

Prinzipien der genetischen Diagnostik bei Verdacht auf Immundefekt

STAND: 03-2023

AUTORIN:
PROF. DR. MED. MIN AE LEE-KIRSCH

Abstract

Technische und wissenschaftliche Fortschritte in der Genetik haben unser Verständnis von Krankheit in allen Bereichen der Medizin maßgeblich verändert. In der pädiatrischen Immunologie hat die Aufklärung monogen bedingter Erkrankungen, die auf einer Fehlregulation des Immunsystems beruhen, zu neuen grundlegenden Erkenntnissen über die vielfältigen Funktionen des Immunsystems geführt. Zunehmend sind Krankheiten des Immunsystems einer spezifischen therapeutischen Intervention zugänglich. Insofern kommt der genetischen Ursachenfindung bei der diagnostischen Abklärung eines Patienten im Hinblick auf das klinische Management eine besondere Bedeutung zu. Klinisch tätige Ärzte sollten daher mit den Möglichkeiten und Grenzen aktueller molekulargenetischer diagnostischer Verfahren vertraut sein.

Einfluss der Genetik auf die klinische Medizin

Die Genetik als medizinisches Anwendungsgebiet befasst sich mit der Erforschung genetisch bedingter Variabilität und deren Auswirkung auf die Entstehung von Krankheiten. Der rasante Fortschritt in der genetischen Forschung, insbesondere die Entschlüsselung des humanen Genoms im Jahr 2001, sowie die stetige Weiterentwicklung molekulargenetischer Technologien haben ganz wesentlich dazu beigetragen, dass wir die genetischen Grundlagen von Gesundheit und Krankheit besser verstehen. So lassen sich mit Hilfe molekulargenetischer

Methoden nicht nur Genmutationen identifizieren, welche eine Krankheit verursachen oder den Entstehungsprozess einer Erkrankung maßgeblich beeinflussen, sondern auch immer öfter Aussagen über den Verlauf einer Erkrankung oder das Ansprechen auf therapeutische Interventionen machen. Wissenschaftliche genetische Erkenntnisse sind ein zentraler Motor bei der Entwicklung neuer diagnostischer Verfahren sowie neuer zielgerichteter Behandlungsansätze und nehmen daher eine Schlüsselrolle bei der medizinischen Innovation ein. Genetische und genomische Informationen haben damit weitreichenden Einfluss auf alle Sektoren der Medizin. Den Möglichkeiten der molekulargenetischen Diagnostik und der kontinuierlichen Zunahme an genetischem Wissen stehen für den klinisch tätigen Arzt Herausforderungen gegenüber, die mit der Anwendung molekulargenetischer Technologien und der Interpretation genetischer Daten verbunden sind. Immer mehr müssen Ärzte auf der Grundlage meist sehr komplexer Informationen individuelle diagnostische und therapeutische Entscheidungen treffen. So lassen sich im Rahmen der individualisierten Medizin, basierend auf dem Wissen um krankheits- und therapierelevante Gene, zunehmend maßgeschneiderte Therapien ableiten. Dies trifft beson-



Tabelle 1: Web-basierte regelmäßig aktualisierte Informationsquellen zu genetisch bedingten Erkrankungen

Datenbase	Web-Adresse	Beschreibung
OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man	www.omim.org	Katalog humaner Gene und genetisch bedingter Krankheiten; Beschreibung von Genfunktionen, Krankheitsphänotypen und Krankheitsmechanismen; umfassende Literaturangaben und Links zu Gen- und Protein-Datenbasen; kuratiert von der Johns Hopkins University, Baltimore, USA
GeneReviews	www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116	Übersicht über gut erforschte genetisch bedingte Krankheiten mit klinisch relevanten Informationen zu Diagnose, Differential-diagnose und Therapie; umfassende Literaturangaben und Links zu weiteren Datenbasen; kuratiert vom National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine und National Institutes of Health, Bethesda, USA
Orphanet	www.orpha.net/national/DE-DE/index/startseite	Verzeichnis seltener Krankheiten; Informationen über Leitlinien, Expertenzentren, Diagnostikleistungen, Forschungsprojekte, Register, klinische Studien und Patientenorganisationen; Literaturangaben und Links zu weiteren Datenbasen; Orphanet Deutschland wird von der Medizinischen Hochschule Hannover kuratiert, Orphanet International wird vom Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) und der Europäischen Kommission kuratiert

ders für die pädiatrische Immunologie zu, da sich zahlreiche genetisch bedingte Erkrankungen, die mit einer Immundysregulation einher gehen, mit einem größer werdenden Arsenal an Biologika gezielt behandeln lassen⁽¹⁾. Daher ist es besonders wichtig, sich kontinuierlich zu informieren und interdisziplinär zu vernetzen, um neue wissenschaftliche Zusammenhänge über Krankheitsmechanismen zu verstehen und Evidenz-basierte Entscheidungen im Interesse des Patienten treffen zu können. Eine Möglichkeit sich über genetisch bedingte Erkrankungen zu informieren, stellen unabhängige, qualitätsgesicherte und ständig aktualisierte Informationsplattformen im Internet dar, auf die Ärzte zugreifen können, um sich ergänzend zu informieren (Tab. 1) ^(2,3).

Molekulargenetische Diagnostik

Die Entwicklung molekulargenetischer Methoden, insbesondere die Entwicklung der unter dem Begriff des Next generation sequencing (NGS) zusammengefassten neuen Sequenziertechnologien, haben die genetische Diagnostik revolutioniert und wesentlich zur Identifizierung neuer krankheitsrelevanter Genen beigetragen. Die Technolo-

gie des NGS ermöglicht die simultane Sequenzierung multipler Regionen des Genoms oder des gesamten Genoms innerhalb kurzer Zeit. Das Exom umfasst alle Exons (Expressed regions) der ca. 23.000 Protein-kodierenden Gene des Menschen, die zusammen lediglich etwa 1,5 % des gesamten Genoms ausmachen. Da bei monogenen Erkrankungen ca. 85 % aller Mutationen in Protein-kodierenden Genabschnitten liegen, stellt die Exom-Sequenzierung (Whole exome sequencing) eine sinnvolle Methode für die Identifizierung krankheitsrelevanter Mutationen dar (Tab. 2). Mit der Exom-Sequenzierung lassen sich vor allem Punktmutationen und kleinere Deletionen/Insertionen gut identifizieren, wobei mittlere oder größere Deletionen/Insertionen sowie schwache Mosaik je nach Analyseverfahren nicht sicher auffindbar sind. Wichtige Voraussetzung für eine akkurate Datenanalyse ist vor allem eine ausreichende Sequenziertiefe, die eine möglichst vollständige Abdeckung des Exoms und die Identifizierung heterozygoter Genvarianten gewährleistet.

Bei einer Panel-Sequenzierung werden nur gezielt ausgewählte Gene, die für eine Krankheit oder eine Krankheitsgruppe relevant sind, sequenziert (Tab. 2).



Tabelle 2: Molekulargenetische Methoden zum Nachweis genetischer Veränderungen

Methode	Verfahren	Nachweisbare Mutationen
Einzelgen-Sequenzierung	Ermittlung der Basenabfolge eines Genabschnitts, der zuvor per PCR amplifiziert wurde, mittels Kettenabbruch-Synthese nach Sanger	Punktmutationen, kleine Deletionen oder Insertionen
Exom-Sequenzierung	Sequenzierung der Protein-kodierenden Abschnitte (Exons) aller Gene mittels Next generation sequencing. Bei der Auswertung werden in der Regel nur ausgewählte Gene, die für eine bestimmte Erkrankung oder eine Erkrankungsgruppe relevant sind, analysiert. In diesem Fall spricht man auch von Panel-Analyse. Da aber das gesamte Exom sequenziert wurde, können bei einer Reevaluation weitere andere Gene in die Auswertung mit einbezogen werden.	Punktmutationen, kleine Deletionen oder Insertionen, je nach Sequenziertiefe auch Mosaik
Panel-Sequenzierung	Parallele Sequenzierung mehrerer Gene, die für eine bestimmte Erkrankung oder eine Erkrankungsgruppe relevant sind, mittels Next generation sequencing. Es können nur die sequenzierten Gene ausgewertet werden.	Punktmutationen, kleine Deletionen oder Insertionen, Mosaik
Genom-Sequenzierung	Sequenzierung des gesamten Genoms mittels Next generation sequencing	Punktmutationen, kleine Deletionen oder Insertionen, Gendosis-Variationen (Copy number variants), mitochondriale Gene, je nach Sequenziertiefe auch Mosaik

Zunehmend wird statt einer Panel-Sequenzierung eine Panel-Analyse durchgeführt. Hierbei erfolgt eine Exom-Sequenzierung, jedoch werden bei der Datenauswertung nur gezielt ausgewählte Gene, also ein Panel, analysiert. Diese Vorgehensweise ermöglicht es, im Rahmen einer Reevaluation der Exom-Daten, andere bisher nicht ausgewertete Gene nachträglich zu analysieren.

Trotz höherer Kosten und besonderer Anforderungen an Computerkapazität, hat die Genom-Sequenzierung (Whole genome sequencing) inzwischen Einzug in die Routinediagnostik gefunden. So besteht seit 2022 für bestimmte gesetzlich versicherte Patienten an ausgewählten Zentren für Seltene Erkrankungen (www.se-atlas.de) im Rahmen eines interdisziplinären Fallmanagements, die Möglichkeit einer Genom-Sequenzierung.

Die Frage, welche genetische Untersuchung zu welchem Zeitpunkt am sinnvollsten ist, hängt von der klinischen Präsentation eines Patienten ab. So ist bei Vorliegen klinisch eindeutiger Symptome eine Einzelgen-Sequenzierung (Tab. 2) sinnvoll. Bei klinischen Symptomen, die

sich nicht sicher einer bestimmten Erkrankung zuordnen lassen, ist unter den aktuellen Randbedingungen eine Exom-Sequenzierung zu empfehlen. Dies gilt insbesondere dann, wenn aufgrund der Stammbaumdaten ein monogener Erbgang angenommen werden kann. Die Exom-Sequenzierung kann aber auch bei Patienten ohne auffällige Familienanamnese, die einen besonders ungewöhnlichen oder schweren Verlauf oder einen sehr frühen Krankheitsbeginn aufweisen, eingesetzt werden. Zudem erlaubt die parallele Exom-Sequenzierung der Eltern eines erkrankten Kindes, selbst wenn diese nicht von der Erkrankung betroffen sind, die Identifizierung von de novo-Mutationen. Insgesamt wird die Diagnoserate mittels Exom-Sequenzierung auf ca. 25 % geschätzt, wobei unter Kleinkindern eine Diagnoserate von bis zu 50 % erzielt werden kann⁽⁴⁻⁷⁾.

Bei weiterhin unklaren Fällen kann eine Genom-Sequenzierung zielführend sein, da mit dieser Methode auch tiefe intronische oder regulatorische Sequenzen, die das Splicing von Gen-Transkripten verändern können, erfasst werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die

CSL Behring

Think Human

Einfach ersetzen, was fehlt.

Über 100 Jahre
Plasmaprotein-Forschung

CSL Behring ist ein weltweit führendes Unternehmen im Bereich Biotherapeutika, das sich seinem Versprechen, Leben zu retten, verpflichtet hat.

Wir erforschen, entwickeln und liefern innovative Therapeutika für Menschen mit Erkrankungen in den Bereichen

- **Immunologie**
- **Hämatologie**
- **Herz-Kreislauf- und Stoffwechselkrankheiten**
- **Atemwegserkrankungen und Transplantation**

Für die Herstellung unserer Therapien nutzen wir drei strategische wissenschaftliche Plattformen: Plasmafraktionierung, rekombinante Proteintechnologie sowie Zell- und Gentherapie. Damit fördern wir kontinuierliche Innovation und verbessern die Art und Weise, wie Produkte ungedeckte medizinische Bedürfnisse erfüllen. Dies mit dem Ziel, Patienten helfen zu können, ein erfülltes Leben zu führen.

www.cslbehring.de

Tabelle 3: Einteilung von Gen-Varianten nach ACMG-Kriterien ⁽⁸⁾

Klasse	Wahrscheinlichkeit, pathogen zu sein	Interpretation, weiteres Vorgehen
1 – benigne	< 0,001	<ul style="list-style-type: none"> • nicht krankheitsrelevant
2 – wahrscheinlich benigne	0,001 – 0,049	<ul style="list-style-type: none"> • nicht krankheitsrelevant
3 – Variante unklarer Signifikanz	0,05 – 0,949	<ul style="list-style-type: none"> • nicht sicher krankheitsrelevant • unter Berücksichtigung weiterer Kriterien wie Art der Mutation, Populationsfrequenz, funktionelle Daten etc. kann die Einschätzung der Krankheitsrelevanz von niedrig bis hoch variieren • eine Reevaluation ist sinnvoll, z. B. nach Segregationsanalyse der Variante in der Familie
4 – wahrscheinlich pathogen	0,95 – 0,99	<ul style="list-style-type: none"> • krankheitsrelevant • krankheitsspezifische Maßnahmen erforderlich
5 – pathogen	> 0,99	<ul style="list-style-type: none"> • krankheitsrelevant • krankheitsspezifische Maßnahmen erforderlich

Genom-Sequenzierung in den kommenden Jahren die Exom-Sequenzierung als primäres genetisches Diagnoseverfahren ablösen wird.

Für bestimmte Fragestellungen, beispielsweise bei Verdacht auf grobstrukturelle chromosomale Aberrationen, spielen andere etablierte Methoden der molekulargenetischen Diagnostik wie die Array-CGH (Comparative genomic hybridization) oder die Chromosomenanalyse weiterhin eine Rolle. Die Klärung der genetischen Ursache einer Erkrankung ist nicht nur für den betroffenen Patienten, sondern auch für die gesamte Familie von großer Bedeutung. So eröffnet die molekulargenetische Sicherung der Diagnose die Möglichkeit, weitere Familienmitglieder gezielt auf Mutationsstatus oder Anlageträgerschaft zu untersuchen, Aussagen über das Wiederholungsrisiko zu machen sowie Maßnahmen für eine vorgeburtliche Diagnostik zu ergreifen.

Interpretation von Varianten unklarer Varianz

Der Kenntnis aller Gen-Varianten des Exoms eines Individuums steht die Schwierigkeit gegenüber, die genetischen Daten hinsichtlich ihrer pathogenetischen Rele-

vanz zu interpretieren. Ein weiterer Aspekt ist die Frage, wie man mit sekundären Befunden wie beispielsweise Mutationen in Onkogenen umgeht, die nicht im Zusammenhang mit der betrachteten Erkrankung stehen. Dies sollte im Vorfeld einer Diagnostik mit dem Patienten bzw. den Eltern eines erkrankten Kindes besprochen werden.

Nach den Leitlinien des American College of Medical Genetics and Genomics wird für die Interpretation von Sequenz-Varianten eine Klassifizierung empfohlen, die sich danach orientiert, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Gen-Variante pathogen ist ⁽⁸⁾. Demnach werden Varianten in 5 Klassen mit zunehmenden Grad an Pathogenität eingeteilt, wobei die Einteilung verschiedene Evidenzkriterien berücksichtigt wie populationsbezogene Allelfrequenzen, bioinformatische Vorhersagen zur funktionellen Auswirkung einer Variante, Segregationsdaten sowie experimentelle Daten zur Funktion (Tab. 3).

Wenn bei der Analyse des Exoms oder Genoms eines Patienten eine Gen-Variante identifiziert wird, bei der unklar ist, ob diese Variante tatsächlich ursächlich mit der Krankheit zusammenhängt, wird diese als Variante unklarer Signifikanz (VUS) bezeichnet. Solche VUS

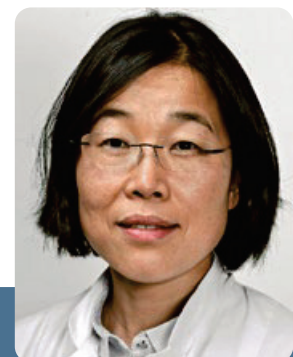
machen den größten Anteil aller Varianten aus. In der Regel sind weitere Informationen erforderlich, um festzustellen, ob die Variante mit einer Krankheit in Zusammenhang steht. Hierzu zählt die Segregationsanalyse, mit der geprüft wird, ob alle Familienmitglieder, die die Variante tragen, auch an der betrachteten Krankheit erkrankt sind. Weiterhin können neue wissenschaftliche Erkenntnisse oder experimentelle Untersuchungen auf Forschungsbasis Aufschluss über die funktionelle Auswirkung einer Variante geben. Da diese Einflussgrößen einem stetigen Wandel unterliegen, kann die Interpretation von VUS als dynamischer Prozess betrachtet werden. Daher sollte bei Vorliegen einer VUS gegebenenfalls in regelmäßigen Abständen eine erneute Evaluation und Interpretation erfolgen.

Fazit für die Praxis

- * Genetische Faktoren spielen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese zahlreicher Krankheitsbilder, die mit einer Fehlregulation des Immunsystems einhergehen.
- * Für eine zunehmende Anzahl an Erkrankungen des Immunsystems stehen gezielte Therapien zur Verfügung. Daher kommt der Sicherung der genetischen Diagnose eine entscheidende Rolle zu.
- * Die molekulargenetische Abklärung eines Patienten sollte in Abhängigkeit von der Symptomkonstellation erfolgen. Bei eindeutigen Symptomen kann als Erstes die Einzelgen-Sequenzierung erfolgen. NGS-basierte Methoden wie die Exom-Sequenzierung sind bei unklarer Symptomatik sinnvoll.
- * Da das Wissen über die genetischen Ursachen von Immundefekten stetig zunimmt, sollten molekulargenetische Befunde, die im Rahmen einer Exom-Sequenzierung erhoben wurden, bei weiterhin unklarer Diagnose regelmäßig reevaluiert werden.

Literatur

1. Manthiram K, Zhou Q, Aksentijevich I, Kastner DL. The monogenic auto-inflammatory diseases define new pathways in human innate immunity and inflammation. *Nat Immunol.* 2017 Jul 19;18(8):832-42.
2. Antonarakis SE, McKusick VA. OMIM passes the 1,000-disease-gene mark. *NatGenet.* 2000 May;25(1061-4036 (Print)):11.
3. Pavan S, Rommel K, Mateo Marquina ME, Höhn S, Lanneau V, Rath A. Clinical Practice Guidelines for Rare Diseases: The Orphanet Database. *PLoS ONE.* 2017;12(1):e0170365.
4. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical Whole-Exome Sequencing for the Diagnosis of Mendelian Disorders. *New England Journal of Medicine.* 2013 Oct 17;369(16):1502-11.
5. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical Exome Sequencing for Genetic Identification of Rare Mendelian Disorders. *JAMA.* 2014 Nov 12;312(18):1880-7.
6. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA.* 2014 Nov 12;312(18):1870-9.
7. Posey JE, Rosenfeld JA, James RA, Bainbridge M, Niu Z, Wang X, et al. Molecular diagnostic experience of whole-exome sequencing in adult patients. *Genet Med.* 2016 Jul;18(7):678-85.
8. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, 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 May;17(5):405-24.



Prof. Dr. med. Min Ae Lee-Kirsch
 Molekulare Pädiatrie
 Universitätsklinikum Carl Gustav Carus
 Technische Universität Dresden
 Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin