



Punkte sammeln auf ...

SpringerMedizin.at

Das DFP-E-Learning ist Teil des Diplom-Fortbildungs-Programms (DFP) der Österreichischen Ärztekammer und ermöglicht qualitätsgesicherte Fortbildung durch das Studium von Fachartikeln nach den Richtlinien des DFPs.

Teilnahmemöglichkeiten:

DFP Punkte Online, per Post, Fax oder eMail

Der Multiple-Choice-Fragebogen des DFP kann bis zum jeweils angegebenen Datum eingereicht werden:

- Online: Für eingeloggte User steht der Beitrag und der Fragebogen auf unserer Website unter <http://www.springermedizin.at/> zur Verfügung.
- per Post: Prinz-Eugen-Straße 8-10, 1040 Wien
- per Fax: +43 1 330 24 26
- per eMail (eingescannter Test) an: susanna.hinterberger@springer.at

Approbation

Diese Fortbildungseinheit wird mit 3 DFP Punkten approbiert. Die Fortbildungspunkte werden rasch und unkompliziert mit Ihrer ÖÄK-Nummer elektronisch verbucht.

Kontakt und weitere Informationen

Springer-Verlag GmbH
Springer Medizin
Susanna Hinterberger
E-Mail: susanna.hinterberger@springer.at
SpringerMedizin.at



DFP-Fortbildung

Mateja Smogavec · Jürgen Neesen · Franco Laccone

Institut für Medizinische Genetik, Zentrum für Pathobiochemie und Genetik, Medizinische Universität Wien, Wien, Österreich

Genetische Diagnostik

Inhalt

Genetische Beratung und Stammbaumanalyse
Allgemeine gesetzliche Regelungen zur genetischen Beratung und Diagnostik
Indikationen zur genetischen Beratung und zur genetischen Diagnostik
Einteilung der genetischen Diagnostik
Forschungsansätze, „nahe“ diagnostische Zukunft
Methoden der Präimplantationsdiagnostik
Angebot im Institut für Medizinische Genetik der MUW
DFP-Fragen

Ärztlicher Fortbildungsanbieter

Klinische Abteilung für Hämatologie und Hämostaseologie, Universitätsklinik für Innere Medizin I, Medizinische Universität Wien, Währinger Gürtel 18-20, 1090 Wien, Österreich

Lecture Board

P. Balcke, St. Pölten
W. Hilbe, Wien
M. Köller, Wien
R. Koppensteiner, Wien
I. Lang, Wien
K. Machold, Wien

C. Marosi, Wien
I. Pabinger, Wien
E. Pohanka, Linz
G.-H. Scherthaner, Wien
M. Steurer, Innsbruck
F. Thalhammer, Wien

M. Trauner, Wien
F. Weidinger, Wien
C. Wenisch, Wien
G. Zollner, Graz
J. Zwerina, Wien

Genetische Beratung umfasst: Erhebung der Anamnese, Stammbaumanalyse und Erläuterung der indikationsspezifischen Genetik

Genetische Beratung vor genetischer Untersuchung: muss durch Facharzt für Humangenetik/medizinische Genetik/für das Indikationsgebiet zuständigen Facharzt erfolgen

Genetische Beratung und Stammbaumanalyse

Die erstmalige genetische Beratung ist ein umfassendes Gespräch mit den Ratsuchenden bzw. den Eltern eines minderjährigen Patienten mit einer Erhebung der Eigen- und Familienanamnese, einer Analyse des Stammbaumes über drei Generationen des Ratsuchenden, einer Erhebung des klinischen Status des Patienten mit Fotodokumentation und körperlicher Untersuchung, falls nötig, Übermittlung von Informationen über genetische Grundlagen und Vererbung der vermuteten bzw. bestehenden genetisch bedingten Erkrankung, Informationen über die Möglichkeiten der genetischen Abklärung, Erläuterung der Einverständniserklärung für die genetische Untersuchung und eine anschließende Probenentnahme. Ein Befund mit den Erläuterungen hinsichtlich möglicher Folgen für den Ratsuchenden selber und gegebenenfalls seiner Familie sowie mögliche therapeutische Optionen und evtl. Präventionsmaßnahmen werden dem Ratsuchenden entsprechend gesetzlicher Vorgaben im Rahmen eines Zweitgespräches ausführlich erläutert.

Allgemeine gesetzliche Regelungen zur genetischen Beratung und Diagnostik

Die gesetzliche Vorgabe zur genetischen Beratung und Diagnostik regelt das Gentechnikgesetz in Österreich [1].

Gemäß §69 des Gentechnikgesetzes darf eine genetische Analyse der Keimbahnmutationen nur nach Vorliegen einer schriftlichen Bestätigung der zu untersuchenden Person, durch vertretungsbefugte Erziehungsberechtigte oder sonstige gesetzliche Vertreter durchgeführt werden. Vor einer genetischen Untersuchung muss die Person durch einen Facharzt für Humangenetik/medizinische Genetik oder einen für das Indikationsgebiet zuständigen Facharzt über deren Wesen, Tragweite und Aussagekraft aufgeklärt werden, d. h. dass die genetische Beratung in Österreich ärztlich vorbehalten ist.

Der Ratsuchende kann jederzeit mitteilen, dass er das Ergebnis der Analyse und der daraus ableitbaren Konsequenzen nicht erfahren möchte. Beratungen vor und nach einer genetischen Analyse sind mit einem individuellen Beratungsbrief an den Ratsuchenden abzuschließen, in dem die wesentlichen Inhalte des Beratungsgespräches in allgemein verständlicher Weise zusammengefasst sind. Der Datenschutz und Umgang mit den erhobenen Daten ist durch §71 des Gentechnikgesetzes geregelt.

Der untersuchten Person sind unerwartete Ergebnisse mitzuteilen, die von unmittelbarer klinischer Bedeutung sind oder nach denen sie ausdrücklich gefragt hat. Diese Mitteilung ist insbesondere dann, wenn die untersuchte Person nicht danach gefragt hat, so zu gestalten, dass sie auf die untersuchte Person nicht beunruhigend wirkt. In Grenzfällen kann diese Mitteilung gänzlich unterbleiben.

Indikationen zur genetischen Beratung und zur genetischen Diagnostik

Die Indikationen zur genetischen Beratung sind sehr vielfältig. Die genetische Beratung ist indiziert, wenn die Symptomatik einer Person mit dem Auftreten oder der Wahrscheinlichkeit einer (epi-)genetisch bedingten oder mitbedingten Erkrankung oder Entwicklungsstörung zusammenhängen könnte. Die Indikation kann auch in einer subjektiven Besorgnis des Patienten bestehen [2].

Es werden postnatale Untersuchungen wie differentialdiagnostische Untersuchungen (symptomatische Person, Suche nach der genetischen Ursache), prädiktive Untersuchungen (asymptomatische Person, familiär bekannte Mutation), Testung auf Anlagetragerschaft bei autosomalrezessiven Erkrankungen bzw. Konduktorinnenstatus bei X-chromosomal gebundenen Erkrankungen sowie pränatale Untersuchungen unterschieden und auch genetische Untersuchungen im Rahmen einer Präimplantationsdiagnostik.

Einige Beispiele der Indikationen für genetische Beratung und genetische Diagnostik: unerfüllter Kinderwunsch und Infertilität, wiederholte Aborte, Präimplantationsdiagnostik, fetale Ultraschallauffälligkeiten bzw. pathologische biochemische Messungen während der Schwangerschaft, neuropädiatrische Auffälligkeiten (faziale Dysmorphien, Fehlbildungen, Entwicklungsstörung, mentale Retardierung, Epilepsie), erbliches Tumorleiden (u. a. hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom, hereditäres nicht-polyposes Kolonkarzinom (HNPCC, Lynch-Syndrom), Li-

Tab. 1 Möglichkeiten der genetischen Diagnostik**Zytopogenetische/molekularzytopogenetische Analysen**

Chromosomenanalyse

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Array-CGH

SNP-Array

Molekulargenetische Analysen

Fragmentlängenbestimmung von Repeats bei durch Repeatverlängerung bedingten Erkrankungen

Sanger-Sequenzierung

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) und/oder quantitative PCR

Analyse von epigenetischen Veränderungen

Next-Generation SequenzierungMulti-Gen-Panels (einige dutzende Gene) bis zur 6713-Gene sog. *Clinical Exome Sequencing*, (CES)*Whole Exome Sequencing* (WES), Exomsequenzierung*Whole Genome Sequencing* (WGS)^a, Genomsequenzierung

Nicht-invasive pränatale Diagnostik (NIPT)

^aWird derzeit nicht in der Routinediagnostik angeboten

Fraumeni-Syndrom), weitere erblich bedingte Erkrankungen im Erwachsenenalter (u. a. neurologische, neuromuskuläre, internistische, ophthalmologische).

Einteilung der genetischen Diagnostik

Genetische Diagnostik der Keimbahn kann grob in zytopogenetische bzw. molekularzytopogenetische und molekulargenetische Analysen unterteilt werden (■ Tab. 1). Die in der ■ Tab. 1 aufgeführten diagnostischen Möglichkeiten werden aktuell routinemäßig in Österreich angeboten (außer einer Genomanalyse) und werden nachfolgend ausführlich aufgeführt. Ferner können diese Analysen bei entsprechender Indikation sowohl pränatal als auch postnatal durchgeführt werden.

Genetische Analysen werden auch für die Detektion somatischer Mutationen z. B. in der Tumorgenetik verwendet. Diese sind nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Chromosomenanalyse

Grundlagen

Als Chromosomenanalyse wird eine Untersuchung der Chromosomen mit Hilfe eines Lichtmikroskops bezeichnet. Für die Analyse sind kernhaltige, teilungsfähige und in der (Pro-) Metaphase arretrierte Zellen notwendig. Unter optimalen Bedingungen haben die Chromosomen eine Auflösung zwischen 550–800 Banden pro haploiden Chromosomensatz. Der Gesamtstatus der Chromosomen in der Metaphase wird Karyogramm und die Darstellung des Chromosomenbestandes einer Zelle, eines Gewebes oder eines Individuum als Karyotyp bezeichnet [3]. Zur Darstellung der Chromosomen können diese mit unterschiedlichen Farbstoffen angefarbt werden (z. B. Giemsa-Trypsin-Bänderung, GTG-Banding) und dann bei ca. 1000-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop analysiert werden. Die Auswertung erfolgt in der Regel mittels spezifischer Software-Programme. Die Beschreibung einer Chromosomenanalyse erfolgt nach einem international anerkannten System ISCN (*An International System of Human Cytogenomic Nomenclature*) [4].

Indikationen

V. a. numerische Chromosomenaberration (z. B. Trisomie 21, 18, 13, Turner-Syndrom, Klinefelter-Syndrom), balancierte bzw. nicht-balancierte strukturelle Chromosomenaberration wie Translokationen, Inversionen (z. B. habituelle Aborte, familiär bekannte Translokation, Störungen der Fertilität, Tumorzytopogenetik).

Genetische Diagnostik umfasst zytopogenetische/molekularzytopogenetische und molekulargenetische Methoden

Chromosomenanalyse erfolgt an kernhaltigen, teilungsfähigen Zellen

Indikation: V. a. numerische oder strukturelle Chromosomenaberration mit Auflösungsgrenze von mind. 5–10 Megabasen

FISH: Metaphase- und Interphasen-FISH

Indikation: V. a. ein bestimmtes Mikrodel-/Mikroduplikations-syndrom (z. B. Williams-Beuren-, DiGeorge-Syndrom), Mosaikbestimmung

Array-CGH: genomweite Detektion von nicht-balancierten chromosomalen Aberrationen (Deletionen und Duplikationen; Auflösungs-grenze ca. 20–30 Kilobasen)

Untersuchungsmaterial

Meist Lymphozyten aus venösem Vollblut (3–10 ml heparinisiertes Blut), Chorionzotten bzw. Fruchtwasserzellen, spezielle Fragestellungen: u. a. kultivierte Fibroblasten aus einer Hautbiopsie.

Auflösung

Auflösungsgrenze der klassischen Zytogenetik abhängig von der erreichten Bandenauflösung ca. 5–10 Megabasen.

Grenzen der Methode

Kleine strukturelle Veränderungen an den Chromosomen sind nicht nachweisbar (Detektionsgrenze <5–10 Megabasen).

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**Grundlagen**

Die FISH-Technik ermöglicht Chromosomen bzw. chromosomale Abschnitte mittels fluoreszierender Farbstoffe lichtmikroskopisch zu markieren. Mit Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA-Sonden hybridisieren (binden) spezifisch an komplementäre einzelsträngige DNA-Abschnitte der Chromosomen. Die Untersuchung kann an Chromosomen in der Metaphase (Metaphase-FISH) oder an dekondensierten Chromosomen in der Interphase des Zellzyklus (am Zellkern) durchgeführt werden (Interphase-FISH). Es existieren gen-, locus- und chromosomenspezifische DNA-Sonden (chromosome painting) (z. B. für unklare strukturelle Aberrationen) [3].

Indikationen

Verdacht auf ein bestimmtes Mikrodeletions- bzw. Mikroduplikations-Syndrom (wie z. B. Cri-du-chat-Syndrom, Williams-Beuren-Syndrom, DiGeorge-/Velocardiofaciales Syndrom), pränatal vorkommende numerische chromosomale Aberrationen (wie z. B. Trisomie 21, 13, 18), Mosaikbestimmung (z. B. Turner-Syndrom in Mosaikform), Charakterisierung von Marker-Chromosomen (ein Markerchromosom nach ISCA Definition: abnormales Chromosom, in dem kein Teil mittels herkömmlicher Chromosomenanalyse identifiziert werden kann).

Untersuchungsmaterial

CVS bzw. Fruchtwasser (natives Material), Lymphozyten aus venösem Vollblut (3–10 ml Heparinblut), Mundschleimhautabstrich und weitere kernhaltige Zellen.

Auflösung

Ca. wenige Kilobasen (bzw. abhängig von verwendeten Sonden).

Grenzen der Methode

Über die untersuchte Region hinaus sind keine Aussage hinsichtlich des restlichen Genoms möglich, genaue Größenangabe zur strukturellen Aberration nicht möglich.

Array-CGH**Grundlagen**

Die Array-CGH (Engl.: *comparative genomic hybridization*; Deutsch: vergleichende genomische Hybridisierung) ist eine Methode zur genomweiten Detektion von zahlenmäßigen als auch nicht-balancierten chromosomalen Veränderungen. Ursprünglich wurden Patienten-DNA und Kontroll-DNA mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (meist rot und grün) markiert und äquimolar auf Metaphasen hybridisiert. Abweichungen von der Mischfarbe (gelb) deuteten entweder auf Zugewinne oder Verluste an genetischem Material bei dem Patienten hin. Mittlerweile wurde die CGH weitgehend durch die technisch nicht so anspruchsvolle Array-CGH Analyse ersetzt. Hierbei werden auf ein Trägermaterial kurze DNA-Moleküle in definierten Bereichen (Spots) aufgebracht. Die DNA-Fragmente eines Spots decken einen bestimmten Bereich des Genoms ab. Derzeit gängige Arrays haben ca. 60–180 tausend solcher Spots über das gesamte Genom verteilt. Eine Laserkamera detektiert die Bindung der Proben innerhalb eines Spots anhand

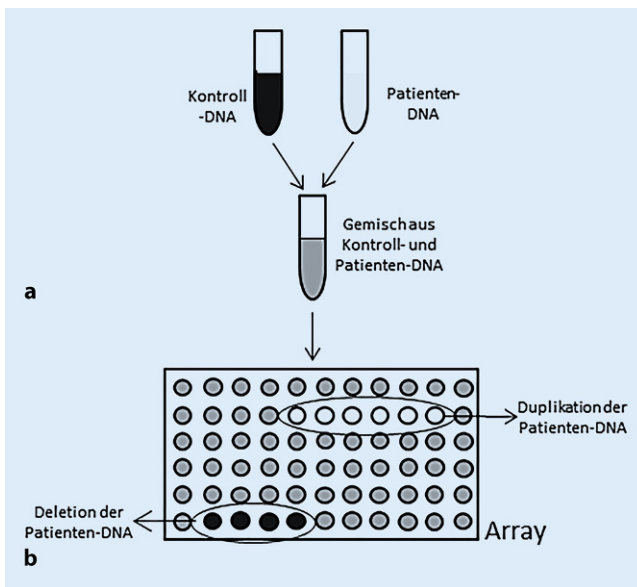


Abb. 1 ◀ Vereinfachte Darstellung der Array-CGH-Methode. **a** Die schwarze Farbe repräsentiert die Kontroll-DNA, die hell-graue die Patienten-DNA. Das Gemisch der beiden DNA-Proben hat eine dunkel-graue Farbe. **b** Die hell-graue Farbe deutet auf einen Überschuss der Patienten-DNA hin, was auf eine Duplikation hinweist, die schwarze Farbe zeigt eine Unterrepräsentation der Patienten-DNA, was auf eine Deletion in der Patienten-DNA hindeutet

ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten. Auch hier ermöglicht die Abweichung von der Mischfarbe (rot-grün) die genomweite Feststellung von Duplikationen (stärkeres Farbsignal der Patienten-DNA) bzw. Deletionen (stärkeres Farbsignal der Kontroll-DNA) (■ **Abb. 1**; [5]).

Indikationen

Mikrodeletions- und Mikroduplikations-Syndrome; Charakterisierung des euchromatischen Anteils von Markerchromosomen und dessen potentielle klinische Auswirkung; multiple Fehlbildungen bzw. ungeklärtes Dismorphiesyndrom, psychomotorische Entwicklungsverzögerung bzw. geistige Behinderung, psychiatrische Krankheiten.

Untersuchungsmaterial

DNA aus EDTA-Blutprobe (3–10 ml), DNA aus Chorionzotten bzw. Fruchtwasserzellen.

Auflösung

Generell 50–100 Kilobasen, im Einzelfall können auch Zugewinne oder Verluste einzelner Exons nachgewiesen werden.

Grenzen der Methode

Keine niedriggradigen Mosaik, keine Sequenzveränderungen, keine balancierten chromosomalen Aberrationen, routinemäßig keine uniparenterale Disomie (UPD) nachweisbar.

SNP-Array

Grundlagen

Bei dieser Methode finden sich neben den Sonden zur Detektion von Zugewinnen und Verlusten auch ca. 50.000 Proben zur Identifizierung von SNPs (Engl. „Single Nucleotide Polymorphism“, Deutsch: Einzelnukleotidpolymorphismen). In der Regel liegt die Mehrzahl dieser SNPs heterozygot vor, sodass größere Bereiche bei denen diese Heterozygotie nicht nachweisbar ist üblicherweise als LOH (*Loss of Heterozygosity*) bzw. als ROH (*Region of Homozygosity*) bezeichnet werden, leicht identifiziert werden können [3]. Die computergestützte Analyse kann dann zwischen dem Vorliegen einer Deletion oder einer Region mit dem identischen Haplotyp beider Chromosomen (ROH) unterscheiden. Neben einem Einsatz in der Tumorgenetik werden SNP-Arrays häufig bei Kindern aus konsanguinen Familien eingesetzt, um homozygote Bereiche nachzuweisen. Diese Regionen können folgend auf solche Gene überprüft werden, die potentiell als Ursache der Symptomatik bei diesen Kindern in Frage kommen.

SNP-Array: genomweite Detektion von nicht-balancierten chromosomalen Aberrationen und Detektion von uniparentaler Isodisomie (UPD)

Indikationen

Wie Array-CGH jedoch zusätzlich Nachweis von uniparenteralen Isodisomie (UPD) und LOHs.

Untersuchungsmaterial

Wie bei Array-CGH.

Auflösung

Abhängig vom verwendeten Array (etwa 100–200 Kilobasen), LOH je nach Auflösung 2–10 Megabasen.

Grenzen der Methode

Keine niedriggradigen Mosaik, keine Sequenzveränderungen, keine balancierten chromosomalen Aberrationen nachweisbar.

Analyse der Repeat-Erkrankungen**Grundlagen**

Bei den sogenannten Repeat-Erkrankungen handelt es sich um Veränderungen in der Anzahl aufeinanderfolgender Wiederholungen von (meist) Trinukleotiden, wie z. B. des Trinukleotids CAG bei der Chorea Huntington. Bei der Anzahl der Repeats wird häufig zwischen der Anzahl im Normbereich und im pathologischen Bereich („Vollmutation“) unterschieden. Öfter gibt es zwischen diesen beiden Extremen einen sog. Zwischenbereich, der oft nicht eindeutig einzuordnen ist (in einigen Fällen als „Prämutation“ bezeichnet). Solche Trinukleotide zeichnen sich oftmals durch eine Instabilität aus, d. h., dass es in der Keimbahn eines Elternteils zu einer Zunahme der Repeatzahl kommen kann, bei der Chorea Huntington kann es so bei den Kindern eines Betroffenen zu einer Verschlimmerung der Symptomatik kommen (sog. Antizipation). Die Zunahme kann unter Umständen eine Prämutation oder im Extremfall eine Vollmutation bedingen. Bei den Prämutationen befinden sich die Repeatzahlen noch unterhalb der Grenze für die volle Ausprägung/Entwicklung der Erkrankung und haben abgesehen von der Expansionsmöglichkeit bei der Weitergabe an die nächste Generation i. d. R. keine klinische Bedeutung (z. B. Myotone Dystrophie Typ 1) oder können u. U. ein anderes, weniger schwerwiegendes Krankheitsbild verursachen (z. B. das Fragile-X-assoziierte-Tremor-Ataxie-Syndrom (FXTAS) bzw. POF (*premature ovarian failure*) bei Frauen mit Prämutation im *FMRI*-Gen für das Fragile-X-Syndrom). Eine Expansion eines Repeats führt ab einem bestimmten Schwellenwert zur Vollmutation mit Beeinträchtigung von Funktion bzw. Expression des Genproduktes, was letztendlich die Erkrankung hervorruft.

Indikationen

Verschiedene Repeat-Erkrankungen (u. a. Huntington-Erkrankung, Fragiles-X-Syndrom, spinocerebelläre Ataxien, Myotone Dystrophien).

Untersuchungsmaterial

DNA aus EDTA-Blutprobe (3–10 ml), DNA aus Chorionzotten bzw. kultivierten Fruchtwasserzellen.

Auflösung

Analysiert wird nur ein spezifisches Repeat.

Grenzen der Methode

Keine Veränderungen außerhalb des Repeats nachweisbar, bei Homozygotie kann ein *Allele-Drop out* (Allelausfall; nur ein Allel wurde untersucht) nicht völlig ausgeschlossen werden.

Sanger-Sequenzierung

Grundlagen

Bei der DNA-Sequenzierung nach Sanger (auch als Dideoxymethode, Kettenabbruchmethode oder Sanger-Sequenzierung bezeichnet) handelt es sich grundsätzlich um die Analyse der primären, linearen Basenzusammensetzung eines DNA-Abschnittes [6].

Indikationen

Z. B. zur molekulargenetischen Sicherung einer klinischen Diagnose (z. B. Sichelzellanämie) mit Analyse eines Gens, Analyse mehrerer kleiner Gene (da dies kostengünstiger als eine NGS-Analyse ist), prädiktive/differentialdiagnostische Untersuchung auf familiär bekannte Sequenzveränderung, Bestätigung der Sequenzveränderungen, die mittels NGS-Methoden (siehe unten) detektiert worden sind.

Untersuchungsmaterial

DNA (aus EDTA-Blutprobe, Mundschleimabstrich, Chorionzotten, Fruchtwasserzellen, Gewebeproben etc.).

Auflösung

Veränderungen einzelner bis mehrerer Nukleotide.

Grenzen der Methode

In der Regel keine Aussage über Deletionen/Duplikationen einzelner Exons im Gen bzw. des gesamten Gens möglich, Mosaik <10–15% sind schwer nachweisbar, falsch negative Befunde durch *Allele-Drop out* (nur ein Allel wird untersucht, aufgrund fehlerhafter PCR).

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Analyse

Grundlagen

Die *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)*-Analyse ist eine Methode zur relativen quantitativen Darstellung der Kopienzahl in bis zu 50 unterschiedlichen kurzen genomischen DNA- bzw. RNA-Proben in einem Versuchsansatz. Bei der *MLPA*-Methode werden PCR-Produkte generiert, deren Quantifizierung im Vergleich zu einem parallel mitgeführten Ansatz aus Kontroll-DNA Rückschlüsse auf die Gendosis ermöglicht und somit die Identifizierung von Duplikationen oder Deletionen in definierten Regionen im Genom [7] gewährleisten kann.

Es wurden auch methylierungsspezifische *MLPAs* (*MS-MLPA*) entwickelt, bei denen sowohl die Bestimmung der Kopienzahl als auch die Analyse des Methylierungsmusters erfolgt. Die *MS-MLPA* wird oft zur Untersuchung genomisch geprägter Gene eingesetzt, etwa bei der Diagnostik des Prader-Willi/Angelman-Syndroms und Beckwith-Wiedemann/Silver-Russell-Syndroms.

Indikationen

Deletionen bzw. Duplikationen einzelner Exons des Gens, des gesamten Gens oder mehrerer Gene (anhängig vom verwendeten *MLPA*-Kit), Methylierungsmuster bestimmter Regionen mit *MS-MLPA*.

Untersuchungsmaterial

Qualitativ hochwertige DNA (u. a. aus EDTA-Blutprobe (3–10 ml), Chorionzotten bzw. kultivierten Fruchtwasserzellen).

Auflösung

Heterozygot/homozygot vorliegende Deletionen bzw. Duplikationen einzelner Exons des Gens, des gesamten Gens oder mehrerer Gene, Veränderungen in der genomischen Prägung.

Grenzen der Methode

Bei schlechter Qualität der DNA kann es zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen kommen. Steht nur für eine begrenzte Anzahl von Genen zur Verfügung.

Sanger-Sequenzierung: Kettenabbruchmethode, Analyse der DNA-Sequenz eines Gens bzw. einer spezifischen Sequenzveränderung

MLPA-Analyse: indirekte Analyse von Deletionen/Duplikationen einzelner Exons des Gens/des gesamten Gens

Epigenetik und genomisches Imprinting

Grundlagen

Genetische Informationen können in einer reversiblen elternabhängigen DNA-Modifikation vermittelt werden. Bei identischer Nukleotidsequenz des maternalen und paternalen Allels hängt bei manchen Genen die Expression von der elterlichen Prägung ab (Epigenetik). Vereinfacht bedeutet dies, dass ein bestimmtes Gen nur exprimiert wird, wenn es auf dem Chromosom lokalisiert ist, welches vom Vater bzw. von der Mutter stammt. Im menschlichen Genom weisen zwischen 100 und 200 Gene eine elternspezifische Prägung auf und diese Gene befinden sich in der Regel in Imprinting-Clustern. Diese haben ein Imprintingzentrum (Engl.: *imprinting control region*, ICR), das die Methylierung dieser Gene und die Prägung über die gesamte Region reguliert. Für jede einzelne dieser Regionen ist in somatischen Zellen ein spezifisch erkennbares Muster festgelegt, das auch „Imprintingsmuster“ (sog. Prägungsmuster) genannt wird. Die Methylierung ist einer der wichtigsten und bekanntesten Mechanismen, die bei der Regulation von Genexpression eine Rolle spielt (unter DNA-Methylierung versteht man die Einführung von $-CH_3$ Methylgruppen in die DNA durch DNA-Methyltransferasen). In Säugerzellen im Kontext des Imprintings spielen die sog. „CpG-Insel“ eine zentrale Rolle, die sich meistens im Bereich von Promotoren (regulieren Expression der Gene) bzw. regulatorischen Regionen befinden. Eine massive Methylierung spezifischer Regionen führt zu einer chemischen Modifikation der DNA und in Folge zu einer Inaktivierung der Gene.

In der Keimbahn wird das in somatischen Zellen erkennbare Methylierungsmuster gelöscht und anschließend entsprechend dem Geschlecht neu hergestellt. Im Rahmen der Spermatogenese erhalten alle Spermien ein männliches Imprintingmuster, im Rahmen der Oogenese alle Eizellen ein weibliches Imprintingmuster. Somit ist es gewährleistet, dass eine befruchtete Eizelle bzw. ein Embryo ein ausgeglichenes und korrektes Imprinting des gesamten Genoms aufzeigt und dieses wird unter der Kontrolle regionaler Imprintingzentren auf den einzelnen Chromosomen über alle folgenden Zellteilungen hindurch aufrechterhalten.

Eine Imprintingstörung kann durch verschiedene Mechanismen entstehen:

- a. *Vorliegen einer Mikrodeletion*, durch die der Chromosomenabschnitt mit der exprimierten Genkopie verloren geht (die Mehrheit der Patienten mit Prader-Willi- und Angelman-Syndrom). Je nachdem, ob die Deletion auf dem väterlichen oder mütterlichen Allel liegt, können unterschiedliche Krankheitsbilder entstehen (15q11-q13-Region: Deletion des maternalen Allels führt zum Angelman-Syndrom, Deletion des paternalen Allels zum Prader-Willi-Syndrom).
- b. *Vorliegen einer uniparentalen Disomie (UPD)*, wenn zwei homologe Chromosomen vom gleichen Elternteil stammen. Bei der maternalen UPD (matUPD) fehlt das paternale Chromosom. Sollte auf diesem Chromosom ein Imprinting vorliegen und nur die väterliche Region aktiv sein, geht die Funktion der Gene, die nur auf dem väterlichen Exemplar dieses Chromosoms exprimiert werden (z. B. eine matUPD15 in der Prader-Willi-Region enthält nicht die notwendige aktive väterliche Kopie und somit bedingt sie das Prader-Willi-Syndrom) verloren. Umgekehrt gilt dies bei einer paternalen UPD des Chromosoms 15 (patUPD15) im Falle des Angelman-Syndroms. Bei einer nachgewiesenen UPD bei einem Kind sollte eine Chromosomenanalyse der Eltern erfolgen, um eine Chromosomenstörung, die das Auftreten der UPD prädisponiert, auszuschließen (z. B. eine Robertsonsche-Translokation).
- c. Eine *Genmutation* in einem aktiven Gen, das dem Imprinting unterliegt. Eine solche Mutation kann von einem asymptotischen Elternteil vererbt werden. Ein Beispiel dafür ist eine Mutation des (im Gehirn) maternal exprimierten *UBE3A*-Gens für das Angelman-Syndrom. Wenn ein Kind eine pathogene Mutation im *UBE3A*-Gen vom Vater erbt, hat dies keine Auswirkungen (die notwendige und physiologisch aktive mütterliche Kopie ist ja intakt), wenn diese jedoch von der Mutter erbt wird, entwickelt das Kind das Angelman-Syndrom. In diesem Fall besteht auch ein Wiederholungsrisiko von 50% für nachfolgende Geschwister.
- d. Das Vorliegen einer *Störung des Imprintingzentrums*. Die wichtigste Ursache des Beckwith-Wiedemann-Syndroms ist der Verlust der maternalen Methylierung in der Imprintingregion 11p15.5, während der Verlust der Methylierung des paternalen Allels ein Silver-Russel-Syndrom verursacht.

- e. Das Vorliegen einer *Duplikation des imprimierten Gens*, wenn es auf ein Gleichgewicht zwischen verschiedenen mütterlich oder väterlich geprägten Genen ankommt (z. B. maternale Duplikation beim Silver-Russel-Syndrom, paternale Duplikation beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom).

Indikationen

Häufiger vorkommende Erkrankungen: Angelman-Syndrom, Prader-Willi-Syndrom, Beckwith-Wiedemann-Syndrom, Silver-Russel-Syndrom, matUPD14, patUPD15.

Untersuchungsmaterial

Qualitativ hochwertige DNA (aus EDTA-Blutprobe 3–10 ml, Chorionzotten bzw. kultivierten Fruchtwasserzellen).

Auflösung

Imprintingstörungen einer bestimmten Region.

Mitochondriale Erkrankungen

Grundlagen

Eukaryontische Zellen haben neben dem nukleären Genom ein mitochondriales Genom in Form eines ringförmigen Doppelstranges (mtDNA) mit 16.569 Basen in zahlreichen Kopien, das sich in den Mitochondrien befindet. Das mtDNA-Molekül enthält insgesamt 37 Gene, 13 davon kodieren für bestimmte Proteine der Atmungskette (der oxidativen Phosphorylierung), die anderen 24 Gene enthalten die Information zur Herstellung der 22 tRNA- und 2 rRNA-Molekülen, die für die Synthese der mitochondrial kodierten Polypeptide notwendig sind.

Der Mensch erhält alle funktionellen Mitochondrien über die Eizelle von seiner Mutter. Es handelt sich somit um eine mitochondriale bzw. maternale Vererbung (eine Mutter mit einer Mutation in ihrer mtDNA kann diese Mutation an alle Nachkommen weitergeben, wogegen ein Vater mit der gleichen Mutation in der mtDNA diese an keinen seiner Nachkommen weitergibt). Die mtDNA wird unabhängig vom Zellzyklus in jedem Mitochondrium individuell repliziert. Die Mitochondrien werden während der Oogenese zufällig vom Oogonium auf die primären Oocyten aufgeteilt. Auch bei weiteren Zellteilungen verläuft die Verteilung zufällig. Eine bestimmte mtDNA-Variante kann so nur einen Teil der mtDNA-Kopien betreffen (sog. Heteroplasmie), oder eine Zelle enthält nur Mitochondrien mit mutierter oder nur mit normaler mtDNA (sog. Homoplasmie). Die phänotypische Auswirkung der mitochondrialen Variante hängt häufig vom Verhältnis der Anzahl zwischen normaler und veränderter mtDNA in den Zellen ab. Dieses kann zwischen unterschiedlichen Organen und im Verlauf mehrerer Zellteilungen stark variieren, was eine Variabilität der Symptome bzw. Expressionsstärke der Symptome über die Zeit verursacht. Organe, die einen hohen Energiebedarf haben, wie Muskeln, Nervenzellen und Retina werden je nach Erkrankung im unterschiedlichen Ausmaß in Mitleidenschaft gezogen. Eine unvollständige Penetranz (Penetranz bedeutet die Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmter Genotyp den entsprechenden Phänotyp bedingt) und eine variable Expressivität (Schweregrad des Phänotyps) sind typische Merkmale für alle mitochondrial vererbten Krankheiten.

Die Mehrzahl von mitochondrialen Atmungskettenproteinen und aller anderen mitochondrialen Proteine werden jedoch nukleär kodiert.

Indikationen

Enzephalo-, Myo-, Kardiomyopathie, Ataxie, retinale Degeneration, Lähmungen der äußeren Augenmuskeln, eine Entwicklung von Laktatazidose bei leichter körperlicher Belastung, in der Skelettmuskulatur mikroskopisch bestehende sog. „ragged red fibers“ (subsarkolemmale Ansammlungen von Mitochondrien).

Untersuchungsmaterial

Muskelgewebe, EDTA-Blutprobe (3–10 ml).

Mitochondriale Erkrankungen: mitochondriale Vererbung über die Mutter; Heteroplasmie/Homoplasmie; variable Expressivität und unvollständige Penetranz

Tab. 2 NGS-Analysen

	Kleines Multi-Gen-Panel	Klinisches Exom (CES)	Exom-Sequenzierung (WES)	Genom-Sequenzierung (WGS) ^b
Zielsequenz	Mehrere im Panel definierte Gene (bis mehrere 100 Gene)	6713 krankheitsassoziierte Gene ^a	Etwa 20.000–25.000 Gene (alle kodierende Bereiche der bekannten proteinkodierenden menschlichen Gene; etwa 180.000 Exons; nur 1,5% des gesamten Genoms)	Gesamtes humanes Genom
Indikationen	Spezifische, für die Fragestellung relevante, Gene	Schwierig einzuordnende Krankheiten und Differentialdiagnosen (krankheitsassoziierte Gene)	Schwierig einzuordnende Krankheiten und Differentialdiagnosen	Schwierig einzuordnende Krankheiten und Differentialdiagnosen
Untersuchungsmaterial	DNA aus EDTA-Blutprobe (3–10 ml), Chorionzotten bzw. Fruchtwasserzellen, andere Gewebeproben			
Vorteile	Sequenzveränderungen und CNV-Analyse zur Detektion von Deletionen bzw. Duplikationen in kodierenden Bereichen der im Panel umfassten Bereiche der Gene		Sequenzveränderungen und CNV-Analyse zur Detektion von Deletionen bzw. Duplikationen des Exoms	Sequenzveränderungen und CNV-Analyse zur Detektion von Deletionen bzw. Duplikationen des gesamten Genoms
Nachteile	Differentialdiagnostisch relevante Gene oft nicht enthalten; wenig flexibel	Erhöhte Wahrscheinlichkeit für VUS	Große Datenmengen müssen ausgewertet und interpretiert werden, hohe Wahrscheinlichkeit für VUS	Große Datenmengen müssen ausgewertet und interpretiert werden, hohe Wahrscheinlichkeit für VUS
Zusatzbefunde	Geringe Wahrscheinlichkeit	Erhöhte Wahrscheinlichkeit	Hohe Wahrscheinlichkeit	Hohe Wahrscheinlichkeit
Grenzen der Methode	Sequenzveränderungen und CNVs außerhalb der analysierten Bereiche (tiefe intronische Bereiche), strukturelle Rearrangements, epigenetische Veränderungen, Repeaterkrankungen			Strukturelle Rearrangements, epigenetische Veränderungen, Repeaterkrankungen

CES Clinical Exome Sequencing, klinisches Exom, WES Whole Exome Sequencing, Exomsequenzierung, WGS Whole Genome Sequencing, Genomsequenzierung, VUS Variante unklarer Signifikanz, CNV Kopienzahlvarianten

^aIm *expanded* Kit der CES-Analyse

^bWGS wird nicht in der Routinediagnostik angeboten

Next-Generation Sequenzierung (NGS)

Grundlagen

Es handelt sich um eine parallele Sequenzierung einer großen Anzahl von Genen bis hin zum „gesamten“ Genom. Es werden kleine Multi-Gen-Panels von großen Multi-Gen-Panels (Klinisches Exom (*Clinical Exome Sequencing*, CES)), die Exomsequenzierung (*Whole-exome Sequencing*, WES) sowie die Sequenzierung des gesamten Genoms (*Whole-genome Sequencing*, WGS) unterschieden (■ Tab. 2). Die WGS wird derzeit noch nicht in der Routinediagnostik angeboten.

Der Prozessfluss umfasst die Fragmentierung (mechanisch oder enzymatisch) der genomischen DNA, das Anhängen der Adaptersequenzen an die erzeugten DNA-Fragmente und die Hybridisierung mit der *Capture-Library* (sog. *Region of interest*, ROI), Reinigung der durch die Sonden gebundenen DNA-Fragmente mit magnetischen Kügelchen (*Beads*) für die Gewinnung der gewünschten Zielregionen und die Amplifikation der gereinigten Zielregionen. Anschließend erfolgt die Sequenzierung auf einer automatisierten Sequenzierplattform (u. a. Illumina, ThermoFisher). Bei der Sequenzierung des gesamten Genoms gibt es Abweichungen zu dem o. g. Prozess.

Die gesamten, so hergestellten DNA-Abschnitte werden parallel in kleinen Sequenzierungen („Minisequenzieren“) analysiert, die sich hunderttausendfach auf dem „Nanochip“ befinden. Dazu wird der gleiche DNA-Abschnitt mehrere hunderte bis zu tausend Mal sequenziert (sog. *Reads*). Somit wird eine große „Sequenziertiefe“ (sog. *Coverage*) erreicht, was auch die Detektion von Veränderungen in nur einem Teil der Körperzellen (niedriggradiges Mosaik) ermöglicht.

Die NGS-Methode ermöglicht zusätzlich auch Hinweise auf Kopienzahlvarianten (Engl.: *Copy Number Variation*, CNV). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass die Anzahl der Sequenzierungen (*Reads*) einzelner Exone einer Probe mit anderen Proben untereinander verglichen werden kann. Als Kontrollen dienen DNA-Proben von Patienten, die in der Vergangenheit bereits mit derselben Methode untersucht worden waren. Spezifische Algorithmen ermöglichen dann

NGS: massive parallele Analyse einer Großzahl von Genen; *Reads*, *Coverage*

eine vergleichende Analyse. Damit können Deletionen und Duplikationen einzelner bzw. mehrerer Exone des gesamten Gens bzw. größere Deletionen bzw. Duplikationen potentiell detektiert werden.

Bei den CES-, vor allem aber bei den WES- bzw. WGS-Analysen kann eine Einzel-Untersuchung vom Indexpatienten erfolgen, eine sog. Duo-Untersuchung von z. B. zwei Betroffenen in der Familie (Geschwister) oder eine Trio-Analyse vom Indexpatienten und seinen Eltern oder weitere mögliche Kombinationen. Bei einer Trio-Exom-Diagnostik wird sowohl bei dem Patienten als auch den Eltern eine exomweite Analyse (WES) durchgeführt. Somit ist es bei der Auswertung der Veränderungen möglich, Sequenzvarianten besser zu beurteilen und damit zielgerichteter auszuwerten. Die Identifizierung und Interpretation von klinisch nicht mit einer Erkrankung assoziierter Gene und Varianten sowie die Detektion von neu entstandenen (*de novo*) Mutationen kann dadurch erleichtert werden.

Die Diagnosestellung mittels CES- und WES-Analyse unterscheidet sich erheblich in Abhängigkeit von der Indikation sowie der ausgewählten Patientenkohorte. Allgemein kann eine Detektionsrate von ca. 20 % bis ca. 50 % angegeben werden. Die WES-Mutationsdetektionsraten bei pädiatrischen Patienten bewegen sich zwischen ca. 25 % [8] bzw. ca. 49 % [9]. Bei Patienten mit Verdacht auf mitochondriale Erkrankungen zeigte sich mittels WES eine Detektionsrate der ursächlichen Sequenzveränderungen von ca. 40 % [10].

Durch Trio-WES Analysen bei Kindern mit Entwicklungsstörungen unklarer Ätiologie fand sich eine Detektionsrate von ca. 42 % in bekannten krankheitsassoziierten Genen [11].

Studien mit konsanguinen Familien belegen Detektionsraten von homozygoten Sequenzvarianten von ca. 30 bis 40 % [12, 13]. Die gesamte Detektionsrate war hier aufgrund weiterer detektierter Sequenzvarianten etwas höher (von ca. 40 bis 50 %). Insgesamt ist die Detektionsrate in konsanguinen Familien etwas höher als bei nicht konsanguinen Familien, bleibt aber insgesamt deutlich hinter den Erwartungen zurück.

Auswertung der Multi-Gen-Panel/CES/WES-Daten

Österreichweit erfolgt die Auswertung der gewonnenen Sequenzdaten institutionsspezifisch, basierend auf den Richtlinien der deutschen, europäischen und amerikanischen Gesellschaft für Genetik.

Um die Gensequenzen der Patienten mit der korrekten Referenzsequenz der Gene vergleichen zu können, werden den analysierten Genen entsprechende Referenzsequenzen nach der NM-Nomenklatur (aus *NCBI-National Center for Biotechnology Information*) zugeordnet.

Die Auswertung der identifizierten Sequenzveränderungen wird mehrstufig durchgeführt. Es werden HPO- (*Human Phenotype Ontology*)-Stichworte für die angegebene Symptomatik bzw. den angegebenen Phänotyp für die Auswertung der Sequenzveränderungen verwendet. Mit Hilfe der HPO wird eine Anzahl an Genen zusammengestellt, die unter den biologischen und genetischen Aspekten im Zusammenhang mit dem Phänotyp stehen. Je ausführlicher und genauer der Phänotyp im Untersuchungsauftrag vom angeforderten Arzt beschrieben ist, desto spezifischer und zielführender ist in diesem Schritt die Auswertung der Daten möglich.

Sequenzveränderungen werden nach festgelegten Kriterien mit verschiedenen gängigen Datenbanken (ExAC (*Exome Aggregation Consortium*), gnomAD (*Genome Aggregation Database*), EVS (*Exome Variant Server*) bzw. 1000-Genome-Projekt) abgeglichen und filtriert. Unter den verbliebenen Sequenzveränderungen wird eine weitere Bestimmung der Pathogenität unter Einbeziehung weiterer Datenbanken wie HGMD (*Human Gene Mutation Database*), ClinVar, LOVD (*Leiden Open Variation Database*) und OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) durchgeführt. Bei einer bereits beschriebenen krankheitsverursachenden Sequenzveränderung ist die Auswertung hier dann in der Regel beendet.

Unbekannte identifizierte Sequenzveränderungen werden hinsichtlich der möglichen Assoziation mit dem Phänotyp filtriert und mit den Prädiktionsprogrammen (u. a. *PolyPhen-2*, *MutationTaster*, *SIFT*, *Human Splicing Finder* (HSF)) auf deren Pathogenität überprüft.

Alle reportierten Sequenzveränderungen werden in der Regel mittels Sanger-Sequenzierung überprüft.

Hier ist es anzumerken, dass die für die Datenauswertung notwendige interne Filtrierung die potentielle Gefahr birgt, wichtige Informationen und sogar die krankheitsverursachende

Trio-Exom-Analyse: WES-Analyse vom Indexpatienten und seinen Eltern

Detektionsraten mittels WES zwischen ca. 20 % bis ca. 50 % möglich

Klassifizierung der detektierten Veränderungen erfolgt in fünf Klassen

VUS = Variante unklarer Signifikanz (Klasse 3): eine Veränderung, deren Bedeutung für das Krankheitsbild nach dem Stand der Wissenschaft als unklar bewertet ist

Zusatzbefunde: krankheitsverursachende genetische Veränderungen ohne direkten Zusammenhang mit der Indikation für die genetische Analyse

Tab. 3 Klassifizierung der genetischen Veränderungen

Klasse der Veränderung	Pathogenität
Klasse 1	Benigne
Klasse 2	Wahrscheinlich benigne
Klasse 3	Variante unklarer Signifikanz (VUS)
Klasse 4	Wahrscheinlich pathogen
Klasse 5	Pathogen

Veränderung aus zu filtern. Hier sind Erfahrung und umfangreiche medizinisch-genetische Kenntnisse der „Auswerter“ ein unverzichtbares „muss“ (Anmerkung der Autoren).

Die identifizierten Veränderungen werden nach den ACMG-(*American College of Medical Genetics and Genomics*)-Kriterien klassifiziert [14] und entsprechend der IARC-(*International Agency for Research on Cancer*)-Empfehlung in fünf Klassen kategorisiert ([15]; **Tab. 3**).

In der Regel werden nur Veränderungen der Klasse 5 oder Klasse 4 oder klinisch möglicherweise relevante Veränderungen der Klasse 3 im Befund angegeben. Die prädiktive Untersuchung bei weiteren Familienmitgliedern ist nur für wahrscheinlich pathogene Mutationen der Klasse 4 sowie pathogene Mutationen der Klasse 5 vertretbar. Anzumerken ist, dass sich die Klassifizierung einer Sequenzveränderung aufgrund neuer Erkenntnisse/Literaturdaten jederzeit ändern kann. Eine Reevaluation der Daten ist daher unter Umständen sinnvoll.

Methodisch bedingt werden nicht alle Bereiche der in der hergestellten „Library“ zu analysierenden Gene vollständig mit einer ausreichenden Abdeckung von >10-fach in eine Leserichtung erreicht. Es kann sogar dazu kommen, dass bestimmte Bereiche, z. B. CG-reiche Sequenzen, nicht abgedeckt sind. Dies ist ein gravierender Nachteil der NGS-Methodik.

Problematik bei Identifizierung von Varianten unklarer Signifikanz

Je höher die Anzahl der analysierten Gene ist, desto wahrscheinlicher wird die Detektion einer Variante unklarer Signifikanz (VUS). Diese Veränderungen haben i. d. R. eine sehr niedrige Frequenz in der Allgemeinbevölkerung und sind nicht in den Datenbanken gelistet. Mit Hilfe der bioinformatischen Vorhersageprogrammen ist nicht immer möglich, sie als eindeutig benigne bzw. wahrscheinlich benigne oder eindeutig pathogen bzw. wahrscheinlich pathogen einzuordnen. Solche Veränderungen werden als Varianten unklarer Signifikanz (VUS) eingestuft. Eine Testung einer solchen Veränderung bei weiteren betroffenen und nicht-betroffenen Familienmitgliedern kann sich als hilfreich für die bessere Einstufung solcher Veränderungen herausstellen.

Durch den Wissenszuwachs in der Genetik werden VUS regelmäßig neu klassifiziert (z. B. neue Einstufung in den relevanten Datenbanken wie ClinVar, OMIM oder publiziert). Es ist zu erwarten, dass sich diese Problematik in Zukunft verbessern wird und durch den weiteren Informationsgewinn die Bewertung der genetischen Veränderungen geregelter wird.

Zusatzbefunde

Zusatzbefunde beziehen sich auf genetische Veränderungen, die nicht im Zusammenhang mit der direkten Indikation der angeforderten Untersuchung stehen. Bei Auswertung der indikationsspezifischen Gene mittels z. B. eines kleinen Multi-Gen-Panels ist die Wahrscheinlichkeit eines Zusatzbefundes eher gering, da die Anzahl und die Spezifität der Genen auf den Phänotyp beschränkt sind. Diese Situation sieht bei der Auswertung der WES-Daten wie z. B. bei einem unklaren Syndrom mit Entwicklungsverzögerung vollkommen anders aus. Hier kann eine Vielzahl von Zusatzbefunden für therapierbare Erkrankungen, für Erkrankungen mit prophylaktischen Maßnahmen, für nicht therapierbare Erkrankungen oder für Anlageträgerschaften für erblich bedingte Erkrankungen detektiert werden.

Hierfür ist eine entsprechende genetische Beratung vor der Durchführung einer solchen Untersuchung von großer Bedeutung. Der Patient muss über die Tragweite und Grenzen der zu verwendeten genetischen Untersuchung ausführlich aufgeklärt werden und soll vor der Untersuchung auch schriftlich bestimmen, ob bzw. welche Zusatzbefunde ihm mitgeteilt werden sollen. Wenn das Einverständnis des Patienten nicht den Umgang mit Zusatzbefunden umfasst bzw. der Patient über die Zusatzbefunde nicht informiert werden möchte, dürfen über die medizinische Fragestellung hinausgehende Veränderungen nicht beobachtet, dokumentiert oder reportiert

Tab. 4 Zusammenfassung der Detektionsmöglichkeiten und Indikationsbereiche der genetischen Untersuchungen

Genetische Analyse	Analysierte genomische Regionen	Detektionsmöglichkeiten			Indikationen
		Aneuploidie/ genomische Re- arrangements	CNV	SNP, Indel	
Chromosomenanalyse	Genom	+++	+	–	Aneuploidien (Monosomie, Trisomien), balancierte Rearrangements (Translokationen, Inversionen)
FISH-Analyse	Spezifische Region	+	+	–	Spezifisches Mikrodeletions-/Mikroduplikationssyndrom, Aneuploidien (in Mosaikform)
Array-CGH	Genom	++	+++	–	Mikrodeletions-/Mikroduplikationssyndrom (Multiple Anomalien)
Sanger-Sequenzierung	Spezifisches Gen, bekannte Sequenzveränderung	–	–	+++	Bestimmte genetisch bedingte Erkrankungen mit einem/wenigen bekannten Genen, familiär bekannte Sequenzveränderungen
MLPA-Analyse	Spezifische Region	–	+++	+	Ausschluss von Deletionen bzw. Dupikationen einzelner Exone bis zu gesamten Genen, familiär bekannte Deletion einzelner Exone, MS-MLPA (PWS/AS; BWS/SRS)
Kleine Gen-Panels	Spezifische Gene	–	+	+++	Monogene Erkrankung mit klar definierten krankheitsassoziierten Genen (z. B. Noonan-Syndrom, MODY)
CES	Spezifische krankheitsassoziierte Gene	–	+++	+++	Breites Indikationsspektrum (auf bekannte krankheitsassoziierte Gene begrenzt)
WES	Genom (kodierende Bereiche)	–	+++	+++	Breites Indikationsspektrum
WGS ^a	Das gesamte Genom	–	+++	+++	Breites Indikationsspektrum

+++; ja; ++: nur bestimmte Veränderungen; +: sehr begrenzt möglich; –: nein

CNV Kopienzahlvarianten, **SNP** Engl. *Single-Nukleotid Polymorphism*, Deutsch: Einzelnukleotid-Polymorphismus, **Indel** Insertionen und Deletionen zusammengesetzt, **FISH** Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, **CGH** Engl.: *comparative genomic hybridization*; Deutsch: vergleichende genomische Hybridisierung, **MLPA** Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, **MS-MLPA** Methylierungsspezifische **MLPA**, **PWS** Prader-Willi-Syndrom, **AS** Angelman-Syndrom, **BWS** Beckwith-Wiedemann-Syndrom, **SRS** Silver-Russell-Syndrom, **CES** Clinical Exome Sequencing, klinisches Exom, **WES** Whole exome Sequencing, Exomsequenzierung, **WGS** Whole Genome Sequencing, Gesamt-Genom-Sequenzierung

^a Wird nicht als Routinediagnostik angeboten

werden. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Komplexität und die Tragweite der Thematik in vielerlei Hinsicht eine Herausforderung für betreuenden Arzt und den Patienten ist.

Die ACMG hat basierend auf den Veränderungen in den Genen, aus denen sich gezielt therapeutische oder präventive Maßnahmen ergeben, eine Liste von sog. *Actionable Genes* erarbeitet [16]. Wesentliche Gruppen der erblich bedingten Erkrankungen in dieser Liste betreffen erbliche Tumorpredispositionssyndrome, Herz-Kreislaufkrankungen (u. a. thorakale Aortenerweiterungen, Herzrhythmusstörungen und Kardiomyopathien) sowie einige Stoffwechselerkrankungen und die maligne Hyperthermie. Nach entsprechender Aufklärung und Dokumentation des Einverständnisses des Patienten kann sich hier ein Nutzen von genetischen Hochdurchsatz-Analysen ergeben.

Bei der Aufklärung des Patienten ist sein „Recht auf Nichtwissen“ zu berücksichtigen. Zusätzlich aufgedeckte Anlageträgerschaften für erblich bedingte Erkrankungen können bei einigen Patienten möglicherweise zu einer starken persönlichen Belastung führen.

In der **Tab. 4** sind die Detektionsmöglichkeiten und die Indikationsbereiche unterschiedlicher genetischer Untersuchungen zusammengefasst.

Nicht-invasive pränatale Diagnostik (NIPT)

Ein weiterer Anwendungsbereich der NGS-Technologie ist die nicht-invasive pränatale Testung (NIPT). Zellfreie fetale DNA (cfDNA) aus dem Trophoblastengewebe der Plazenta ist im Plasma von Schwangeren nachweisbar. Die Menge steigt im Verlauf der Schwangerschaft. Sie macht etwa 5–13% der zellfreien DNA im Blut der Schwangeren aus. Zwei Stunden nach Geburt ist keine fetale DNA mehr im Blut der Mutter nachweisbar. Mit dieser Untersuchung können aktuell Chromosomenfehlverteilungen der Chromosomen 21, 18, 13, der Geschlechtschromosomen oder bestimmte Mikrodeletionen analysiert werden [17]. Das Screening kann ab der 10. SSW durchgeführt werden. Im Vergleich zum herkömmlichen Ersttrimester-Screening sind die Sensitivität

NIPT an zellfreier fetaler DNA zum Nachweis von Trisomie 21, 18, 13 und Fehlverteilungen der Geschlechtschromosomen sowie bestimmter Mikrodeletionssyndrome

und die Spezifität der NIPT-Untersuchungen deutlich höher und die Falsch-Positiv-Rate, z. B. für die Trisomie 21 deutlich geringer. Es handelt sich um einen Screening-Test, daher wird bei jedem auffälligem Ergebnis ein invasiver diagnostischer Test zur Bestätigung des Ergebnisses dringend empfohlen.

Forschungsansätze, „nahe“ diagnostische Zukunft

Mit den neuen Methoden, die aktuell noch als Forschungsansatz verwendet werden, besteht die Hoffnung, dass die Diagnosestellung bei genetisch bedingten Störungen in Zukunft deutlich gesteigert werden kann.

Whole Genome Sequencing (WGS); Genomsequenzierung

Mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms kann der Großteil der humanen DNA analysiert werden. Hier werden auch die Sequenzdaten der nicht-kodierenden Abschnitte, d. h. der intronischen und regulatorischen Bereiche der Gene, gewonnen. Da für diese Analyse keine bestimmte Anreicherung notwendig ist, fällt die Abdeckung der verschiedenen Bereiche des Genoms gleichmäßiger aus. Eine Interpretation möglicher Veränderungen in nichtkodierenden Bereichen ist nach dem heutigen Stand des Wissens in den meisten Fällen ohne Zusatzuntersuchungen allerdings nicht möglich. Es wurde gezeigt, dass der Zugewinn der Detektionsrate von ursächlichen Mutationen mittels WGS im Vergleich zu den Daten im WES nur etwa 7 % ist [18]. Studien zeigten ebenfalls, dass aufgrund der gleichmäßigeren Abdeckung über das gesamte Genom, die Detektionsrate von Mutationen in den kodierenden Bereichen der Gene mit WGS höher ist als mit WES [19]. Allerdings liefert die WGS derzeit noch deutlich mehr VUS als eine WES, so dass ihr Zugewinn gegenüber einer Verunsicherung des Patienten durch mehr VUS genau abgewogen werden sollte.

RNA-Seq (sog. Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung)

Unter RNA-Seq, auch „Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung“ genannt, wird die Bestimmung der RNA-Sequenz mittels NGS-Methode bezeichnet. Alle kernhaltigen Zellen im menschlichen Körper haben identische Gene, die aber in unterschiedlichen Zelltypen ganz unterschiedlich exprimiert werden können und somit den Zellen spezifische Funktionen ermöglichen. Im engeren Sinn ist mit der Genexpression die Synthese von Proteinen gemeint. Bei der RNA-Seq werden die RNA-Moleküle in eine cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben und sequenziert, so dass Gewebe-spezifische Expressionsmuster identifiziert werden können. Hierdurch können auch zellspezifische Spleißvarianten, Fusionstranskripte oder Sequenzveränderungen nachgewiesen werden [20]. Eine Einschränkung dieser Methode ist die Gewinnung der Probe aus den verschiedenen Geweben, da diese nicht immer (einfach) zu isolieren sind. Im Bereich der Forschung wurden bereits die Transkriptome einzelner Zellen bestimmt.

Optical Mapping, Saphyr-System der Firma Bionano (Analyse der strukturellen Varianten mittels langer DNA-Fragmente)

Die Saphyr-Technologie kombiniert den NanoKanal-Array mit optischem Mapping extrem langer, hoch-molekularer DNAs. Hierzu werden DNA-Fragmente mit einer Größe von ca. 100–1200 Kilobasenpaare erzeugt. Dadurch ist der Nachweis von großen strukturellen (balancierten und nicht-balancierten) Veränderungen möglich, die mittels NGS-Methoden aufgrund der Analyse von kleinen DNA-Fragmenten meist nicht detektiert werden können. Auch können strukturelle Veränderungen detektiert werden, die aufgrund ihrer Größe bei einer herkömmlichen Chromosomenanalyse nicht erkannt werden können. Gegenüber der Array-CGH hat das *Optical Mapping* den Vorteil, dass einerseits auch balancierte Strukturvarianten nachgewiesen werden können und, dass das *Optical Mapping* auch häufig eine Aussage über die Position der Veränderung im Genom zulässt. Es werden genomweite strukturelle Veränderungen zwischen 500 bp bis zur Größe im Megabasenbereich detektiert. Es können homozygot und heterozygot vorliegende Insertionen und Deletionen, balancierte und unbalancierte Translokationen, Inversionen, Duplikationen

WGS: NGS basierte Analyse des gesamten menschlichen Genoms

RNA-Seq: NGS basierte Analyse des menschlichen Transkriptoms

und Kopienzahlvarianten detektiert werden. Diese können für unterschiedliche Krankheitsbilder ursächlich sein, wie z. B. Krebsleiden als auch Entwicklungsstörungen.

Single Molecule, Real-Time (SMRT) Sequenzierung (PacBio)

Die SMRT-Technologie ermöglicht die Sequenzierung und Detektion eines einzelnen DNA-Moleküls in einer spezifischen Reaktionskammer, die als *Zeromode Waveguide* (ZMW) bezeichnet wird. Am Boden jeder dieser Kammern befindet sich eine einzige aktive DNA-Polymerase mit einem einzelsträngigen DNA-Molekül. Sobald einer der vier verschiedenen dNTPs, die mit jeweils einem anderen Fluoreszenzstoff verbunden sind, an die einzelsträngigen DNA mit Hilfe der Polymerase bindet und somit die DNA-Synthese erfolgt, kann die DNA-Sequenzierung in Echtzeit (*Real-Time*) gemessen werden. Diese Reaktion findet parallel in tausenden Reaktionskammern gleichzeitig statt. Die Methode ermöglicht Sequenzierung von langen Reads von mehreren Kilobasenpaaren. Mit dieser Methode können eine WGS, strukturelle genomische Varianten (balancierte und unbalancierte), RNA-Sequenzierung sowie epigenetische Veränderungen analysiert werden [18].

Sequenzierung extrem langer DNA-Fragmente mittels Nanopore-Technologie

Die Nanopore-Sequenzierung ermöglicht die Sequenzierung einzelner nativer DNA-(genomische DNA, bereits amplifizierte DNA, cDNA) oder RNA-Moleküle in Echtzeit ohne PCR-Amplifizierung. Bei der Nanopore-Technologie wird ein DNA-Molekül durch eine Nanopore geschleust (Durchmesser von 10^{-9} m). Im System kann durch die Präsenz der elektrolytischen Lösung und eines konstanten elektrischen Feldes ein elektrischer Fluss beobachtet werden. Die Sequenzierung ist durch Änderung des elektrischen Flusses mit jeder Base, die durch die Nanopore fließt, möglich. Mit dieser Methode ist es möglich, „ultra“ lange Reads von bis zu 2 Mbp zu erzeugen. Somit können mit dieser Methode Repeaterkrankungen, Kopienzahlvarianten und epigenetische Veränderungen detektiert werden. Hierfür gibt es heutzutage auch tragbare, USB-geeignete (MinION) oder größere Sequenzierer.

Methoden der Präimplantationsdiagnostik

Die Präimplantationsdiagnostik bezeichnet jede Methode zur genetischen Untersuchung entwicklungsfähiger Zellen, bevor sie in den Körper der Frau eingebracht werden. Es wird die Polkörperdiagnostik (PKD) von der Präimplantationsdiagnostik im engeren Sinne (PID) unterschieden. Da Polkörper keine entwicklungsfähigen Zellen darstellen, ist die genetische Abklärung an aus Polkörpern gewonnener DNA nicht durch das Fortpflanzungsmedizingesetz aus dem Jahr 2015 reglementiert.

Polkörperdiagnostik (PKD)

Die PKD ist eine Untersuchungsmethode, mit der im Rahmen einer künstlichen Befruchtung eine indirekte Untersuchung der entnommenen Eizelle erfolgt. Bei Menschen entstehen durch die Reife- und Reduktionsteilung der Eizelle zwei bis drei Polkörper, die keine Bedeutung für die weitere embryonale Entwicklung haben und an der befruchteten Eizelle haften. Durch in-vitro Fertilisation (IVF) wird die Eizelle befruchtet. Vor der Verschmelzung von mütterlichem und väterlichem Vorkern (Syngamie) werden die Polkörper entnommen. Nach Vermehrung der DNA der Polkörper durch eine WGA (sog. *Whole genome amplification*), kann die DNA untersucht werden. Mit dieser Methode können sowohl Rückschlüsse auf chromosomale Fehlverteilungen in der Eizelle/Embryo erhalten werden als auch monogene Erkrankungen (vor allem maternal vererbte autosomal-dominante und X-chromosomale Erkrankungen, u. U. auch autosomal-rezessive Erkrankungen) untersucht werden [21].

PKD: Untersuchung beider Polkörper, indirekte Untersuchung der Eizelle, maternal vererbte Erkrankungen; in Österreich uneingeschränkt erlaubt

PID: zur Identifizierung der Anlagerträgerschaft familiär bekannter genetischer Veränderungen für schwerwiegende Erbkrankheiten des Kindes geeignet und unterliegt dem Fortpflanzungsmedizingesetz

Tab. 5 Angebot der genetischen Untersuchungen im Institut für Medizinische Genetik der Medizinischen Universität Wien

Chromosomenanalyse mit/ohne FISH-Untersuchung
Array-CGH
Repeat-Analysen (u. a. Fragiles-X-Syndrom, Chorea Huntington, spinocerebelläre Ataxien)
Sanger-Sequenzierung (familiäre Mutation/kleine Gene)
MLPA-Analyse (für eine Mehrzahl von Genen)
Kleine Multi-Gen-Panels mittels NGS-Methode
Klinisches Exom (<i>Clinical Exome Sequencing</i> , CES)
Exomsequenzierung (<i>Whole Exome Sequencing</i> , WES)

Präimplantationsdiagnostik (PID)

Die PID ist eine direkte Methode zur Untersuchung der genetischen Konstitution an einzelnen Blastomeren des Embryos im 8-Zell Stadium am Tag 3 bzw. an den Trophektodermzellen am Tag 5 nach IVF. Diese Untersuchungsmethode ist seit dem 24. Februar 2015 in Österreich erlaubt. Die PID wird in Österreich ausschließlich an Zellen des Trophektoderms durchgeführt. Die Präimplantationsdiagnostik wird dabei zur Erkennung von Erbkrankheiten oder Chromosomenanomalien angewendet. Ziel der Untersuchung ist es, einen Embryo ohne nachweisbare Chromosomenanomalie bzw. ohne Risiko für die Entwicklung der familiär bekannten erblichen Erkrankung in die Gebärmutter der Frau einzupflanzen. Eine PID darf in Österreich nur *in einer hierfür speziell zugelassenen Einrichtung durchgeführt werden*. Parallel zur ärztlichen Aufklärung und Beratung in Bezug auf die medizinisch unterstützte Fortpflanzung ist vor der Durchführung einer PID eine umfassende Aufklärung und Beratung¹ durch einen in Humangenetik/medizinischer Genetik ausgebildeten Facharzt oder einen für das Indikationsgebiet zuständigen Facharzt vorgesehen. Eine PID ist nur zulässig, wenn *auf Grund der genetischen Disposition* zumindest *eines Elternteils* (z. B. ein Elternteil ist Träger einer Erbkrankheit) die *ernste Gefahr besteht*, dass es zu einer *Fehl- oder Totgeburt* oder zu einer schwerwiegenden Erbkrankheit *des Kindes kommt*. Die Bestimmung des Geschlechts im Rahmen einer Präimplantationsdiagnostik ist nur zulässig, wenn die Erbkrankheit geschlechtsabhängig ist [22].

Angebot im Institut für Medizinische Genetik der MUW

Im Institut für Medizinische Genetik der Medizinischen Universität Wien bieten wir das gesamte Spektrum routinemäßiger zytogenetischer/molekularzytogenetischer als auch molekulargenetischer Untersuchungen an (■ Tab. 5).

Bei allen Anforderungen ist die Indikationsstellung mit ausführlicher Beschreibung der Symptomatik, Angaben zu den Ergebnissen der apparativen bzw. laborchemischen Diagnostik sowie Angaben zur auffälligen bzw. unauffälligen Familienanamnese für die Auswertung der Daten von großer Bedeutung. Bei der Auswertung von CES- bzw. WES-Daten ist das Vorhandensein der maternalen und paternalen DNA zum Abgleich der identifizierten Veränderungen sehr wichtig. Diese sollten gleichzeitig mit der kindlichen DNA zugeschickt werden.

Korrespondenzadresse

Assoc. Prof. Priv. Doz. Dr. med. Franco Laccone

Institut für Medizinische Genetik, Zentrum für Pathobiochemie und Genetik, Medizinische Universität Wien
Währinger Straße 10, 1090 Wien, Österreich
franco.laccone@meduniwien.ac.at

Funding. Open access funding provided by Medical University of Vienna.

¹ Aufgrund der technischen Komplexität einer PKD/PID zum Ausschluss einer monogen vererbten Erkrankung, ist jedoch eine Beratung durch einen in dieser Technologie sehr erfahrenen Humangenetiker unabdingbar, um die Möglichkeiten und Grenzen dieser Methodik den Familien/ Paaren verständlich und ausführlich zu erläutern (persönliche Meinung der Verfasser).

Interessenkonflikt. M. Smogavec, J. Neesen und F. Laccone geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Open Access Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>) veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Literatur

1. Rechtsinformationssystem (RIS) des Bundes. Gesamte Rechtsvorschrift für Gentechnikgesetz, Fassung vom 25.04.2019. 2019. <https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10010826>. Zugegriffen: 11.06.2019
2. Deutsche Gesellschaft für Humangenetik e.V. (GfH) und Berufsverband Deutscher Humangenetiker e.V. (BVDH). S2k-Leitlinie Humangenetische Diagnostik und genetische Beratung. medgen. 2011;23:281–2323.
3. Spinner NB, Ferguson-Smith MA, Ledbetter DH. Cytogenetic analysis. In: Rimoin D, Peyerit R, Korf B, Hrsg. Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics. Cambridge: Academic Press; 2013. S. 4700.
4. McGowan J. An international system for human cytogenomic nomenclature (ISCN). Basel: Karger; 2016. S. 139.
5. Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. Ann N Y Acad Sci. 2009;1151:157–1166.
6. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci Usa. 1977;74:5463–55467.
7. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 2002;30:e57.
8. Yang Y, Muzny DM, Xia F, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. JAMA. 2014;312:1870–11879.
9. Kuperberg M, Lev D, Blumkin L, et al. Utility of whole exome sequencing for genetic diagnosis of previously undiagnosed pediatric neurology patients. J Child Neurol. 2016;31:1534–11539.
10. Wortmann BS, Koolen DS, Smeitink JA, van den Heuvel L, Rodenburg RJ. Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. J Inherit Metab Dis. 2015;38:437–4443.
11. Mahler EA, Johannsen J, Tsikas K, et al. Exome sequencing in children. Dtsch Arztebl Int. 2019;116:197–1204.
12. Alfares A, Alfadhel M, Wani T, et al. A multicenter clinical exome study in unselected cohorts from a consanguineous population of Saudi Arabia demonstrated a high diagnostic yield. Mol Genet Metab. 2017;121:91–995.
13. Monies D, Abouelhoda M, Al-Sayed M, et al. The landscape of genetic diseases in Saudi Arabia based on the first 1000 diagnostic panels and exomes. Hum Genet. 2017;136:921–39.
14. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015;17:405–4424.
15. Plon SE, Eccles DM, Easton D, et al. IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. Hum Mutat. 2008;29:1282–11291.
16. Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. Genet Med. 2017;19:249–2255.
17. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2015;45:249–2266.
18. Alfares A, Aloraini T, Subaia LA, et al. Whole-genome sequencing offers additional but limited clinical utility compared with reanalysis of whole-exome sequencing. Genet Med. 2018;20:1328–11333.
19. Meienberg J, Bruggmann R, Oexle K, Matyas G. Clinical sequencing: is WGS the better WES? Hum Genet. 2016;135:359–3362.
20. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet. 2009;10:57–563.
21. Montag M, van der Ven K, van der Ven H. Polkörperdiagnostik. Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch. 2009;49:62–668.
22. Rechtsinformationssystem (RIS) des Bundes. Gesamte Rechtsvorschrift für Fortpflanzungsmedizinengesetz, Fassung vom 06.05.2019. 2019. <https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10003046>. Zugegriffen: 10.06.2019

Hinweis des Verlags. Der Verlag bleibt in Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutsadressen neutral.

DFP-E-Learning

Bitte beachten Sie:

Im Rahmen des Diplom-Fortbildungsprogramms ist es möglich, durch das E-Learning in der Wiener Klinische Wochenschrift Education Punkte für das DFP zu erwerben.

1. Nach der Lektüre des DFP-Artikels beantworten Sie bitte die Multiple-Choice-Fragen. Eine Frage gilt dann als richtig beantwortet, wenn alle möglichen richtigen Antworten angekreuzt sind. Bei positiver Bewertung (66 Prozent der Fragen) werden Ihnen drei DFP-Fachpunkte für das Sonderfach Innere Medizin zuerkannt.

2. Schicken Sie diese Seite entweder per Post oder Fax an die Redaktion von Springer Medizin Wien (z. Hd. Susanna Hinterberger), Prinz-Eugen-Straße 8-10, 1040 Wien, Fax: 01 / 330 24 26.
3. Einsendeschluss: 30.04.2020

4. Internet: Sie haben die Möglichkeit, den Fragebogen unter www.SpringerMedizin.at/ herunterzuladen oder unter E-Learning auf der Website der Österreichischen Akademie der Ärzte www.meindfp.at auszufüllen.

DFP-Fragen

? Ein Paar stellte sich mit unerfülltem Kinderwunsch und habituellen Aborten vor. Bei der Frau wurde im Rahmen der genetischen Abklärung der Aborte eine Robertson-Translokation (balancierte Translokation) zwischen den Chromosomen 13 und 14 festgestellt. Mit welcher der folgenden Methoden war die Detektion dieser Translokation möglich?

- Chromosomenanalyse
- Array-CGH
- Sanger-Sequenzierung
- MLPA-Analyse
- Whole-Exome-Sequencing (WES)

? Die Array-CGH-Analyse hat bei einem Kind mit Entwicklungsverzögerung eine krankheitsverursachende terminale Deletion auf dem Chromosom 1 und eine krankheitsverursachende terminale Duplikation auf dem Chromosom 3 ergeben. Welche Untersuchungen zur Abschätzung des Wiederholungsrisikos für weitere Schwangerschaften der Eltern sind bei den Eltern des Kindes sinnvoll?

- Array-CGH wie bei dem Kind
- MLPA-Analyse der Gene in der beim Kind deletierten und duplizierten Region

- WES-Analyse der entsprechenden Regionen
- Chromosomenanalyse mit Metaphase-FISH-Analyse
- keine, da bei solchen Veränderungen kein erhöhtes Risiko besteht

? Welche genetische Veränderung kann mit einer Sanger-Sequenzierung detektiert werden?

- unbalancierte Translokation zwischen Chromosom 2 und Chromosom 9
- Punktmutation im *MSH6*-Gen
- niedriggradiges Mosaik von 4% im *NF1*-Gen
- Deletion mehrerer Exons des *BRCA1*-Gens auf dem Chromosom 17
- UPD bei Prader-Willi-Syndrom

? Welche der vorliegenden genetischen Veränderungen führt zum Prader-Willi-Syndrom?

- eine Mutation im *FMR1*-Gen
- eine Mikroduplikation auf dem X-Chromosom
- eine maternale uniparentale Disomie des Chromosoms 15
- eine Duplikation der imprimierten Prader-Willi-Syndrom-Region
- eine Translokation zwischen Chromosom 2 und dem Y-Chromosom

? Welche molekulargenetische Untersuchung eignet sich besonders für die Detektion des Fragilen-X-Syndroms?

- Chromosomenanalyse
- Array-CGH
- eine Multi-Gen-Panel-Untersuchung in der auch das *FMR1*-Gen inbegriffen ist
- Analyse des spezifischen Repeats im *FMR1*-Gen
- Whole-Exome-Sequencing (WES)

? Die MLPA-(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)-Analyse wird vor allem für die Detektion folgender Veränderung angewendet:

- Repeaterkrankung
- niedriggradige Keimbahnmosaik
- Deletion eines Exons
- bekannte balancierte Translokation
- unbekannte unbalancierte Translokation

? Bei einer 34-jährigen Patientin mit Mammakarzinom wurde eine Variante unklarer Signifikanz (VUS, Klasse 3) im *BRCA1*-Gen detektiert. Was bedeutet diese Sequenzveränderung für die Patientin und ihre Familie?

- Die identifizierte VUS im *BRCA1*-Gen kann als Ursache des Hereditären Mamma- und Ovarialkarzinoms bei der Patientin betrachtet werden.

- Die Ursache eines möglichen erblichen Tumorleidens bei der Patientin bleibt mit dieser Veränderung ungeklärt.
- Die detektierte VUS im *BRCA1*-Gen hat einen wichtigen prädiktiven Wert für die Tumorentstehung bei Familienmitgliedern.
- Eine Untersuchung der VUS bei weiteren Betroffenen in der Familie würde nicht zur besseren Einschätzung der Pathogenität dieser VUS beitragen.
- Eine Re-Klassifizierung einer VUS ist in Zukunft nicht möglich.

? Mit der Exomsequenzierung (*Whole-Exome-Sequencing*; WES) mittels *NGS*-Technologie, die aktuell in der Diagnostik durchgeführt wird, ist es möglich folgende genetische Veränderung zu detektieren:

- Verlängerung des CAG-Trinukleotidrepeats im *Huntingtin*-Gen.
- eine balanciert vorliegende Translokation zwischen zwei chromosomalen Abschnitten.
- ein Imprinting-Defekt als Ursache des Silver-Russell-Syndroms.
- eine kleine Deletion von vier Basen im *MSH2*-Gen.
- eine tief-intronische Mutation.

? Die Polkörperdiagnostik (PKD) ermöglicht:

- Detektion einer paternal vorhandenen pathogenen Sequenzveränderung.
- Ausschluss beider vorliegender pathogener Sequenzveränderungen bei bekannter elterlicher Trägerschaft einer autosomal-rezessiven Erkrankung.
- Detektion einer vom Vater vererbten X-chromosomal gebundenen Erkrankung.
- Detektion von maternal vererbter pathogener Mutation im Dystrophin-Gen, die beim männlichen Geschlecht zur Muskeldystrophie Typ Duchenne führt.
- ist in Österreich gesetzlich nicht erlaubt.

? Welche Aussage über Zusatzbefunde trifft zu?

- Zusatzbefunde stehen im direkten Zusammenhang mit der Indikation für die Untersuchung.
- Ein für den Patienten relevanter Zusatzbefund muss dem Patienten immer mitgeteilt werden.
- Der Patient hat das Recht auf Nichtwissen und muss nicht über die Zusatzbefunde informiert werden.
- Ein Zusatzbefund ergibt sich häufiger bei der *MLPA*-Analyse als bei einer WES-Untersuchung.
- Zusatzbefunde dürfen rechtlich gesehen dem Patienten nicht mitgeteilt werden.

> Bitte ausfüllen

Absender (Bitte gut leserlich ausfüllen)

Name: Frau Herr

Straße/Gasse:

Ort/PLZ: Ich besitze ein gültiges ÖÄK-Diplom

Telefon: Altersgruppe: <30 51–60

31–40 >60

ÖÄK-Nummer: _ _ _ _ _

41–50