

## Untersuchung des klinischen Exoms mittels Next Generation Sequencing

T. von Känel, A. Bottani, Zentralinstitut der Spitäler, Spital Wallis, Sitten

### Hintergrund

Next Generation Sequencing (NGS), die parallele Sequenzierung von Millionen DNA-Fragmenten, findet seit einigen Jahren Anwendung in der genetischen Diagnostik, so zum Beispiel bei der Untersuchung von Erbkrankheiten (siehe z.B. Caduceus Express 12-2014 und 11-2015) oder von soliden Tumoren (Caduceus Express 09-2014 und 05-2016). Diese Untersuchungen beschränken sich meistens auf eine kleine Anzahl Gene und ersetzen die aufwändige Sequenzierung nach Sanger.

In den letzten Jahren wurden die Kapazitäten der NGS-Geräte weiter verbessert. Dadurch, und dank der Aufnahme dieser Tests in die Analysenliste des BAG, kann nun auch in der Diagnostik die simultane Sequenzierung von tausenden Genen angeboten werden [1, 2]. Die Anwendungen können dabei in drei Bereiche eingeteilt werden:

- Gendiagnostik bei mono- oder oligogenen Krankheiten, für welche es kein krankheitsspezifisches NGS-Panel gibt.
- Diagnostik von Krankheiten, bei denen Mutationen in vielen verschiedenen Genen vorliegen können (z.B. Epilepsien, Schwerhörigkeit, neurodegenerative Erkrankungen).
- Explorative Untersuchung des Exoms (kodierender Bereich aller Gene) oder des *klinischen* Exoms (nur Gene mit bekannter klinischer Bedeutung).

In den ersten beiden Fällen werden nur diejenigen Gene ausgewertet, welche für die klinische Fragestellung relevant sind. Bei sorgfältiger Vorbereitung und Auswertung ist dabei kein oder nur ein geringer Verlust an Sensitivität im Vergleich mit der Sanger-Methode zu beobachten. Die Spezifität ist ebenfalls hoch und kann durch eine Mutationsbestätigung mit der Sanger-Methode zusätzlich gesichert werden. Wie die klassische Sanger-Sequenzierung erfasst auch das NGS nur Punktmutationen und kleine Deletionen; chromosomale Aberrationen und grössere Deletionen werden nicht detektiert.

### Vor der Untersuchung

In einem ersten Schritt bespricht der Arzt die geplante Untersuchung mit dem Patienten. Spezialisierte genetische Prätest-Beratungen sind empfehlenswert und werden vom Facharzt FMH in medizinischer Genetik am ZIS in Sitten angeboten. Wichtig ist eine genaue Aufnahme des Phänotyps, denn sie kann die Wahl des verwendeten Tests sowie die Auswertung entscheidend beeinflussen. Auch sollte mit dem Patienten das mögliche Auftreten von Zufallsbefunden besprochen werden. Mit dem Genetiklabor wird dann die geeignete Untersuchungsmethode gewählt, wobei Fallstricke wie eine ungenügende Abdeckung der Zielregionen zu beachten sind.

Auch muss die Krankenkasse um eine Kostengutsprache ersucht werden. Für die Untersuchung von 1-10 Genen können Ärzte mit einem Weiterbildungstitel „in engstem fachlichem Zusammenhang mit der untersuchten Krankheit“ das Gesuch einreichen; bei mehr als 10 Genen muss der beantragende Arzt über einen FMH-Titel in medizinischer Genetik verfügen. Die Kosten gemäss Analysenliste liegen dabei bei 2900 TP für 1-10 ausgewertete Gene, 3300 TP für 11 bis 100 Gene, und 3800 TP für über 100 Gene.

### Nach der Untersuchung

Nach der eigentlichen Sequenzierung im Nasslabor (Abb. 1) folgt die bioinformatische Auswertung, bei der man die generierten Sequenzen mit dem Referenzgenom abgleicht. Ausgewertet werden nur diejenigen Gene, welche der Arzt verlangt – dies reduziert die Gefahr von ungewollten Zufallsbefunden. Die Beurteilung der Pathogenität von nachgewiesenen Sequenzvarianten beruht auf Mutationsdatenbanken und bioinformatischen Parametern. Auch das Vererbungsmuster hilft bei der Beurteilung: ist z.B. eine Variante in einem dominanten Gen de novo entstanden, so ist sie eher pathogen als wenn sie von einem gesunden Elternteil vererbt wurde. Der diagnostische Ertrag steigt denn auch entsprechend, wenn gleichzeitig die Eltern sequenziert werden [3]; diese Leistung ist aber nicht kassenpflichtig und wird entsprechend eher im Rahmen von Forschungsprojekten angeboten.

Die nachgewiesenen pathogenen Sequenzvarianten sowie allfällige methodische Schwächen (wie eine ungenügende Abdeckung von einzelnen Regionen) werden dem Arzt berichtet, welcher die Befunde dem Patienten vermittelt. Bei komplexen Befunden empfiehlt sich dringend eine Board-ähnliche Diskussion der Resultate unter verordnendem Arzt, Facharzt FMH in medizinischer Genetik und Laborspezialisten, sowie eine Posttest-Beratung des Patienten durch den Facharzt FMH in medizinischer Genetik.

### Vor- und Nachteile der Untersuchung

Evidenter Vorteil ist die Menge an generierten Daten, denn so kann bei einem negativen Befund nachträglich die Auswertung von weiteren, differentialdiagnostisch relevanten Genen veranlasst werden. Meistens ist davon abzuraten, von vornherein eine grosse Zahl von Genen explorativ auszuwerten, da es die Gefahr von ungewollten Zufallsbefunden erhöht. Zudem bleiben auch unter Einbezug der aktuellsten Datenbanken und Bioinformatik-Tools oft sogenannten "Variants of Unknown Significance" (VUS) übrig, deren klinische Bedeutung zur Zeit nicht klar oder bekannt sind. Erfahrungsgemäss korrelieren die Anzahl der untersuchten Gene und die Anzahl der VUS.

### Fazit

NGS erlaubt die Analyse des klinischen Exoms. Die Untersuchung verlangt vor und nach dem Test eine genetische Beratung und ist nach entsprechendem Antrag kassenpflichtig. Sie sollte in enger Zusammenarbeit von betreuendem Arzt, Facharzt FMH in medizinischer Genetik und Laborspezialisten erfolgen – nur so kann für den Patienten ein maximaler Nutzen aus der Untersuchung gezogen werden.

### Literatur

- [1] Biesecker LG et al. *Diagnostic clinical genome and exome sequencing*. N Engl J Med. 2014 Jun 19;370(25):2418-25
- [2] Bowdin S et al. *Recommendations for the integration of genomics into clinical practice*. Genet Med. 2016 May. doi: 10.1038/gim.2016.17
- [3] Lee H et al. *Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders*. JAMA. 2014 Nov 12;312(18):1880-7

### Kontaktpersonen

Thomas von Känel, PhD  
Dr. med. Armand Bottani

thomas.vonkaenel@hopitalvs.ch  
armand.bottani@hopitalvs.ch

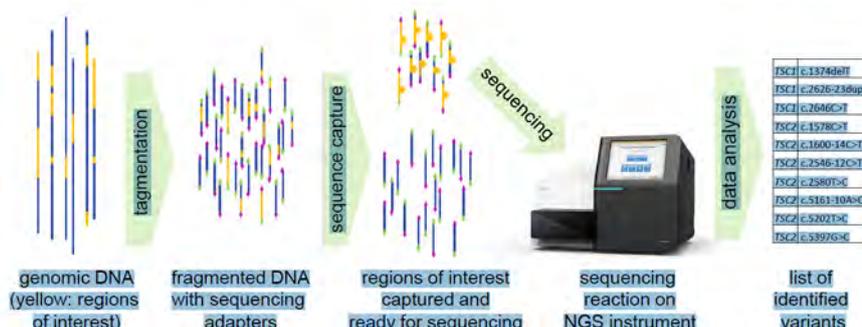


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung des TruSightOne-Tests von Illumina, welcher in Zusammenarbeit mit dem KS Aarau auch am ZIS angeboten wird. Der Test erlaubt die simultane Sequenzierung von 4813 Genen, bei denen eine klinische Bedeutung bekannt ist („klinisches Exom“).