

Systematisch Methodische Plattform DNA

Teilprojekt „Nationale Genotypisierungsplattform 3“ GSF Neuherberg

Förderkennzeichen: 01GR0411
Teilprojekt-ID: PDN-S31T06

Schlussbericht

über den Projektverlauf vom 01.11.2004 bis 31.05.2008

Projektleiter:
Prof. Dr. Thomas Meitinger

Institut für Humangenetik
HelmholtzZentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)
Ingolstädter Landstraße 1
85764 Neuherberg
Tel: 0049-(0)89-3187-3216
Fax: 0049-(0)89-3187-3297

Inhaltsverzeichnis

I. 1. Aufgabenstellung

I. 2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

I. 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

I. 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

I. 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

5.1. Partner im Konsortium

5.2. Externe Partner

II.1. Erzielte Ergebnisse

II.2. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

II.3. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

II.4. Literaturliste

I.1. Aufgabenstellung

Am Standort GSF (seit 2008 Helmholtz Zentrum München) der NGFN2-Genotypisierungsplattform (GTP-München) sollten Strategien und Methoden zur Bearbeitung von Genkartierungs- und Genidentifizierungsprojekten bei komplexen und monogenen Erkrankungen entwickelt werden.

Im Rahmen von zahlreichen Kooperationen sowohl innerhalb als auch außerhalb des NGFN2 (z.B. EU-Projekte) sollten Hochdurchsatzgenotypisierungen und deren statistische Analyse erfolgen, mit dem Ziel Sequenzvarianten im Zusammenhang mit klinischen Phänotypen zu identifizieren. Mit der Erweiterung bestehender und der Etablierung neuer Methoden der Genotypisierung sollten die Voraussetzungen geschaffen werden, Typisierungsprojekte auf dem neuesten Stand der Technik möglichst schnell und kosteneffizient durchzuführen. Ein weiterer Schwerpunkt des Projektes war die Entwicklung und Etablierung von Qualitätskontrollsystemen hinsichtlich der Datenqualität sowie des optimalen Betriebs der Plattform.

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Vorhaben wurde auf der Basis der seit 2002 an der GSF Neuherberg (seit Jan. 2008 Helmholtz Zentrum München) etablierten GTP-München durchgeführt, die im Antragszeitraum stetig erweitert und verbessert wurde. Dabei wurden die bestehenden engen Kooperationen mit anderen Teilnehmern des NGFN2-Netzwerkes sowie mit zahlreichen internationalen Partnern weiter genutzt.

Zu Beginn der Förderperiode waren an der GTP-München die aktuell möglichen Genotypisierungsmethoden wie die Analyse mit 10K-Affymetrix-Arrays und die Sequenomplattform mit Analyse-Plexgrad 5 etabliert und wurden vorwiegend zur Untersuchung von Familien mit monogenen Erbgängen sowie Feinkartierung von Kandidatengenregionen erfolgreich eingesetzt. Die Möglichkeiten für genomweite Analysen mit ausreichend dichtem SNP-Raster bei komplexen Erkrankungen waren begrenzt, sowohl von methodischer Seite (Kostenintensität) als auch wegen der zur

Verfügung stehenden DNA-Proben, deren kritische Samplegröße bei multifaktoriellen Erkrankungen häufig nicht erreicht wurde.

Die Identifizierung von Sequenzvarianten im Zusammenhang mit klinischen Phänotypen beinhaltet drei wesentliche Komponenten: I) Die Beschreibung eines Phänotyps samt der dazugehörigen Proben, II) die Bestimmung von Sequenzvarianten und III) die Analyse und Bestätigung des Zusammenhangs zwischen Phänotyp und Genotyp. Die Komponente I wurde im wesentlichen von den NGFN2-Kooperationspartnern sowie auch von externen Kooperationspartnern gestellt, die Komponente II ist gleichzusetzen mit der GTP am Helmholtz Zentrum München (ehem. GSF), die Komponente III wurde zu unterschiedlichen Anteilen von Kooperationspartnern, Plattform und GEM (Genetisch-Epidemiologische Methodenzentren) bereitgestellt. Die GTP-München war aus Mitteln der GSF (Institut für Humangenetik, T. Meitinger) mit Geräten (z. B. TaqMan-Geräte, Massenspektrometer-Sequenom, Pipettierstation) und Personal ausgestattet, mit Hilfe der ersten NGFN-Förderung ausgebaut worden und stand im Rahmen der NGFN2-Förderung auf dem aktuellen technischen Stand für zahlreiche Kooperationsprojekte zur Verfügung.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Aufgaben waren definiert zum einen durch die Planung und Durchführung von Kopplungs- und Assoziationsstudien im Zusammenarbeit mit NGFN2-Projekten und zum anderen in der Weiterentwicklung der GTP-München mit dem Ziel einer erhöhten Datenqualität, einer erhöhten Prozesssicherheit, eines erhöhten Durchsatzes und einer Steigerung der Kosteneffizienz. Für die erste Aufgabe wurde zusammen mit den Kooperationspartnern die Auswahl von Sequenzvarianten und DNA-Proben optimiert. Parallel dazu wurde die GTP-München der technischen Entwicklung im Projektverlauf angepasst. Neue Methoden wurden etabliert, begleitet von qualitätssichernden Maßnahmen bei der Genotypisierung.

Im Rahmen der einzelnen Kooperationsprojekte standen Feinkartierungs- und Replikationsstudien im Vordergrund. Die Durchsatzquantität der Plattform wurde systematisch erhöht. So wurde z.B. der Plexgrad von 5-Plex (2004) über 7-Plex

(2005), Multiplex 29 (2006, i-Plex Sequenom) bis Multiplex 40 (2007) gesteigert. Außerdem wurden erweiterte Fehlermodelle vervollständigt, z.B. durch eine Verallgemeinerung des zugrunde liegenden Genotypfehlermodells und Übertragung auf "Haplotype-Sharing" Methoden.

Die Meilensteine der Etablierung von Hochdurchsatzgenotypisierungstechniken während des Antragszeitraumes sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Meilensteine der methodischen Entwicklung der GTP-München am Hemholtz Zentrum München

<u>Jahr</u>	<u>Technische Entwicklungen der Plattform</u>	<u>Methode</u>	<u>Max. Durchsatz/Woche</u>
2004	- Sequenomplattform: Erweiterung von Plexgrad 5 auf Plexgrad 7	hME	250.000 Genotypen
2005	- Illumina-Plattform mit 1 Scanner am MPI	Golden Gate	600.000 Genotypen
2006	- Affymetrix Plattform mit 2 Scannern und 6 Fluidic-Stationen	GeneChip Arrays	200 Arrays o.
	- Illumina-Plattform mit 1 Scanner	Infinium	50 Arrays
	- Sequenomplattform: Einführung il-Plex Gold Erweiterung auf Plexgrad 30 bis 40	iPlex Gold	1,2 Mio. Genotypen
2007	- Illumina-Plattform mit 2 Scannern, - Autoloader, Tecan-Pipettierroboter - Hochdurchsatz-Sequenzierereinheit Illumina - Genome Analyzer	Infinium	200 Arrays, 400 Proben
2008	- Illumina-Plattform Quad-Chip-Zertifizierung	Infinium	120 Arrays/ 480 Proben

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Zu Beginn des Projekts (Nov. 2004) waren der Genotypisierung häufiger Varianten technologisch deutliche Grenzen gesetzt. Trotz der Existenz einer dichten Nukleotidvarianten-Karte des menschlichen Genoms (1,4 Mio SNPs, HapMap) waren