Ioana Barb

Dr. med.

Next-generation sequencing - a valuable tool for developing cardiovascular biomarkers

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: PD Dr. med. Benjamin Meder

Die Entwicklung der Next-Generation-Sequenzierung (NGS) hat die Möglichkeit, genetische Daten zu generieren, substantiell erweitert. Ein Bereich, welcher von dieser Technologie extrem profitieren könnte, ist die Entwicklung von kardiovaskulären Biomarkern.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die NGS Technik dafür einzusetzen, um das klinische Management von Patienten, die unter Herzinsuffizienz leiden, zu verbessern. Zu diesem Zweck gab es zwei Interventionspunkte: 1. die Verbesserung der genetischen Diagnostik der dilatativen Kardiomyopathie (Hauptursache der terminalen Herzinsuffizienz) und 2. die Verbesserung der Überwachung einer Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation.

1. Vererbte Herzerkrankungen können bereits im jungen Alter zum plötzlichen Herztod führen. Genetische Screenings könnten eine robustere Diagnose und ebenso eine Risikostratifizierung ermöglichen, so dass die Therapieeinleitung und Prognosestellung frühzeitig geschehen. In diesem Zusammenhang war das Ziel des ersten Projektes die Etablierung eines NGS standardisierten Tests für die genetische Diagnostik von Kardiomyopathien. Zu diesem Zweck wurde eine Vergleichsstudie beruhend auf dem Prinzip der zielgenauen Anreicherung und NGS an 10 DCM Patienten durchgeführt. Dabei wurden die technische Leistung als auch die Eignung für den klinischen Alltag evaluiert. Unterschiedliche Varianten wurden durch Sanger Sequenzierung validiert. Die Eignung der oben beschriebenen Techniken wurden anhand der Sequenzabdeckung, Anreicherungs-faktoren, Uniformität, Richtigkeit der generierten Varianten evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass die SureSelect Technologie insgesamt eine bessere Leistung als Haloplex ermöglicht. Jedoch bietet die Haloplex Technologie zahlreiche Vorteile für den klinischen Alltag (z.B. kürzere Prozessierungszeiten, einfachere Protokolle für die Probenvorbereitung, geringere DNA-Mengen). Da falsch positive Varianten v.a. durch PCR-Artefakte und unzureichende Basenabdeckung v.a. durch das Amplikon-Design entstehen, wurden in dieser Arbeit

zahlreiche Verbesserungsvorschläge gemacht und Strategien entwickelt, die voraussichtlich die Leistung der Haloplex Methode verbessern können.

2. Die Herztransplantation ist trotz deutlicher Organknappheit die effektivste Therapieoption der terminalen Herzinsuffizienz, wobei die dabei häufigste Komplikation die Organabstoßung darstellt. Die Überwachung der Abstoßungsreaktion wird heutzutage mittels endomyokardialer Biopsien durchgeführt, dabei werden drei Abstoßungsgrade unterschieden (0R, 1R, 2R). Die Komplikationsrate, die mit der Entnahme von Myokardbiopsien assoziiert ist, beträgt ungefähr 1%. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines nichtinvasiven Biomarkers für die Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation, indem microRNA Blutprofile mittels NGS für 103 herztransplantierte Patienten erstellt wurden. MicroRNA Populationen, die eine Korrelation zum Abstoßungsgrad zeigten, wurden dann in einer anderen Patientenkohorte mittels quantitativer real-time PCR validiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expressionswerte von zahlreichen miRNA Populationen (z.B. miR-184, miR-4637, miR-132, miR-33a), welche bereits in der Literatur als Zielmoleküle, welche in verschiedenen immunologischen, kardialen oder metabolischen Abläufen involviert sind, beschrieben wurden, mit dem ISHLT Abstoßungsgrad korrelieren. Ebenso nennenswert ist die Tatsache, dass einige von diesen miRNA Populationen imstande waren, unter den verschiedenen Abstoßungsgraden als Einzelmarker (z.B. AUC gleich 0.78 für miR-4637 in der 0R vs. 2R Analyse) oder als kombinierte Marker (z.B. AUC gleich 0.82 für 10 kombinierte miRNAs in der 0R vs. 2R Analyse) zu unterscheiden. Obwohl eine dreifache Klassifikation basierend auf den erhobenen Daten nicht möglich war, konnten einige erfolversprechende zweifache Klassifikationen etabliert werden. Die entdeckten miRNA Populationen konnten also nicht unter den drei verschiedenen Abstoßungsgraden – so wie diese heutzutage in der klinischen Praxis definiert sind (basierend auf morphologische Veränderungen in Biopsieschnitten) – differenzieren. Dennoch war eine zweifache Klassifikation (“keine/wenig” Abstoßung vs. “mäßige/schwere” Abstoßung) möglich, was dennoch die Therapieentscheidung im klinischen Alltag beeinflussen kann. Auch wenn die Entnahme einer endomyokardialen Biopsie zum jetzigen Zeitpunkt noch immer die Standardüberwachungsmethode der Abstoßungsreaktion nach einer Herztransplantation ist, könnte ein nichtinvasiver Biomarker in einer ersten Phase zu einer Risikostratifizierung führen und voraussagen, welche Patienten von einer Biopsieentnahme profitieren würden.

Was man aus beiden Studien schlussfolgern kann, ist die Tatsache, dass NGS ein wertvolles Tool für die Entwicklung von kardiovaskulären Biomarkern ist.