



NGS (next generation sequencing) oder die gute alte Sanger-Sequenzierung? – Was ist zu beachten?

Einleitung

Unter NGS (Next Generation Sequencing) versteht man Verfahren der Hochdurchsatz-Sequenzierung, die es erlauben, hunderte Gene parallel zu analysieren, und die sowohl in der Forschung als auch zunehmend in der medizinischen Diagnostik eingesetzt werden [1, 2]. Aus dem wissenschaftlichen Umfeld hervorgehende Untersuchungen müssen klar als solche ausgewiesen sein, dürfen nicht ohne Validierung des Verfahrens und ohne die Beachtung einschlägiger Leitlinien diagnostisch eingesetzt werden [3, 4]. Seit dem letzten Jahrzehnt haben diese Technologien die molekulargenetische Diagnostik nicht nur hinsichtlich der Reduktion von Zeitaufwand und Kosten, sondern auch im Sinne von Präzisionsmedizin und personalisierten Behandlungsansätzen (z. B. Tumordiagnostik, zielgerichtete Therapien, nichtinvasive pränatale Diagnostik, Prävention) revolutioniert, gehen aber auch mit folgenden großen Herausforderungen einher:

- Speicherung riesiger Datenmengen und Notwendigkeit effizienter bioinformatischer Analysen, um aus den Sequenzierdaten biologisch und diagnostisch relevante und sinnvolle Informationen herauszufiltern.
- Interpretation des Befundes hinsichtlich klinischer bzw. therapeutischer Relevanz (fragliche Pathogenität verschiedener Varianten in unter-

- schiedlichen Genen, Limitationen betreffend Methodik und Qualität)
- Ethische Aspekte im Rahmen der genetischen Beratung der untersuchten Personen vor und nach der genetischen Analyse betreffen nicht nur „Zusatzbefunde“ und unklare Ergebnisse, sondern auch das Recht auf Nichtwissen (nur von der Minderheit der untersuchten Personen in Anspruch genommen) und die Rekonfiguration der Definition von Krankheit (prädiktive Befunde).
- Trotz einer dramatischen Senkung der Sequenzierungskosten durch NGS-Verfahren wird diskutiert, dass ein starker Anstieg NGS-bedingter Zusatzbefunde wiederum die damit verbundenen Kosten im Gesundheitswesen (erhöhter Bedarf an Beratung, klinisch-diagnostischen und laborchemischen Untersuchungen) und bei Krankenversicherungen markant ansteigen lässt und eine ökonomische Herausforderung darstellen wird.

Zur Klärung NGS-bezogener Anwendungen und Begriffe soll nachfolgende Auflistung dienen:

- *ChIP-Seq* (chromatin immuno precipitation DNA sequencing) untersucht DNA-Protein-Interaktionen mittels Chromatin-Immunpräzipitation und Sequenzierung regulatorischer Sequenzen der DNA, wie z. B. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren oder Proteine der Histonmodifikation.

- *CES* (clinical exome sequencing) – gezielte Sequenzierung ausgewählter Protein-kodierender (exonischer) Bereiche von Genen, von denen krankheitsverursachende Varianten bekannt sind.
- *Methyl-Seq* – Ähnlich wie bei ChIP-Seq brachte NGS auch einen Boost

Key points

- NGS (Next Generation Sequencing) sind Hochdurchsatzverfahren, die die parallele Sequenzanalyse einer Vielzahl von Genen unter Verwendung bioinformatischer Technologien erlauben.
- Essenziell für die Veranlassung der Genanalyse ist das Wissen um deren Aussagekraft (Limitationen, analytische Qualität). Die gewählte Methodik muss für die Bearbeitung der Fragestellung geeignet sein.
- Bei diagnostischer Gleichwertigkeit sollte nach Möglichkeit das Verfahren eingesetzt werden, das mit der geringsten Wahrscheinlichkeit von Zusatzbefunden verbunden ist.
- Die Kenntnis der HGVS-Nomenklatur und der Klassifikationskriterien genetischer Varianten sind die Voraussetzung für das Verständnis und die korrekte Interpretation eines genetischen Befundes.
- Der Umgang mit Zusatzbefunden und unklaren Genvarianten muss vor der Durchführung der Analyse festgelegt sein – sowohl seitens des Labors als auch im Rahmen der genetischen Beratung der zu untersuchenden Personen.
- Eine Datenschutz- und Gentechnik-konforme Dokumentation, Klassifikation und Ablage der genetischen Befunde ist verpflichtend, aber immer noch herausfordernd.

für epigenetische Untersuchungen von z. B. DNA-Methylierungen, die eine wichtige Rolle nicht nur bei physiologischen Prozessen (Imprinting), sondern auch bei Erkrankungen spielen.

- **HGVS** (Humane Genome Variation Society) – Vorgaben zur standardisierten Nomenklatur von Genvarianten, die dadurch leichter identifizierbar und vergleichbar werden.
- **HPO** (human phenotype ontology) – eine Auswahl (Liste) von Genen, die mit einer bestimmten klinischen Symptomatik (Phänotyp) verbunden sind, kann als Grundlage von erkrankungsspezifischen Gen-Panels (siehe oben z. B. Phäochromozytom) oder zur gezielten Auswertung von Whole-Exome-Analysen verwendet werden.
- **RNA-Seq** – Die Analyse der Gesamtheit der mRNA, auch als Transkriptom bezeichnet, kann über die Expression unterschiedlicher Varianten (entsprechend der Genaktivität) z. B. in verschiedenen Geweben Auskunft geben. RNA muss vor einer Sequenzierung in DNA umgeschrieben werden.
- **Target sequencing (Multigen-Panel)** – Sequenzierung von Genen, von denen pathogene Varianten eines oder mehrerer spezifischer Krankheitsbilder bekannt sind (z. B. Hyperlipidämie-, oder Phäochromozytom/Paragangliom-Panel, und viele mehr).
- **TRIO-Analyse** – Zusätzlich zur erkrankten Person werden deren Eltern in die genetische Analyse miteinbezogen.
- **Unklare Ergebnisse** – Wenn Varianten nicht als eindeutig benigne oder pathogen klassifiziert werden können, werden sie als Varianten unklarer Bedeutung (variants of unknown significance – C3) eingestuft. Können Deletionen, Insertionen, Duplikationen nicht eindeutig nachgewiesen oder eingegrenzt werden, sind gegebenenfalls weiterführende Analysen unter Verwendung ergänzender Methoden durchzuführen.
- **WES** (whole exome sequencing) – erfasst die Protein-kodierenden

(exonischen), nicht jedoch die intronischen bzw. regulatorischen Bereiche des Genoms.

- **WGS** (whole genome sequencing) – erfasst auf DNA-Ebene das gesamte Genom inklusive nicht-kodierender Bereiche.
- **Zusatzbefunde (Nebenbefunde)** – Befunde, die nicht mit der ursprünglichen Fragestellung in Verbindung stehen und dennoch für die Gesundheit der untersuchten Personen oder ihrer Verwandten von Bedeutung sein können. Dazu gehören ein eventueller Überträgerstatus für eine rezessive Erkrankung oder bekannt pathogene Genvarianten (z. B. für Brustkrebs), die aber nicht in Zusammenhang mit der zur Analyse führenden bestehenden Symptomatik stehen. Es muss sich dabei um Varianten handeln, die klar krankheitsverursachend sind und für die präventive oder therapeutische Konsequenzen für die Untersuchten oder deren Familie bestehen [5, 6]. Weiters ist gefordert, dass derartige Ergebnisse auch analytisch gesichert und wissenschaftlich validiert sind. Welche Positivlisten (Experten oder ACMG-Konsortium) verwendet werden, wird unterschiedlich gehandhabt und beeinflusst die Anzahl der zu erwartenden Zusatzbefunde.

Indikationsstellung

Dass die Durchführung von genetischen Analysen im Sinne des Gentechnikgesetzes § 65 nur in hierfür zugelassenen Einrichtungen und nur auf Veranlassung von in Humangenetik/medizinischer Genetik ausgebildeten Fachärzt:innen oder von für das Indikationsgebiet zuständigen behandelnden oder diagnosestellenden Fachärzt:innen nach entsprechender genetischer Beratung erfolgen darf, wurde schon in früheren Artikeln näher ausgeführt. Eine kurze Zusammenfassung der Symptomatik, der Verdachtsdiagnose und der Fragestellung ist für alle Zuweisungen genetischer Analysen unabdingbar. Gerade aber bei NGS-Verfahren ist es besonders wichtig, seitens der Zuweis:innen auch mitzuteilen, ob primär eine erbliche Ätiologie angenom-

men wird oder ob die genetische Untersuchung eher aus differenzialdiagnostischen Gründen veranlasst wird.

Vor der Durchführung der Analyse sollte die jeweilige Anforderung auch vom entsprechenden Labor auf Plausibilität geprüft werden, insbesondere ob die angeforderte Methodik zur Bearbeitung der Fragestellung geeignet ist. So ist auch an dieser Stelle anzuführen, dass NGS-Verfahren für den gezielten Nachweis oder Ausschluss von bereits bekannten familiären pathogenen Genvarianten in den meisten Fällen nicht zielführend sind. Seitens des die Genanalyse Veranlassenden muss bedacht werden, dass je umfangreicher die Untersuchung angelegt ist (z. B. WGS, WES, CES), desto größer auch die Wahrscheinlichkeit von Zusatzbefunden und unklaren Ergebnissen ist. Daher ist von den die Genanalyse veranlassenden Fachärzt:innen im Rahmen der Beratung der zu untersuchenden Personen zu klären und zu dokumentieren, wie mit Zusatzbefunden (opt-in, opt-out) umgegangen werden soll. Auf das Recht des Nichtwissens ist hinzuweisen und der Schutz nicht einwilligungsfähiger Personen muss berücksichtigt werden. Ein Procedere betreffend des Umganges mit Zusatzbefunden muss auch seitens des Labors festgelegt und für Zuweis:innen einsehbar sein. Im klinisch-diagnostischen Kontext sollte bei diagnostischer Gleichwertigkeit nach Möglichkeit das Verfahren eingesetzt werden, das mit der geringsten Wahrscheinlichkeit von Zusatzbefunden verbunden ist [4, 5].

Wenn zusätzlich zur Probe der erkrankten Person parallel auch eine „Vergleichsuntersuchung“ der Proben der Eltern durchgeführt wird, spricht man von einer „Trio“-Analyse. Diese dient dazu, das Auffinden neu bei Indexpatient:innen aufgetretener pathogener Varianten bzw. den Ausschluss nicht neu entstandener seltener (aber nicht pathogener) Varianten zu erleichtern. Dies bedeutet aber natürlich primär auch eine Erhöhung der Kosten und wiederum die Möglichkeit von Zusatzbefunden bei den Eltern.

Welche Kriterien und Aspekte bei der Veranlassung einer Sequenzanalyse zu beachten sind, soll nachfolgend dargelegt werden.

Einzelgenanalyse

Diese Form der genetischen Analyse, meist auf der Methodik nach Sanger (auch als Kettenabbruch- oder Didesoxymethode bezeichnet) basierend, stellte für lange Zeit auf vielen Gebieten den Goldstandard der genetischen Diagnostik betreffend Sequenzanalysen dar. Praktisch bedeutet das, dass der/die die molekulargenetische Analyse veranlassende Fachärzt:in eine Sequenzanalyse für ein oder mehrere Gene wählt, die für die vermutete Erkrankung bzw. klinische Symptomatik als am wahrscheinlichsten kausal erscheint oder bereits bekannt ist. Die Analyse verschiedener in Frage kommender Gene erfolgt dann nach Wahrscheinlichkeit der Kausalität in einem Stufenverfahren.

Prinzip. Die Einzelgenanalyse mittels Sanger-Sequenzierung basiert üblicherweise auf einer oder mehreren Polymerasekettenreaktionen (PCR), mit denen die Regionen (Exons, Exon-/Intron-Übergänge) von Interesse mit spezifischen Primern amplifiziert werden. Nach Reinigung der PCR-Produkte erfolgt die Sequenzierung z. B. im Kapillarsequenzierer (in Abhängigkeit vom Gerät können Sequenzen von 300–1000 bp Länge gelesen werden), anschließend die Auswertung mit einer Analysensoftware. Die Methodik erlaubt die Detektion einzelner Nukleotidsubstitutionen (Missense-, Nonsense-, Splice-Site-Mutationen) und kleiner Deletions- und Insertionsdefekte, Nukleotid-Repeat-Expansionen, große Deletionen, Konversionen und Duplikationen können jedoch nicht erfasst werden. Um diese zu detektieren, wird häufig die MLPA („multiplex ligation dependent probe amplification“) verwendet, die eine von mehreren Methoden der Kopienzahlanalyse darstellt, aber durch die Wahl spezifischer Sonden zusätzlich auch bestimmte bereits bekannte Genvarianten detektieren kann [7].

Analytische Sensitivität und Limitationen. Sensitivität und Limitationen der für die genetischen Analysen verwendeten Methoden sind in jedem genetischen Befund anzuführen, da sonst ei-

ne Interpretation der Ergebnisse bzw. eine umfassende Beratung des Ratsuchenden nicht möglich ist. Stellen große Deletionen/Konversionen bzw. Duplikationen für die zu diagnostizierende Erkrankung relevante pathogene Varianten dar (z. B. AGS, *MEN1*), ist eine Sanger-Sequenzierung allein nicht ausreichend, sodass eine aussagekräftige Analyse betreffend Überträgerstatus oder Erkrankung auch eine Dosisanalyse (z. B. MLPA, siehe oben) beinhalten muss. Üblicherweise wird bei einer derartigen diagnostischen Untersuchung eine analytische Sensitivität von >98 % erreicht.

Interpretation. Zusatzbefunde sind nicht zu erwarten, es können aber bislang nicht als benigne oder pathogen klassifizierte seltene Varianten detektiert werden, die als *Variante unklarer Bedeutung* (VUS – „variants of unknown significance“, C3) eingestuft werden müssen. Ob derartige Varianten im Befund bzw. im Beratungsgespräch mitgeteilt werden, wird unterschiedlich gehandhabt.

- Bei komplexen Genen (*Pseudogene etc.*) wie z. B. dem *CYP21A2*-Gen, dessen pathogene Varianten kausal für das adrenogenitale Syndrom (AGS) aufgrund eines 21-Hydroxylase-Defekts sind, ist auch aktuell noch die Sanger-Sequenzierung im Kombination mit einer MLPA der Goldstandard (EMQN-Leitlinie), der von über 90 % der am europäischen AGS-Ringversuch (EMQN) teilnehmenden Laboratorien verwendet wird [7, 8].
- Eine Einzelgenanalyse ist auch immer noch die Methodik der Wahl, wenn einzelne in Indexpatient:innen bereits detektierte bekannte pathogene Varianten in weiteren Familienmitgliedern untersucht werden sollen und eine entsprechende Einzelgenanalyse zur Verfügung steht.

NGS

Die teilweise bereits angeführten Anwendungen werden einerseits anhand der untersuchten Bereiche (kodierend, nichtkodierend, regulatorisch, etc.) unterschieden (WGS, WES, CES, Gen-Panel), wer-

den aber auch hinsichtlich Qualität bzw. analytischer Genauigkeit und Sequenzierertiefe (Depth, Coverage) klassifiziert (Qualitätsstufen A–C).

WGS. Das alle Bereiche (Protein-kodierende wie auch -nichtkodierende) des Genoms erfassende WGS ist die erfolgversprechendste Methodik, um neue Gene und krankheitsrelevante Sequenzen zu identifizieren. Aufgrund der riesigen Menge untersuchter und analysierter Daten ist jedoch die Wahrscheinlichkeit für Zusatz- und unklare Befunde sehr hoch, sodass diese Methodik großteils noch in der Forschung und lediglich bei ausgewählten diagnostischen Fragestellungen zum Einsatz kommt.

WES. Eine hohe Wahrscheinlichkeit für Zusatz- und unklare Befunde gibt es auch bei dieser Anwendung, obwohl hier lediglich die Protein-kodierenden Bereiche untersucht werden. Diese stellen zwar nur ca. 1–2 % des gesamten Genoms dar, bedeuten aber immer noch die Analyse von ca. 20.000 Genen, anhand derer ca. 85 % der Erkrankungen abgedeckt werden können. Daher stellt WES zwar eine weiter verbreitete Diagnostikanwendung dar als WGS, hat gegenüber diesem aber auch den Nachteil, dass eine Anreicherung des Exoms erfolgen muss, die bezüglich der vollständigen Abdeckung der untersuchten Bereiche oft Probleme aufwirft. Letztere Schwierigkeit gilt für alle NGS-Anwendungen, die auf die Analyse der exonischen Bereiche ausgerichtet sind.

CES. Clinical Exome Sequencing beinhaltet eine gezielte Untersuchung des Protein-kodierenden Bereichs von Genen (ca. 5000 bis 7000), für die eine Assoziation mit einer Erkrankung als gesichert gilt. Grundlage für die Auswahl dieser Gene sind neben Leitlinien für die entsprechenden Erkrankungen auch Datenbanken wie OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), Orphanet (Portal für seltene Krankheiten und Orphan Drugs) oder RefSeq-Projekte, z. B. MANE (Matched Annotation from the NCBI and EMBL-EBI) Plus Clinical. CES, WES und WGS werden insbesondere für Erkrankungen mit un-

spezifischen Symptomen genutzt und sind so differenzialdiagnostisch sehr wertvoll. Die Ausrichtung von CES auf diese krankheitsassoziierten Gene bietet gegenüber der Analyse des kompletten Exoms (WES) den Vorteil der geringeren Kosten, einer schnelleren Bearbeitungszeit und vor allem auch einer einfacheren Interpretation der Daten. Weiters steigert eine deutlich höhere Abdeckung (Coverage) der krankheitsrelevanten Gene die Wahrscheinlichkeit, die genetische Ursache einer Erkrankung nachzuweisen. Nachteil ist, dass pathogene Varianten in Genen, die bislang nicht mit Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wurden, mittels CES nicht erfasst werden können.

Multi-Gen-Panel. Krankheitsspezifische Multi-Gen-Panels (Targeted Sequencing), bei denen der exonische Bereich einer begrenzten Auswahl von Genen, für die krankheitsverursachende Varianten bekannt sind, untersucht werden, haben den Vorteil, dass die Wahrscheinlichkeit für Zusatzbefunde und unklare Ergebnisse geringer ist als bei WGS, WES und CES. Von Nachteil hingegen ist, dass aktuelle Erkenntnisse von neuen krankheitsrelevanten Genen nicht unmittelbar in eine derartige Analyse einfließen können. Um neue Gene mit dem Panel zu analysieren, muss das Panel angepasst werden, wobei eine solche Adaptierung in der Regel nur in größeren Zeitintervallen (z. B. alle 12 Monate) erfolgt. Für differenzialdiagnostische (pathogene Varianten in anderen Genen, die zu ähnlicher klinischer Symptomatik führen) Fragestellungen ist das Gen-Panel im Vergleich zu WES und CES weniger geeignet.

Prinzip. Ausgehend von aus Blut oder Geweben isolierter Doppelstrang-DNA werden DNA-Fragmente erzeugt, an die spezifische Adapter-Oligonukleotide gebunden werden und die dann als „Library“ (DNA-Bibliothek) bezeichnet werden. An eine Oberfläche gebunden, werden diese Fragmente inklusive der Adaptoren mittels PCR-basierter Methoden vervielfältigt (amplifiziert), sodass Cluster mit einer hohen Dichte identischer DNA-Fragmente (massives paralleles Sequenzieren, „deep sequenc-

ing“) generiert werden, in denen die eigentliche Sequenzierung abläuft. Die erhaltenen Datenmengen müssen adäquat gespeichert und bioinformatisch aufbereitet werden (Vergleich der detektierten Sequenzen – „Reads“ – mit dem Referenzgenom), um sinnhaft weitergegeben und interpretiert werden zu können. Im Rahmen der primären Datenanalyse werden diese „Reads“ zusammengefügt und einer Referenzsequenz des humanen Genoms zugeordnet (als Alignment bezeichnet). Dann erfolgt die sekundäre Datenanalyse, mittels derer Unterschiede zwischen Referenzgenom und Patient:innenprobe („variant calling“) detektiert werden, wobei bei diesem Schritt auch Sequenzierartefakte herausgefiltert werden müssen. Die personenindividuellen Unterschiede zum Referenzgenom werden als Varianten bezeichnet, die im Rahmen der tertiären Datenanalyse mittels verschiedener Softwareprogramme und Datenbanken und in Zusammenschau mit klinischen Informationen bzw. wenn notwendig nach Rücksprache mit den Zuweisenden klassifiziert werden. Diese Klassifikation (C1–C5) und Interpretation („annotation“) erfolgt nach den international gültigen Kriterien von ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) und AMP (Association for Molecular Pathology) [9].

Analysenqualität. Für die Analyse mittels NGS kommen verschiedene Verfahren zur Anwendung, die nach den entsprechenden Anbietern als Plattformen bezeichnet werden (z. B. Illumina, etc.), wobei schlussendlich für alle Verfahren die Sequenziertiefe bzw. Coverage (Abdeckung) eines der wichtigsten Qualitätsmerkmale ist. Letztere gibt an, mit welcher Häufigkeit jedes Nukleotid im Durchschnitt erfasst wird, und stellt ein Maß für die Genauigkeit/Zuverlässigkeit dar, mit der eine Variante detektiert wird, wenn sie vorhanden ist.

Für diagnostisch relevante Fragestellungen wird eine Sequenziertiefe von mehr als 20 Sequenzen pro Base in 100 % der analysierten Regionen gefordert (Typ-A-Qualität), sodass eine Detektionsgenauigkeit von >99 % erreicht wird. Es ist wichtig, hier anzumerken,

dass unbedingt darauf zu achten ist, dass bei Ersatz der Methodik der Sanger-Sequenzierung durch NGS-Verfahren die hohe analytische Sensitivität von >99 % weiter gewährleistet ist. So sollte gerade bei einer Tumordiagnostik wie z. B. *BRCA1*, *RET-Protoonkogen*, *MEN1*, etc. eine Coverage von mindestens 20 % gewährleistet sein, da über Bereiche, die mit weniger als 20 Sequenzen pro Base abgedeckt sind, keine sichere Aussage getroffen werden kann.

Je größer ein Multigen-Panel ist, desto schwieriger wird es aber auch, für alle Gene eine Coverage von über 20 % zu erreichen, sodass bei großen Panels mit über 50 Genen dies häufig nicht mehr für alle Gene auf dem Panel bewerkstelligt werden kann. Daher soll aus einer Hochdurchsatz-Genliste seitens des Diagnostikanten hervorgehen, welche Gene als „Hauptgene“ („core genes“) betrachtet werden [3, 4], da diese dann mit durchgehend hoher Qualität (Coverage > 20 %) und üblicherweise vollständiger technischer Abdeckung der Zielregion (>99 %) analysiert und ausgewertet werden.

Limitationen. Wie schon bei der Einzelgenanalyse angeführt, ist auch bei NGS-Verfahren vor der Bewertung der Analysenergebnisse auf die Limitationen der jeweiligen Anwendung zu achten. Dazu kann gehören, dass regulatorische Mutationen in intronischen Bereichen (> ± 5 bp zur Exongrenze), größere genomische Deletionen oder Duplikationen (> 50 bp), strukturelle Rearrangements (Translokationen und Inversionen) bzw. Repeat-Expansionen nicht detektiert werden. Auch die zuverlässige Analyse von Genen mit Pseudogenen bzw. homologen Regionen kann eingeschränkt sein. Hier ist, abhängig von der Fragestellung, zusätzlich eine Untersuchung der Kopienzahl („copy number variations“) nötig, z. B. MLPA (siehe oben) oder Array-CGH („array-based comparative genomic hybridization diagnostics“) zur genomweiten Deletions-/Duplikationsanalyse.

Je nach klinischer Fragestellung bzw. Methodik kommen unterschiedliche Stufen der diagnostischen Tiefe (Qualitätsstufen von Typ A bis C) zur Anwendung [2, 3]:

- **Typ-A-Test:** vollständigste Analyse mit dem aktuellen Stand der Technik, die bedeutet, dass alle Zielregionen (kodierende Regionen und flankierende Exon-/Intron-Grenzen) mit hohen Qualitätsparametern und einer vollständigen technischen Abdeckung der Zielregion >99% bzw. mit einer Coverage von mind. 20% abgedeckt sind. Sofern das für eine bestimmte Zielregion nicht zutreffend ist, müssen diese Bereiche mittels Sanger- oder alternativer Sequenzierungsmethodik ergänzt werden.
- **Typ-B-Test:** Bei großen Analysen (>50 Genen) ist eine hohe Coverage und lückenlose Abdeckung aller Gene häufig nicht mehr möglich (weder mit NGS noch mit nachfolgender Sanger-Sequenzierung). Nur für Core-Gene wird daher die Analyse mittels Sanger-Sequenzierung ergänzt, aber für andere Gene bleiben Lücken, sodass Mutationen in bestimmten Genen bzw. Genbereichen und damit auch bestimmte Verdachtsdiagnosen nicht ausgeschlossen werden können. Diese Limitationen einer Methodik sind im genetischen Analysenbefund unter dem methodischen Teil auszuweisen und müssen auch von den den Befund Interpretierenden verstanden und berücksichtigt werden.
- **Typ-C-Test:** Die Analyse basiert ausschließlich auf NGS, Lücken werden nicht mit Sanger-Sequenzierung oder alternativen Methoden geschlossen (z. B. bei WES, WGS).

Zusatzbefunde. Diese stehen, wie oben angeführt, nicht mit der ursprünglichen Fragestellung in Verbindung, können aber trotzdem für die Gesundheit bzw. Familienplanung der untersuchten Personen oder ihrer Verwandten von Bedeutung sein. Dazu gehören ein eventueller Überträgerstatus für eine rezessive Erkrankung oder bekannt pathogene Genvarianten (z. B. für Brustkrebs), die aber nicht in Zusammenhang mit der zur Analyse führenden bestehenden Symptomatik stehen. Es muss sich dabei um Varianten handeln, die klar krankheitsverursachend sind und für die präventive oder therapeutische

Konsequenzen für die Untersuchten oder deren Familie bestehen. Weiters ist gefordert, dass derartige Ergebnisse auch analytisch gesichert und wissenschaftlich validiert sind. Laut der Österreichischen und der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (ÖGH und GfH) wird für die Beratung mitteilungsrelevanter (Zusatz)befunde folgende Kategorisierung [5] nach ihrer Bedeutung für die untersuchte Person vorgeschlagen, wobei die Übergänge zwischen den Kategorien 1–3 fließend sein können:

Kategorie 1: Genetische Eigenschaften, aus denen sich ein relevantes Risiko für eine Erkrankung ergibt, für die eine effektive Therapie bzw. wirksame Vorbeugemaßnahmen zur Verfügung stehen.

Kategorie 2: Genetische Eigenschaften, die ein relevantes Risiko für eine zum Untersuchungszeitpunkt nicht behandelbare Erkrankung ausweisen.

Kategorie 3: Genetische Eigenschaften, die das Risiko für das Auftreten einer Erkrankung nur gering modifizieren, z. B. Daten aus genomweiten Assoziationsstudien zu multifaktoriellen Erkrankungen.

Kategorie 4: Genetische Eigenschaften, die für die untersuchte Person selbst keine gesundheitlichen Risiken bergen, aber zu Krankheiten bei eigenen Nachkommen und/oder Familienangehörigen führen und damit einen Einfluss auf die Familienplanung haben können.

Während nach ÖGH die Mitteilung von Kategorie-1-Befunden geboten ist, sollte die Mitteilung von Befunden der Kategorien 2–4 kontextabhängig beurteilt werden. Die Mitteilung von Kategorie-3-Befunden, die das Krankheitsrisiko nur geringgradig modifizieren, erscheint wenig sinnvoll [5].

Gene, von denen pathologische Varianten in Form von Zusatzbefunden mitgeteilt werden sollen, werden in sogenannten Positivlisten zusammengefasst. Welche Positivlisten (Experten oder ACMG-Konsortium) verwendet werden, wird unterschiedlich gehandhabt und beeinflusst die Anzahl der zu erwartenden Zusatzbefunde.

Der genetische Befund

Das Ergebnis der genetischen Analyse muss in schriftlicher Form mitgeteilt und mit einer genetischen Beratung abgeschlossen werden. Die Patient:innen können die Durchführung der human-genetischen Analyse bzw. die Mitteilung des Ergebnisses zu jedem Zeitpunkt und ohne Angabe von Gründen widerrufen bzw. sind über das Recht auf Nichtwissen die Zusatzbefunde betreffend aufzuklären.

Ein genetischer Befund muss verschiedenste Kriterien erfüllen, für die entsprechende internationale Richtlinien gibt [10]. Auf die Notwendigkeit, die verwendeten Methoden und deren Limitationen und analytische Sensitivität und Spezifität im Befund auszuweisen, wurde im Rahmen der obigen Methodendiskussion schon mehrfach hingewiesen. Im Rahmen dieses Abschnittes soll weiters auf häufig diskutierte Aspekte wie die Interpretation und die Dokumentation der Befunde im klinischen Betrieb eingegangen werden.

Klassifikation von Genvarianten. Die mittels Sanger-Sequenzierung oder NGS detektierten Varianten sind zu klassifizieren und HGVS-konform im Befund anzugeben [9, 11]. Pathogene (C5) und wahrscheinlich pathogene (C4) Varianten werden berichtet, benigne (C1) und wahrscheinlich benigne (C2) üblicherweise nicht. Die Mehrzahl der Varianten ist zwar bekannt, da sie in der Fachliteratur in Zusammenhang mit der Erkrankung beschrieben worden bzw. in Datenbanken gelistet sind, viele können aber nicht eindeutig als pathogen oder benigne eingestuft werden und werden daher als Varianten unklarer Signifikanz (VUS, C3) klassifiziert. Ob C3-Varianten im Befund ausgewiesen werden oder wie C1- und C2-Varianten auf Anfrage erhältlich sind, sollte im Befund dargelegt sein. Funktionelle Untersuchungen, Überprüfung der Häufigkeit dieser Varianten in einer Kontrollpopulation oder weitere Untersuchungen im Tumormaterial bzw. Kosegregationsanalysen in betroffenen versus nicht betroffenen Familienmitgliedern könnten helfen bzw. wären notwendig, um eine VUS (C3)

doch noch in Varianten der Klassen 1, 2, 4 oder 5 einstuft zu können. Diese Untersuchungen sind aufgrund des zeitlichen, wie auch personellen und finanziellen Aufwands kurzfristig oft nicht möglich. Manchmal ist es auch sinnvoll, seitens des Diagnostikantbieters den Zuweiser zu kontaktieren, um der Klassifikation dienliche klinische Information einfließen lassen zu können. Sind VUS im Befund dokumentiert, können diese auf Anfrage des Zuweisers zu einem späteren Zeitpunkt seitens des Diagnostikantbieters nach dem dann aktuellen Stand der Wissenschaft reevaluiert werden, sodass sich für manche VUS zu einem späteren Zeitpunkt eine geänderte Klassifikation in Richtung benigne oder pathogen ergeben könnte.

Die *Vergleichbarkeit genetischer Befunde* stellt eine immer wieder auftretende Problematik dar. Lagen diesbezügliche Schwierigkeiten früher primär an der Verwendung einer nichtstandardisierten Nomenklatur, beruhen sie derzeit auch darauf, dass sich die Panels in den untersuchten Genen unterscheiden und dass die Methodik, die analytische Qualität und die Abdeckung verschieden sind. Eine der größten Herausforderungen ist zudem der bereits oben adressierte unterschiedliche Umgang mit Zusatzbefunden und prädiktiven Ergebnissen. Letztere sind insbesondere bei spätem Manifestationsalter der Erkrankung und Detektion bei jungen Personen eine herausfordernde Situation.

Dokumentation und Archivierung genetischer Befunde. Grundlage der genetischen Untersuchungen in Österreich ist das Gentechnikgesetz (GTG), ein aus 1994 stammendes Bundesgesetz, mit dem Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, das Freisetzen und Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Organismen und die Anwendung von Genanalyse und Gentherapie am Menschen geregelt werden. Befundung und Beratung haben weiters unter Wahrung des größten Nutzens und des geringsten Risikos für Ratsuchende, Patient:innen und deren Familien zu erfolgen.

§ 65 des GTG legt fest, dass *Analysen am Menschen zu medizinischen Zwe-*

cken nur nach dem Stand von Wissenschaft und Technik durchgeführt werden, wobei verschiedene Typen (siehe unten Typ 1–4) unterschieden werden, die auch die Grundlage für die Dokumentation in der Krankenakte darstellen.

- *Typ 1* dient der Feststellung einer bestehenden Erkrankung, der Vorbereitung einer Therapie oder Kontrolle eines Therapieverlaufs und basiert auf Aussagen über konkrete somatische Veränderung von Anzahl, Struktur, Sequenz oder deren konkrete chemische Modifikationen von Chromosomen, Genen oder DNA-Abschnitten.
- *Typ 2* dient der Feststellung einer bestehenden Erkrankung, welche auf einer Keimbahnmutation beruht.
- *Typ 3* dient der Feststellung einer Prädisposition für eine Krankheit, insbesondere der Veranlagung für eine möglicherweise zukünftig ausbrechende genetisch bedingte Erkrankung oder Feststellung eines Überträgerstatus, für welche nach dem Stand von Wissenschaft und Technik Prophylaxe oder Therapie möglich sind.
- *Typ 4* dient der Feststellung einer Prädisposition für eine Krankheit, insbesondere der Veranlagung für eine möglicherweise zukünftig ausbrechende genetisch bedingte Erkrankung oder Feststellung eines Überträgerstatus, für welche nach dem Stand von Wissenschaft und Technik keine Prophylaxe oder Therapie möglich sind.

Laut § 71a (1) *dürfen Ergebnisse aus genetischen Analysen des Typs 1 in jedem Fall, Ergebnisse aus genetischen Analysen des Typs 2 und 3 nur sofern der Patient dem nicht schriftlich widersprochen hat, in Arztbriefen und Krankengeschichten dokumentiert werden. Auf die Möglichkeit des Widerspruches ist in der Beratung gem. § 69 Abs. 3 hinzuweisen. Ergebnisse aus genetischen Analysen des Typs 4, ebenso wie Ergebnisse des Typs 2 oder 3, wenn die Dokumentation in Arztbriefen und Krankengeschichten wegen Widerspruches des Patienten nicht zulässig ist, dürfen nur in der Einrichtung, in der sie erhoben worden sind, und nur auf*

Veranlassung des behandelnden Arztes verarbeitet werden; sie sind von anderen Datenarten gesondert aufzubewahren oder zu speichern und dürfen nur von jenen Personen die in der Einrichtung mit der Verarbeitung der Daten unmittelbar befasst sind, und nur mit einer gesonderten Zugriffsmöglichkeit abrufbar sein.

Dass einerseits die genetischen Befunde für die fortwährend beste medizinische Betreuung der Patient:innen für die ärztliche Seite zur Verfügung stehen müssen, andererseits aber auch dafür Sorge zu tragen ist, dass die obigen Vorgaben eingehalten werden, ist gerade in großen medizinischen Einrichtungen eine oft nicht leicht zu bewerkstellende Herausforderung.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mit der steigenden Nachfrage NGS-basierter diagnostischer Verfahren deutlich wird, dass sowohl die Interpretation der Analyseergebnisse als auch die humangenetische Beratung vor und nach der genetischen Analyse zum Nadelöhr bei diesen Verfahren wird. Von den zuständigen Fachärzt:innen gefordert sind in diesem Zusammenhang eine umfassende Beratungskompetenz und Erfahrung, eine enorme Sachkenntnis und die Möglichkeit und Fähigkeit, trotz der rasant steigenden Weiterentwicklungen am aktuellen Stand der Wissenschaft zu bleiben. Dem gegenüber stehen sogenannte DCT („Direct-to-Consumer“-Gentests, die in zunehmendem Ausmaß im Internet angeboten werden und zu deren Durchführung eine Speichelprobe (ohne ärztliche humangenetische Aufklärung und Beratung) an den Anbieter versendet wird. In vielen Fällen werden Tests mit geringer oder fragwürdiger klinischer Relevanz angeboten, d. h., deren Nutzen ist wissenschaftlich nicht belegt. Für derartige Gentests schätzt die ÖGH die potenziellen Gefahren einer Fehl- oder Überinterpretation für die Kunden wesentlich höher ein als den erworbenen Nutzen (siehe Stellungnahme der ÖGH [12]). Daher ist einmal mehr darauf hinzuweisen, dass die Veranlassung und Interpretation humangenetischer Analysen, soll deren positives Potenzial zum Nutzen der untersuchten Personen und ihrer Familien ausgeschöpft werden, mit einer entsprechenden fachkompetenten

Aufklärung und Beratung einhergehen muss.

Weitere Informationen über genetische Analysen in Österreich bekommen Sie unter anderem über folgenden Links: www.oeges.at (Molekulare Endokrinologie) und www.oegh.at (Österr. Gesellschaft für Humangenetik, ÖGH).

Korrespondenzadresse

a.o. Univ.-Prof. DI Dr.

Sabina Baumgartner-Parzer

Universitätsklinik für Innere Medizin III,

Medizinische Universität Wien

Währinger Gürtel 18–20, 1090 Wien, Österreich
sabina.baumgartner-parzer@meduniwien.ac.at

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

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. S. Baumgartner-Parzer gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Für diesen Beitrag wurden von den Autor/-innen keine Studien an Menschen oder Tieren durchgeführt. Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

Open Access. Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz 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.

Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen.

Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Literatur

- Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N (2011) What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 48(9):580–589. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100223>
- Kappelmann-Fenzl M (2021) Next generation sequencing and data analysis. Springer, Cham
- Matthijs G, Souche E, Alders M et al (2016) Guidelines for diagnostic next generation sequencing. *Eur J Hum Genet* 24(1):2–5. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.226>
- Bauer P, Wildhardt G, Gläser D et al (2018) GfH-S1-Leitlinie: Molekulargenetische Diagnostik mit Hochdurchsatz-Verfahren der Keimbahn, beispielsweise mit Next-Generation Sequencing (Verabschiedet 02.07.2018. Geplante Aktualisierung Juni 2023. Siehe Homepage der Österr. und Deutschen Gesellschaft für Humangenetik)
- ÖGH (2017) Stellungnahme zu genetischen Zusatzbefunden in Diagnostik und Forschung (Siehe Homepage der Österr. und Deutschen Gesellschaft für Humangenetik)
- Green RC, Berg JS, Grody WW et al (2013) ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med* 15(7):565–574. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.73>
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30(12):e57. <https://doi.org/10.1093/nar/gnf056>
- Baumgartner-Parzer S, Witsch-Baumgartner M, Hoepfner W (2020) EMQN best practice guidelines for molecular genetic testing and reporting of 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Hum Genet* 28(10):1341–1367. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0653-5>
- Richards S, Aziz N, Bale S et al (2015) 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* 17(5):405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Claustres M, Kozich V, Dequeker E et al (2014) Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet* 22(2):160–170. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.125>
- Den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR et al (2016) HGVS recommendations for the description of sequence variants. *Hum Mutat* 37(6):564–569. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>
- ÖGH (2017) Stellungnahme zu „Direct-to-Consumer“ (DTC)-Gentests (Siehe Homepage der Österr. und Deutschen Gesellschaft für Humangenetik)

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

Diabetes und Schwangerschaft



Eine extrem strenge Blutzuckerkontrolle war vor einigen Jahren das Primat der Behandlung des Diabetes mellitus in der Schwangerschaft. Heute

stehen andere Aspekte, wie Lifestyle-Modifikationen, individuelle Aufklärung und Beratung, im Vordergrund.

Die Ausgabe 2/2022 von *Der Gynäkologe* widmet sich in 4 Artikeln den modernen Therapiestrategien, postbariatrischen Schwangerschaften und Aspekten der Geburtsplanung, wie der Wahl des Geburtsorts, des Geburtszeitpunkts und der peripartalen Überwachung.

- Bariatrische Operationen und Schwangerschaft
- PCOS und Schwangerschaft
- Diabetes in der Schwangerschaft: Strategien inklusive Bewegungsprogramme
- Geburtsplanung bei Diabetes in der Schwangerschaft

Suchen Sie noch mehr zum Thema?

Mit e.Med – den maßgeschneiderten Fortbildungsabos von Springer Medizin – haben Sie Zugriff auf alle Inhalte von SpringerMedizin.de. Sie können schnell und komfortabel in den für Sie relevanten Zeitschriften recherchieren und auf alle Inhalte im Volltext zugreifen.

Weitere Infos zu e.Med finden Sie auf www.springermedizin.de

