplifiziert. Nach der Reaktion und dem anschließenden Aufbrechen der Emulsion erhält man ein Gemisch der Microbeads, von denen jedes mit genau einem spezifischen Typ von Amplikon bedeckt ist. Die Microbeads werden anschließend in eine sog. Picotiterplatte verteilt, die so beschaffen ist, dass in jede Vertiefung genau ein Microbead passt. Hier findet die eigentliche Sequenzierreaktion statt. Der Einbau von Nukleotiden in den wachsenden Strang wird als Lichtreaktion in der jeweiligen Kammer detektiert. Die Auswertung der Signale (Bildanalyse) findet direkt nach der Sequenzierung durch das Gerät statt.

Nachdem das GS-Junior-Gerät etwa ein Jahr lang zur *BRCA1/2*-Diagnostik genutzt wurde, stellte sich heraus, dass der stetig zunehmenden Nachfrage nach dem Test im Zusammenhang mit kurzfristigen therapeutischen Entscheidungen (Vorliegen eines Ergebnis innerhalb von 2 Wochen) nur durch den Kauf eines 2. GS Ju-

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

Tab. 1 Durchschnittliche Sequenziertiefen des GS-Junior- bzw. MiSeq™-Systems pro Exon, gemittelt über 13 für die Validierung verwendeten Proben

BRCA1-Exon	GS-Junior-System			MiSeq™-System		
	Durchschnittliche Sequenziertiefe („forward/revers“)	Standardabweichung (±)	Durchschnittliche Sequenziertiefe (Minimum/Maximum)	Durchschnittliche Sequenziertiefe („forward/revers“)	Standardabweichung (±)	Durchschnittliche Sequenziertiefe (Minimum/Maximum)
2	223(95/128)	105	80/395	12.363 (5245/7118)	10.714	1641/30.049
3	84(30/53)	50	15/154	6207 (3062/3145)	4363	700/14.804
4	141(71/70)	59	54/220	4171 (1130/3041)	3045	508/10.569
5	155(69/86)	87	44/298	16.866 (7839/9027)	15.296	2193/41.460
6	111(52/59)	57	33/209	3886 (1282/2604)	2732	464/8822
7	196(94/102)	58	107/289	15.256 (7988/7268)	7346	8347/33.190
8	115(59/56)	72	33/245	28.172 (14.019/14.153)	9548	19.246/54.510
9	206(101/105)	100	58/383	18.245 (9029/9216)	6326	11.436/35.692
10	198(90/108)	33	129/249	12.277 (6038/6239)	1620	10.130/15.578
11	275(130/145)	139	79/487	16.746 (5690/11.056)	14.555	2104/41.903
12	118(57/61)	48	44/192	4401 (2192/2208)	3089	544/10.586
13	211(90/121)	106	51/368	16.286 (8466/7820)	14.400	2057/39.089
14	202(86/116)	57	104/279	15.229 (6199/9030)	6258	7382/28.533
15	207(101/107)	33	157/275	15.341 (7447/7894)	5651	8675/28.864
16	129(57/72)	47	63/205	4613 (2271/2342)	3266	575/10.449
17	178(88/91)	93	44/319	11.583 (6610/4974)	10.179	1588/28.000
18	238(113/125)	72	128/348	26.336 (13.075/13.261)	10.901	12.899/51.331
19	385(187/198)	88	231/478	32.480 (16.035/16.445)	17.504	10.420/75.610
20	155(82/73)	43	86/206	21.611 (10.718/10.892)	10.115	9881/44.772
21	167(80/86)	91	55/315	19.403 (9669/9733)	5919	14.151/35.136
22	117(61/56)	71	20/278	6320 (3728/2592)	6751	543/21.281
23	151(69/83)	77	58/296	10.016 (4838/5178)	4129	6130/21.582
BRCA2-Exon	Durchschnittliche Sequenziertiefe („forward/revers“)	Standardabweichung (±)	Durchschnittliche Sequenziertiefe (Minimum/Maximum)	Durchschnittliche Sequenziertiefe („forward/revers“)	Standardabweichung (±)	Durchschnittliche Sequenziertiefe (Minimum/Maximum)
2	214 (140/74)	68	118/351	29.051 (14.592/14.460)	10.746	12.243/51.836
3	106 (51/55)	39	34/164	6523 (4388/2136)	3249	2800/12.789
4	176 (97/78)	94	43/346	18.989 (8529/10.459)	8833	2475/37.461
5,6	225 (121/104)	78	94/358	21.170 (10.296/10.875)	14.924	3636/47.749
7	263 (164/99)	132	96/513	25.698 (19.420/6278)	19.476	2464/62.644
8	224 (121/103)	66	109/336	21.817 (11.013/10.804)	7525	9263/37.147
9	91 (48/43)	52	20/193	4144 (2079/2065)	3807	388/14.077
10	200 (111/89)	33	135/259	13.184 (6726/6458)	3032	9888/21.001
11	228 (127/101)	36	147/288	17.465 (9015/8450)	4232	14.415/30.706
12	139 (73/66)	76	32/263	15.093 (6512/8582)	6661	2316/29.263
13	136 (75/61)	81	25/269	6122 (3090/3032)	5471	803/20.496
14	177 (98/79)	37	94/222	4211 (2243/1968)	2862	768/10.235
15	132 (69/63)	79	33/303	4753 (2636/2117)	4112	668/15.228
16	145 (95/50)	47	78/197	22.385 (9981/12.404)	8071	9374/37.880
17	214 (123/91)	68	102/342	19.894 (10.313/9582)	7438	9519/36.023
18	203 (115/88)	64	95/312	9833 (6416/3417)	6669	1840/23.341
19	229 (128/101)	125	67/453	20.888 (9898/10.990)	16.401	1853/53.824
20	173 (98/74)	85	69/328	17.482 (11.683/5799)	13.144	1647/42.721
21	212 (117/95)	86	74/329	24.018 (12.100/11.918)	10.449	3687/45.747
22	135 (75/60)	81	31/274	15.531 (6525/9006)	7020	2205/28.383
23,24	167 (96/71)	52	89/242	15.769 (7087/8682)	11.031	2886/38.394
25	265 (140/125)	37	201/337	23.417 (11.795/11.622)	6242	13.132/36.867
26	187 (99/88)	106	47/386	17.171 (10.068/7103)	7718	2439/35.004
27	223 (127/97)	49	165/344	17.529 (8035/9494)	5136	9402/25.838

Tab. 2 Sequenzveränderungen bei den 13 für die Validierung verwendeten Proben

Probe	Gen	Art der Veränderung	Beschreibung (nach HGVS-Nomenklatur)
1	<i>BRCA1</i>	Indel	c.68_69delAG
2	<i>BRCA1</i>	Punktmutation	c.213-12A>G
3	<i>BRCA1</i>	Punktmutation	c.564A>G
4	<i>BRCA1</i>	Indel	c.843_846delCTCA
5	<i>BRCA1</i>	Punktmutation	c.9257-1G>C
6	<i>BRCA1</i>	Größere DNA-Umlagerung	c.4358-?_4484+?dup
7	<i>BRCA2</i>	Punktmutation	c.3516G>A
8	<i>BRCA2</i>	Punktmutation	c.125A>G
9	<i>BRCA2</i>	Indel	c.426-7_426-4delATTT
10	<i>BRCA2</i>	Indel	c.654-12_654-8delGTTTT
11	<i>BRCA2</i>	Indel	c.658_659delGT
12	<i>BRCA2</i>	Indel	c.3975_3978dupTGCT
13	<i>BRCA2</i>	Indel	c.10095delinsGAATTATATC

HGVS Human Genome Variation Society, *Indel* Kombination aus Deletionen und Duplikationen.

niors oder durch den Umstieg auf ein Gerät mit einem höheren Durchsatz begegnet werden konnte. Es wurde sich aus folgenden Gründen für die Umstellung der Diagnostik auf ein MiSeq™-Gerät (Illumina®) entschieden:

- Die Probenvorbereitung ist im Vergleich zum Roche-System deutlich einfacher.
- Durch den Unterschied in der Sequenzieretechnik spielt die Homopolymerproblematik nur noch eine untergeordnete Rolle
- Das bereits etablierte Multiplex-PCR-Kit ist mittlerweile auch für die MiSeq™-Plattform verfügbar und kann somit praktisch unverändert weiterverwendet werden.
- Das MiSeq™-Gerät kann auch für eine zunehmende Ausweitung der Diagnostik (Paneldiagnostik) eine ausreichende Menge an Sequenzierdurchsatz zur Verfügung stellen.

Das MiSeq™-System ist für die *BRCA1/2*-Diagnostik aktuell validiert worden und wird zurzeit in die Routinediagnostik überführt. Nach der bereits beschriebenen Probenvorbereitung mit dem Multiplicom-Kit wird für den MiSeq™-Lauf das gepoolte Probenet nach einer Qualitätskontrolle verdünnt und auf die „flow cell“ aufgetragen, in der dann sowohl die PCR-Amplifikation der Amplikons (isothermale Clusterbildung) als auch die eigentliche Sequenzierreaktion mittels „sequencing by synthesis“ stattfindet. Beide Re-

aktionen finden automatisiert im Gerät statt. Somit verkürzt sich hierdurch die notwendige Hands-on-Zeit im Vergleich zum GS-Junior-System deutlich von etwa 13,5 auf 7,5 h (Abb. 1). Es wird eine Paired-end-Sequenzierung durchgeführt, d. h. ein Amplikon wird jeweils sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende her sequenziert. Mit dem hier verwendeten „MiSeq™ Reagent Kit v2“ (500 Zyklen) wird so eine maximale Leselänge von 2×250 Basen erzeugt. Pro MiSeq™-Lauf können mit diesem Kit etwa 7,5 Gb sequenziert werden. Die Dauer eines Sequenzierlaufs ist mit etwa 36 h allerdings mehr als 3-mal so lang wie beim GS-Junior-System (10 h). Theoretisch könnten somit bei einer gewünschten durchschnittlichen 100-fachen Mindestsequenziertiefe mehr als 4000 Patientenproben pro Lauf sequenziert werden. Da es aber auch bei der Sequenzierung mit dem MiSeq™-System zu starken Schwankungen in der Sequenziertiefe kommt (Tab. 1) und sich ein Handling von mehr als 16 Proben pro Lauf als nicht praktikabel herausgestellt hat, werden pro MiSeq™-Lauf 10 bis maximal 16 Proben bearbeitet.

Validierung

Für die Validierung beider MPS-Verfahren wurden zunächst jeweils 13 Proben mit bekannten Mutationen durch MPS analysiert. Die Mutationen waren zuvor mittels „high resolution melting analysis“ (HRM) und denaturierender Hochdruck-

flüssigkeitschromatographie (DHPLC) bzw. Sanger-Sequenzierung nachgewiesen worden. Das Vorscreening der *BRCA1/2*-Proben mittels HRM bzw. DHPLC und anschließender fluoreszenzbasierter Sanger-Sequenzierung mit M13-Primern war bis zur Einführung der Sequenzierung mit dem GS-Junior-System die im Institut der Autoren in der Routinediagnostik verwendete Methode. Pro Probe mussten nach dem DHPLC-/HRM-Vorscreening durchschnittlich 54 Sanger-Sequenzierungen durchgeführt werden [6].

Bei der Auswahl der Proben wurde darauf geachtet, ein möglichst breites Spektrum an Veränderungen abzudecken. Insbesondere wurden mehrere Proben mit verschiedenen kleinen Deletionen, Duplikationen oder einer Kombination aus beidem (sog. Indels) ausgewählt (Tab. 2). Da jede Probe zusätzlich mehrere bereits bekannte Polymorphismen enthielt, die technisch einer Punktmutation entsprechen, ergaben sich für dieses Validierungsset etwa 100 nachzuweisende Veränderungen. Eine Probe enthielt außerdem eine Duplikation des kompletten Exons 13 in *BRCA1*. Hiermit sollte herausgefunden werden, ob es durch Messung der Unterschiede in der durchschnittlichen Sequenziertiefe einer Region möglich ist, auch Deletionen oder Duplikationen größerer Genbereiche zu detektieren.

Alle pathogenen Mutationen (bis auf die komplette Duplikation von Exon 13, Probe 6) und alle Polymorphismen wurden mit beiden Techniken nachgewiesen. Unterschiede zur DHPLC-/HRM-/Sanger-Sequenzanalyse ergaben sich aufgrund unterschiedlicher, an diesen Stellen nicht überlappender Primerdesigns lediglich bei Polymorphismen in den intronischen Randbereichen der Amplikons.

Die Duplikation des Exons 13 in *BRCA1* konnte weder mit dem GS-Junior noch dem MiSeq™-System nachgewiesen werden. Eine Auswertung der MPS-Daten hinsichtlich größerer Deletionen/Duplikationen ist zwar prinzipiell möglich [7] und könnte so den zusätzlichen Schritt einer Multiplex-ligation-dependent-probe-amplification (MLPA)-Diagnostik überflüssig machen. Im Labor der Autoren hat sich die Detektion von größeren Deletionen/Duplikationen im *BRCA1*- oder *BRCA2*-Gen anhand eines Ver-

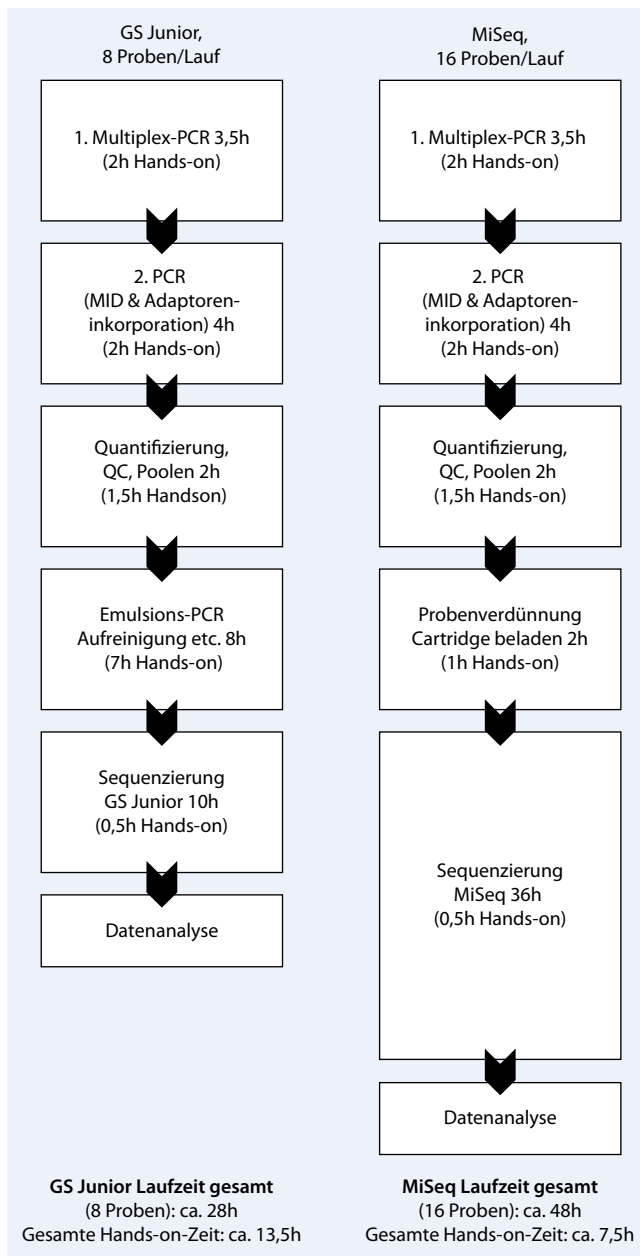


Abb. 1 ▲ Schematische Darstellung der Arbeitsschritte und des zeitlichen Ablaufs eines GS-Junior- und eines MiSeq™-Laufs. MID „multiplex identifier“

gleichs der durchschnittlichen Sequenzierertiefe pro Amplikon aber auch bei weiteren Proben mit größeren DNA-Umlagerungen jedoch als nicht robust genug erwiesen, um sie in der humangenetischen Diagnostik anzuwenden. Die durchschnittliche Sequenzierertiefe der Exon-13-Region von *BRCA1* (und auch die aller anderen Amplikons) fiel im Mittel zwischen den verschiedenen Patientenproben zu heterogen aus, um sichere Rückschlüsse auf größere DNA-Umlagerungen ziehen

zu können, was sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen deckt [8]. Zum Nachweis dieser Art von Veränderungen wird daher weiterhin parallel eine MLPA-Untersuchung durchgeführt.

Im 2. Schritt wurden 16 Proben von Patienten mit unbekanntem Mutationsstatus parallel mittels Sanger-Sequenzierung und MPS untersucht. Auch hier fielen die Ergebnisse identisch aus und die Verfahren wurden in die Routinediagnostik übernommen. Die Multiplex-PCR

mit dem verwendeten Kit einschließlich nachfolgender MPS führt zu einer kompletten Abdeckung der codierten Sequenz und der Exon-Intron-Grenzen beider Gene. Eine Nachsequenzierung von Teilregionen mittels Sanger-Sequenzierung wird somit v. a. für die Bestätigung von unklaren Varianten und pathogenen Veränderungen durchgeführt. Sie wird auch notwendig, wenn Homopolymerregionen zu unklaren Ergebnissen in der MPS-Diagnostik führen bzw. wenn die geforderte 30-fache (GS Junior) bzw. 100-fache (MiSeq™) Mindestsequenzierertiefe für ein Amplikon (bzw. einen Teilbereich des Amplikons) nicht erreicht wurde. Bei allen positiv getesteten Proben konnte die Mutation mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden. Eine Überprüfung der MPS-Ergebnisse mittels Sanger-Sequenzierung ist im Durchschnitt unter Verwendung des GS-Junior-Systems bei 1–2 Amplikons pro Patientenprobe notwendig, hauptsächlich bedingt durch unklare Sequenzierungsergebnisse in Homopolymerregionen. Dies entspricht den in der Literatur berichteten Angaben [9]. Da mit dem MiSeq™-System die Homopolymerregionen der sequenzierten *BRCA1/2*-Regionen bei allen bisher sequenzierten Proben problemlos dargestellt werden konnten, war bei diesem System lediglich eine Überprüfung von (potenziell) pathogenen Sequenzveränderungen durch Sanger-Sequenzierung nötig.

Softwarebasierte Auswertung

Die Auswertung von MPS-Daten stellt besondere Anforderungen an die verwendete Software, da die anfallende Datenmenge je nach Fragestellung deutlich größer sein kann als bei einer Sanger-Sequenzierung. Bei der Verwendung für die Diagnostik ergibt sich eine weitere Schwierigkeit, da die meisten erhältlichen Softwarelösungen die speziellen Anforderungen im medizinischen Bereich nicht erfüllen. Hierzu gehören z. B. die patientenbasierte Auswertung und die Möglichkeit der Ergebnisvalidierung, sowie eine audittaugliche Rückverfolgbarkeit der durchgeführten Arbeitsschritte. Verschiedene Validierungsebenen und die Rückverfolgbarkeit der Arbeitsschritte ermöglichen die Tren-

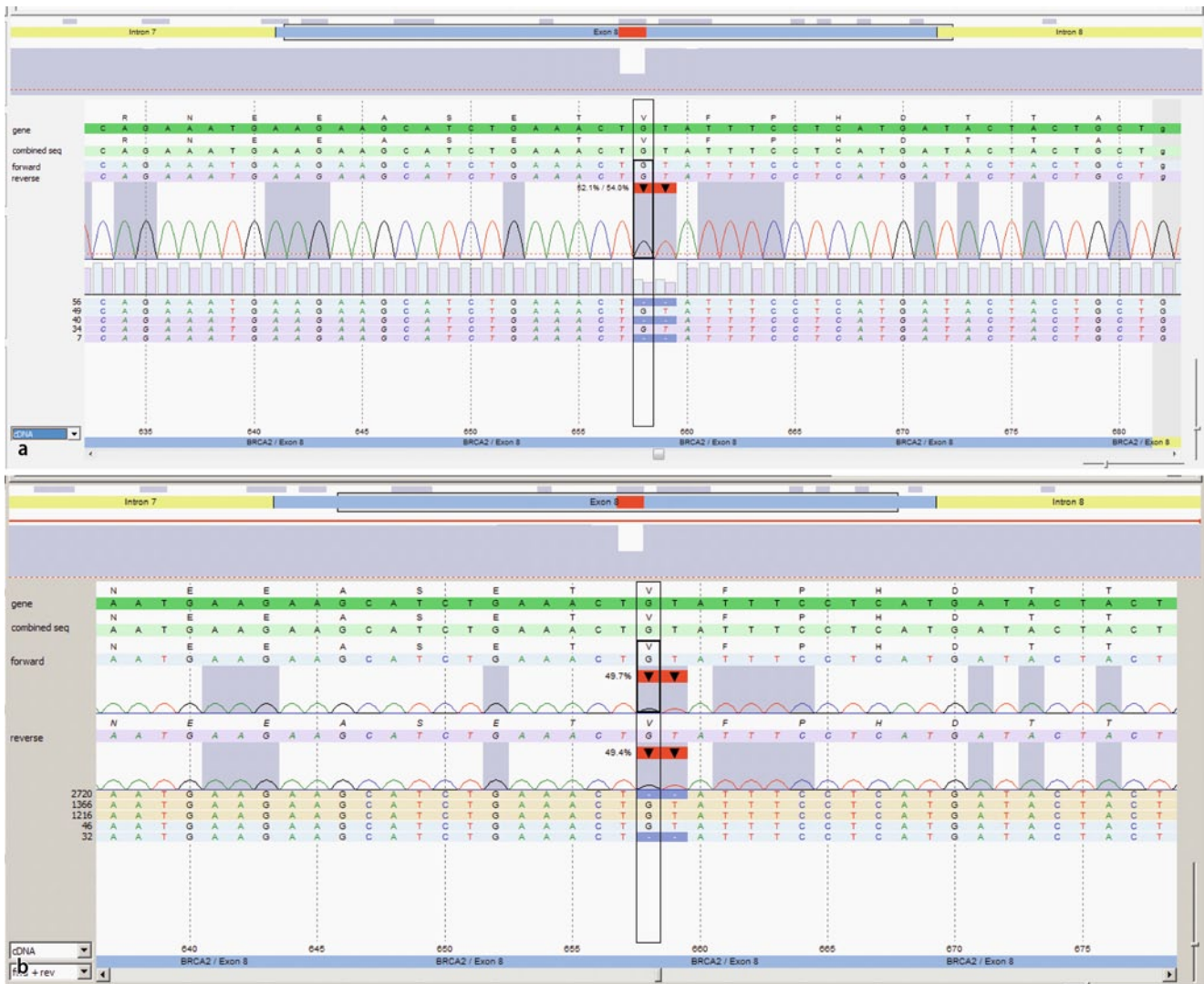


Abb. 2 ▲ Graphische Darstellung der Veränderung c.658_659delGT; p.Val220Ilefs im Exon 8 des *BRCA2*-Gens (Probe 11) mit der SeqNext-Software (JSI Medisys). Aus dem GS-Junior-Lauf wurden für diese Probe 16.375 Reads erzeugt, von denen 16.308 auf die Zielregion abgebildet werden konnten (99,59%). Aus dem MiSeq™-Lauf wurden für diese Probe 1.492.893 Reads erzeugt, von denen 1.444.276 auf die Zielregion abgebildet werden konnten (96,74%). **a** Bei der Sequenzierung mittels GS-Junior-System kann die Deletion in 53% der insgesamt 116 Reads in dieser Region dargestellt werden (62 „forward“, 54 „revers“). **b** Bei der Sequenzierung mittels MiSeq™-System Detektion der Deletion in 50% der 6646 Reads in dieser Region (3352 „forward“, 3294 „revers“)

nung in eine technische Validierung im Labor sowie eine medizinische Validierung durch den Befunder.

Mit der Einführung von MPS für die *BRCA1/2*-Diagnostik haben die Autoren verschiedene kommerziell erhältliche Softwarelösungen getestet:

- die mit dem Gerät gelieferte Ampli-con-variant-analyzer(AVA)-Software der Fa. Roche (Deutschland),
- die Software NextGene® des Anbieters Softgenetics (USA) sowie
- die Software SeqNext von JSI Medisys (Deutschland).

Von diesen 3 Lösungen arbeitete zum Testzeitpunkt lediglich SeqNext patientenbasiert und ermöglichte eine stufenweise Validierung der Ergebnisse.

Nach dem Auftrennen der gepoolten Sequenzierdaten über MID müssen die patientenspezifischen Reads mit der Zielsequenz verglichen werden („alignment“) und es erfolgt eine Darstellung der detektierten Sequenzabweichung. Methodisch bedingt kommt es bei der MPS zur Detektion von vielen i. d. R. falsch-positiven Veränderungen in einzelnen Reads. Daher ist eine Filterung der Daten unab-

dingbar. Je nach Einstellung der entsprechenden Filterparameter sollten möglichst wenige falsch-positive Sequenzvarianten dargestellt werden. Je stringenter die Filter gewählt werden, desto höher ist jedoch die Wahrscheinlichkeit, richtige positive Varianten nicht mehr zu detektieren. Die systembedingten Eigenschaften der erzeugten Sequenzen, wie z. B. die Homopolymerproblematik bei den GS-Junior-Daten oder die im Vergleich deutlich kürzere Leselänge beim MiSeq™-System, müssen daher unbedingt in der Auswertung Berücksichtigung finden. Für die

Tab. 3 Vergleich der mit dem GS-Junior- bzw. MiSeq™-System erzeugten Reads mit MID für die 13 Validierungsproben und der davon auf die entsprechende *BRCA1/2*-Zielregion abbildbaren Reads

Probe	1	2	3	4	5	6
GS Junior						
Zahl der Reads mit entsprechendem MID	16.911	16.795	17.483	15.204	17.052	16.678
Davon <i>BRCA</i> -zugeordnete Reads	16.653	16.447	17.311	15.075	16.814	16.500
Anteil von Reads mit MID	98,47%	97,93%	99,02%	99,15%	98,60%	98,93%
MiSeq™						
Zahl der Reads mit entsprechendem MID	1.339.260	1.800.343	1.119.167	1.232.853	1.368.677	1.685.530
Davon <i>BRCA</i> -zugeordnete Reads	1.310.202	1.754.224	1.101.419	1.202.370	1.341.561	1.658.225
Anteil von Reads mit MID	97,83%	97,44%	98,41%	97,53%	98,02%	98,38%

Auswertung der mit dem GS-Junior-System erzeugten Sequenzen wurden folgende Einstellungen gewählt:

- Eine Warnung (graphisch sowie in der Ergebnistabelle) erfolgt bei einer Sequenziertiefe von <30.
- Ausgewertet werden lediglich Regionen, die mindestens eine kombinierte Sequenziertiefe von >20 aufweisen.
- Für die Detektion einer Mutation müssen mindestens 5 Reads die Abweichung aufweisen, davon 25% pro Leserichtung.

Für mit dem MiSeq™-System erzeugte Sequenzen wurden folgende Einstellungen gewählt:

- Warnung bei einer Sequenziertiefe <100,
- nur Auswertung von Regionen, die mindestens eine Sequenziertiefe von >50 pro Leserichtung aufweisen.
- Für die Detektion einer Mutation müssen mindestens 20 Reads pro Leserichtung die Abweichung aufweisen, davon 25% pro Leserichtung.

In **Abb. 2** ist der Nachweis einer Deletion von 2 Basen in Exon 8 des *BRCA2*-Gens mithilfe des GS-Junior- und des MiSeq™-Systems vergleichend dargestellt. Diese Sequenzveränderung ist in jeweils 53 bzw. 50% der Reads nachweisbar. Eine vergleichende Übersicht der durchschnittlichen Sequenziertiefe der einzelnen Exons von *BRCA1/2* zwischen dem GS-Junior- und dem MiSeq™-System findet sich in **Tab. 1**, die vergleichende Darstellung der jeweils erzeugten Read-Mengen in **Tab. 3**.

Eine Bewertung der detektierten Sequenzabweichungen erfolgte mittels der

hauseigenen Mutationsdatenbank, der Datenbank des Konsortiums für erblichen Brust- und Eierstockkrebs sowie weiterer frei zugänglicher Mutationsdatenbanken, wie z. B. der Breast-cancer-information-core-Datenbank (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>). Zugegriffen: 21. Mai 2014). Insbesondere die Bewertung von unklassifizierten Varianten ist sehr aufwändig und benötigt die Einbeziehung der genannten Datenbanken, von Vorhersageprogrammen, Literaturdaten und ggf. Segregationsanalysen [10]. Wenn möglich erfolgt eine Einteilung der unklassifizierten Varianten hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit, ob es sich um eine pathogenen bzw. benigne Variante handelt [11].

Zusammenfassung und Ausblick

Seit Einführung der MPS-Technik für die *BRCA1/2*-Diagnostik wurden im Labor der Autoren über 600 Patientenproben mit dem GS-Junior-System untersucht. Hierbei konnten in 21,4% der Proben auffällige Sequenzveränderungen detektiert werden, davon 4,6% unklassifizierte Varianten. Alle mittels MPS detektierten Veränderungen wurden mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt.

Zusammenfassend erfolgte die Einführung der MPS in die Diagnostik hereditärer Brust- und Eierstockkrebskrankungen problemlos. Die Sequenzierergebnisse mittels MPS entsprechen denen der Sanger-Sequenzierung. Die durchschnittliche Dauer bis zum Vorliegen eines Befunds konnte durch die Einführung der MPS-basierten *BRCA1/2*-Diagnostik auf etwa die Hälfte reduziert werden (4–6 Wochen).

Sowohl der Zeit- als auch der Kostenaufwand kann durch den Einsatz eines Benchtop-MPS-Geräts deutlich reduziert werden. Mit der Einführung des GS-Junior-Systems konnten die Kosten an Verbrauchsmaterial pro Probe um etwa 70% im Vergleich zur HRM-/DHPLC-/Sanger-Methode gesenkt werden, bei Verwendung des MiSeq™-Systems um etwa 80%. Eine Kostenersparnis bei der *BRCA*-Sequenzierdiagnostik kann nach dem hier beschriebenen Modell jedoch nur erzielt werden, wenn eine relativ hohe Anzahl an *BRCA*-Proben anfällt. Bei weniger als 6 *BRCA*-Sequenzierungen pro Woche ist eine Probenbearbeitung mittels konventioneller Sanger-Sequenzierung im Vergleich zur Sequenzierung mit einem GS-Junior-Gerät i. d. R. kostengünstiger. Für einen wirtschaftlichen Einsatz des MiSeq™-Gerätes ist ein mindestens ebenso hoher Probendurchsatz nötig. Bei weniger als 6–8 Proben pro Woche könnte der Einsatz des Ion-Torrent™-Geräts, das eine bessere Skalierbarkeit für einen geringen Probendurchsatz bietet, eine Alternative darstellen.

Der Bedarf an Sequenzierkapazität im Bereich der Diagnostik bei erblichem Brust- und Eierstockkrebs wird kurzfristig weiter ansteigen, da zunehmend weitere assoziierte Risikogene, wie *TP53*, *RAD51C*, *RAD51D*, *ATM*, *CHEK2* oder *PALB2*, in diagnostische Panels aufgenommen werden, um bei mehr Patienten eine molekulargenetisch basierte Diagnose stellen zu können. Diese Art der Diagnostik kann mittels Sanger-Sequenzierung sowohl personell als auch wirtschaftlich nicht mehr bewältigt werden. Den geringeren Kosten für Verbrauchsmaterialien stehen bei der Analyse weiterer Risi-

7	8	9	10	11	12	13
16.723	21.289	16.989	12.842	16.375	18.031	11.110
16.609	21.055	16.800	12.743	16.308	17.894	11.067
99,32%	98,90%	98,89%	99,23%	99,59%	99,24%	99,61%
1.507.704	1.470.983	1.412.858	1.550.593	1.492.893	1.605.706	1.830.856
1.483.869	1.443.035	1.381.784	1.518.632	1.444.276	1.577.902	1.708.130
98,42%	98,10%	97,80%	97,94%	96,74%	98,27%	93,30%

kogene aber die deutlich höheren Anforderungen und damit Personalkosten hinsichtlich der Auswertung gegenüber.

Fazit für die Praxis

- Durch die Einführung der MPS in die BRCA1/2-Diagnostik kann die durchschnittliche Dauer bis zum Vorliegen eines Befunds deutlich reduziert werden.
- Im Vergleich zu herkömmlichen Sequenziermethoden können auch die Verbrauchsmaterialien pro Probe unter Verwendung eines Benchtop-MPS-Geräts deutlich gesenkt werden. Voraussetzung hierfür ist ein (relativ) hoher Probendurchsatz.
- Zukünftig wird die Paneldiagnostik an Bedeutung gewinnen, die mit konventionellen Methoden nicht mehr zu bewältigen ist.
- Durch die fortschreitende Automatisierung sowohl bei der Probenvorbereitung als auch bei der Sequenzierung selbst wird sich ein Großteil der Bearbeitungszeit bei der Sequenzierdiagnostik von der Erstellung der Sequenzen hin zur Auswertung der vielen jeweils gefundenen Varianten unklarer Signifikanz und zu ihrer Interpretation hinsichtlich der möglichen Bedeutung im klinischen Kontext verschoben.

Korrespondenzadresse

B. Auber
 Institut für Zell- und Molekularpathologie,
 Medizinische Hochschule Hannover
 Hannover
 Auber.Bernd@mh-hannover.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. B. Auber, K. Heinecke, S. Morlot, B. Schlegelberger und D. Steinemann geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine Studien an Menschen oder Tieren.

Literatur

- Ripperger T et al (2009) Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet* 17:722–731
- Meindl A et al (2011) Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom: Neue Gene, neue Therapien, neue Konzepte. *Dtsch Arztebl Int* 7:26
- Francken AB et al (2013) Breast cancer in women at high risk: the role of rapid genetic testing for BRCA1 and -2 mutations and the consequences for treatment strategies. *Breast* 22(5):561–568
- Loman NJ et al (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 30:434–439
- Metzker ML (2010) Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet* 11:31–46
- Hansen TV et al (2011) Screening of 1331 Danish breast and/or ovarian cancer families identified 40 novel BRCA1 and BRCA2 mutations. *Fam Cancer* 10:207–212
- Abel HJ, Duncavage EJ (2013) Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data: a review of informatic approaches. *Cancer Genet* 206(12):432–440
- Feliubadalo L et al (2013) Next-generation sequencing meets genetic diagnostics: development of a comprehensive workflow for the analysis of BRCA1 and BRCA2 genes. *Eur J Hum Genet* 21(8):864–870
- Tarabeux J et al (2014) Streamlined ion torrent PGM-based diagnostics: BRCA1 and BRCA2 genes as a model. *Eur J Hum Genet* 22:535–41
- Moghadas S et al (2013) Variants of uncertain significance in BRCA1 and BRCA2 assessment of in silico analysis and a proposal for communication in genetic counselling. *J Med Genet* 50:74–79
- Plon SE et al (2008) Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* 29:1282–1291