



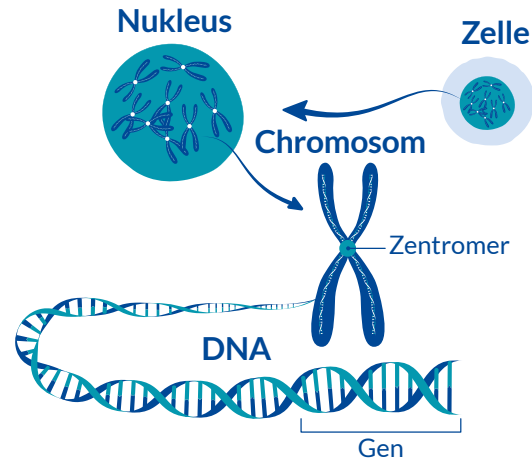
GENETISCHE DIAGNOSTIK IN DER PÄDIATRIE

LEITFADEN FÜR DIE PRAXIS

Die Humangenetik ist ein sich ständig weiterentwickelndes Fach, das gerade in der pädiatrischen Diagnostik eine zunehmend zentrale Rolle einnimmt. Sie ermöglicht es, die komplexen Grundlagen von Erkrankungen zu verstehen und therapeutische Ansätze zu entwickeln. Diese Broschüre richtet sich an alle Kinderärztinnen und Kinderärzte. Sie soll ihnen dabei die Grundlagen und Anwendungen dieses Fachgebiets näherbringen und helfen, die diagnostischen Möglichkeiten besser zu verstehen.

HUMANGENETISCHE GRUNDLAGEN

Die DNA befindet sich im Kern der Zellen und enthält die genetische Information. Der genetische Code ist der Schlüssel zur Herstellung und Funktion von Proteinen. Obwohl die DNA den allgemeinen Bauplan für Organismen enthält, gibt es genetische Variationen, die Unterschiede zwischen Individuen hervorrufen. Diese Variationen sind die Grundlage für die Vielfalt des Lebens, können jedoch auch Grundlage genetischer Erkrankungen sein. Während genetische Veränderungen früher als **Mutationen** bezeichnet wurden, so werden diese heute als **Varianten** bezeichnet, denn erst ihre Klassifikation als (wahrscheinlich) pathogen verleiht einer genetischen Veränderung, also einer Variante, einen Krankheitswert.

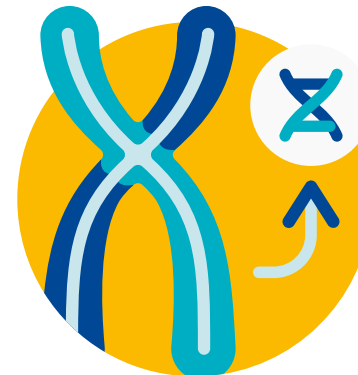


DIE GENETISCHE UNTERSUCHUNG UND IHRE RECHTLICHE GRUNDLAGE

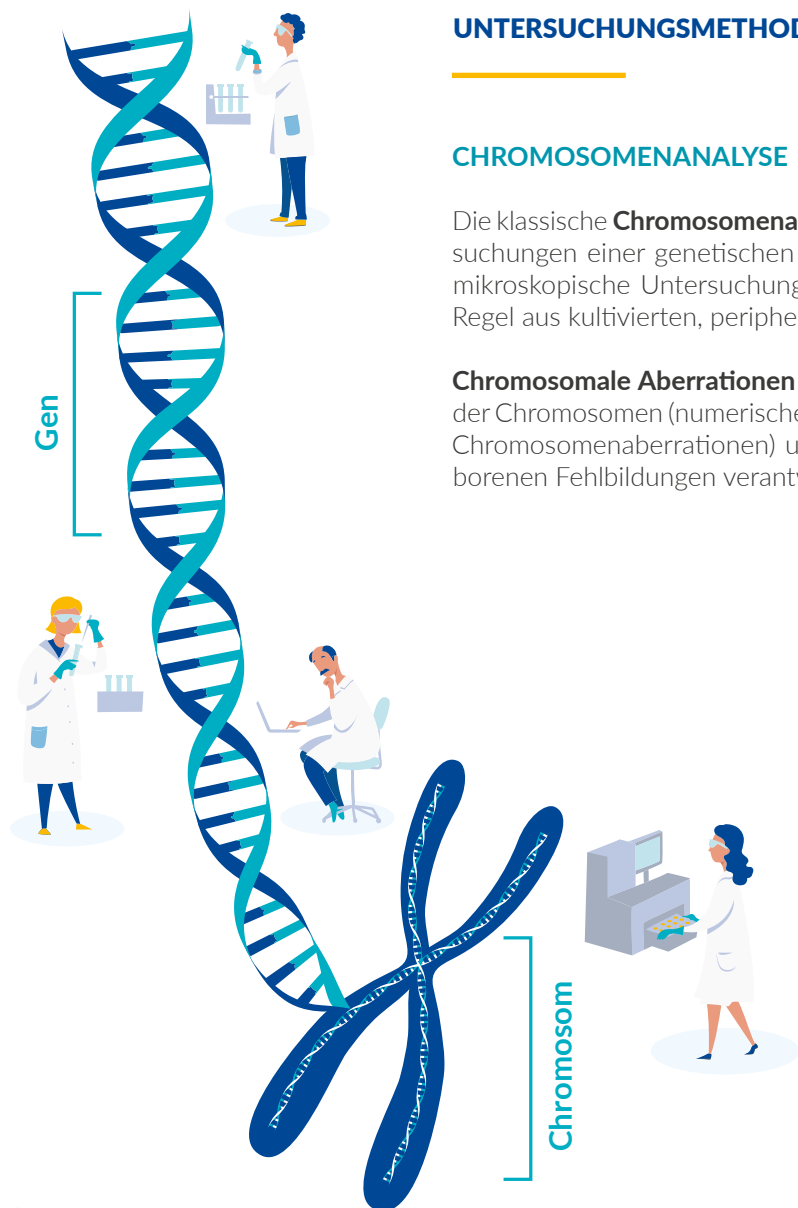


Diagnostische genetische Untersuchungen werden dann durchgeführt, wenn eine Person klinisch bereits Symptome einer Erkrankung zeigt. Diese Art der Untersuchung darf von jedem/r Arzt/Ärztin veranlasst werden. Es ist eine schriftliche Einwilligung des/r Patient:in oder des gesetzlichen Vertreters/ der gesetzlichen Vertreterin erforderlich, jedoch vorab keine genetische Beratung.

Die Abklärung, ob genetische Eigenschaften vorliegen, die zusammen mit der Einwirkung bestimmter äußerer Faktoren oder Fremdstoffe eine Erkrankung auslösen können, gehört ebenfalls zu den diagnostischen Untersuchungen. Liegen beispielsweise Anhaltspunkte für das Vorhandensein einer arrhythmogenen Herzerkrankung vor (z.B. Fälle in der Familie), so kann eine diagnostische genetische Untersuchung des/r Patient:in erfolgen - auch ohne das Vorliegen von klinischen Symptomen.



Prädiktive genetische Untersuchungen werden bei Personen durchgeführt, die klinisch unauffällig sind. Ziel dabei ist es, eine individuelle Risikoabschätzung vornehmen zu können. Zu den prädiktiven Untersuchungen gehört insbesondere die Testung auf eine in der Familie bereits bekannte Variante. Diese Untersuchung darf nur durch Fachärzt:innen für Humangenetik oder aber Ärzt:innen mit der Zusatzqualifikation zur fachgebundenen genetischen Beratung angefordert werden. Sie erfordert neben der schriftlichen Einwilligung des/r Patient:in eine vorherige genetische Beratung.



UNTERSUCHUNGSMETHODEN ZYTOGENOMIK

CHROMOSOMENANALYSE

Die klassische **Chromosomenanalyse** gehört zu den Basisuntersuchungen einer genetischen Analytik und umfasst die lichtmikroskopische Untersuchung des Erbgut. Sie erfolgt in der Regel aus kultivierten, peripheren Blutlymphozyten.

Chromosomale Aberrationen betreffen entweder die Anzahl der Chromosomen (numerische) oder ihre Struktur (strukturelle Chromosomenaberrationen) und sind für 0,5-1 % aller angeborenen Fehlbildungen verantwortlich.

FISH

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) werden fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden auf Chromosomenpräparate hybridisiert, um chromosomale Anomalien wie Translokationen, Deletionen und Amplifikationen (v. a. Duplikationen) zu detektieren.

ARRAY-CGH

Die Array-based Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH) bietet die Möglichkeit einer hochauflösenden Genomanalyse. Hiermit können Stückverluste oder -zugewinne erkannt werden, wobei das Auflösungsvermögen routinemäßig bei etwa 20-50 Kilobasen liegt. Nicht erkannt werden balancierte strukturelle Veränderungen, da die Untersuchung auf dem Prinzip einer Dosismessung basiert.

OPTICAL GENOME MAPPING

Das Optical Genome Mapping dient dazu, die Struktur und Anordnung des gesamten Genoms zu kartieren. Dabei können strukturelle Veränderungen im Genom, wie Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen, identifiziert werden. Die Technik ermöglicht dabei auch den Nachweis von kleinen, balancierten Translokationen sowie die genaue Identifizierung und Charakterisierung des Bruchpunktes, der bei einer strukturellen Veränderung entsteht. So kann dieser beispielsweise auch bei einer eigentlich balanciert erscheinenden Translokation, also ohne Verlust oder Zugewinn von Erbinformation, innerhalb eines Gens verlaufen und somit zu einer Funktionseinschränkung führen.

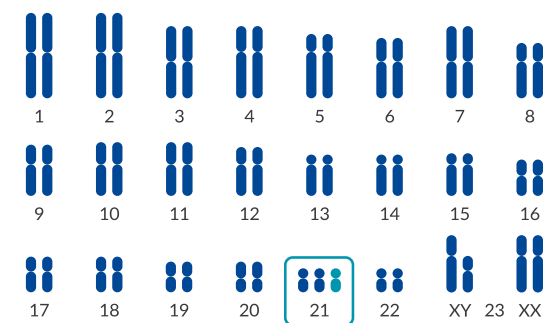


Abbildung des Erbguts einer Zelle mit 23 Chromosomenpaaren. Hier Trisomie 21 - drei Kopien des Chromosoms 21 anstelle von zwei

WHOLE EXOME SEQUENCING (GESAMTEXOMSEQUENZIERUNG; WES) / WHOLE GENOME SEQUENCING (GESAMTGENOMSEQUENZIERUNG; WGS)

Mit dem WES können alle proteincodierenden Bereiche der DNA (alle Exons; entspricht ca. 1-2 % des Genoms) untersucht werden. Das WES ist sehr flexibel und für verschiedene Indikationen einsetzbar, insbesondere für ursächlich ungeklärte Entwicklungsstörungen.

Die Analyse wird vorzugsweise im sogenannten Trio-Exom-Ansatz durchgeführt. Hierbei wird die DNA des/r Indexpatient:in vergleichend mit der DNA der biologischen Eltern untersucht. Die Eltern erhalten dabei in der Regel keinen individuellen genetischen Befund, ihre Untersuchung dient in der Auswertung lediglich dem Erkennen, ob und wenn ja, von wem eine beim Kind detektierte Variante ererbt wurde. Somit kann die Auswertung und schließlich die Aufklärungsrate deutlich verbessert werden.

Entscheidend ist darüber hinaus, dass detaillierte klinische Informationen über das Kind vorliegen. Basierend auf phänotypischen Merkmalen ist eine algorithmusbasierte, und somit differenzierte Auswertung mit Fokus auf die klinischen Merkmale des Kindes möglich (sog. HPO-terms; human phenotype ontology).

Im Vergleich zum Whole Exome Sequencing (WES), bei dem alle proteincodierenden Bereiche analy-

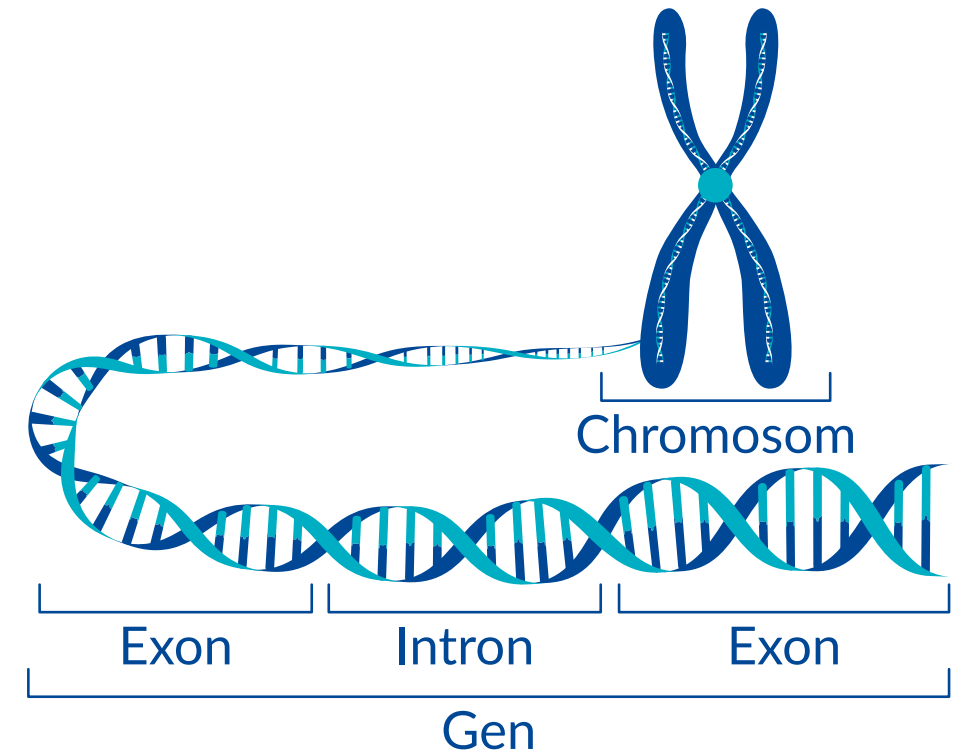
siert werden, handelt es sich beim Whole Genome Sequencing (WGS) um die Sequenzierung des gesamten Genoms, d.h. auch aller nicht-codierenden Regionen. Auch wenn das WGS derzeit noch mit vergleichsweise hohen Kosten verbunden ist und eine besonders hohe Anzahl von unklaren Varianten erwartet wird, erhält das WGS allmählich Einzug in die Routine-Diagnostik.

Vor einer Untersuchung mittels WES oder WGS muss eine entsprechende Aufklärung im Sinne des Gendiagnostikgesetzes erfolgen. Diese kann im Falle einer diagnostischen Untersuchung, also bei einem klinisch auffälligen Kind, durch jede:n Kinderarzt/-ärztin erfolgen.

Im Rahmen eines WES/WGS können sogenannte Zusatz- oder Zufallsbefunde auftreten, also derartige Befunde, die nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Fragestellung stehen, jedoch von klinischer oder therapeutischer Relevanz sein können. Ob ein/e Patient:in die Mitteilung solcher Befunde wünscht, soll vor der Untersuchung besprochen und entsprechend auf der Einwilligungserklärung für die genetische Untersuchung vermerkt werden. Die Aufklärung für die sogenannte Segregationsanalyse, also die Untersuchung und Mitteilung darüber, ob und wenn ja, welcher von beiden Elternteilen eine beim Kind nachgewiesene

Veränderung ebenfalls trägt, erfordert vorab eine fachärztlich humangenetische Beratung.

Zusammengefasst ist also die Anforderung einer genetischen Untersuchung, die der Ursachenerklärung bei einem klinisch auffälligen Kind dient, durch jede:n Kinderarzt/-ärztin möglich.



EINZELGEN-, PANEL- UND ZIELDIAGNOSTIK

PANELDIAGNOSTIK

Wenn bei einer Erkrankung ursächliche Varianten in verschiedenen Genen auftreten können, so werden diese Gene in einem Panel zusammengefasst und in einem Ansatz untersucht. Auch können verschiedene genetische Erkrankungen mit ähnlicher Symptomatik in einem Ansatz analysiert werden. Eine Panel Diagnostik ermöglicht einen umfassenden Diagnoseansatz bei überlappenden klinischen Präsentationen.

EINZELGENDIAGNOSTIK

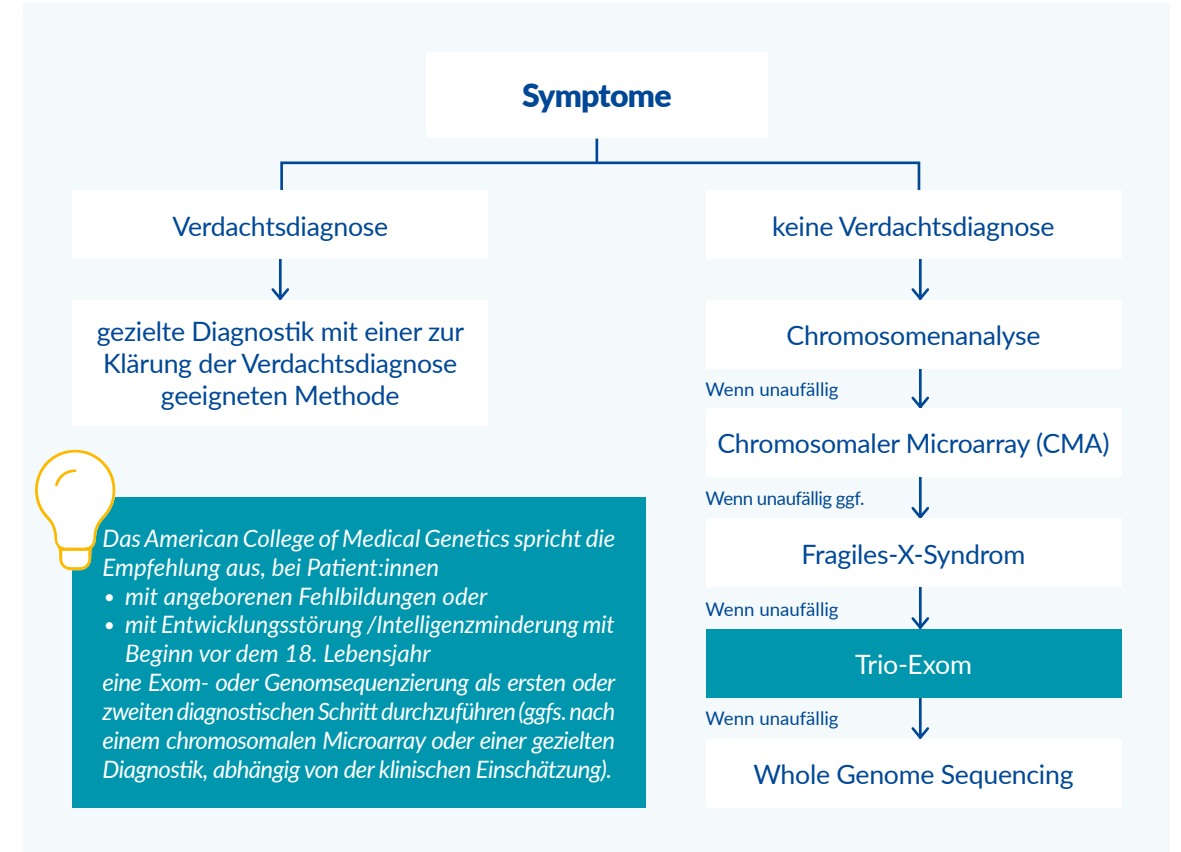
Einzelgendiagnostik analysiert ein spezifisches Gen, um genetische Varianten zu identifizieren, die für die Symptome einer Person verantwortlich sein könnten. Diese Methode ist vor allem dann indiziert, wenn basierend auf Symptomen und Familienanamnese der Verdacht auf eine bestimmte genetische Erkrankung besteht.

ZIELDIAGNOSTIK

Eine Zieldiagnostik ermöglicht den Nachweis einer spezifischen genetischen Veränderung, die in einer Familie bereits bekannt ist.



DIAGNOSTISCHES VORGEHEN



WANN SOLLTE EINE GENETISCHE UNTERSUCHUNG IN BETRACHT GEZOGEN WERDEN?

Eine genetische Untersuchung kann im Rahmen verschiedener Indikationen sinnvoll sein, unter anderem bei

- klinischem Verdacht auf eine genetische Erkrankung,
- ungeklärten Entwicklungsverzögerungen oder Intelligenzminderungen,
- angeborenen Fehlbildungen oder Dysmorphien, wie z.B. Skelettanomalien oder Herzfehler,
- unklaren oder komplexen Krankheitsbildern.

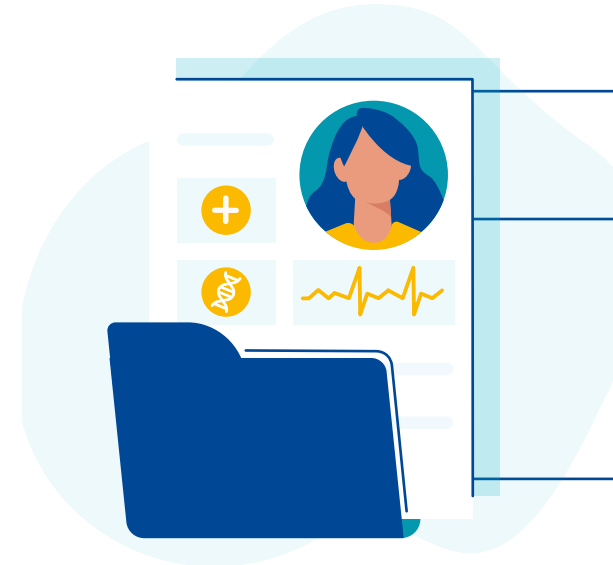
Besonders bei Patient:innen mit angeborenen Fehlbildungen oder mit Entwicklungsstörung / Intelligenzminderung wird empfohlen, eine Exom- oder Genomsequenzierung als ersten oder zweiten diagnostischen Schritt durchzuführen.

Diese Vorgehensweise erhöht die Chance, eine genetische Ursache einer Erkrankung mit komplexen und unspezifischen Symptomen zu finden, und kann somit die Zeit bis zur Diagnosestellung verkürzen und die Kosten durch Ersparnis zusätzlicher diagnostischer Verfahren verringern.

Bei Unsicherheiten kann es helfen, das Kind zur Mitbeurteilung in einer klinisch-genetischen Sprechstunde vorzustellen.

WELCHE ERGEBNISSE KANN EINE SOLCHE UNTERSUCHUNG LIEFERN?

Nicht jede Abweichung vom sogenannten Referenzgenom ruft eine Erkrankung hervor. Die Varianten werden daher gemäß den Guidelines des American College of Medical Genetics (ACMG) klassifiziert.

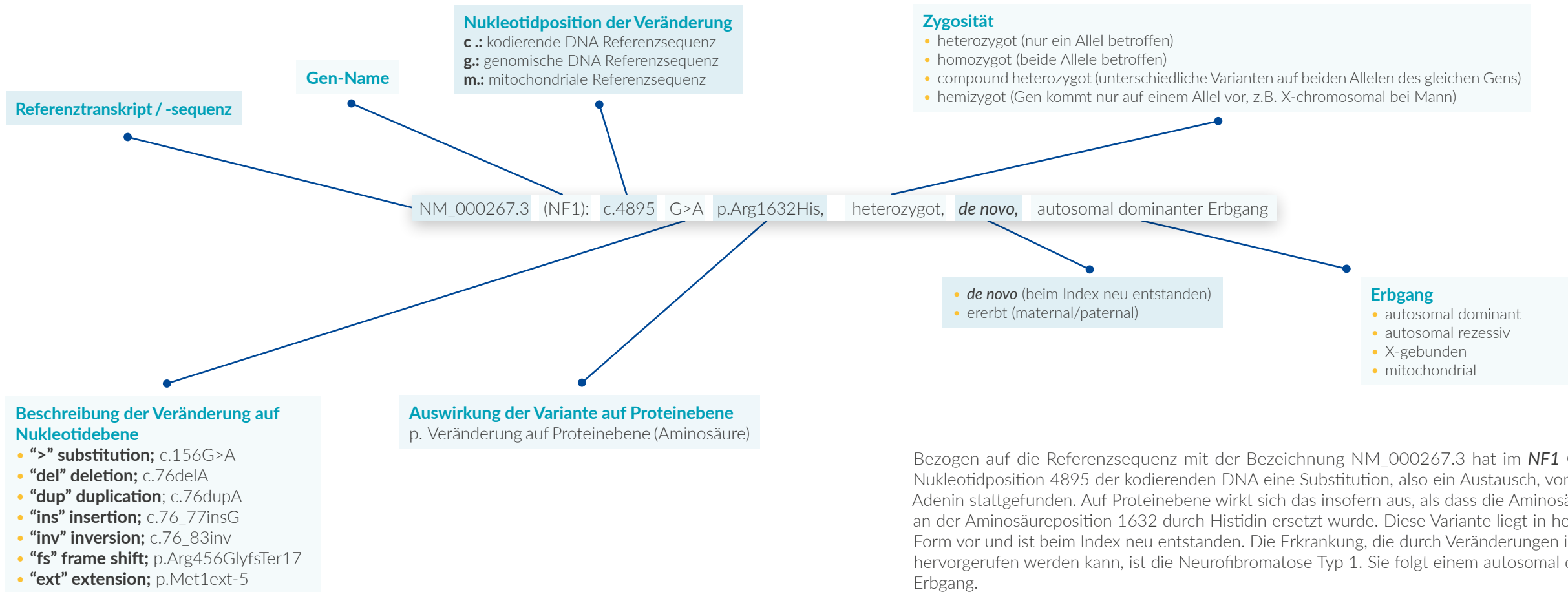


• **Klasse 4 und 5** sind wahrscheinlich bzw. sicher pathogene Varianten, also solche, die mit einer Erkrankung in ursächlichem Zusammenhang stehen.

• Für Varianten der **Klasse 3** kann keine Aussage hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz getroffen werden. Diese werden als Varianten unklarer Signifikanz (VUS) bezeichnet. Hier empfiehlt sich eine Reevaluation nach 2-4 Jahren, ggf. in Zusammenarbeit mit hinzukommenden klinischen Merkmalen.

• **Klasse 1 und 2** sind benigne bzw. wahrscheinlich benigne Varianten, die also keine Erkrankung hervorrufen, sondern zur normalen Variation zwischen gesunden Individuen beitragen.

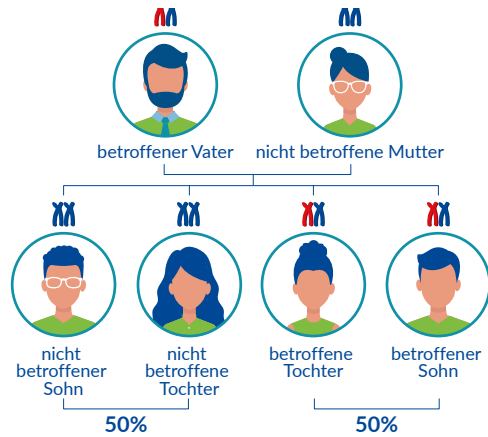
WIE IST EIN GENETISCHER BEFUND ZU LESEN?



Bezogen auf die Referenzsequenz mit der Bezeichnung NM_000267.3 hat im **NF1** Gen an der Nukleotidposition 4895 der kodierenden DNA eine Substitution, also ein Austausch, von Guanin zu Adenin stattgefunden. Auf Proteinebene wirkt sich das insofern aus, als dass die Aminosäure Arginin an der Aminosäureposition 1632 durch Histidin ersetzt wurde. Diese Variante liegt in heterozygoter Form vor und ist beim Index neu entstanden. Die Erkrankung, die durch Veränderungen im **NF1** Gen hervorgerufen werden kann, ist die Neurofibromatose Typ 1. Sie folgt einem autosomal dominanten Erbgang.

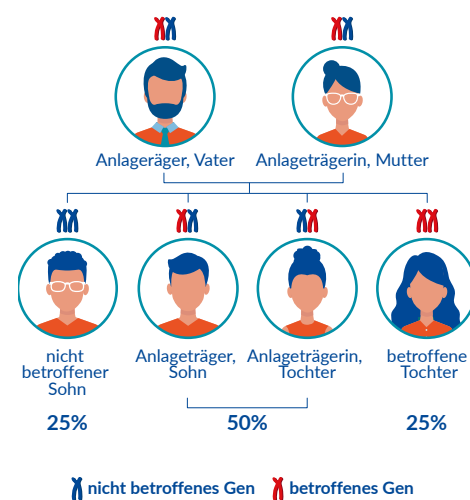
ART DER VERERBUNG

AUTOSOMAL DOMINANTE VERERBUNG



Bei einem autosomal dominanten Erbgang genügt es, wenn eine der beiden Genkopien eine veränderte Variante enthält, um die Ausprägung eines Krankheitsbildes oder Merkmals zu bedingen. Die krankheitsursächliche Variante wird dabei mit einer Wahrscheinlichkeit von jeweils 50% von einem betroffenen Elternteil an direkte Nachkommen beider Geschlechter vererbt. In etwa 90% der Fälle wird die Variante von einem ebenfalls betroffenen Elternteil geerbt. In etwa 10% der Fälle ist die erkrankte Person die bzw. der erste Betroffene in der Familie, man geht dann von einer neu entstandenen (de novo) Veränderung aus.

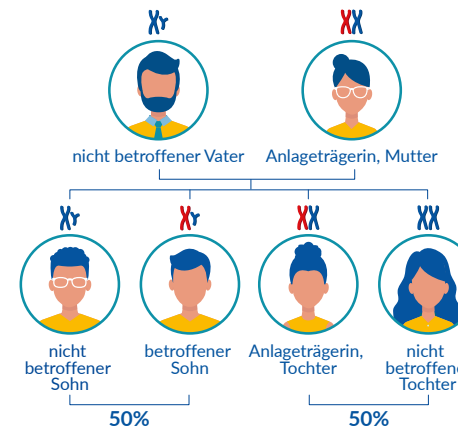
AUTOSOMAL REZESSIVE VERERBUNG



Bei einem autosomal rezessiven Erbgang tritt eine Erkrankung erst dann in Erscheinung, wenn die betroffene Person zwei veränderte Genkopien trägt. Träger:innen von nur einer veränderten Genkopie sind in der Regel gesunde Anlageträger:innen. Typischerweise wird beim autosomal rezessiven Erbgang eine veränderte Genkopie vom Vater und eine weitere von der Mutter erbt. Daher sind bei einem autosomal rezessiven Erbgang meistens nur ein Familienmitglied oder mehrere Geschwister betroffen, während die Eltern gesunde Anlageträger:innen sind. Sind beide Elternteile Anlageträger:in für die Erkrankung, besteht in jeder weiteren Schwangerschaft ein

Wiederholungsrisiko für ein betroffenes Kind von 25%. 50% der Nachkommen sind ebenfalls gesunde Anlageträger:innen, 25% tragen keine veränderte Genkopie.

X-CHROMOSOMALE VERERBUNG



Manche Erkrankungen folgen einem X-gebundenen Erbgang, das bedeutet, dass die Veränderung auf dem X-Chromosom liegt. Bei diesem Erbgang gelten folgende Regeln:

1 Die Veränderung in der Erbanlage betrifft bei Frauen in der Regel nur eines der beiden X-Chromosomen. Aus diesem Grund zeigen

Frauen meist nur abgeschwächte oder keine Symptome der Erkrankung. Das zweite X-Chromosom ist bei Frauen in der Lage, die Variante auf dem anderen X-Chromosom weitgehend auszugleichen. Frauen mit einer veränderten Erbanlage sind Überträgerinnen der Erkrankung. Frauen sind also entweder gesunde Überträgerinnen oder aber zeigen eine mildere Symptomatik. Bei einer Frau kann eine X-gebunden vererbte Erkrankung dann im Vollbild auftreten, wenn auf beiden X-Chromosomen eine veränderte Genkopie vorliegt.

2 Eine Überträgerin gibt das X-Chromosom mit dem veränderten Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% an ihre Nachkommen weiter. Das heißt, dass eine Tochter mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% ebenfalls Überträgerin der Erkrankung sein wird. Ein Sohn wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% von der Erkrankung betroffen sein, weil er kein zweites X-Chromosom hat (Hemizygotie), das die Veränderung in der Erbanlage ausgleichen könnte.

3 Ein betroffener Vater kann die veränderte Erbanlage nicht an seine Söhne weitervererben, weil die Söhne vom Vater stets das Y-Chromosom erhalten. Alle Töchter eines betroffenen Vaters sind Überträgerinnen der Erkrankung.



WARUM KÖNNEN AUCH MIT EINER EXOM- ODER GENOM-UNTERSUCHUNG NICHT ALLE KLINISCHEN AUFFÄLLIGKEITEN URSÄCHLICH GEKLÄRT WERDEN?

- Nicht alle Erkrankungen sind genetisch bedingt. Auch nicht-genetische, exogene Faktoren können ursächlich sein.
- Der Erkrankung kann ein Pathomechanismus zugrunde liegen, der sich nicht auf (strukturelle oder numerische) Veränderungen der Basenabfolge bezieht. Auch epigenetische Veränderungen können einen Einfluss auf die Funktion der Gene haben (z.B. Methylierungsstörungen). Die Detektion solcher Veränderungen kann eine andere Methode erfordern.
- Manche Veränderungen können als sogenanntes **Mosaik** vorliegen, das bedeutet, dass nicht alle Zellen von einer genetischen Veränderung betroffen sind, sondern diese erst im Laufe der Embryonalentwicklung entstanden ist (soma-
- tisch). Hier kann es sein, dass ein Nachweis nur in klinisch betroffenen Geweben gelingt (z.B. Hautbiopsat).
- Nicht jede genetische Variante kann als klar pathogen oder benigne eingestuft werden. Das liegt daran, dass über manche Gene oder ihre Proteinprodukte in der Literatur noch nicht ausreichend Informationen bekannt sind, um eine klare Einschätzung abgeben zu können (**Gene unklarer Signifikanz**; GUS).
- Es kann sein, dass mit den heute zur Verfügung stehenden technischen Methoden noch nicht alle genetischen Ursachen erkannt werden können.



Es empfiehlt sich, bei negativem Befund und dem weiterhin bestehenden Verdacht auf eine genetische Erkrankung zunächst in Rücksprache mit einem/r Facharzt/-ärztin für Humangenetik eine Ausweitung der Untersuchungsmethode in Erwägung zu ziehen oder aber die Untersuchung nach 2-4 Jahren zu wiederholen.

WELCHES MATERIAL WIRD FÜR WELCHE UNTERSUCHUNG BENÖTIGT? WIE LANG KANN DAS BLUT VOR EINER UNTERSUCHUNG GELAGERT WERDEN?

Chromosomenanalyse: Lithiumheparin-Blut (2-4ml), sollte zügig, spätestens jedoch innerhalb von 3 Tagen im Labor sein und kann bei Raumtemperatur gelagert werden

Optical Genome Mapping: EDTA-Blut (2-5 ml), sollte zügig, spätestens jedoch innerhalb von 3 Tagen im Labor sein und bei Raumtemperatur gelagert werden

Alle anderen genetischen Untersuchungen: EDTA-Blut (2-5 ml) oder Wangenschleimhauttupfer, hierbei gibt es keine besonderen Versand- oder Lagerungshinweise zu beachten



WEITERE INFORMATIONEN

- Die **Kosten** für eine ärztlich indizierte genetische Untersuchung werden ebenso wie die Kosten für eine genetische Beratung von der gesetzlichen Krankenkasse übernommen. Bitte legen Sie der Untersuchung einen Laborüberweisungsschein Muster 10, eine ausgefüllte und unterschriebene Einwilligungserklärung sowie relevante klinische Angaben bei.
- Bei **Fragen** zu den Indikationsstellungen der einzelnen Untersuchungsmethoden oder dem weiteren Vorgehen nach (unauffälligem) Befund stehen wir gerne zur Verfügung.

LITERATUR

1. Manickam, K., McClain, M. R., Demmer, L. A., Biswas, S., Kearney, H. M., Malinowski, J., Massingham, L. J., Miller, D., Yu, T. W., Hisama, F. M., & ACMG Board of Directors (2021). Exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability: an evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 23(11), 2029–2037. <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01242-6>
2. South, S. T., Lee, C., Lamb, A. N., Higgins, A. W., Kearney, H. M., & Working Group for the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee (2013). ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 15(11), 901–909. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.129>



KONTAKT

Medicover Genetics GmbH
Tel: +49 89 895578-0
Fax: +49 89 895578-780
www.medicover-diagnostics.de
info@medicover-diagnostics.de