

NGS Next-Generation-Sequencing-Diagnostik

Das Next-Generation-Sequencing (NGS) ist eine neue Hochdurchsatz-Methode zur gleichzeitigen Untersuchung mehrerer Gene auf krankheitsrelevante Veränderungen. Ihr Einsatz in der genetischen Diagnostik erlaubt eine effiziente, schnelle, kostenreduzierte und umfangreiche Analyse. Durch Einsatz dieses Verfahrens konnte für einige Erkrankungen die genetische Aufklärungsrate mindestens verdoppelt werden. Der Einsatz von NGS läutet eine neue Ära in der genetischen Diagnostik ein und kann für den einzelnen Patienten einen großen Vorteil bieten. Insbesondere bei genetisch und klinisch heterogenen Erkrankungen, bei denen mehrere Gene ursächlich sein können, kann die NGS-Analyse die diagnostische Ausbeute wesentlich erhöhen.

Der diagnostische Nutzen ist jedoch stark von der Qualität der Analyse abhängig. Daher wurden in einer Leitlinie Qualitätsparameter und Standards für diese neue Technologie definiert, auch um eine Vergleichbarkeit der Techniken zu erreichen (Matthijs et al., Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. Eur J Hum Genet. 2016 Oct;24(10):1515).

Qualitätsparameter für NGS

Die Leitlinie schlägt ein Bewertungsschema für diagnostische NGS-Assays vor, wobei drei Qualitätsstufen auf der Grundlage der Abdeckung und der diagnostischen Ausbeute unterschieden werden

Typ-A-Test:

Diese Art des Tests stellt die höchsten Qualitätsanforderungen, die mit dem derzeitigen Stand der Technik erreicht werden können. Hier besteht eine Nachweisgenauigkeit von >99% (Abdeckung mehr als 50-fach) für die gesamte kodierende Region und die flankierenden intronischen Sequenzen (+/- 20 Basenpaare). Alle mittels NGS nicht genügend abgedeckten Lücken werden mit der Sanger-Sequenzierung gefüllt. Bei einem Typ A Test werden die untersuchten Gene des Panels vollständig abgedeckt. **Alle von uns angebotenen NGS-Tests entsprechen dieser Kategorie.**

Typ B-Test:

Hier wird nicht für alle Gene eine lückenlose Abdeckung garantiert. Nur bei einem Teil der Gene werden die Lücken mit Sanger-Sequenzierung geschlossen. Es wird genau beschrieben, für welche Gen-Regionen eine >99% Nachweisgenauigkeit garantiert wird. Mit Typ B-Tests können Verdachtsdiagnosen lediglich bestätigt, jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Typ-C-Test:

Der Typ-C-Test beruht ausschließlich auf der Qualität der NGS-Sequenzierung. Es wird keine zusätzliche Sanger-Sequenzierung durchgeführt.

NGS-Analyse

- Die Anreicherung spezifischer Regionen der zu untersuchenden Gene erfolgt mittels multiplex-PCR mit dem BRCA Hereditary Cancer MASTR™ PLUS Kit von Multiplicom
- Sequencing by synthesis Verfahren auf dem MiSeq-Sequencer von Illumina
- Alignment mittels Burrows-Wheeler-Aligner (BWA)
- Variant calling mittels Genome Analysis Toolkit (GATK)
- Sequenzauswertung mittels SeqNext Version 4.3.0 (JSI)
- Qualitätskriterien: Sequenzierläufe mit Quality score (Q-phred score) >30 (Detektionsgenauigkeit >99,9%) bei mindestens 75% der Basen
- Die erforderliche minimale Abdeckung der Zielregionen ist 50fach
- Bewertung der Sequenzvarianten nach Richards et al. *Genetics in medicine* 17.5 (2015): 405-423.
- Die angebotenen Tests entsprechen der Qualitätsstufe A

Limitationen:

- PCR-basierende Anreicherungen sind empfindlich gegenüber allelic-dropout, verursacht durch SNPs in der Primerbindungsstelle
- Tief intronische Mutationen werden nicht detektiert
- Größere genomische Deletionen/Duplikationen, die ganze Exons betreffen, werden mittels NGS nicht detektiert. Hier kommen zusätzliche Methoden (MLPA) zum Einsatz (siehe Testbeschreibung).
- Strukturelle Rearrangements (wie Inversionen oder Translokationen) werden nicht identifiziert
- Die Analyse von Genen mit bekannten Pseudogenen erfordert ein besonderes Augenmerk (z.B. CHEK2, PMS2).

Hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom (HBOC)

Eine genetische Untersuchung sollte angeboten werden, wenn eine familiäre bzw. individuelle Belastung vorliegt, die mit einer mindestens 10 %-igen Mutationsnachweiswahrscheinlichkeit einhergeht.

Dies trifft zu, wenn in einer Linie der Familie

- mindestens 3 Frauen an Brustkrebs erkrankt sind
- mindestens 2 Frauen an Brustkrebs erkrankt sind, davon 1 vor dem 51. Lebensjahr
- mindestens 1 Frau an Brustkrebs und 1 Frau an Eierstockkrebs erkrankt sind
- mindestens 2 Frauen an Eierstockkrebs erkrankt sind
- mindestens 1 Frau an Brust- und Eierstockkrebs erkrankt ist
- mindestens 1 Frau mit 35 Jahren oder jünger an Brustkrebs erkrankt ist
- mindestens 1 Frau mit 50 Jahren oder jünger an bilateralem Brustkrebs erkrankt ist
- mindestens 1 Mann an Brustkrebs und eine Frau an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt sind

Bei vorliegendem Verdacht auf HBOC kann eine molekulargenetische Untersuchung nur bei Erfüllung eines der Einschlusskriterien durchgeführt werden.

Zusätzlich zu den Genen BRCA1 und BRCA2 ist die Analyse dreier weiterer Gene fakultativer Bestandteil der Regelleistung (EBM Kap. 11.4.2, Ziffer 11440).

Pathogene BRCA1 und BRCA2 Keimbahnmutationen wurden bei ca. 25% der Index-Patienten, die die o.g. Einschlusskriterien erfüllen, gefunden. Mutationen im CHEK2- und PALB2-Gen können bei ca. 2,5% bzw. 1,2% der BRCA1/2-negativen Index-Patienten identifiziert werden (Hauke et al., 2018). Frauen mit einer BRCA1 oder BRCA2 Mutation erkranken rund 20 Jahre früher als Frauen ohne familiäres Risiko und haben ein lebenslanges Risiko von durchschnittlich 60% an einem Mammakarzinom, von durchschnittlich 40% an einem kontralateralen Mammakarzinom und 16-55% an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Während CHEK2 mit einem moderaten Brustkrebsrisiko assoziiert ist, scheint PALB2 mit einem ähnlich hohen Risiko wie BRCA1/2 einher zu gehen. RAD51C ist primär mit einem erhöhten Ovarialkarzinomrisiko assoziiert (siehe S3 Leitlinie).

Sollte die Analyse der genannten fünf Gene ein unauffälliges Ergebnis liefern, kann nach vorangegangener Beantragung bei der zuständigen Krankenkasse und vorliegender Genehmigung eine erweiterte Diagnostik angeschlossen werden (Stufe II, EBM Kap. 11.4.2, Ziffer 11490). Das Deutsche Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs empfiehlt die Untersuchung der Gene **ATM** und **RAD51D**, welche mit einem moderat erhöhten Risiko für die Entstehung von Mamma- bzw. Ovarialkarzinomen assoziiert sind. Zusätzlich wird die Analyse des BRIP-Gens empfohlen, welches mit einem moderat erhöhten Ovarialkarzinomrisiko assoziiert ist. Zusätzlich liegt bei den Tumorprädispositionssyndromen **Li-Fraumeni-Syndrom (TP53)** und bei dem durch Mutationen im CDH1-Gen vermittelten **hereditären diffuse Magenkarzinom (CDH1)** ein stark erhöhtes Brustkrebsrisiko vor. Ca. 5-6% der HBOC-Familien tragen kausale Varianten in einem dieser weiteren fünf Gene.

Literatur

Kast, K., et al., J Med Genet, 2016. **53**(7): p. 465-71.; Mavaddat, N., et al., Breast Cancer Res, 2010. **12**(3): p. R28.; Hauke, J., et al. *Cancer medicine* 7.4 (2018): 1349-1358; Meindl, A. et al., *medizinische genetik* 27.2 (2015): 202-210; S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion 3.0 (2012)

| Erkrankung | ICD-10 | OMIM-P | Gen | Analysen | OMIM-Gen |
|--|----------------|--------|------------------------|---|----------|
| Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom (Stufe I) EBM Kapitel 11.4.2 GOP 11440 | C50.- C56.- | 604370 | BRCA1 (obligat) | NGS, MLPA | 113705 |
| | | 612555 | BRCA2 (obligat) | NGS, MLPA | 600185 |
| | | 114480 | CHEK2 (fakultativ) | NGS; MLPA*, Sanger Sequenzierung Exon 12 [†] | 604373 |
| | | 114480 | PALB2 (fakultativ) | NGS | 610355 |
| | | 613399 | RAD51C (fakultativ) | NGS | 602774 |

*Testung auf die Mutation 1100delC und Deletions/Duplikationsanalyse der Exons 1 und 9 Kapitel 11.4.2

[†]wegen Anwesenheit eines hoch homologen Pseudogens zusätzliche Sanger Sequenzierung

Erweiterte Diagnostik nach nur nach genehmigter Kostenübernahme durch den Versicherer

| Erkrankung | ICD-10 | OMIM-P | Gen | Analysen | OMIM-Gen |
|---|----------------|--------|--------------------|--|----------|
| Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom (Stufe II) EBM Kapitel 11.4.2 GOP 11449 | C50.- C56.- | 114480 | ATM *,** | NGS, MLPA | 607585 |
| | | 114480 | CDH1 *,** | NGS, MLPA | 192090 |
| | | 114480 | BRIP * | NGS; MLPA*, Sanger Sequenzierung Exon 12 | 605882 |
| | | 614291 | RAD51D *,** | NGS | 602954 |
| | | 114480 | TP53 *,** | NGS | 191170 |
| | | | | | |

Hereditäres Kolorektales Karzinom ohne Polyposis (HNPCC; Lynch Syndrom)

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist eine der häufigsten Tumorarten weltweit. Das lebenslange CRC-Risiko in der Allgemeinbevölkerung beträgt etwa 5-6%. Bei etwa 20% der Fälle liegt eine familiäre Häufung von zwei oder mehr betroffenen Verwandten ersten und/oder zweiten Grades vor. Etwa 5-10% der CRC sind monogen erblich bedingt, wobei 2-7% dem **HNPCC** (Hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom oder **Lynch-Syndrom**) zuzuschreiben sind. Das Lynch Syndrom wird durch Mutationen in einem der vier DNA-Mismatch-Reparaturgene **MLH1**, **MSH2**, **MSH6** oder **PMS2** bedingt, selten durch Deletionen in der 5'-Region des **EPCAM**-Gens. Das Lynch-Syndrom ist gekennzeichnet durch ein Auftreten der CRC in einem frühen Alter (≈ 44 Jahre), mit rechtsseitiger Dominanz ($\approx 70\%$ proximal der Milzflexur), und einem signifikanten Auftreten von synchronen und metachronen Läsionen. Neben CRC gibt es ein hohes Risiko für das Auftreten von Endometriumkarzinomen (Lebenszeitrisiko der Anlageträgerinnen 40-60%), gefolgt von Karzinomen des Eierstocks (bei 10-15% der Anlageträgerinnen), des Magens, des Dünndarms (bei 4-8%), der Bauchspeicheldrüse, des hepatobiliären Trakts, des Gehirns und des Urogenitaltraktes. In einigen Familien treten auch Talgdrüsenadenome und/oder Talgdrüsenkarzinome auf (seltene phänotypische Variante, Muir-Torre-Syndrom). Eine Mutation in einem der vier Mismatch-Reparaturgene findet sich in ca. 40-60% der HNPCC-Patienten, wobei **MSH2** und **MLH1**-Mutationen zusammen ca. 90% ausmachen.

Eine klinische Auswahl der Patienten und der durchzuführenden Analysen erfolgt nach den Amsterdam II Kriterien und den überarbeiteten Bethesda-Richtlinien. Ist eines der revidierten Bethesda-Kriterien erfüllt, findet zunächst eine Untersuchung auf Mikrosatelliteninstabilität am Tumorgewebe statt und/oder ein immunhistochemischer Nachweis der Anwesenheit der MLH1-, MSH2-, MSH6- und PMS2- Proteine im Tumor.

Bei nachgewiesener Mikrosatelliteninstabilität und/oder dem immunhistochemischen Verlust der Expression der MLH1-/PMS2-Proteine bzw. MSH2-/MSH6-Proteine werden die entsprechenden Gene auf das Vorliegen pathogener Mutationen analysiert (EBM Kap. 11.4.2, Ziffer 11431). Falls kein Tumormaterial vorliegt, der Patient aber die Amsterdam II Kriterien erfüllt, können auch alle vier Gene analysiert werden (EBM Kap. 11.4.2, Ziffer 11432).

Amsterdam II Kriterien (alle Kriterien müssen zutreffen)

1. Mindestens drei Familienmitglieder mit HNPCC-assoz. Karzinomen (Kolon/Rektum, Endometrium, Dünndarm, Urothel (Ureter/Nierenbecken))
2. Mindestens zwei aufeinanderfolgende Generationen betroffen
3. Ein Familienmitglied erstgradig verwandt mit den beiden anderen
4. Ein Erkrankter zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 50 Jahre
5. Ausschluss einer familiären adenomatösen Polyposis

Revidierte Bethesda-Kriterien (eines der Kriterien muss zutreffen)

- Patient mit CRC vor dem 50. Lj.
- Patient mit syn- oder metachronen kolorektalen oder anderen HNPCC-assoziierten Tumoren (Kolon, Rektum, Endometrium, Magen, Ovar, Pankreas, Ureter, Nierenbecken, biliäres System, Gehirn (v.a. Glioblastom), Haut (Talgdrüsenadenome und -karzinome, Keratoakanthome, Dünndarm)) unabhängig vom Alter bei Diagnose.
- Patient mit CRC vor dem 60. Lj. mit typischer Histologie eines MSI-H- Tumors (Tumor-infiltrierende Lymphozyten, Crohn's like Lesions, muzinöse oder siegelringzellige Differenzierung, medulläres Karzinom).
- Patient mit KRK, der einen Verwandten 1. Grades mit einem KRK oder einem HNPCC-assoziierten Tumor vor dem 50. Lebensjahr hat.
- Patient mit KRK (unabhängig vom Alter), der mindestens zwei Verwandte 1. oder 2.Grades hat, bei denen ein KRK oder ein HNPCC-assoziiertes Tumor (unabhängig vom Alter) diagnostiziert wurde.

| Erkrankung | ICD-10 | OMIM-P | Gen | Analysen | OMIM-Gen |
|--|--------|--------|--|---|--------------------------------------|
| Hereditäres Kolorektales Karzinom ohne Polyposis (HNPCC) | C18.- | 609310 | <i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i> | NGS, MLPA NGS, MLPA NGS; MLPA NGS; MLPA; Sanger Sequenzierung Exons 11-15* | 120436 609309 600678 600259 |

*wegen Anwesenheit hoch homologer Pseudogene zusätzliche Sanger Sequenzierung