



BUNDESMINISTERIUM
FÜR GESUNDHEIT

Hochdurchsatzsequenzierung und weitere genomweite Untersuchungstechniken im Zusammenhang mit prädiktiven genetischen Analysen



Impressum

Herausgeber, Medieninhaber und Hersteller:
Bundesministerium für Gesundheit, Sektion II
Radetzkystraße 2, 1031 Wien

Für den Inhalt verantwortlich:
Dr. Ulrich Herzog, BMG

Erscheinungstermin:
Jänner 2012

Autor:
Univ. Prof. Dr. Berthold Streubel
Universitätsklinik für Frauenheilkunde / Core Unit Genomics
Medizinische Universität Wien

Coverfoto:
Copyright Image Source Limited / Buenos Dias

Druck:
Kopierstelle des BMG, Radetzkystraße 2, 1031 Wien

Bestellmöglichkeiten:
Telefon: 0810/81 81 64
E-Mail: broschuerenservice@bmg.gv.at
Internet: <http://www.bmg.gv.at>

ISBN 978-3-902611-57-4

Inhaltsverzeichnis:

Inhalt und Strukturierung des Gutachtens	4
Allgemeine Einleitung	5
Vorstellung der Techniken und ihre Möglichkeiten für die Routine.....	10
Genomsequenzierung- Traditionelle vs neue Technologie: Ein wesentlicher Unterschied.....	10
Das Funktionsprinzip der neuen Technologien.....	12
Gibt es auch andere Technologien.....	15
Literatur.....	16
Kann eine Genomsequenzierung alle Fragestellungen beantworten.....	18
Ist die Genomsequenzierung für den Einzelnen heute schon realistisch.....	19
Ist eine genomweite Analyse neu in der Routinediagnostik.....	20
Hochdurchsatzsequenzierungen – Analyse	22
Hochdurchsatzsequenzierungen – Datenausblendung	23
Hochdurchsatzsequenzierungen – Datenspeicherung	25
Genomsequenzierung – nur die Keimbahn.....	26
Der derzeitige Status quo in der Genetischen Beratung und eine Übersicht, wie sich die Situation ändern könnte.....	27
Die grenzüberschreitenden Möglichkeiten bei Labortests.....	29
Qualitätssicherung der Genomsequenzierung für die Routine.....	30
Die neuen Sequenziertechnologien in Zusammenschau mit dem Gentechnikgesetz	31
§ 65: Genetische Analysen bei Typ 1.....	31
§ 65: Genetische Analysen bei Typ 2-4 in Zusammenschau mit §69 Einwilligung und Beratung.....	32
§ 65: Genomanalysen – unterschiedliche Kategorien.....	33
§ 70: Einbeziehung von Verwandten	35
§ 71: Datenschutz.....	36

§ 66 Wissenschaft	37
§ 67: Arbeitgeber, Versicherer.....	38

Inhalt und Strukturierung des Gutachtens

Angestrebtes Ergebnis

Der Gutachter strebt an, dem BMG eine Übersicht über die rezenten Entwicklungen auf dem Gebiet der genetischen Untersuchungstechniken und allfällige Problemfelder in Hinblick auf die aktuelle Rechtslage zu geben. Dieses Gutachten wird aus Sicht des medizinischen Experten erstellt und soll dem Auftraggeber als Entscheidungshilfe dienen für eine allfällige Anpassung des 4. Abschnitts des österreichischen Gentechnikgesetzes (genetische Analyse/Gentherapie) an den Stand von Wissenschaft und Technik im Rahmen der Novelle.

Inhalt des Gutachtens

Das Gutachten beinhaltet die Erhebung des derzeitigen Entwicklungsstands von Hochdurchsatzsequenzierungen und weiterer genomweiter Untersuchungstechniken sowie deren absehbaren Entwicklungen in naher Zukunft. Die fortschreitenden technischen Entwicklungen sollen im Zusammenhang mit prädiktiven genetischen Analysen von Erbkrankheiten betrachtet werden. Ein besonderer Schwerpunkt liegt hierbei darauf, was derzeit auf dem Gebiet der genetischen Diagnostik mit Hilfe dieser neuen Technik schon gemacht wird bzw. möglich ist, was in naher Zukunft absehbar ist und welche Auswirkungen dies auf die genetische Diagnostik und Beratung haben könnte. Weiters wird auf die aktuelle Rechtssituation und sich die eventuell daraus ergebenden Probleme eingegangen.

Aufbau des Gutachtens

Das Gutachten ist in folgende Teile gegliedert:

- 1) Allgemeine Einleitung: Hier werden grundlegende Informationen über die Genetik gegeben. Die Darstellung ist für den Nicht-Genetikexperten formuliert als Verständnisgrundlage für die folgenden Teile
- 2) Vorstellung der Techniken und ihre möglichen Konsequenzen für die Routine
- 3) Aus Punkt (2) resultierende Diskussionspunkte an den Gesetzgeber bezüglich einer allfällig Prüfung hinsichtlich einer etwaigen Änderung des Gentechnikgesetzes.

Allgemeine Einleitung

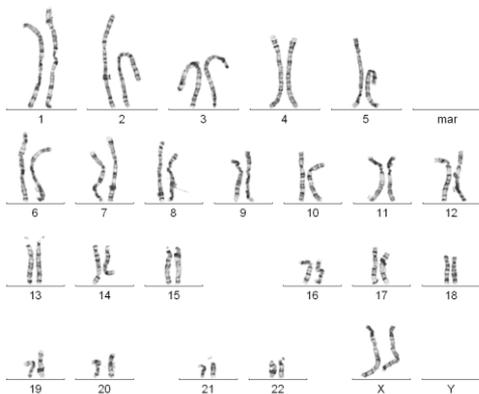
Vorab sei darauf hingewiesen, dass die Aufstellung hier keinen Anspruch auf Vollständigkeit hat. Es sollen in diesem Abschnitt Aspekte der Genetik veranschaulicht werden, die das Studium des weiteren Gutachtens erleichtern sollen.

Allgemeine genetische Grundlagen

Das humane Genom ist die Grundlage für den Bauplan des Menschen und definiert alle Körperfunktionen. Jeder Mensch ist in seinem Bauplan einzigartig. Vergleicht man die unterschiedlichen Sequenzvarianten zweier zufälliger Menschen derselben Population, so herrscht eine Übereinstimmung von ungefähr 99,5%. Krankmachende Veränderungen können Sequenzänderungen des genetischen Codes bzw. Zugewinne/ Verluste chromosomalen Materials betreffen. Abweichungen in einzelnen kritischen Regionen alleine beziehungsweise mehrere Abweichungen in mehreren Regionen gemeinsam können zu krankmachenden Veränderungen führen. Entsprechend dem Zeitpunkt des Auftretens der Mutationen unterscheidet man **angeborene** (Pränatal-, Postnataldiagnostik) von **erworbenen genetischen Veränderungen** (Tumorgenetik).

Aufbau des menschlichen Genoms – Chromosomen

Die überwiegende Mehrheit des genetischen Codes ist in jeder Körperzelle im Zellkern gespeichert. Hierbei ist das Genom auf sogenannten Chromosomen organisiert. Man kann sich Chromosomen wie Perlenketten vorstellen, bei denen die einzelnen Gene hintereinander aufgereiht sind. Jeder Mensch hat normalerweise 46 Chromosomen, die sich aus 22 Paaren Nicht-Geschlechtschromosomen und einem Paar Geschlechtschromosomen (X-Chromosom und X-Chromosom bei der Frau, X-Chromosom und Y-Chromosom beim Mann) zusammensetzen. Jeweils ein Chromosom eines Chromosomenpaares erbt jeder Mensch vom Vater, das andere von der Mutter. Entsprechend gibt man selbst wiederum ein Chromosom jedes Chromosomenpaares an die Nachkommen weiter, das andere kommt vom Partner.



Somit stammt jeweils ungefähr die Hälfte des Chromosomenmaterials/Erbinformation von den beiden Elternteilen (Anmerkung: auf die mitochondriale DNA wird hier nicht näher eingegangen).

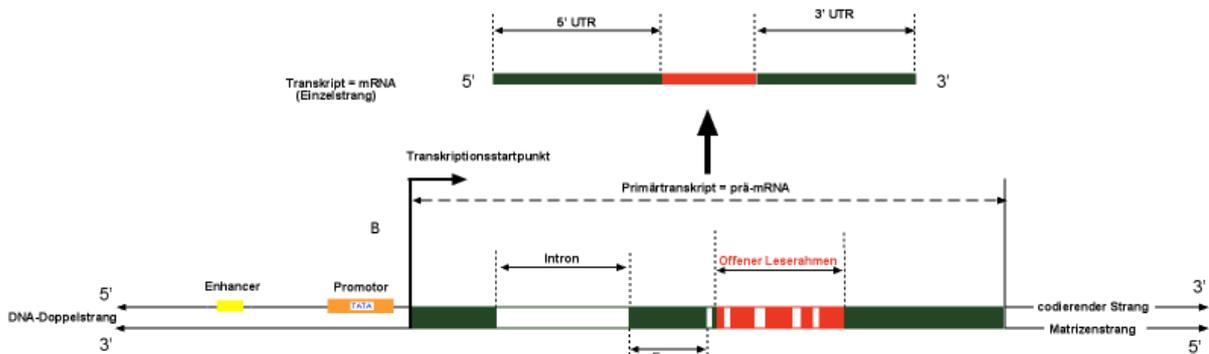
Krankmachende Veränderungen der Chromosomen – chromosomale Erkrankungen

Die Zahl der Chromosomen ist mit 46 exakt festgelegt. Es kann jedoch zu einer **krankmachenden Abweichung von der Chromosomenzahl** kommen, was man dann als chromosomale Erkrankung bezeichnet. Die Ursache der Pathogenität liegt darin, dass die Gendosis nicht mehr stimmt, z.B. liegen bei einer Trisomie alle Gene des betroffenen Chromosoms in dreifacher (statt zweifacher) Kopienzahl vor; bei Monosomie (ein Chromosom eines Chromosomenpaares fehlt) ist entsprechend die Gendosis auf die Hälfte reduziert. Zahlenmäßige Veränderungen der Nicht-Geschlechtschromosomen sind üblicherweise mit einem Leben nicht vereinbar, die Feten sterben sehr früh in der Embryonalentwicklung. Lediglich bei der Trisomie 21 ist eine Lebenserwartung bis

ins Erwachsenenalter möglich. Abweichende Zahlen der Geschlechtschromosomen sind vergleichsweise deutlich weniger dramatisch und können zum Teil sogar unerkant bleiben. Neben der Abweichung ganzer Chromosomen kann es auch vorkommen, dass **Teile eines Chromosoms** fehlen (Deletionen) beziehungsweise verdoppelt sind (Duplikationen). Entsprechende der Lage, Größe und Art (Verlust oder Zugewinn) der Veränderung kommt es zu unterschiedlichen Krankheitsbildern, die sich in der Art als auch im Schweregrad unterscheiden können. Da die Bruchpunkte zumeist individuell sind, sind auch die Krankheitsbilder sehr divergent und in der klinischen Ausprägung schwer vorhersehbar.

Aufbau des menschlichen Genoms – Gene

Wie vorhin erwähnt sind die Gene auf den einzelnen Chromosomen hintereinander organisiert. Ein Gen liefert die Information für ein Genprodukt, also zum Beispiel für ein Protein. Ein Gen besteht aus mehreren Teilen: Es gibt regulatorische Teile, die mitentscheiden, ob das Ablesen der Geninformation aktiviert wird. Weiters unterscheidet man bei einem Gen Exone und Introne, wobei Exone die relevante Information für den Zusammenbau des Proteins enthalten und die Information der Introne als unwesentlich angesehen und verworfen wird. Das Herausschneiden der Introns („Splicing“) passiert



üblicherweise zu dem Zeitpunkt, zu dem von dem Gen eine Kopie - eine sogenannte messenger RNA (mRNA) - erstellt wird, aus der dann schlussendlich das Protein abgelesen wird. Bei dem Vorgang des Überschreibens in mRNA wird der DNA-Strang, der üblicherweise doppelsträngig ist, gelockert. Die einzelnen Informationseinheiten/Basen (es gibt vier unterschiedliche Basen (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin)) des DNA-Strangs sind einzelsträngig ablesbar und werden dabei zu mRNA abgeschrieben. Der fertig abgeschriebene mRNA Strang wandert dann zu den Ribosomen, wo aus der mRNA letztendlich das Protein gebildet wird. Hierbei geben immer drei Basen die Information für eine Aminosäure. Die Aneinanderreihung der Aminosäuren bildet dann das Protein. Wichtig sind auch die aus drei Basen bestehende Start- bzw. Stoppsignale, da diese den Anfang bzw. Ende der Aminosäurekette vorgeben.

Krankmachende Veränderungen der Gene – monogene Erkrankungen

Eine Veränderung der Basenabfolge/des genetischen Codes innerhalb eines Gens kann zu einer Erkrankung führen; sie kann auch so schwerwiegend sein, dass sie mit dem Leben nicht vereinbar ist. Entscheidend ist, in welchem Gen die Veränderung/Mutation auftritt und wie die Art der Mutation ist. Hierzu einige biologische Gesetzmäßigkeiten:

Arten der Vererbung: Wie vorhin erwähnt sind die Gene üblicherweise paarig vorhanden: ein Gen eines Genpaares erben wir vom Vater, eines von der Mutter. Ist es bereits ausreichend, dass ein Gen eines Genpaares krankmachend verändert ist, damit der Betroffenen krank ist, sprechen wir

von einer „starken“ (dominanten) Mutation, das aberrante Gen dominiert sozusagen über das normale Gen. Ist es notwendig, dass beide Gene eines Genpaares verändert sind, damit der Betroffene krank wird, sprechen wir von einer „schwachen“ Mutation oder auch rezessiven Erbkrankheit. Abhängig davon, ob das Gen auf einem Geschlechtschromosom oder Nicht-Geschlechtschromosom (Autosom) liegt, ist die Erbkrankheit geschlechtsgebunden oder eben nicht. Je nach Erbgang ergibt sich ein unterschiedliches Wiederholungsrisiko für eine Familie. Überdies sei erwähnt, dass auch Neumutation beobachtet werden, d.h. eine krankmachende Änderung des genetischen Codes ist in dem Patienten neu aufgetreten und beschränkt sich auf diesen und eventuell seine Nachkommen.

Arten der Mutation: Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, wie die Erbinformation verändert sein kann. So kann es z.B. zu einem Austausch einer Base durch eine andere kommen; eine andere Möglichkeit ist, dass ein oder mehrere Basen fälschlich eingebaut wurden bzw. verloren gingen. Die Konsequenzen solcher Mutationen können sehr unterschiedlich sein: sie können überhaupt keine Relevanz haben (z.B. wenn sich die Abfolge der Aminosäuren nicht ändert), eine relative milde Konsequenz haben (z.B. Austausch einer Aminosäure durch eine andere an einer relativ unwichtigen Stelle im Protein), oder aber auch sehr schwerwiegend sein, wie z.B. eine Stoppmutation, was bedeutet, dass das Ablesen der Information vorzeitig abgebrochen wird und somit überhaupt kein Genprodukt gebildet wird. Üblicherweise kann man häufig bereits aufgrund der Art der Mutation voraussagen, ob eine Veränderung pathogenetisch relevant ist, hierbei kann man sich auch häufig auf bereits beschriebene Daten aus der Literatur stützen. Allerdings kommt es regelmäßig vor, dass man im Rahmen einer Mutationsanalyse neue Varianten entdeckt und keine sichere Aussage über deren Bedeutung machen kann.

Unterschiedliche Phänotypen in der Familie bei gleicher Mutation: Falls eine Mutation/Mutationen auf mehrere Mitglieder innerhalb einer Familie weitergegeben wird, bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass diese alle in gleichem Maße betroffen sein müssen. Dies kann sogar soweit gehen, dass manchmal Mutationsträger überhaupt nicht krank werden und die Erkrankung erst wieder in der nächsten Generation manifest wird (man sagt dazu, dass die Mutation inkomplett penetrant ist). Weiters darf man nicht vergessen, dass ein Gen in seiner Funktion nicht isoliert ist, sondern in Interaktion mit vielen anderen Genen steht. Diese Interaktion kann hierbei individuell stark schwanken, so wie wir uns ja individuell voneinander unterscheiden, und somit zu einer unterschiedlichen Krankheitsausprägung führen. Überdies sei auch zu erwähnen, dass es Mutationsarten gibt, bei denen die Mutation nicht stabil ist und sich von Generation zu Generation verschlimmern kann. Zusammenfassend sei hier die wichtige Feststellung gemacht, dass man nicht zwangsläufig von einer Mutation auf den individuellen Krankheitsverlauf schließen kann.

Eine Ursache – viele Wirkungen: Es sei erwähnt, dass ein Gen häufig unterschiedliche Funktionen in unterschiedlichen Organen erfüllen kann. Weiters kann z.B. ein Gen sehr früh in der Embryonalentwicklung eine wesentliche Wirkung auf andere Gene ausüben und somit bei Fehlfunktion eine Kettenreaktion auslösen. Beide Argumentationen zielen darauf ab zu veranschaulichen, dass die Mutation in einem Gen häufig ein vielschichtiges, komplexes Krankheitsbild zur Konsequenz hat. Auch können Patienten mit Mutationen in unterschiedlichen Genen ein scheinbar identes Krankheitsbild aufweisen, wenn diese unterschiedlichen Gene sehr ähnliche Funktionen übernehmen. Dieses Phänomen hat häufig eine sozusagen sehr unangenehme Konsequenz für ein genetisches Diagnoselabor, da bei manchen Krankheitsbildern sehr viele verschiedene Gene untersucht werden müssen, was zum Teil sehr aufwendig werden kann. Schlussendlich sei auch erwähnt, dass es neben den monogenen Erbkrankheiten eine große Gruppe heterogener/multifaktorieller Erkrankungen gibt. Hierbei geht man davon aus, dass mehrere Genvarianten miteinander kooperieren müssen, damit es zu einer Erkrankung kommt (ein Gen ist hierbei nicht ausreichend). Diese Assoziationen sind jedoch noch wesentlich

ungenauer definiert als bei den monogenen Erkrankungen (ein Gen = eine Krankheit) und Gegenstand intensiver Forschungstätigkeit.

Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation: Die Tatsache, dass eine Keimbahnmutation bei Geburt vorhanden ist, bedeutet nicht zwangsläufig, dass bei Geburt die Symptome bereits erkennbar sind. Der Grund für einen späteren Krankheitsbeginn kann zum Beispiel sein, (a) dass eine fehlende Genfunktion zu einer langsamen Ansammlung toxischer Substanzen in den Körperzellen und somit zu einem verzögerten Funktionsverlust der Zellen führt, oder (b) , dass durch ein mutiertes Tumorsuppressorgen der Zellschutz nicht aufrechterhalten werden kann und es somit im Laufe des Lebens zu einer zweiten, erworbenen Mutation kommt, die in weiterer Folge zur Entstehung von Krebs führt.

Vielfältiges Mutationsspektrum: Man sollte nicht vergessen, dass es unterschiedliche Mutationstypen gibt. Dies kann sogar dazu führen, dass man, selbst wenn man mit Sicherheit von einem einzigen Kandidatengen in einem Patienten ausgeht, nicht immer die Mutation findet. Die Gründe hierfür können vielseitig und sehr komplex/schwer erkennbar sein. Unter anderem können regulatorischen Elemente, die die Genexpression steuern, oder epigenetische Faktoren (z.B. Faktoren, die die Aktivität eines Chromosomenabschnittes steuern) betroffen sein.

Wann werden derzeit genetische Untersuchungen in der klinischen Routine angeboten?

Entsprechend der Einteilung in angeborene und erworbene genetische Erkrankungen gibt es zwei Hauptbetätigungsfelder:

Tumorgenetik:

Hier gilt bereits für einige Tumorentitäten, insbesondere hämatopoetische Tumoren (Leukämien, Lymphome), adulte Weichteiltumoren und kindliche Tumoren, dass die Genetik einen festen Bestandteil im Rahmen der Diagnosestellungen repräsentiert. Tumore entstehen in letzter Konsequenz aufgrund genetischer Veränderungen und diese Veränderungen sind detektierbar. Die WHO-Klassifikation definiert die Genetik als eine von vier Säulen neben Klinik, Histopathologie und Immunmorphologie. Neben der Diagnosefindung ist die Genetik wichtig für die Prognoseeinschätzung und Beurteilung des Therapieverlaufs (z.B. minimale Resterkrankungen). Der Kliniker trifft die Entscheidung für ein Therapieschema oftmals aufgrund des genetischen Befundes.

Angeborene Erkrankungen:

Die Mehrzahl der angeborenen genetischen Erkrankungen wird bereits in der Kindheit auffällig. Hierbei kann die genetische Laboranalyse den Verdacht auf eine bestimmte genetische Erkrankung bestätigen, somit die Diagnose sichern und bei unklarem Krankheitsbild die Diagnosefindung ermöglichen (und somit das weitere klinische Management verbessern). Meistens gehen genetische Diagnosen mit einem erhöhten Wiederholungsrisiko in der Familie bei einer neuerlichen Schwangerschaft einher, Überträgern kann allfällig eine Pränataldiagnostik angeboten werden.

Genetische Erkrankungen können auch erst im Erwachsenenalter auftreten. Neben der Konfrontation mit einem Krankheitsbild kann es jedoch auch andere Gründe für eine genetische Beratung und Testung geben. Hierbei seien insbesondere Paare mit Kinderwunsch angeführt, deren Wunsch auf Schwangerschaft aus unbekanntem Gründen bzw. aufgrund häufiger Fehlgeburten unklarer Ursache bisher unerfüllt blieb.

Die Detektion von Keimbahnvariationen kann auch ganz allgemein wichtig sein, z.B. im Rahmen der richtigen Dosierung eines Medikaments (Pharmakogenetik), da Menschen unterschiedlich rasch Medikamente abbauen können.

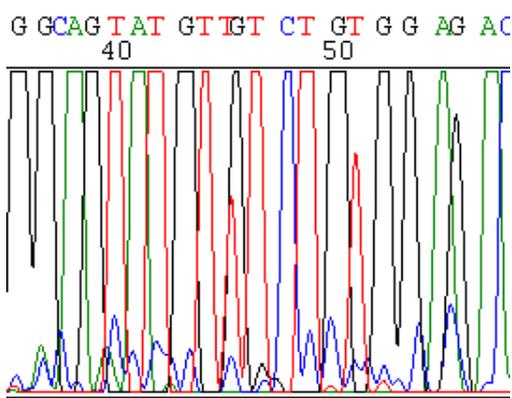
Ganz allgemein kann festgehalten werden, dass – je genauer die klinische Fragestellung ist – die genetische Diagnostik einfacher ist als in den Fällen, in denen die klinische Situation/Krankheitsbild unklar ist. Für letztere Fälle können genomweite Analysemöglichkeiten einen entscheidenden Vorteil für das Patientenmanagement bringen.

Zusammenfassung:

Es soll abschließend für diesen Abschnitt betont werden, dass es keine Norm für unser Genom gibt. Jeder Mensch unterscheidet sich sowohl in der Gendosis für einzelne DNA-Abschnitte als auch in der Genomsequenz. Diese Schwankungen sind dafür mitverantwortlich, dass wir Menschen uns voneinander unterscheiden. Entsprechend schwer kann es daher auch für genomweite Analysen sein, aus der Vielzahl von Normvarianten die wenigen Mutationen zu finden, die für uns krankheitsrelevant sind. Die Mutationen können auch teilweise schwer interpretierbar sein hinsichtlich der Pathogenität und Abschätzung des Krankheitsverlaufs.

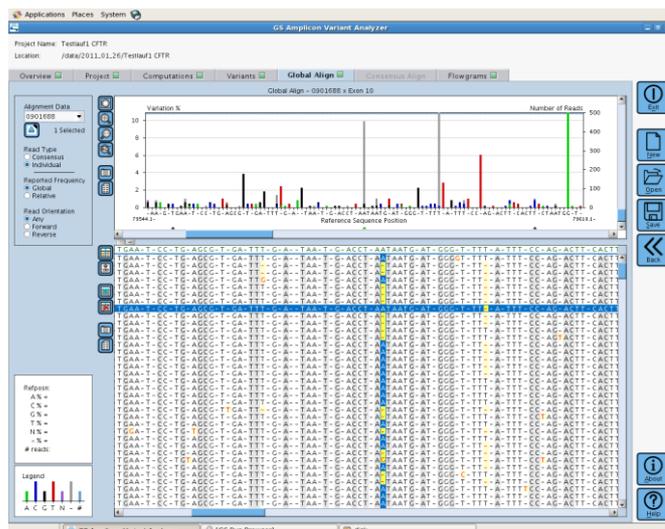
Vorstellung der Techniken und ihre möglichen Konsequenzen für die Routine

Genomsequenzierung – Traditionelle vs neue Technologie: Ein wesentlicher Unterschied



Traditionelle molekulargenetische Sequenzierungstechniken haben häufig ihren Ursprung darin, dass Sie gezielt einen klar definierten, in Relation zum Gesamtgenom sehr kleinen Genomabschnitt (zumeist ein Gen) analysieren. Häufig steht hierbei eine Vervielfachung des Genomabschnittes mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion am Anfang. Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion verlangt, dass Startsequenzen (sogenannte Primer) an den zu untersuchenden DNA-Abschnitt angelagert werden, die als Ausgangspunkt für eine gezielte DNA-Vervielfältigung (Amplifikation)

dienen. Es ist somit notwendig, dass die Basenabfolge der zu untersuchenden Zielsequenz bekannt ist; entsprechend müssen die Primer im Labor für die Untersuchung hergestellt werden. **Anders ausgedrückt, man muss wissen, was man analysieren will, bevor man die Untersuchung startet, und ist in der Analyse zwangsläufig darauf beschränkt.** Nach erfolgter Amplifikation werden in weiterer Folge die einzelnen Bausteine (sogenannte Nukleotide), die schlussendlich die Information für das Genprodukt liefern, mittels Kapillarsequenzierung analysiert.



Ein wesentlicher Unterschied der **neuen Hochdurchsatztechnologien** besteht darin, dass diese neuen Technologien **ungerichtet sequenzieren** können. Somit kann zum Beispiel das Genom einer völlig unbekanntes Spezies sequenziert werden. Die DNA-Sequenzen, die der Sequenzierreaktion angeboten werden, werden komplett ausgelesen. Auf den Menschen bezogen bedeutet dies, da üblicherweise im Patientenroutinebetrieb die gesamte genomische DNA isoliert wird, dass das Gesamtgenom sequenziert werden kann und wird. Aufgrund der

derzeitigen Kosten ist es für viele Anwendungen häufig üblich, dass bestimmte Regionen aus dem Gesamtgenom angereichert werden, und diese – aufgrund der relativen Anreicherung – bevorzugt ausgelesen werden. Zur Zeit wird vornehmlich eine Exomanreicherung – d.h. die kodierenden Bereiche aller Gene - durchgeführt. Eine Anreicherung ist jedoch nicht als absolut zu betrachten, das heißt, dass auch das restliche Genom (wenn auch in geringerer Lesedichte) mit ausgelesen wird. Derzeit werden Anreicherungen häufig deswegen durchgeführt, weil die

Kapazität einiger Plattformen noch nicht den notwendigen Durchsatz für Genomsequenzierungen aufweisen bzw. die Reagenzienlaufkosten für eine Genomsequenzierung im Vergleich zu einer Exomsequenzierung deutlich höher sind. Aufgrund des starken Preisverfalls und der Technologieweiterentwicklung ist jedoch davon auszugehen, dass die Exomsequenzierung in naher Zukunft durch die komplette Genomsequenzierung ersetzt werden wird.

Zusammenfassung:

Eine Hochdurchsatzsequenzierung erlaubt die Beantwortung bisher nicht möglicher Fragestellungen und hat somit einen direkten Einfluss auf die Patient/Ratsuchenden-Arzt Interaktion.

Das Funktionsprinzip der neuen Technologien

Präambel:

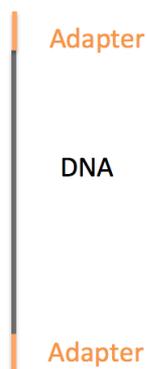
Vorausschickend muss festgestellt werden, dass bereits heute eine Vielzahl unterschiedlicher Techniken verfügbar sind. Es ist auch absehbar, dass die Technologieweiterentwicklung noch lange nicht abgeschlossen ist und es aus Sicht des Gutachters auch nicht richtig wäre, hier Prognosen abzugeben. Unabhängig davon kann man jedoch feststellen, dass eine Vielzahl der Technologien primär darauf abzielt, schneller, billiger und genauer eine komplette Genomsequenzierung anzubieten. Da bereits jedoch aus heutiger Sicht eine individuelle Genomsequenzierung realistisch ist, erscheint es dem Gutachter nicht so wesentlich, hier alle Technologien bis in das letzte Detail zu erklären. Vielmehr wird in einem ersten Abschnitt das grundlegende Prinzip des Marktführers detaillierter erklärt und im zweiten Abschnitt eine größere Übersicht über weitere Anbieter dargelegt. Solange das obengenannte Ziel - nämlich schneller, genauer und billiger eine Genomsequenzierung anzubieten - das gleiche bleibt, dürfte es nach Einschätzung des Gutachters für den Gesetzgeber unerheblich sein, welche Techniken zum Einsatz kommen. Die technische Weiterentwicklung entsprechend oben genanntem Ziel dürfte sich eher in der Anwendungsfrequenz auswirken. Falls sich jedoch durch technische Neuerungen die inhaltlichen Möglichkeiten/Fragestellungen zukünftig erweitern würden, wäre aus Sicht des Gutachters eine Neubewertung erwägenswert.

Sequenzierplattform eines Marktführers (Illumina):

Es werden 4 Hauptarbeitsschritte definiert:

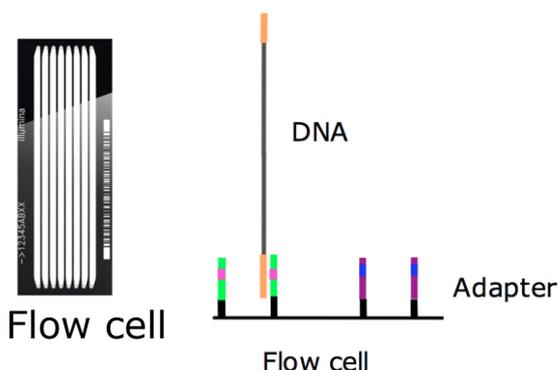
- Die Präparierung der DNA-Bibliotheken
- Die Generierung von Klustern
- Die eigentliche Sequenzierung
- Die Datenanalyse

Die Präparierung der DNA-Bibliotheken:



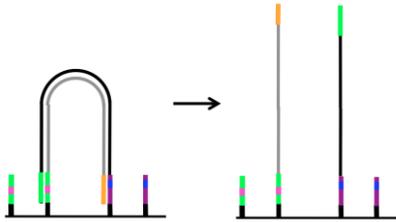
Prinzipiell können für unterschiedliche Applikationen unterschiedliche Ausgangsmaterialien verwendet werden. Im Zusammenhang mit dem grundlegenden Thema für das Gutachten wird als Ausgangsmaterial die genomische DNA angenommen, wobei es naturgemäß für die Technologie irrelevant ist, ob es sich hierbei um DNA aus Pränatalmaterial und Postnatalmaterial (Keimbahnmutationen) oder erworbene Tumormutationen handelt. Die DNA wird zuerst fragmentiert, d.h. die langen Doppelstränge werden in relativ kleine, doppelsträngige DNA-Fragmente von ca. 200 Basenpaaren zerlegt. In weiterer Folge werden die Enden der DNA-Fragmente modifiziert, d.h. es werden an beiden Seiten Adapter angelagert, die für die weiteren Reaktionen notwendig sind.

Die Generierung von Klustern:



Initiale Verlängerung/Anlagerung: Im ersten Schritt muss zuerst die vorpräparierte DNA an eine feste Vorlage angelagert werden. An dieser Vorlage, die bis zu einem gewissen Maßen äußerlich einem Objektträger ähnelt und „Flow cell“ genannt wird, sind bereits Adaptern vorgefertigt, an die sich die vorpräparierte DNA anlagern kann.

Der angelagerte DNA-Strang dient als Vorlage für dessen Nachbildung. Danach wird die ursprüngliche Vorlage durch Denaturierung gelöst und es liegt nun eine immobilisierte Kopie liegt an der Flow cell.

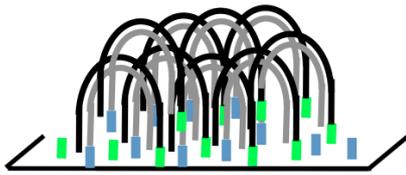


Brückenamplifikation:

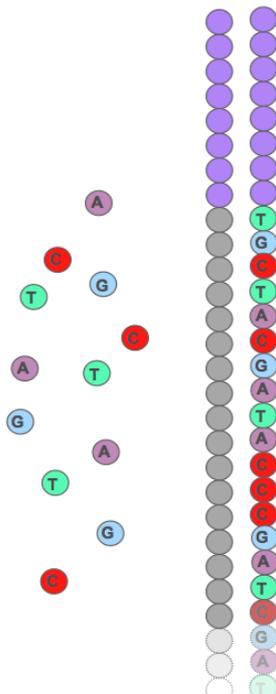
Der gebundene einzelsträngige DNA-Strang dient nun als Vorlage für weitere Amplifikationen. Hierbei wird der einzelsträngige DNA-Strang über das freie Ende an einen neuen Adaptor gebunden. In weiterer Folge wird nach dem bekannten Prinzip aus dem einzelsträngigen DNA-Strang eine

Kopie erstellt, es entsteht somit eine doppelsträngige DNA. Die doppelsträngige DNA wird wiederum durch einen Denaturierungsschritt gelöst. Somit sind aus dem ursprünglichen einen

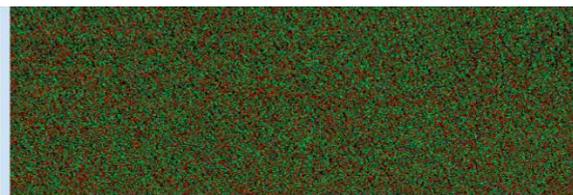
Einzelstrang zwei Einzelstränge entstanden, es hat somit eine Verdoppelung stattgefunden. Dieser Prozess wird mehrfach wiederholt, es kommt somit zu einer Amplifizierung. Nach Abschluss der Brückenamplifikation sind weitere modifizierende Schritte (Linearisierung, Blocken, Primeranlagerung) notwendig, bevor die eigentliche Sequenzierung beginnen kann.



Sequenzierung:



Die eigentliche Sequenzierreaktion ist vom Verständnis herkömmlichen Techniken ähnlich. Im Prinzip werden die vier DNA-Bausteine den fertig vorbereiteten DNA-Einzelsträngen in vier unterschiedlichen Farben angeboten. Entsprechend der Basenabfolge werden die unterschiedlich leuchtenden Nukleotide eingebaut. Jeder Nukleotideinbau entspricht einem Zyklus, nach jedem Zyklus wird ein Foto gemacht und somit der neue eingebaute Farbstoff erkannt und die Information, welcher Baustein eingelagert wurde, gespeichert.



Das Prinzip mag für die Einzelreaktion sehr einfach erscheinen. Die Komplexität besteht unter anderem darin, dass eine extrem hohe Anzahl an Parallelreaktionen auf kleinstem Raum stattfindet und ausgelesen werden kann. So kann in einem Lauf derzeit die schwer vorstellbare Zahl von bis zu 600 Milliarden Basen sequenziert werden.

Zum Vergleich: Das menschliche Genom ist ungefähr 3 Milliarden Basen groß.

Datenverarbeitung:

Die Daten, die während eines 10-tägigen Laufes entstehen sind aus heutiger IT-Sicht sehr groß. Man sollte sich vergegenwärtigen, dass die Rohdaten gewöhnliche digitalisierte Fotos (tif Bilder) sind. Die Bilddaten, die hierbei während eines Laufes entstehen, betragen über 60 TB, was kaum administrierbar ist. Daher müssen die Bilder bereits während des Laufes in Sequenzinformationen umgerechnet werden. Über mehrere Zwischenschritte werden die Sequenzfolgen errechnet. Die Milliarden Puzzleteile müssen weiters zu einer Gesamtsequenz zusammengefügt werden. Die zusammengefügt Daten betragen dann ungefähr 3TB. Mit diesen Daten beginnt hernach die eigentliche Arbeit, nämlich die Suche nach relevanten Sequenzänderungen entsprechend der Fragestellung. Da eine langfristige Speicherung der EDV-Daten derzeit teurer erscheint als eine nochmalige Sequenzierung, werden nach Abschluss von Forschungsprojekten oftmals die Laufdaten verworfen und lediglich die DNA archiviert. Es wird hierbei häufig argumentiert, dass ja bei asservierter DNA das Laborexperiment jederzeit wiederholt werden kann. Auf die Problematik der Datenanalyse wird später eingegangen.

Zusammenfassung:

Aufgrund der rasanten technologischen Entwicklung ist davon auszugehen, dass komplette Genomsequenzierungen in absehbarer Zeit zu geringen Kosten und relativ geringem Zeitaufwand problemlos auch bei einer großen Zahl von Personen machbar sein werden.

Gibt es auch andere Technologien?

Zweite Generation:

Die oben beschriebene Technologie entspricht einer sogenannten „Zweiten Generation“ der Hochdurchsatzsequenzierung (Anmerkung: Als „Erste Generation“ bezeichnet man üblicherweise die konventionelle Sanger Sequenzierung).

Ein wesentliches Merkmal der zweiten Generation ist, dass kleine amplifizierte DNA-Fragmente räumlich getrennt auf einem festen Träger angelagert und ausgelesen werden. Bei den Techniken der zweiten Generation ist es noch immer wichtig, dass es während des Laborprotokolls zu einem Amplifikationsschritt, d.h. Vervielfachung der DNA kommt. Hintergrund hierfür ist, dass die meisten Aufnahmesysteme (CCD Kameras) für Fluoreszenzfarbstoffe nicht die Möglichkeit haben, einzelne Fluoreszenzmoleküle zu detektieren. Die beiden häufigsten Amplifikationsmethoden sind die Emulsions-PCR bzw. die Festphasenamplifikation. Entsprechend der unterschiedlichen Technologien können ungefähr bis zu 500 Basenpaar lange Fragmente ausgelesen werden. Die am meisten verwendeten Plattformen sind derzeit Illumina, Roche/454, und Applied Biosystems/Solid.

Dritte Generation:

Die angesprochenen Amplifikationsschritte, die für die zweite Generation notwendig sind, haben auch Nachteile. Hierbei sei besonders (a) die Gefahr eines falschen Baseneinbaus und (b) das ungleiche Auslesen unterschiedlicher Genomregionen erwähnt. Für (a) wäre eine Konsequenz, dass schlussendlich eine falsche Sequenz ausgelesen werden könnte und somit z.B. fälschlich eine Mutation angenommen wird. Für (b) gilt, dass bestimmte Regionen aufgrund komplexer Strukturen in geringerem Maße amplifiziert und somit wenig bis gar nicht ausgelesen werden d.h. Genomabschnitte könnten einfach fehlen. Deshalb wird die Entwicklung sogenannter Plattformen der dritten Generation angestrebt. Im Prinzip handelt es sich hierbei um echte Einzelmolekül-Sequenzierungstechniken. Hierbei gibt es unterschiedliche Ansätze, wobei zum Teil die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der einzelnen Basen, wie zum Beispiel elektrische Leitung oder Wellenlänge ausgenutzt werden. Die hierbei vermutlich am besten ausgereifte Plattform ist die Ion Torrent Sequenzier Technologie, bei der eine direkte Verbindung zwischen chemischer und digitaler Information mittels Halbleitertechnologie hergestellt wird. Weitere Systeme sind Einzelmolekül-Echtzeit Sequenzierer (Pacific Biosciences), Heliscope Einzelmolekül Sequenzierer (Helicos), Nanopore Sequenzierung, VisiGen Einzelmolekül Sequenzierer (VisiGen) Biotechnologies und eine sogenannte Multiplex Polony Technologie. Mehrere dieser Systeme sind noch in Entwicklung, einige sind jedoch bereits kommerziell erhältlich. Die Komplexität und Unterschiedlichkeit der Technologien dürfte für den Nicht-Experten überfordernd und zu umfangreich sein und wird daher nicht näher erläutert. Außerdem ist nicht mit Sicherheit vorhersehbar, ob sich die einzelnen, sehr jungen Techniken durchsetzen werden beziehungsweise noch neuere Technologien diese wieder ersetzen werden.

Zusammenfassung:

Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Technologien, die für eine Genomsequenzierung entwickelt werden. Aus den Technologien der 3. Generation ergeben sich neue Möglichkeiten; hierzu zählen eine mögliche einfachere Bedienung, raschere und genauere Datenaquisition, die Möglichkeit weiterer Leselängen sowie die Echtzeitanalyse von Einzelmolekülen.

Literatur: Zweite Generation – allgemeine Übersicht

Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31-46. Epub 2009 Dec 8.

Zhao J, Grant SF. Advances in whole genome sequencing technology. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011 Feb 1;12(2):293-305.

Nowrousian M. Next-generation sequencing techniques for eukaryotic microorganisms: sequencing-based solutions to biological problems. *Eukaryot Cell.* 2010 Sep;9(9):1300-10. Epub 2010 Jul 2.

Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J Genet Genomics.* 2011 Mar 20;38(3):95-109. Epub 2011 Mar 15.

Horner DS, Pavesi G, Castrignanò T, De Meo PD, Liuni S, Sammeth M, Picardi E, Pesole G. Bioinformatics approaches for genomics and post genomics applications of next-generation sequencing. *Brief Bioinform.* 2010 Mar;11(2):181-97. Epub 2009 Oct 27.

Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:387-402.

Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 2008 Mar;24(3):133-41. Epub 2008 Feb 11.

Mardis ER. The \$1,000 genome, the \$100,000 analysis? *Genome Med.* 2010 Nov 26;2(11):84.

Mardis ER. New strategies and emerging technologies for massively parallel sequencing: applications in medical research. *Genome Med.* 2009 Apr 17;1(4):40.

Morozova O, Hirst M, Marra MA. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:135-51.

Nyrén P. The history of pyrosequencing. *Methods Mol Biol.* 2007;373:1-14.

Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev.* 2011 Nov;32(4):177-95.

<http://www.illumina.com/>

<http://my454.com/>

<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing.html>

Literatur: Dritte Generation

Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet.* 2010 Oct 15;19(R2):R227-40. Epub 2010 Sep 21.

Su Z, Ning B, Fang H, Hong H, Perkins R, Tong W, Shi L. Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011 Apr;11(3):333-43.

Zhao J, Grant SF. Advances in whole genome sequencing technology. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Feb 1;12(2):293-305.

Braslavsky I, Hebert B, Kartalov E, Quake SR. Sequence information can be obtained from single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3960-4. Epub 2003 Mar 21.

Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet*. 2011 Feb;12(2):87-98. Epub 2010 Dec 30.

Ozsolak F, Milos PM. Transcriptome profiling using single-molecule direct RNA sequencing. *Methods Mol Biol*. 2011;733:51-61.

Levene MJ, Korlach J, Turner SW, Foquet M, Craighead HG, Webb WW. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science*. 2003 Jan 31;299(5607):682-6.

Eid J, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*. 2009 Jan 2;323(5910):133-8. Epub 2008 Nov 20.

Greenleaf WJ, Block SM. Single-molecule, motion-based DNA sequencing using RNA polymerase. *Science*. 2006 Aug 11;313(5788):801.

Astier Y, Braha O, Bayley H. Toward single molecule DNA sequencing: direct identification of ribonucleoside and deoxyribonucleoside 5'-monophosphates by using an engineered protein nanopore equipped with a molecular adapter. *J Am Chem Soc*. 2006 Feb 8;128(5):1705-10.

Selvin PR. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat Struct Biol*. 2000 Sep;7(9):730-4.

Mitra RD, Butty VL, Shendure J, Williams BR, Housman DE, Church GM. Digital genotyping and haplotyping with polymerase colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5926-31. Epub 2003 May 2.

Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, Wang MD, Zhang K, Mitra RD, Church GM. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science*. 2005 Sep 9;309(5741):1728-32. Epub 2005 Aug 4.

Kedes L, Liu E, Jongeneel CV, Sutton G. Judging the Archon Genomics X PRIZE for whole human genome sequencing. *Nat Genet*. 2011 Mar;43(3):175.

Mardis ER. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*. 2011 Feb 10;470(7333):198-203.

www.pacificbiosciences.com

www.personalgenomes.org

<http://www.iontorrent.com/>

Kann eine Genomsequenzierung alle Fragestellungen beantworten?

In diesem Zusammenhang muss man sich vergegenwärtigen, dass unterschiedliche Mechanismen zu krankmachenden Veränderung führen können. Die Durchsequenzierung des menschlichen Genoms mit der Technologie der zweiten Generation kann aus jetziger Sicht hierbei nicht ein kompletter Ersatz aller bisherigen Techniken, die in der Routinediagnostik eingesetzt werden, sein. Dieser Punkt wird vom Gutachter deswegen betont, weil der Gutachter die Erfahrung gemacht hat, dass Laien häufig der falschen Ansicht sind, dass eine Sequenzierung des Genoms alle Fragen beantwortet. Es ist jedoch festzuhalten, dass eine Genomsequenzierung der zweiten Generation bereits jetzt eine Vielzahl konventioneller Techniken ersetzen kann und das Anwendungsgebiet zukünftig möglicherweise auch ausgeweitet wird. In diesem Zusammenhang sei die große Gruppe der chromosomalen Erkrankungen erwähnt. Unter chromosomalen Erkrankungen versteht man die krankmachende Veränderungen des Genoms im Sinne von Zugewinnen oder Verlusten chromosomaler Abschnitte/ganzer Chromosomen (z.B. Trisomie 21) beziehungsweise strukturelle Veränderungen innerhalb desselben oder zwischen Chromosomen. Derzeit kann die zweite Sequenziergeneration diese Fragestellung nicht mit der gleichen Sicherheit beantworten wie andere Techniken. Es ist jedoch vorstellbar, dass es auch hier zukünftig eine Anwendungserweiterung geben wird. Dies wird vor allem von einer verbesserten Bioinformatik, einer gleichmäßigeren Sequenzierung über das gesamte Genom und einer verbesserten Leselängen abhängen, um chromosomale Bruchereignisse besser erkennen zu können.

Zusammenfassung:

Durchsequenzierungen können viele, jedoch bei weitem nicht alle Fragestellungen beantworten. Es ist derzeit nicht absehbar, dass durch eine Genomsequenzierung alle anderen Technologien obsolet werden.

Ist die Genomsequenzierung für den Einzelnen heute schon realistisch?

Die Antwort ist mit einem klaren Ja zu beantworten. Während eine Genomsequenzierung derzeit noch als relativ kosten- und ressourcenintensiv angesehen wird, hält die Technologie der zweiten Generation bereits immer stärkeren Einzug in die Routinelabors. Hierbei wird die Technologie häufig genutzt, um einzelne Gene, größere Gengruppen, beziehungsweise das gesamte Exom (die kodierenden Bereiche aller Gene) zu analysieren. Nach Einschätzung vieler Experten sind wir gerade in einer Phase des Umbruchs. Dies spiegelt sich auch darin wider, dass Sequenziergeräte der ersten Generation durch die der zweiten Generation zunehmend vom Markt verdrängt werden beziehungsweise es bereits zu Absatzschwierigkeiten für Geräte der konventionellen Sequenzierung der ersten Generation kommt. Bevor ein Routinelabor technologisch umstellt, müssen in der Regel eine Reihe von Faktoren gegeben sein. Hierzu zählen unter anderem die technische Machbarkeit, die Genauigkeit/Reproduzierbarkeit, die Vereinfachung der Laborprotokolle und die Kosten. Prinzipiell sind die notwendigen Voraussetzungen für große Labors bereits gegeben, auf zwei Punkte sei hier noch näher eingegangen:

Genauigkeit: Es wurde bereits zuvor auf technische Probleme hingewiesen. Es sei hier betont, dass jede Technologie Schwächen aufweist und auch Fehler passieren können. Für die Sequenzierertechnologie der zweiten Generation gilt wie auch für andere Technologien, dass es Qualitätskriterien gibt, die einzuhalten sind. Die Genauigkeit bei der zweiten Generation ist im Prinzip viel höher als bei der konventionellen Sequenzierung der ersten Generation. Das Problem liegt vielmehr im hohen Durchsatz. Wenn man zum Beispiel eine Genauigkeit von 99,9% annimmt, wäre dies für das konventionelle Sequenzieren der ersten Generation ausreichend, wenn man bedenkt dass hier lediglich sehr wenige Sequenzen ausgelesen werden. Bei Hochdurchsatzsequenzierungen, im Zuge derer 2x3 Milliarden Basen sequenziert werden, bedeutet eine Fehlerrate von 0,1% noch immer eine hohe Fehlerrate. Ein Weg um die Fehlerrate möglichst gering zu halten, ist die sogenannte Coverage, d.h. man sequenziert ein Exom z.B. nicht 2x sondern 100x. dadurch wird die Zahl an zufälligen Fehlern minimiert. Im Prinzip liegt es in der Verantwortlichkeit des Labors die Genauigkeit des Systems entsprechend der vorliegenden Publikationen und Evaluierungen im eigenen Labor zu definieren und gegebenenfalls durch eine zweite, unabhängige Methode zu bestätigen.

Kosten: Dies ist aus Sicht des Gutachters ein wesentlicher Punkt. Bereits jetzt liegen die Reagenzienkosten für das gesamte Exom bei ungefähr € 500,- für ein Großlabor mit hohem Durchsatz. Kommerziell werden Exomsequenzierungen bereits um USD 1000,- angeboten. Somit sind – insbesondere wenn man die Arbeitszeit noch mit einberechnet – die Kosten für ein Exom (alle Exone aller Gene) mittels Sequenzierertechnologie der zweiten Generation billiger als alle Exone eines einzigen größeren Gens mit Sequenzierertechnologie der ersten Generation. Da anzunehmen ist, dass die Preise weiterhin fallen werden, ist davon auszugehen, dass zukünftig die Exomsequenzierung durch die Genomsequenzierung verdrängt werden wird.

Zusammenfassung:

Die neue Technologie ist genau, Ergebnisse werden möglicherweise aber auch künftig durch unabhängige Methoden bestätigt werden müssen. Der Preisverfall ist dramatisch und macht bei Preisen von jetzt bereits unter €1000,- **die Sequenzierung aller Exone aller Gene billiger als die Sequenzierung aller Exone eines Gens** mittels konventioneller Techniken. Es werden daher vermutlich zwangsläufig die Hochdurchsatztechnologien das konventionelle Sequenzieren vom Markt verdrängen.

Ist eine genomweite Analyse neu in der Routinediagnostik?

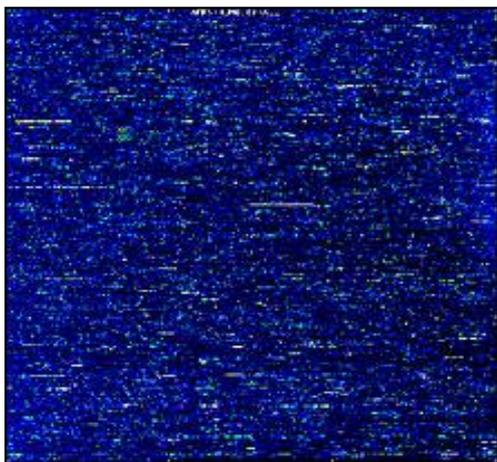
Man sollte sich bewusst machen, dass eine genomweite Analyse in der Routine bereits seit Jahrzehnten üblich ist (siehe unten). Der Unterschied ist jedoch, dass die Genauigkeit, mit der das Genom analysiert wird, rasant zugenommen hat. Bisher sind genomweite Analysen für chromosomale Erkrankungen üblich, wobei auch hier die Messgenauigkeit rasant zunimmt.

Chromosomale Erkrankungen-konventionelle Zytogenetik:

Die konventionelle Zytogenetik, dies bedeutet die Analyse aller Chromosomen in der Lichtmikroskopie, ist schon seit Jahrzehnten eine unumstrittene Standardtechnik, um chromosomale Erkrankungen zu detektieren. Hierbei werden alle Chromosomen simultan auf Veränderungen analysiert. Auch wenn die Fragestellung mit Verdacht auf eine chromosomale Erkrankung relativ eng definiert werden kann (z.B. Verdacht auf Trisomie 21), kann die Untersuchung auch ein völlig anderes Ergebnis, d.h. eine chromosomale Veränderung auf einem anderen Chromosom hervorbringen. Ein wichtiger Limitationsfaktor bei der lichtmikroskopischen konventionellen Zytogenetik ist, dass Zugewinne/Verluste unter 11 Millionen Basenpaaren üblicherweise unterhalb der Auflösungsgrenze liegen und somit nicht erfassbar sind.

Chromosomale Erkrankungen-Mikroarray-Untersuchungen (Array-CGH):

Aufgrund der erwähnten, relativ niedrigen Auflösungsgrenze von 11 Millionen Basenpaaren sind



sogenannte Mikrodeletionen nicht erfassbar. Bei Mikrodeletion handelt es sich um krankheitsauslösende sublichtmikroskopische Zugewinne und Verluste. In letzter Zeit setzen sich Microarray Techniken vermehrt durch bzw. ersetzen teilweise die konventionelle Zytogenetik. Vereinfacht gesprochen werden bei Microarrayanalysen DNA-Chips mit Millionen über das Genom verteilter Sonden verwendet, mittels derer das Genom auf Zugewinne und Verluste untersucht werden kann. Somit erzielt man eine Auflösung, die - falls gewünscht - alle Gene auf Zugewinne und Verluste abdecken kann. Der Einsatz

dieser Technologie kann für Erkrankte bereits zum Untersuchungsstandard an den Genetischen Zentren gezählt werden und wird durch die deutlich höhere Detektionsrate chromosomaler Erkrankungen gerechtfertigt. In manchen Situation kann der Einsatz der hochauflösenden Technik jedoch auch problematisch werden; hierzu zählt (a) die Aufdeckung genetischer Veränderungen unklarer Bedeutung und ohne die Möglichkeit der sicheren Voraussage über die klinische Relevanz oder (b) die Aufdeckung von Zufallsbefunden, wie beispielsweise krankheitsrelevanter genetischer Veränderungen bei Kindern, welche z.B. im Erwachsenenalter oder für die spätere Familienplanung bedeutsam sind.

Zusammenfassung:

Hochauflösende genomweite Untersuchungen sind bereits schon jetzt in der genetischen Routinediagnostik, vor allem im Rahmen von Microarray/Array-CGH-Untersuchungen zur Detektion von chromosomalen Zugewinnen und Verlusten, erfolgreich im Routineeinsatz. Der Einsatz hierbei zielt primär auf die Klärung bereits vorliegender Krankheitsbilder ab. Ein

wesentlicher Unterschied der Hochdurchsatzsequenzierungstechniken ist, dass hier vermehrt Veränderungen aufgedeckt werden können, die erst zu einem späteren Zeitpunkt im Erwachsenenalter oder für die eigene Familienplanung bedeutsam sein können.

Hochdurchsatzsequenzierungen – Analyse

Bereits zuvor wurde über die technischen Herausforderung bei der informatischen Verarbeitung berichtet. Nach Abschluss der informatischen Verarbeitung stellt die bioinformatische Bewertung der Ergebnisse eine große Herausforderung dar. Hierzu sei auf die ersten Ergebnisse des 1000 Genom-Projekts verwiesen. Man kann davon ausgehen, dass jeder Mensch im Vergleich zum jetzigen Referenzgenom ungefähr 10.000 Veränderungen aufweist, die potentiell zu einer Aminosäurenveränderung innerhalb eines Gens führen kann. Weiters hat sich gezeigt, dass unter den Mutationsarten, von denen man davon ausgehen kann, dass sie einen wesentlichen Einfluss auf die Bildung des Genprodukts haben, mit ungefähr 200 Insertionen/Deletionen, 80 Stoppmutationen, 40 Spleißmutationen und über 200 Mutation mit Leserahmenverschiebungen (die ebenfalls zu einem vorzeitigen Stopp führen) in jedem Menschen zu rechnen ist. Auf Gene umgerechnet bedeutet dies, dass bei jedem Menschen ungefähr 250-300 Gene einen vorzeitigen Kettenabbruch aufweisen. Wenn man diese Gene mit den Mutationsdatenbanken vergleicht, zeigt sich, dass jeder Mensch ungefähr 50-100 Varianten in Genen aufweist, die mit Krankheiten assoziiert sind. Da es sich jedoch primär um heterozygote Mutationen für rezessive Erkrankungen handelt, sind die Betroffenen nicht krank, sind aber Anlageträger. Dies bedeutet aber auch konsequenter Weise, dass sich ein Paar mit Kinderwunsch auf überlappende Mutationen (d.h. beide Eltern sind Anlageträger innerhalb desselben Gens) testen lassen könnten. Aufgrund des gerade erst beginnenden Zeitalters der Genomsequenzierung und der dadurch rasch steigenden Dateninformationen ist davon auszugehen, dass sich die Datenbanken massiv verbessern werden. Eine verbesserte Datenlage zu Genomvarianten wird sicherlich helfen, Polymorphismen ohne Krankheitswert von Mutationen mit gesichertem Krankheitswert abzugrenzen. Allerdings ist auch anzunehmen, dass eine Restunsicherheit immer bleiben wird, da Sequenzänderungen auch individuell auftreten.

Die entsprechende Datenanalyse ist eine der großen Herausforderungen der Hochdurchsatztechnologien. Man kann festhalten, dass die notwendigen Softwareanforderungen derzeit noch nicht befriedigend gelöst sind. Hierbei gilt unter anderem zu lösen, dass Auswertungen entsprechend rasch abwickelbar sind und die komplexen Daten auf eine zu verarbeitende und kommunizierbare Datenmenge reduziert werden können. In jedem Fall kann davon ausgegangen werden, dass im Vergleich zur konventionellen Sequenzierung eine höhere Expertise bei der Auswertung gefordert ist, um die Vielfalt an Veränderungen in der Vielzahl von unterschiedlichen Genen zu bewerten. Auch wenn unklar ist, ob und in welcher Form eine Kompletengenomanalyse möglich ist, so muss doch festgehalten werden, dass eine beschränkte Genomanalyse (z.B. im Rahmen einer medizinischen Fragestellung auf klar definierte Gene) relativ leicht umsetzbar sein sollte.

Zusammenfassung:

Die Analyse kann eine Vielzahl an Mutationen aufzeigen, die vorab nicht absehbar sind und Krankheitsbilder betreffen, die den Ratsuchenden unbekannt sind. Überdies könnte ein Paar mit Kinderwunsch auch eine Testung auf überlappende Anlageträgerschaft für eine autosomal-rezessive Erkrankung in Erwägung ziehen.

Hochdurchsatzsequenzierungen – Datenausblendung

Wie bereits vorher erwähnt ist es wahrscheinlich, dass es schon aus ökonomischen Gründen zukünftig sinnvoll ist, selbst für die Sequenzierung eines Gens eine Komplettssequenzierung durchzuführen. Somit stellt sich zwangsläufig die Frage, wie bei einem Untersuchungsauftrag für ein Gen die Datenanalyse so gestaltet werden kann, dass entsprechend dem Untersuchungsauftrag eine darauf beschränkte Analyse durchgeführt werden kann. Derzeit sind die verfügbaren Software-Lösungen primär an den Forschungsanforderungen orientiert. Der Gutachter hat bei einer Firma, die bereits Software für Hochdurchsatztechnologien kommerziell anbietet, angefragt, inwieweit diese für die Routine anpassbar wäre. Ich möchte hierbei die schriftliche Antwort zur Kenntnis bringen, wobei ich keine Änderungen am Text (mit Ausnahme der Anonymisierung) vorgenommen habe:

Sehr geehrter Herr Prof. Streubel,

ich nehme Bezug auf unsere vorangegangenen Gespräche und unser heutiges Telefonat zum Thema Einsatz der Next Generation Sequencing Technologie im Bereich der klinischen Anwendungen.

Nach intensiver Rücksprache mit unseren Spezialisten und unserer Entwicklungsgruppe „Customization“ möchte ich Ihnen mitteilen, dass die bestehenden Next Generation Sequencing Data Analysis Plattformen von XXXXX

- XXXX Genomics Workbench (front-end client solution)
- XXXX Genomics Server (state-of-the-art client/server solution)

grundsätzlich alle geforderten Applikationen und Funktionalitäten bereitstellen und die von Ihnen genannten besondere Erfordernisse für klinisch-diagnostische Anwendungen können mit vertretbarem Aufwand, zeitnahe und sicher implementiert werden.

Unser Konzept beinhaltet folgende Vorschläge :

1. Strikte Trennung zwischen dem klinisch-diagnostischen Bereich und dem Forschungsbereich bezüglich der Analysesysteme (des kompletten Workflows incl. der verwendeten Hardware und Software)
2. Customization – d.h. Adaptierung der bestehenden XXXXX Next Generation Sequencing data analysis software gemäß Ihrer Vorgaben :
 - a. Systematische detaillierte Protokollierung & Dokumentation aller Analyseschritte und Parameter (wer hat wann was mit welchen Proben gemacht? Ist bereits jetzt schon möglich.)
 - b. Einschränkung der Software auf definierte, zugelassene Funktionen, dauerhafte und sichere Blockierung sämtlicher übrigen Funktionalitäten (Anpassungen erforderlich)
 - c. Einschränkung auf definierte, zugelassene Referenzsequenzen (Maskierung und Inaktivierung aller übrigen Bereiche der Referenzsequenz), in Abhängigkeit von definierten, abgegrenzten Untersuchungsbereichen (spezifisch zugeschnitten auf die unterschiedlichen Zielbereiche) (Anpassungen erforderlich)
 - d. Zentrale Steuerung und Implementierung jeglicher Änderungen (durch eigens dafür autorisierte Personen bzw. Stellen) – das ist möglich

Aus unserer Sicht wäre es sinnvoll, die gegenwärtig existierende XXXXX Genomics Workbench jetzt mit entsprechenden klinischen Datensätzen von Ihnen mit Unterstützung durch unsere

Spezialisten zu testen und zu evaluieren um daraus die notwendigen Anpassungen exakt zu bestimmen.....

Zusammenfassung:

Technisch scheint es möglich, die Datenanalyse auf definierte Bereiche zu beschränken, abhängig von der Fragestellung beziehungsweise von der Berechtigung entsprechend der Laborzulassung durch das Bundesministerium. Allerdings sei auch festgehalten, dass es dem Gutachter unklar ist, ob durch den Gesetzgeber hinreichend geklärt ist, ob und wenn ja unter welchen Bedingungen ein Ausblenden von Teilergebnissen überhaupt zulässig ist.

Hochdurchsatzsequenzierungen – Datenspeicherung

Datenumfang:

Wie bereits besprochen ist die Datenmenge, die bei einer Exom-/Genomsequenzierung anfällt, sehr groß. Der Gutachter kann schwer abschätzen, inwieweit sich durch IT-Fortschritte die Standardspeicherkapazitäten ändern, und geht sicherheitshalber von der Variante aus, dass die großen Datenmengen auch zukünftig eine Herausforderung darstellen. Im Rahmen der Forschung erwägen daher viele Gruppen, die gespeicherten Daten nach Abschluss des Projekts zu löschen. Die Argumentation geht in die Richtung, dass die Lagerung der DNA billiger ist als die Lagerung der Daten und daher im Bedarfsfall das Experiment wiederholt werden soll. Im Prinzip wird auch im diagnostischen Betrieb die DNA asserviert und es sollte daher das Experiment wiederholbar sein. Allerdings stellt sich aus Sicht des Gutachters die Frage, inwieweit eine lückenlose Dokumentation des gesamten Prozesses, die zur Befunderstellung geführt hat, notwendig ist.

Permanente, eventuell zentrale Datenspeicherung:

Zu dem Thema Datenspeicherung ergeben sich ebenfalls mehrere Fragestellungen. Man muss hierzu bedenken, dass möglicherweise der Ratsuchende zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Lebens unterschiedliche Fragestellungen an sein Genom haben könnte und somit auch das Recht haben möchte, darauf – sei es selbst oder über eine ärztliche/genetische Beratung – Zugriff zu haben. Fiktiv seien mehrere Stationen im Leben eines Menschen angenommen, nämlich Verdacht auf eine Erbkrankheit in der Kindheit, eine fragliche Anlageträgerschaft im Rahmen der Familienplanung, eine fragliche Medikamentenunverträglichkeit vor einer Therapie und ein Genomvergleich mit dem Tumorgenom im Rahmen einer Tumorerkrankung. Aus Sicht des Gutachters impliziert dieses durchaus realistische Szenario mehrere zu beantwortende Fragen, wie das Recht des Ratsuchenden auf lebenslangen Zugriff auf sein Genom, die zentrale Registrierung/Speicherung der Daten, die gezielte Abfrage von Teilen des Genoms entsprechend der Fragestellung, sowie Datenschutz und Verwaltung von Zugriffsrechten bei Langzeitspeicherung.

Zusammenfassung:

Eine lebenslange Datenspeicherung des Gesamtgenoms könnte aus medizinischer Sicht Sinn machen. Die Datenspeicherung kann sowohl technisch als auch aus Gründen des Datenschutzes eine große Herausforderung darstellen und erfordert klare Richtlinien.

Genomsequenzierung – nur die Keimbahn?

Der Gesetzgeber unterscheidet im Gentechnikgesetz klar zwischen Keimbahnmutationen und somatischen Mutationen/erworbenen Mutationen. Inhaltlich ändert sich durch die neuen Sequenzieretechnologien nichts an diesem Prinzip. Nichtsdestotrotz muss in Erwägung gezogen werden, dass aus technischen Gründen eine zunehmende Überlappung erfolgen wird. Man muss sich hierzu vergegenwärtigen, dass im Rahmen der Tumordiagnostik, Prognoseeinschätzung und Therapiewahl bereits jetzt genomische Daten im Sinne einer Mutationsdetektion in tumorrelevanten Genen in die Patientenbetreuung einfließen. Es ist abzusehen, dass diese Entwicklung zunehmen wird, weil die Pharmaforschung in die Entwicklung neuer Therapieansätze, die auf tumorrelevante, mutierte Pathways abzielt, investiert und bereits wichtige Erfolge aufweist. Folgerichtig ist zu erwarten, dass auch im Bereich der genetischen Tumordiagnostik die neuen Sequenzieretechnologien, schon allein aus Kostengründen, Einzug halten werden. Somit ist klar, dass auch hierbei neben den erworbenen, tumorspezifischen Mutationen auch Keimbahnmutationen detektiert werden. Überdies ist es auch für die Routine zukünftig – so wie gerade derzeit in der Forschung häufig eingesetzt – möglich, dass schon allein aus Gründen der Übersichtlichkeit und Diagnosesicherheit zu dem Tumorgenom auch parallel das angeborene Genom desselben Tumorpatienten sequenziert wird, um die erworbenen Mutationen mit Sicherheit von Keimbahnmutationen zu unterscheiden. In diesem Zusammenhang sei auch nochmals erwähnt, dass die Keimbahninformationen des Genoms auch für die Therapiewahl zunehmend verstärkt relevant werden können (Pharmakogenetik).

Zusammenfassung:

Auch für genomweite somatische Mutationsanalyse kann im Rahmen der Analyse eine Abgrenzung zu angeborenen Mutationen schwierig sein und bedarf vermutlich einer Erwägung durch den Gesetzgeber, ob hier gesetzliche Rahmenbedingungen nötig sind.

Der derzeitige Status quo in der Genetischen Beratung und eine Übersicht, wie sich die Situation ändern könnte

Die Genetische Beratung:

Im Prinzip geht vor Veranlassung einer genetischen Analyse ein Beratungsgespräch entsprechend Gentechnikgesetz voraus. Hierbei werden die Ziele für eine allfällige Laboruntersuchung definiert und in weiterer Folge in Auftrag gegeben.

Die Laboruntersuchung:

Das Genetische Labor führt entsprechend dem Auftrag/der Fragestellung die Untersuchung durch. Ziel des Labors muss sein, die Fragestellung umfassend zu beantworten, wobei die anzuwendenden Untersuchungstechniken primär in der Verantwortlichkeit des Labors liegen. Die Erfüllung der entsprechenden Qualitätskriterien darf vorausgesetzt werden. Entsprechend der Fragestellung können eine oder mehrere Techniken zur Anwendung kommen, um die Fragestellung ausreichend zu beantworten. Es ist davon auszugehen, dass ein Labor - neben der Einhaltung der entsprechenden Qualitätskriterien - daran interessiert ist, den Untersuchungsaufwand möglichst gering und die Laborkosten möglichst niedrig zu halten, sowie eine rasche zeitliche Verarbeitung und möglichst eine Vereinheitlichung der Laborprotokolle zu erreichen. Schlussendlich enden Laboruntersuchungen in einem Befund, der die angewandten Laboruntersuchungen und deren Resultat wiedergibt und die Interpretation der Ergebnisse entsprechend Fragestellung enthält.

Die Genetische Beratung/Befundbesprechung:

Im genetischen Beratungsgespräch kommt es zur Befundbesprechung mit den daraus resultierenden Konsequenzen für die Ratsuchenden. Die Inhalte der Beratungen werden in einem Beratungsbrief zusammengefasst.

Inwieweit könnte sich oben angeführtes Szenario durch neue Technologien ändern?

- Nach einer Probenentnahme (pränatal und postnatal) wird naturgemäß die gesamte genomische DNA isoliert. Entsprechend liegt die DNA des gesamten Genoms im Labor vor.
- Bisher war aufgrund des hohen technischen Aufwands eine detaillierte Analyse des Genoms nicht möglich. Die Fragestellung musste sich zwangsläufig auf gezielte Genabschnitte konzentrieren.
- Durch neue Technologien ist es möglich, genomweit mit hoher Auflösung zu analysieren. Dies beinhaltet unter anderem eine genaue Analyse auf Zugewinn und Verluste von Chromosomenabschnitten sowie Sequenzanalysen.
- Aufgrund des technischen Fortschrittes ist es vorstellbar, dass sich die Beratungssituation zwischen Arzt und Patient ändern wird. Hierbei könnte
 - (1) einerseits bei bestehender Krankheit mit unklarer genetischer Ursache eine erweiterte/genomweite Suche nach der krankheitsauslösenden genetischen Veränderung angeboten werden.
 - (2) Andererseits ist auch ohne bestehende Krankheit ein Testen auf Mutationen mit potentiell späterem Krankheitsbeginn sowie ein Testen auf mögliche Anlageträgerschaft für Erbkrankheiten möglich. Es sei hierbei betont, dass die Suche ungerichtet passieren könnte, d.h. es ist bei Beginn der Laboruntersuchung unklar, welche und wie viele potentiellen Krankheitsbilder eventuell gefunden werden.

Zusammenfassung:

Bisher war es üblich, dass beim Erstberatungsgespräch die Ziele für die genetische Untersuchung klar definiert waren, angepasst an die individuelle Situation der Ratsuchenden. Insofern gilt für die meisten Beratungen, dass die Inhalte der Befundbesprechung – entsprechend dem jeweiligen Untersuchungsergebnis – mit hoher Wahrscheinlichkeit bisher absehbar waren. Eine genomweite Untersuchung könnte jedoch implizieren, dass die Befundbesprechung im Rahmen einer genetischen Beratung eine deutlich komplexere Situation darstellt, weil die zu vermittelnden Inhalte (1) sehr/zu umfangreich sein können und (2) Inhalte umfassen können, die dem Ratsuchenden zum Zeitpunkt des Untersuchungsauftrags nicht bewusst waren. Auch würde eine statistische Auflistung (wie z.B. „wir haben bei Ihnen Mutationen in 89 Genen gefunden“) kaum einen Mehrwert für den Patienten darstellen und eher zu einer Verunsicherung führen.

Die grenzüberschreitenden Möglichkeiten bei Labortests

Bereits heute gibt es eine Reihe internationaler kommerzieller Anbieter für Genomsequenzierungen und dieser Trend wird sich vermutlich stark fortsetzen. Für eine Person ist es ein leichtes, sich eine Genomsequenzierung selbst zu organisieren. Schlussendlich muss man nur ein Röhrchen Blut oder Sputum verschicken und bekommt dann ein Ergebnis. Aus Sicht des Gutachters ist es sinnvoll, die gesetzlichen Rahmenbedingungen so zu gestalten, dass die Bürger die Möglichkeit haben, unter verantwortungsvollen Bedingungen diese Leistung im eigenen Land in Anspruch zu nehmen. Aus Sicht des Gutachters ist die Versorgung vorort notwendig, weil die Komplexität der Daten massiv zunimmt und die richtige Interpretation zum Wohle des Patienten mit dem Zuwachs an technischen Möglichkeiten immer wichtiger wird. Gute gesetzliche Rahmenbedingungen im eigenen Land erscheinen wichtig, um die Qualität, auf die der Ratsuchende als Nicht-Experte vertrauen darf, zu garantieren, und – wenn man das so formulieren darf – einen Sequenzier-tourismus zu unterbinden, der unter unkontrollierten Bedingungen potentiell viel Verunsicherung und Schaden verursachen könnte.

Qualitätssicherung der Genomsequenzierung für die Routine

Prinzipiell sollte für jede Technologie, die in der Routinediagnostik eingesetzt wird, eine qualitätssichernde Maßnahme möglich sein. Hierbei gilt allgemein, dass sowohl der Laborprozess als auch die Datenanalyse bis zur Befundinterpretation validiert werden sollte.

Die Hochdurchsatzsequenzierung stellt hierbei eine besondere Herausforderung dar, da vor allem bei der Analyse bereits unterschiedliche gesetzliche Rahmenbedingungen unterschiedliche Befunde zwangsläufig ergeben können (was darf/muss mitgeteilt werden). Ungeachtet der Herausforderungen gibt es bereits Bemühungen der Qualitätssicherung:

- Die europäische EMQN (European Molecular Genetics Quality Network) und UKNEQAS planen für die zweite Jahreshälfte 2012 den Pilotringversuch „EQA scheme for Next Generation Sequencing“.
- Größere Gerätefirmen für die Next-Generation Technologie bieten die Möglichkeit einer Registrierung als „Core Lab“ bei positiver Überprüfung der Qualitätsstandards.
- V.a. in Nordamerika, wo strenge Reglementierungen für die Diagnostik gelten, sind bereits Bemühungen für eine Akkreditierung im Gange. Interessant ist hierbei, dass besonderes Augenmerk auf die Einschlusskriterien vor Untersuchung gerichtet ist. Bezüglich der Einschlusskriterien für die Detektion seltener Erkrankungen kann hierbei auf die Richtlinien des American College of Medical Genetics (PubMed: 16247296 und 18496029) verwiesen werden. Ein wesentlicher Punkt für die Akkreditierung wird auch die IT sein, wobei Datenanalyse und Datenmanagement vordergründig sein dürften.

Die neuen Sequenziertechnologien in Zusammenschau mit dem Gentechnikgesetz

Aus den Teilen 1 und 2 des Gutachtens ergeben sich zwangsläufig Fragen, ob und inwiefern das derzeit gültige Gentechnikgesetz neu bewertet und allfällig angepasst werden muss. Der Gutachter erlaubt sich daher aus der Sicht des medizinischen Experten, einzelne Punkte anzusprechen, die möglicherweise hierbei relevant sind. Diese Auflistung kann natürlich nicht den Anspruch auf Vollständigkeit haben und bedarf der Einschätzung juristischer Sachverhalte durch die entsprechenden Experten.

§ 65: Genetische Analysen bei Typ 1

Wie bereits ausgeführt ist es wahrscheinlich, dass man auch zukünftig das Tumorgenom sequenzieren wird. Es ist zweifelsfrei, dass bei einer Genomsequenzierung des Tumors auch Keimbahnmutationen mit erfasst werden. Möglicherweise machen es unklare somatischen Mutationen sogar notwendig, gezielt somatische Mutation mit allfälligen Keimbahnmutation desselben Patienten zu vergleichen. Daraus ergeben sich mehrere Fragen:

- Kann die Trennung des Typs 1 vs der Typen 2-4 in der derzeitigen Form für Genomsequenzierungen aufrechterhalten werden, insbesondere benötigt man für Genomsequenzierungen vom Typ 1 ebenfalls eine zu definierende Zulassung?
- Muss die fachärztliche Expertise des Befunders genauer definiert werden, damit gewährleistet ist, dass Keimbahnmutationen von somatischen Mutationen unterschieden werden können?
- Dürfen/müssen Zufallsbefunde im Sinne von Typ 3 oder 4 ausgeblendet werden?
- Falls Daten ausgeblendet werden dürfen, kann das der anfordernde Arzt alleine entscheiden?
- Muss der Patient für eine Genomsequenzierung Typ 1 sein Einverständnis (nach vorangegangener genetischer Beratung?) erteilen?
- Muss es eine eigene Laborgenehmigung vom Bundesministerium geben für eine Genomsequenzierung Typ 1

§ 65: Genetische Analysen bei Typ 2-4 in Zusammenschau mit § 69 Einwilligung und Beratung

Wer darf beraten?

Ein Facharzt für Medizinische Genetik darf fächerübergreifend beraten, andere Fachärzte für das jeweilige Indikationsgebiet. Es stellt sich die Frage, ob eine allfällige genomweite Analyse lediglich durch den Facharzt für Medizinische Genetik möglich sein soll, da es bei einer Genomanalyse zwangsläufig zu einer fächerübergreifenden Beratung kommt. Konsequenterweise muss man sich auch fragen, ob bereits im Labor, wo die Genomanalysen durchgeführt werden, eine Auswertung der Labordaten ebenfalls geregelt werden muss (wiederum nur ein Laborleiter mit fächerübergreifender Kompetenz (§68a) ?).

Wer darf beraten werden?

Aufgrund der Komplexität der Daten aus der Genomanalyse sowie der möglichen weitreichenden Konsequenzen einer Genomanalyse stellt sich die Frage, ob eine Zustimmung erteilt werden kann entsprechend §69 (2). Mit anderen Worten kann z.B. einer mündigen, minderjährigen Person die volle Tragweite eines Genombefundes zugemutet werden? Ebenso stellt sich die Frage einer Genomsequenzierung im Rahmen eines unerfüllten Kinderwunsches (z.B. häufige Fehlgeburten): Da nicht abschätzbar ist, welche Anlageträgerschaften bei den beiden Partnern gefunden werden, ist es vertretbar, die beiden Partner gemeinsam zu beraten, oder muss nicht jeder individuell beraten werden?

Was darf beraten werden?

Die Komplexität der Beratung nimmt im besonderen Maße zu, hier sei angeführt:

- Bei einer Genomsequenzierung ist prinzipiell unklar, welche Ergebnisse auftreten können. Es stellt sich die Frage, inwieweit der Berater vorab überhaupt abschätzen kann, was dem Ratsuchenden zumutbar ist, sowohl an Inhalten als auch an Informationsumfang.
- Wie können Regeln im Beratungsgespräch aufgestellt werden, was überhaupt kommuniziert werden soll oder darf? Überdies muss man sich vergegenwärtigen, dass der Berater hinsichtlich der Haftungsfrage womöglich in eine defensive Rolle gerät (nach dem Motto: lieber mehr beraten, damit ich nachher nicht belangt werden kann).
- Kann der Ratsuchende überhaupt abschätzen, was eine Genomberatung für ihn bedeuten kann? So kann man davon ausgehen, dass die meisten Ratsuchenden über die Mehrheit der genetischen Erkrankungen nicht informiert sind und plötzlich mit einer Vielzahl von Krankheiten konfrontiert werden, die schwer begreiflich sind.
- Der Berater ist in einem Beratungsgespräch gesetzlich verpflichtet, neben der eigentlichen Fragestellung auch weitere potentielle genetische Erkrankungen in der Familie anzusprechen, die aufgrund des Beratungsgesprächs im Raum stehen. Müsste dann der Berater nicht konsequenter Weise gefordert sein, auf die Möglichkeit einer Genomsequenzierung hinzuweisen, um weitere Anlageträgerschaften zu identifizieren?

§ 65: Genomanalysen – unterschiedliche Kategorien?

Aufgrund der Komplexität der Inhalte stellt sich die Frage, ob man die Genomsequenzierungen vermehrt in Zusammenhang mit den Untersuchungstypen 1-4 bringen soll. Dieser Argumentation liegt der Gedanke zugrunde, dass die Gesamtsituation einfacher ist bei einer klar definierten Frage.

1) Ähnliche Fragestellung wie bisher/neue Technik:

Hier sei als Gedankenbeispiel erwähnt, dass für ein Krankheitsbild mehrere Gene verantwortlich sein können und es schon aus ökonomischen Gründen Sinn machen könnte, eine Hochdurchsatztechnologie einzusetzen, um die Kandidatengene zu untersuchen. Wenn sich die Analyse im Prinzip auf dieselben Gene wie bisher beschränkt, dürfte aus gesetzlicher Sicht kaum Handlungsbedarf bestehen (siehe aber auch unten Datenausblendung/Datensicherheit).

2) Klare umgrenzte Fragestellungen bei Typ 1 bzw. Typ 2:

Vereinfacht gesprochen gibt es hier ein evidenten medizinisches Problem eines Lebendgeborenen, das mit konventionellen genetischen Methoden nicht lösbar ist (z.B. nicht ausreichend klares klinisches Krankheitsbild – welches Gen soll untersucht werden?). Hier kann die Genomanalyse helfen, eine Klärung zu erzielen, die sonst nicht möglich gewesen wäre. Die Klärung kann eine wesentliche Hilfe im klinischen Management darstellen und es ist daher schwer argumentierbar, dass diese Möglichkeit verwehrt wird. Es ist vorstellbar, dass man die Suche entsprechend der Fragestellung auf die krankheitsrelevanten Befunde einengt und Zufallsbefunde, wie die Feststellung eines Überträgerstatus nicht kommuniziert. Hierbei dürfte dann aber auch konsequenterweise die Anlage für eine möglicherweise zukünftig ausbrechende genetisch bedingte Erkrankung nicht kommuniziert werden. Zusammenfassend stellt sich die Frage, ob man bei Fragestellungen von Typ 1 und Typ 2 die Informationen der Genomsequenzierung nur im Sinne von Typ 1 und 2 beantwortet darf und Typ 3 und 4 bewusst zurückhält mit der Gefahr, dass das Nicht-Kommunizieren einer late-onset Erkrankung einen Patientenschaden bewirken könnte.

3) Offenerer Fragestellungen bei Typ 3 und 4:

Prinzipiell sei festgehalten, dass es auch bei Typ 3 und 4 eine klare Fragestellungen geben kann – wie z.B. häufige Fehlgeburten zu einem relativ späten Schwangerschaftszeitpunkt mit Verdacht auf eine unklare rezessive genetische Erkrankung. Auf der anderen Seite kann aber auch der bloße Wunsch auf ein gesundes Kind Partner vor einer Schwangerschaft dazu bewegen, eine Genomsequenzierung durchzuführen. Allfällige gesetzliche Änderungen hinsichtlich der Präimplantationsdiagnostik könnten hierbei die Situation zusätzlich verschärfen. Aufgrund der offeneren Fragestellungen ergibt sich zwangsläufig eine längere Liste an zu kommunizierenden Inhalten. Es gilt die Überlegung, ob dem Berater zugemutet werden darf, entsprechend der jeweiligen Situation zu entscheiden, was analysiert und kommuniziert wird, oder ob klare gesetzliche Regeln getroffen werden sollen, die u.a. (1) das Alter des Ratsuchenden, (2) die Inhalte und den Umfang, die analysiert/kommuniziert werden dürfen und (3) die Haftbarkeit regeln.

Der Gutachter stellt weiters zur Diskussion, dass es möglich ist, im Rahmen von Genomuntersuchungen indirekt Rückschlüsse auf Analageträgerschaften bei weiteren Familienmitglieder zu ziehen. Im Prinzip ist die Situation ja nicht neu, bisher haben sich solche Rückschlüsse aber primär auf Einzelgenniveau abgespielt. Im Rahmen einer Genomanalyse kann jedoch die Beratungssituation deutlich komplizierter werden. Es ist sicherlich eine enorme Herausforderung, wenn man neben den Ergebnissen der Genomsequenzierung für den Einzelnen die Konsequenzen für weitere Familienmitglieder im Rahmen der genetischen Beratung bespricht.

Weiters sei auf §71/1/2 verwiesen: „Der untersuchten Person sind unerwartete Ergebnisse mitzuteilen.....“. Der Gutachter geht davon aus, dass es zu diesem Punkt eine Diskussion hinsichtlich Genomsequenzierung geben muss, da eine Genomsequenzierung zwangsläufig unerwartete Ergebnisse produzieren wird - möglicherweise in einer solchen Fülle, dass alle Inhalte im Rahmen einer genetischen Beratung nicht durchbesprochen werden können.

§ 70: Einbeziehung von Verwandten

Es sei darauf verwiesen, dass es im Rahmen der Suche nach einer krankheitsverursachenden Mutation vom Typ 1 und 2 notwendig sein könnte, weitere Familienmitglieder miteinzubeziehen. Um die genomweite Suche beim kranken Kind einzugrenzen, kann es rechnerisch sehr effektiv sein, neben den Eltern auch Genomanalysen von gesunden Geschwistern durchzuführen. Für eine vergleichende Genomuntersuchung gesunder, minderjähriger Geschwisterkinder sollten aus Sicht des Gutachters eigene Sicherheitsvorschriften gelten, um die Interessen des gesunden Kindes zu wahren.

§ 71: Datenschutz

Es gilt zu klären, ob aufgrund der Sensitivität von Genomdaten entsprechende zusätzliche Richtlinien notwendig sind. Hierzu stellen sich unter anderem folgende Fragen:

- Dokumentation der Untersuchungsergebnisse:

- a) Müssen die sehr umfangreichen Genomdaten gespeichert werden oder ist es ausreichend, den Teil abzuspeichern, der für die Fragestellung relevant ist. Darf ich Daten in der Analyse ausblenden bzw. löschen?
- b) Müssen Genomdaten lebenslang gespeichert werden, da zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedliche Informationen relevant und abrufbar sein sollten?
- c) Sollen eigene Sicherheitsstandards für die Langzeitspeicherung definiert werden. Ist eine entsprechend vor Zugriff geschützte zentrale Datenspeicherung einer lokalen Datenspeicherung vorzuziehen?
- d) Ist die gesetzliche Vorgabe aufrechtzuerhalten, dass der untersuchten Person auf Verlangen Einsicht in alle Daten zu gewähren ist?
- e) Können Daten nicht anonymisiert bei Einverständnis für andere Zwecke verwendet werden, wenn dadurch auch erhöhte Risiken für andere Familienmitglieder evident werden?
- f) Können Daten nicht anonymisiert bei Einverständnis für andere Zwecke verwendet werden, wenn dadurch auch erhöhte Risiken für late-onset Erkrankungen evident werden?

§ 66 Wissenschaft

Prinzipiell sollte man sich vergegenwärtigen, dass Genomdaten bereits jetzt, in Zukunft vermutlich in verstärktem Maße, wesentlich sein werden für die Forschung. Hierzu sei erwähnt, dass das Verständnis des menschlichen Genoms (oder anders ausgedrückt des menschlichen Bauplans) schlichtweg wesentlich ist, um Krankheitsursachen zu erkennen und Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Man muss sich auch bewusst sein, dass Genomdaten nicht für reine Grundlagenforschung, sondern z.B. auch durchaus in klinischen Studien mit Patientenkollektiven notwendig sein können. Die Forschung arbeitet prinzipiell nach dem Prinzip der Reproduzierbarkeit, d.h. die Daten sollten auch für andere Forscher überprüfbar und somit abrufbar sein. Insbesondere hat sich in der Genetik etabliert, dass genetische Daten ins Netz gestellt werden, damit die für die genetische Forschung und Routine wesentlichen Genomkarten etc. laufend verbessert werden können. Dieses Prinzip des Datenteilens kann jedoch auch zu rechtlichen Problemen führen:

- Bedürfen Genomdaten in der Wissenschaft einer besonderen Sicherheitsdefinition (siehe §66/1 („ausschließlich in der jeweiligen Einrichtung mit dem Namen des Probenspenders in Verbindung gebracht wird“))? Es sei hier betont, dass es in einem Kollektiv durchaus vorstellbar sein kann, dass aufgrund der Vielzahl an genetischen Markern, die im Rahmen der Genomanalysen anfallen, eine Rückverfolgung auf einzelne Personen möglich ist.
- Müssen besondere Vorgaben durch den Gesetzgeber definiert werden, damit Punkte (e) und (f) des vorangegangenen Kapitels „§71 Datenschutz“ gewährleistet werden und somit sichergestellt wird, dass den Studienteilnehmern nicht unerwartete Ergebnisse mitgeteilt werden?

§ 67: Arbeitgeber, Versicherer

Im Prinzip sollte auch § 67 für die Genomsequenzierung gelten. Es sei hier betont, dass durch Genomsequenzierungen auch unabhängig von monogenen Erkrankungen erhöhte Risiken/Dispositionen für Erkrankungen festgestellt werden können, die natürlich entsprechend sensibel und schützenswert sind. Es sei darauf hingewiesen, dass Daten hinsichtlich einer Disposition in einem größeren Kollektiv z.B. für Versicherer interessant sein können bei gleichzeitig geringer Relevanz für die Einzelperson.

www.bmg.gv.at

Es werden neue molekulargenetische Techniken beschrieben, die es ermöglichen, das gesamte menschliche Genom zu analysieren. Absehbare Entwicklungen und mögliche Konsequenzen dieser neuen Technologien und daraus resultierende ethische und rechtliche Fragen werden beleuchtet und im Hinblick auf die aktuelle Regelung durch das österreichische Gentechnikgesetz (GTG) diskutiert.