



HTA Austria

Austrian Institute for
Health Technology Assessment
GmbH

Massiv-parallele Sequenzierung

Technologien zur
Hochdurchsatz-Analyse genetisch-genomischer
Datensätze

Endbericht

HTA-Informationdienst Rapid Review Nr.: 015

Projektteam

Projektleitung: Dr. Reinhard Jeindl
Projektbearbeitung: Dr. Reinhard Jeindl
Julia Mayer-Ferbas, BSc MSc

Projektbeteiligung

Visualisierungen: DI Smiljana Blagojevic
Interne Begutachtung: PD Dr. Claudia Wild
Externe Begutachtung: Univ.-Prof. Dr.med. Johannes Zschocke, Ph.D., Direktor des Instituts für Humangenetik,
Medizinische Universität Innsbruck

Korrespondenz: reinhard.jeindl@aihta.at

Dieser Bericht soll folgendermaßen zitiert werden/This report should be referenced as follows:

Jeindl R, Mayer-Ferbas J. Massiv-parallele Sequenzierung – Technologien zur Hochdurchsatz-Analyse genetisch-genomischer Datensätze. AIHTA HTA-Informationssdienst Nr.: 015; 2024. Wien: HTA Austria – Austrian Institute for Health Technology Assessment GmbH.

Interessenskonflikt

Alle beteiligten AutorInnen erklären, dass keine Interessenskonflikte im Sinne der Uniform Requirements of Manuscripts Statement of Medical Journal Editors (www.icmje.org) bestehen.

© 2024 AIHTA – Alle Rechte vorbehalten

IMPRESSUM

Medieninhaber und Herausgeber:

HTA Austria – Austrian Institute for Health Technology Assessment GmbH
Garnisongasse 7/Top20 | 1090 Wien – Österreich
<https://www.aihta.at/>

Für den Inhalt verantwortlich:

Priv.-Doz. Dr. phil. Claudia Wild, Geschäftsführung

Die **HTA-Informationssdienst Rapid Reviews** dienen der Veröffentlichung der Ergebnisse zu Anfragen von österreichischen Sozialversicherungen.

Die **HTA-Informationssdienst Rapid Reviews** werden über den Dokumentenserver „<https://eprints.aihta.at/view/types/his.html>“ der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt.

HTA-Informationssdienst Rapid Review Nr.: 015

© 2024 AIHTA – Alle Rechte vorbehalten

Inhalt

| | |
|--|----|
| Inhalt..... | 3 |
| 1 Zusammenfassung der Ergebnisse | 5 |
| Hintergrund und Fragestellung..... | 5 |
| Ergebnisse..... | 9 |
| Next (Second) Generation Sequencing-Technologien: Short read Sequencing..... | 9 |
| Third Generation Sequencing-Technologien: Long-read Sequencing | 17 |
| Anwendungsbereiche der massiv-parallelen Sequenzierung | 21 |
| Laufende Studien..... | 27 |
| Diskussion | 27 |
| Schlussfolgerung | 30 |
| 2 Anhang..... | 32 |
| Literatursuche INAHTA-Datenbank und HTA-Websites..... | 32 |
| Suchstrategie Studienregister | 34 |
| 3 Literatur..... | 35 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1-1: PICO..... | 7 |
| Tabelle 1-2: Charakteristika verschiedener NGS-Technologien..... | 16 |
| Tabelle 1-3: Charakteristika verschiedener TGS-Technologien | 20 |

1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Hintergrund und Fragestellung

Der Begriff „massiv-parallele Sequenzierung“ bezeichnet unterschiedliche, verwandte Technologien zur Sequenzierung von DNA und RNA, also zur Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem DNA- oder RNA-Molekül [1]. Im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung, die als klassische Methode der Sequenzierung gilt (und demnach neben der Maxam-Gilbert-Sequenzierung als „*first generation*“ bezeichnet wird), hat diese Technologie einen deutlich höheren Durchsatz und wird deshalb als Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologie bezeichnet. Mehrere hundert Gene (ganze Genpanels) können parallel sequenziert werden, Sequenzierergebnisse von mehreren tausend Molekülen sind durch einen einzigen Sequenzierlauf verfügbar, die Sequenzierung einzelner Moleküle ist möglich; Sequenzveränderungen wie z.B. Veränderungen einzelner Nukleotide, Insertionen oder Deletionen können so in kurzer Zeit relativ kostengünstig detektiert werden. Für die Sequenzierung wird eine Gewebeprobe, beispielsweise eine Blutprobe, festes Gewebe oder Sputum, benötigt [2-6].

In Bezug auf die mögliche Leselänge wird zwischen der ursprünglichen *short read* Sequenzierung (traditionell als Next Generation Sequencing, NGS, bezeichnet) und *long read* Sequenzierung (auch als Third Generation Sequencing, TGS, bezeichnet) unterschieden. Als *read* wird dabei ein gelesener DNA- (oder RNA-) Abschnitt bezeichnet. Das Merkmal von *short read*-Technologien ist die massiv-parallele Sequenzierung von kurzen (in der Regel 75-150 Nukleotide, ggf. bis zu 800 Nukleotide) DNA- (oder RNA-) Fragmenten, die vervielfältigt werden, um identische Kopien zu erhalten (klonales Amplifizieren) [1]. Mit TGS-Technologien werden wesentlich größere Leselängen erreicht, deutlich längere DNA- (oder RNA-) Fragmente (mehrere tausend Basen bis zu 2 Millionen Basen) können sequenziert werden [1, 7]. Für TGS ist keine Amplifikation notwendig, jedes einzelne Molekül wird für sich analysiert; die Technologie ermöglicht die Sequenzierung nativer DNA oder RNA [7].

Ein wichtiges Qualitätsmerkmal aller massiv-parallelen Sequenzierungen ist die Sequenziertiefe (*sequencing depth*) oder Coverage; diese beschreibt die Häufigkeit der Erfassung einer einzelnen Base (eines bestimmten Nukleotids) innerhalb einer Gesamtsequenz und gibt damit das Maß an Sicherheit/Genauigkeit an, mit welcher vorhandene Varianten an bestimmten Basenpositionen detektiert werden können. Je nach Fragestellung und Anwendung ist die Anforderung an die Coverage verschieden; für diagnostische Fragestellungen sollte aber eine Coverage von mindestens 20-30x (bei Detektionsgenauigkeit von >99,9 %) erreicht werden [6]. Für bestimmte Fragestellungen, z.B. zum Nachweis geringgradiger Mosaik (d.h. eine Sequenzabweichung liegt nur in einem mehr oder weniger großen, zum Teil sehr kleinen Anteil aller Moleküle derselben Sequenz vor), kann eine sehr viel höhere Coverage bis > 1000x notwendig sein¹.

„Massiv-parallele Sequenzierung“ bezeichnet Technologien zur Analyse von DNA und RNA

deutlich höherer Durchsatz als klassische Sequenzierungstechnologien

„read“ = die Länge des ausgelesenen DNA- (oder RNA-) Abschnitts

Unterscheidung zwischen next generation sequencing (short read) und third generation sequencing (long read)

die Sequenziertiefe oder Coverage ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal

je nach Fragestellung und Anwendung ist eine andere Coverage nötig

¹ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

die massiv-parallele Sequenzierungen ermöglichen neue Anwendungen in Forschung und Routineversorgung

Beispiele: Whole Genome und Whole Exome Sequencing, Targeted Sequencing, RNA-seq, Epigenom-Analyse oder Liquid biopsy

es gibt Plattformen verschiedener Hersteller der Rapid Review soll einen Überblick über massiv-parallele Sequenzierverfahren und deren Anwendungsgebiete geben

Die Einführung der massiv-parallelen Sequenzierung ermöglichte neue Anwendungen sowohl in der Forschung als auch in der Routineversorgung (in der medizinischen Diagnostik). So ist durch sie die Analyse des kompletten humanen Erbguts (Whole Genome Sequencing, WGS) oder dessen Protein-kodierenden Bereichs² (Whole Exome Sequencing, WES), welcher rund 1-2% des gesamten Genoms darstellt, in einem praktikablen zeitlichen Rahmen möglich geworden. Weitere Untersuchungen umfassen unter anderem das Targeted (Re-)Sequencing (bestimmte Teile des Genoms bzw. bestimmte Genpanels werden gezielt sequenziert), die Transkriptom-Analyse (RNA-seq), die Epigenom-Analyse (Methylierungsanalyse), die Mikrobiom-Analyse oder die Analyse von DNA-Protein-Interaktionen (ChIP-Seq) [3, 4, 8]. Eine in der Onkologie zunehmend verbreitete Anwendung ist die „liquid biopsy“, bei der in einer flüssigen Gewebeprobe (z.B. Blut, Urin oder Blutplasma) zirkulierende Tumorzellen oder zellfreie Tumor-DNA (und RNA) untersucht werden [5].

Eine Vielzahl an NGS- und TGS-Technologien und Plattformen verschiedener Hersteller sind derzeit verfügbar und werden in einem sehr breiten Feld an Anwendungsbereichen eingesetzt. Um einen Überblick über bereits etablierte und in Entwicklung befindliche Technologien zu geben, soll der Rapid Review folgende Fragen beantworten:

- Welche massiv-parallelen Sequenzierverfahren gibt es, welche werden bereits eingesetzt und/oder sind in Entwicklung?
- In welchen Anwendungsgebieten werden (welche) Verfahren eingesetzt?

² Als Exom wird jene DNA bezeichnet, die zur Kodierung von Proteinen befähigt ist. Das gesamte Genom umfasst auch nicht-kodierende Sequenzen.

Tabelle 1-1: PICO

| | |
|----------------------|--|
| Population | Personen mit: <ul style="list-style-type: none"> ■ onkologischen Erkrankungen ■ hereditären und genetischen Erkrankungen ■ Risikofaktoren für bestimmte Erkrankungen |
| Intervention | <p>Massiv-parallele (Hochdurchsatz-) Sequenzierung:</p> <p>Next generation sequencing (NGS; Second generation sequencing): short read und Third generation sequencing (TGS): long read</p> <p>für medizinische Anwendungen (z.B. medizinische Forschung, Diagnostik, klinische Genetik, Pharmakogenetik):</p> <p>NGS-Technologien:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Sequencing-by-synthesis (SBS): Illumina SBS, Semiconductor Sequencing with CMOS Technology, Ion Torrent (Halbleitersequenzierung), Pyrosequencing ■ Sequencing-by-ligation: SOLiD-Sequenzierung (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection), DNA Nanoball-Technologie ■ Sequencing-by-binding (SBB): PacBio Onso System <p>TGS-Technologien:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Nanoporen-Sequenzierung ■ Single molecule real-time (SMRT) sequencing <p>Ausschluss: Technologien, die ausschließlich in anderen Bereichen zur Anwendung kommen (z.B. Forensik, Landwirtschaft etc.); Software zur Datenanalyse (bioinformatische Anwendungen)</p> |
| Comparator | Jeglicher Vergleich eingeschlossen |
| Outcomes | <ul style="list-style-type: none"> ■ Technische Funktionsweise und Methode ■ Art der Vervielfältigung (Amplifikation) ■ Vor- und Nachteile ■ Anwendungsbereiche ■ Entwicklungsstand <p>Ausschluss: systematische Bewertung der Spezifität und Sensitivität</p> |
| Studiendesign | <ul style="list-style-type: none"> ■ publizierte Studien jeglichen Studiendesigns ■ laufende Studien Publikationszeitraum: 2020 - 2024 |

es wurde eine Handsuche in MEDLINE durchgeführt

Websites der Hersteller wurden durchsucht

eine Handsuche auf den Websites von Institutionen des INAHTA-Netzwerks und in der INAHTA-Datenbank wurde durchgeführt

Um relevante Studien zu finden, wurde zwischen Mai und Juli 2024 eine Handsuche in MEDLINE (via PubMed) durchgeführt. Aufgrund des Umfangs der Fragestellung wurde keine systematische Literaturrecherche durchgeführt. Websites der Hersteller von Sequenzier-Plattformen wurden durchsucht, um Informationen zu den Technologien zu erhalten.

Zusätzlich wurde zwischen Mai und Juli 2024 eine Handsuche auf den Websites folgender Institutionen des INAHTA-Netzwerks, sowie in der INAHTA-Datenbank durchgeführt:

- Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG)
- National Institute for Health and Care Excellence (NICE)
- Belgian Health Care Knowledge Center (KCE)
- Canada's Drug Agency (CADTH)
- Health Technology Wales (HTW)
- Italian National Agency for Regional Health Services (AGENAS)
- Galician Agency for Health Technology Assessment (Avalia-t)
- Haute Autorité de Santé (HAS)
- Norwegian Institute of Public Health (NIPH)
- The National Health Care Institute Zorginstituut Nederland (ZIN)
- Health Information and Quality Authority (HIQA)
- Agency for Health Technology Assessment and Tariff System (AOTMiT)
- Swedish Agency for Health Technology Assessment (SBU)

mittels Videokonferenz wurden Expert*innen in das Scoping eingebunden

laufende klinische Studien wurden auf clinicaltrials.gov gesucht

zwei Wissenschaftler*innen wählten die Literatur aus

Ergänzend wurde am 11.06.2024 mittels Videokonferenz eine Expert*innenbefragung durchgeführt, um weitere Informationen zu relevanten NGS- und TGS-Technologien, sowie deren Einteilung entsprechend Sequenzierungsverfahren (sequencing-by-synthesis, sequencing-by-ligation, sequencing-by-binding), möglichen Anwendungsbereichen und deren Entwicklungsstand einzuholen.

Zusätzlich wurde am 21.05.2024 nach derzeit laufenden klinischen Studien in folgendem Studienregister gesucht:

- ClinicalTrials.gov

Die Literatursuche erfolgte durch zwei Wissenschaftler*innen (RJ, JM) und orientierte sich an der best-verfügbaren und rezentesten Literatur.

Ergebnisse

Next (Second) Generation Sequencing-Technologien: Short read Sequencing

Es gibt verschiedene NGS-Technologien von unterschiedlichen Herstellern; die Auswahl der geeigneten Plattform hängt meist von den Probeneigenschaften und den Zielen der Analyse ab. Die derzeit am häufigsten eingesetzte Technologie ist *Sequencing-by-synthesis* (SBS), der derzeit führende Hersteller ist Illumina [5, 8]. Das Grundprinzip des NGS basiert auf folgenden Schritten [1, 5, 6, 9]:

1. **Vorbereitung der DNA-Library:** durch physikalische, enzymatische oder chemische Fragmentierung der DNA-Probe entstehen einzelne, kürzere DNA-Fragmente. Nach der Fragmentierung folgt die Endenreparatur (*end-repair*), bei der sichergestellt werden soll, dass die Fragment-Enden frei von Überhängen sind, die 5' Phosphat- und 3' Hydroxygruppen enthalten³; durch Endenreparatur-Enzyme werden stumpfe Fragment-Enden erzeugt. Anschließend werden spezifische Adapter an die Enden der Fragmente gebunden (*adapter ligation*).
2. **Amplifikation/ Cluster-Generierung:** Die DNA -Fragmente werden an ein festes Reaktionsmedium (einen Chip, eine Fließzelle) gebunden. Jedes Fragment wird dann durch PCR-basierte Methoden (z.B. Brücken-PCR oder Emulsions-PCR) zu klonalen Clustern mit einer hohen Dichte identischer DNA-Fragmente vervielfältigt (*clonal amplification*).
3. **Sequenzierung:** Nach der Clusterbildung findet die Sequenzierung statt, die je nach verwendeter Technologie unterschiedlich durchgeführt werden kann.
4. **Datenanalyse:** Die erhaltenen Datenmengen sind sehr groß und werden bioinformatisch analysiert (Primär-, Sekundär- und Tertiäranalyse). Für die Analyse steht eine Vielzahl unterschiedlicher bioinformatische Tools zur Verfügung (unterschiedliche Software, die jeweils bestimmte Daten analysiert). Zunächst werden die Primärdaten in eine Nukleotid-Abfolge übersetzt (*base calling*); das Ergebnis ist der *sequence read*. Im Rahmen der primären Datenanalyse erfolgt das *Alignment*, also die Zuordnung der *sequence reads* zum humanen Referenzgenom. Danach werden in der sekundären Datenanalyse Unterschiede zum Referenzgenom ermittelt (*variant calling*) und Sequenzierartefakte herausgefiltert. Danach erfolgt die tertiäre Datenanalyse, bei der die detektierten Varianten einer Patient*in mit verschiedenen Datenbanken abgeglichen werden; die Varianten werden klassifiziert und interpretiert (*annotation*) [4-6].

Die Auswahl einer NGS-Technologie hängt von der Probe und den Zielen der Analyse ab

Folgende Schritte sind für das NGS nötig:

Vorbereitung der DNA-Library mit Fragmentierung, Endenreparatur und Adapter-Ligation

Amplifikation/ Cluster-Generierung

Sequenzierung je nach angewandeter Technologie

Datenanalyse: Primär-, Sekundär- und Tertiäranalyse durch bioinformatische Tools

die Schritte der Datenanalyse sind base calling, alignment, variant calling und annotation

³ Die Nummerierung bezieht sich hier auf die Kohlenstoffatome, über die im Nukleotid Verbindungen eingegangen werden.

beim NGS wird eine Leselänge von 75 bis 800 Basenpaaren erreicht für die Sequenzierung von RNA wird diese in cDNA übersetzt die Analyse ist komplexer als bei DNA

Gemeinsam ist den unterschiedlichen NGS-Technologien die Leselänge von meist nur 75-150 (z.T. bis 800) Basenpaaren (im Vergleich zum TGS kürzere Leselänge)[1].

Bei der Sequenzierung von RNA (RNA-Seq) wird diese zunächst in cDNA (*complementary DNA* - komplementäre DNA) übersetzt. Danach erfolgen auch hier Fragmentierung, Endenreparatur, Adapter-Anbindung, PCR-Amplifikation und schließlich Sequenzierung und Datenanalyse [1]. Gleich wie bei der Analyse der DNA-Seq werden auch die Daten der RNA-Seq bioinformatisch analysiert, wobei auch hier zwischen Primäranalyse (*base calling*), Sekundäranalyse (*reads mapping und transcriptome reconstruction*) und Tertiäranalyse (*expression quantification und differential expression analysis*) unterschieden wird. Die Analyse ist allerdings komplexer und schwieriger durchzuführen als bei der DNA-Seq [1].

Allgemeine Vor- und Nachteile der massiv-parallelen Sequenzierung

Vorteile: schnellere Durchlaufzeiten, höherer Durchsatz, gleichzeitige Analyse umfangreicher Sequenzen (bis hin zu ganzen Genomen), gleichzeitige Erfassung zahlreicher unterscheidbaren Einzelsequenzen

Verglichen mit den Sequenzierungstechnologien der ersten Generation, wie der Sanger-Sequenzierung, hat die massiv-parallele Sequenzierung mehrere zentrale Vorteile:

- die gleichzeitige Analyse extrem umfangreicher genetischer Sequenzen – bis hin zu ganzen Genomen; bei der Sanger-Sequenzierung werden einzelne Sequenzabschnitte individuell amplifiziert und untersucht;
- die gleichzeitige Erfassung von zahlreichen unterscheidbaren Einzelsequenzen (einzelnen DNA-Molekülen), unter anderem zum Nachweis geringgradiger Mosaik⁴;
- ein höherer Durchsatz ggf. durch *sample multiplexing* (also der parallelen Sequenzierung mehrerer gepoolter, individuell markierter *libraries*);
- schnellere Durchlaufzeiten und geringere Kosten [1, 10].

ein Nachteil sind die großen Datenmengen und substanziellen Geräte- und Analysekosten

Nachteile gegenüber der Sanger-Sequenzierung sind die großen Datenmengen, die gespeichert und bioinformatisch verarbeitet werden müssen [6]. Diese ergeben sich allerdings zwangsläufig aus dem zentralen Nutzen der Technologie. Ein weiterer Nachteil sind die zum Teil noch substanziellen Geräte- und Analysekosten. Für bestimmte Fragestellungen, zum Beispiel den gezielten Nachweis einer einzelnen genetischen Variante in einer Probe, kann die Sanger-Sequenzierung auch heute noch kostengünstiger sein ⁵.

⁴ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

⁵ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

Durch den Nachweis einer extrem großen Zahl unterschiedlicher genetischer Veränderungen ist die größte Herausforderung der massiv-parallelen Sequenzierung die korrekte Interpretation der individuell vorliegenden Varianten und die Zuordnung zu klinischen Fragestellungen. In den weltweiten genetischen Datenbanken sind (bei einer Größe des Genoms von ca. 3,1 Milliarden Nukleotiden) mehr als 1,1 kleinere Sequenzvarianten und knapp 8 Millionen größere strukturelle Varianten beschrieben. Die funktionelle Bedeutung der meisten Varianten ist noch völlig unklar. Jeder einzelne Mensch trägt jeweils ca. 5 Millionen Sequenzvarianten und 7500 größere strukturelle Varianten im Genom. Mit der massiv-parallelen Sequenzierung kann die große genetisch-genomische Variabilität bei jeder einzelnen Person dargestellt werden⁶. Mittels massiv-paralleler Sequenzierung werden bei jedem Menschen zahlreiche Varianten unklarer Bedeutung (nicht eindeutig benigne oder pathogen) identifiziert, welche dann weiterführenden Analysen unterzogen werden müssen [2, 6].

korrekte Interpretation der Vielzahl an vorliegenden Varianten herausfordernd

zahlreiche Varianten unklarer Bedeutung (nicht eindeutig benigne oder pathogen)

Spezifische Vor- und Nachteile von NGS-Technologien

Ein Vorteil von NGS-Technologien gegenüber TGS-Technologien ist, dass sehr viele Analyseprogramme auf die Verarbeitung von *short read*-Daten ausgelegt sind. Zudem hatten *short read*-Technologien über lange Zeit eine geringere Fehlerrate; dieser Vorteil ist jedoch durch die Weiterentwicklung der TGS-Technologien teilweise irrelevant geworden [1, 11]. Die aktuellen NGS-Technologien sind jedoch immer noch substanziell kostengünstiger als die zur Verfügung stehenden TGS-Technologien⁷.

Vorteile des NGS sind vor allem der höhere Durchsatz, schnelle Durchlaufzeiten und relativ geringere Kosten

Nachteile des NGS im Vergleich zum TGS sind [1, 5, 6, 10, 11]:

viele Analyseprogramme sind auf short read-Daten ausgelegt

- eine Beschränkung der Untersuchung von Transkriptom-Varianten in voller Länge, Centromer- und Telomer-Regionen des Genoms und von Genfusionen durch die kürzere Länge der *reads*,
- ein erschwertes bzw. unmögliches *alignment* von kürzeren *reads*, vor allem in repetitiven Regionen des Genoms, Genen mit Pseudogenen oder homologen Regionen,
- die Abhängigkeit von PCR-basierter Amplifikation, welche beispielsweise die Charakterisierung von Regionen mit hohem Guanin/Cytosin-Gehalt erschwert und zu Artefakten sowie höheren Kosten und längeren Bearbeitungszeiten führt; außerdem wird dadurch mehr Equipment und eine umfassendere bioinformatische Analyse benötigt,
- Lücken in der Sequenz (*sequence gaps*) durch die kürzere Länge der *reads*.

Nachteile im Vergleich zum TGS sind Einschränkungen durch die kürzere Länge der reads und die Abhängigkeit von PCR-basierter Amplifikation

Eine Einschätzung der Vor- und Nachteile einzelner Technologien in Bezug auf unterschiedliche Faktoren und Charakteristika ist jedoch immer von der Fragestellung und dem individuellen Ziel der Analyse abhängig.

Vor- und Nachteile sind immer von der Fragestellung abhängig

⁶ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

⁷ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

Sequencing-by-synthesis: Illumina SBS

das Sequencing-by-synthesis (SBS) detektiert den Einbau von einzelnen Basen durch eine Polymerase

Beim *Sequencing-by-synthesis* wird die Sequenz der DNA bestimmt, indem der Einbau von Basen (Nukleotiden) durch eine DNA-Polymerase sequenziell detektiert wird. Die DNA-Polymerase verwendet einen DNA-Einzelstrang als Vorlage für die Synthese eines komplementären Strangs, wobei der Einbau jedes Nukleotids einzeln beobachtet wird [8].

Die Funktionsweise im Detail:

die Technologie basiert auf fluoreszierend markierten reversiblen Terminatoren

Die Technologie von Illumina basiert dabei auf fluoreszierend markierten reversiblen Terminatoren (Desoxyribonukleosidtriphosphaten, dNTPs). Reversible Terminatoren sind modifizierte synthetische Nukleotide, die den Baseneinbau blockieren können; der Effekt ist jedoch reversibel, da die enthaltene Blockerguppe entfernt und der Baseneinbau fortgesetzt werden kann. Zunächst werden DNA-Fragmente an eine Fließzelle gebunden und durch Brücken-PCR zu klonalen Clustern mit identischer Sequenz vervielfältigt. Die Sequenzierung basiert auf dem Messen optischer Signale (Lichtsignale), welche während dem Einbau der einzelnen fluoreszenzmarkierten Nukleotide emittiert werden. Nach Einbau eines Nukleotids bricht die Synthese ab, eine Software speichert das optische Signal und das nächste Nukleotid kann nach Abspaltung des Terminators (der die Synthese blockiert hatte) und der fluoreszierenden Markierung eingebaut werden. Der Vorgang wird wiederholt, bis das ganze DNA-Fragment nach vielen aufeinanderfolgenden Zyklen (*cycles*) sequenziert ist [1, 5, 8]. Mit den NGS-Plattformen von Illumina ist auch eine *paired-end* Sequenzierung möglich, mit der ein DNA-Fragment von beiden Seiten sequenziert werden kann und Daten hoher Qualität für das Alignment generiert werden; die Genauigkeit der bioinformatischen Analysen wird erhöht, beispielsweise ist ein Nachweis von repetitiven Sequenz-Elementen oder Genfusionen einfacher als mit der *single-end* Sequenzierung [1, 5]. Durch die angewendete Technologie der reversiblen Terminatoren in Kombination mit der *paired-end* Sequenzierung erzielen Illumina-Plattformen eine sehr hohe Detektionsgenauigkeit [1].

durch Brücken-PCR entstehen klonale Cluster

optische Signale werden bei Einbau der Nukleotide gemessen

die paired-end Sequenzierung generiert Daten hoher Qualität

die Halbleiter-Sequenzierung mit CMOS-Technologie von Illumina nutzt ein Ein-Kanal-Detektionssystem

ein CMOS-Sensor detektiert Licht-Emissionen beim Einbau der Nukleotide

Von Illumina wird auch eine Halbleiter-Sequenzierung mit CMOS (*complementary metal-oxide semiconductor*)-Technologie angeboten, welche die oben beschriebene Illumina-Technologie mit einem Halbleiter-Chip verbindet. Die Sequenzier-Plattform nutzt hier ein Ein-Kanal-Detektionssystem, das heißt, es werden zur Identifikation der unterschiedlichen Nukleotide nicht vier unterschiedliche, sondern nur eine fluoreszierende Farbmarkierung verwendet. Eine Fließzelle mit vielen gleichmäßig angeordneten Vertiefungen dient als Reaktionsmedium, wobei jede Vertiefung über einer CMOS-Fotodiode angeordnet ist. Während der Generierung der klonalen Cluster werden in jeder Vertiefung unterschiedliche DNA-Fragmente amplifiziert; beim Einbau der Nukleotide detektiert der CMOS-Sensor am Boden jeder Vertiefung Licht-Emissionen, aus denen eine Software die Sequenz ableitet. Mit der Technologie wird eine vergleichbare Detektionsgenauigkeit wie mit der herkömmlichen Illumina SBS-Technologie erreicht [12].

Sequencing-by-synthesis: Ion Torrent (Halbleitersequenzierung)

Ion Torrent von Thermo Fisher basiert ebenfalls auf dem SBS-Prinzip, arbeitet jedoch mit einer Halbleiter-Technologie und misst anstatt optischer Signale die Freisetzung von H^+ -Ionen beim Einbau der Nukleotide in den komplementären DNA-Strang.

Die Funktionsweise im Detail:

DNA-Fragmente werden zunächst durch Emulsions-PCR vervielfältigt: Adapter werden an die DNA-Fragmente ligiert, und anschließend wird jedes Fragment in einem Tröpfchen einer Wasser-in-Öl-Emulsion eingefangen; über den Adapter ist das DNA-Fragment an eine Kugel (*bead*) gebunden, welche mit Nukleotiden, komplementären Adaptern, Primern und der DNA-Polymerase bedeckt ist. In jedem Tröpfchen findet dann eine PCR statt, als deren Folge viele identische Kopien der DNA-Sequenz an jeweils eine Kugel gebunden sind. Die Tröpfchen werden dann auf einen Halbleiter-Chip aufgebracht, auf dem sich viele winzige Vertiefungen befinden; der Chip wird sequenziell mit Nukleotiden geflutet. Beim Einbau jedes einzelnen Nukleotids wird ein H^+ -Ion freigesetzt, der pH-Wert der Lösung ändert sich, was von einem Sensor erfasst wird; daraus wird schließlich die Sequenz berechnet [1].

Ion Torrent basiert auch auf dem SBS-Prinzip

die Freisetzung von H^+ -Ionen beim Einbau der Nukleotide wird gemessen

Ion Torrent verwendet Emulsions-PCR zur Amplifikation

Sequencing-by-synthesis: Pyrosequenzierung

Die von 454 Life Sciences/Roche kommerziell vermarktete Pyrosequenzierung, welche auch auf dem SBS-Prinzip basiert, markierte Anfang der 2000er-Jahre den Beginn des *Next Generation Sequencing* [5, 8]. Roche hat die Herstellung von Pyrosequenzern eingestellt, von Qiagen sind jedoch weiterhin unterschiedliche Plattformen auf dem Markt [10, 13]. Die Pyrosequenzierung gilt heute weniger als Konkurrenz zu anderen NGS-Technologien, sondern stellt eher eine Ergänzung dar [13].

Die Funktionsweise im Detail:

Bei der Pyrosequenzierung werden Pyrophosphat-Ionen (PPi) gemessen, welche beim sequenziellen Einbau der Nukleotide abgespalten werden und unter Zugabe eines Enzyms einen Lichtblitz erzeugen; je mehr PPi abgespalten werden, desto stärker ist das optische Signal. Zunächst werden die DNA-Fragmente mittels Emulsions-PCR amplifiziert, die identischen Kopien der DNA-Sequenz sind infolge - wie bei Ion Torrent - an winzige Kugeln auf einer Fließzelle gebunden. Biotinylierte, einsträngige DNA-Fragmente werden isoliert und mit einem Primer hybridisiert. Danach erfolgt die Zugabe von DNA-Polymerase, weiteren Enzymen, Adenosin-5'-Phosphosulfat und Luciferin. Anschließend werden die Nukleotide nacheinander zugegeben und von der DNA-Polymerase eingebaut. Die bei der Abspaltung von PPi entstehenden Lichtemissionen werden gemessen und von einer Software in eine DNA-Sequenz übersetzt. Der mehrfache Einbau eines Nukleotids erzeugt ein entsprechend stärkeres optisches Signal. Dies wird wiederholt, bis das ganze DNA-Fragment sequenziert ist [10, 13, 14].

die Pyrosequenzierung markierte Anfang der 2000er-Jahre den Beginn des NGS

beim Einbau der Nukleotide werden Pyrophosphationen (PPi) abgespalten, ein enzymatisch erzeugter Lichtblitz wird gemessen und in die Sequenz übersetzt

Emulsions-PCR wird für die Amplifikation verwendet

beim Sequencing-by-binding (SBB) werden optische Signale bei der Bindung von Nukleotiden an die einsträngige DNA gemessen

eine PCR-basierte Amplifikation ist optional

anders als beim SBS enthalten die markierten Nukleotide keine Blocker und werden nach Erfassen des Signals gewaschen

Sequencing-by-binding: PacBio Onso system

Das von PacBio entwickelte Onso System basiert auf dem *Sequencing-by-binding*-Prinzip (SBB™), welches sich vom SBS dadurch unterscheidet, dass das optische Signal nicht beim Einbau der Nukleotide, sondern bei deren Bindung an das einsträngige DNA-Fragment gemessen wird.

Die Funktionsweise im Detail:

SBB besteht im Wesentlichen aus vier Schritten: Initiierung (*initiation*), Abfrage (*interrogation*), Aktivierung (*activation*) und Einbau (*incorporation*). Wie beim SBS wird die DNA zunächst fragmentiert, dann werden die Fragment-Enden mit Adaptern verbunden; eine PCR ist optional. Die Sequenzierung der DNA-Fragmente wird durch eine Polymerase mit einem reversiblen Blocker am 3'-Ende initiiert; so soll verhindert werden, dass zusätzliche Nukleotide eingebaut werden. Während der Abfrage werden fluoreszierend markierte Nukleotide auf die Fließzelle gespült. Anders als beim SBS enthalten diese Nukleotide keine Blocker. Sobald ein Nukleotid an den DNA-Strang bindet, wird ein fluoreszierendes Signal abgegeben, welches gemessen und gespeichert wird. Das Nukleotid wird aber nicht, wie beim SBS, in den Strang eingebaut, sondern nach Erfassen des Signals gewaschen. Anschließend wird das 3'-Ende des Nukleotids aktiviert, indem der reversible Blocker entfernt wird. Unmarkierte, blockierte Nukleotide fluten die Fließzelle und das geeignete Nukleotid wird eingebaut; ein weiterer Einbau wird blockiert, der nächste Zyklus startet. Eine Software errechnet aus den gemessenen optischen Signalen die Sequenz [15, 16].

das Sequencing-by-ligation verwendet Nukleotid-Sonden, die immer zwei Basen gleichzeitig identifizieren

Sequencing-by-ligation: SOLiD®

Die von Applied Biosystems/Thermo Fisher entwickelte *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection* (SOLiD®)- Technologie basiert auf dem *Sequencing-by-ligation*-Prinzip. Es wird nicht, wie beim SBS, die DNA-Synthese verfolgt, sondern es kommen Nukleotid-Sonden (8-Mer Oligonukleotide) zum Einsatz, die nacheinander binden und so immer zwei Basen identifizieren. Diese Sonden bestehen aus acht Nukleotiden, die unterschiedliche Funktionen während der Sequenzierung haben.

Emulsions-PCR wird zur Amplifikation angewendet

Die Funktionsweise im Detail:

Zunächst wird die DNA fragmentiert und an die Enden wird ein Adapter ligiert, der auch als Bindungsstelle des Primers dient. Durch Emulsions-PCR wird das DNA-Fragment vervielfältigt, die identischen Kopien sind an kleine Kugeln gebunden, welche auf eine Fließzelle aufgebracht werden. Zur Sequenzierung sind mehrere Zyklen notwendig, da in jedem Zyklus nur jeweils zwei Basen identifiziert werden können. Nach Anbindung des Primers an den Adapter bindet mit Hilfe einer Ligase eine fluoreszierend markierte Nukleotid-Sonde an den DNA-Strang. Ein Laser regt die Markierung an und das optische Signal wird gemessen. Die drei Nukleotide, die die Markierung tragen, werden abgespalten. Mehrere Zyklen von Ligation, Detektion und Abspaltung werden durchgeführt. In einer nächsten Runde wird der Primer um ein Nukleotid verkürzt, wodurch eine andere Sonde bindet (*primer reset*). Dies geschieht fünfmal, wodurch der ganze DNA-Strang überlappend sequenziert wird und jede Base in zwei unabhängigen Ligations-Reaktionen durch zwei unterschiedliche Primer abgefragt wurde. Die optischen Signale werden von einer Software in die Sequenz übersetzt [17-19].

zur Sequenzierung sind mehrere Zyklen notwendig

ein optisches Signal wird bei Bindung der Sonde an den DNA-Strang gemessen

der DNA-Strang wird überlappend sequenziert

Sequencing-by-ligation: DNA Nanoball technology (DNBSEQ™)

Die von Complete Genomics entwickelte DNA Nanoball-Technologie, kurz DNBSEQ™, basiert ebenso auf dem *Sequencing-by-ligation*-Prinzip [19] und verwendet sogenannte DNA Nanoballs (DNBs), die während der Erstellung der DNA-Library entstehen.

Die Funktionsweise im Detail:

Zunächst erfolgen die Fragmentierung, Endenreparatur und Anbindung der Adapter. Dann werden mit Hilfe einer DNA-Ligase aus doppelsträngigen DNA-Fragmenten Moleküle einsträngiger kreisförmiger DNA (ssCirDNA) erzeugt. Diese einsträngigen Kreise dienen als Vorlage für die *rolling circle replication* (RCR), bei der Milliarden von DNA Nanoballs entstehen. Jede Kopie wird dabei von der originalen DNA gemacht, was mögliche PCR-basierte Fehler vermeidet. Das entstandene Concatamer (eine lange DNA-Kette mit sich wiederholenden Sequenzen) wird zu winzigen Nanoballs mit ~200nm Durchmesser gefaltet. Die Nanoballs werden dann auf eine positiv geladene Fließzelle aufgebracht, die mit gleichmäßig verteilten Bindungsstellen besetzt ist. An jede Stelle bindet ein Nanoball und bleibt dort über viele hunderte Zyklen gebunden. Sequenzier-Primer werden durch *combinatorial probe-anchor synthesis* (cPAS) an die Nanoballs hybridisiert und fluoreszierend markierte Nukleotid-Sonden werden von einer DNA-Polymerase in aufeinanderfolgenden Zyklen an den DNA-Strang gebunden; nicht gebundene Nukleotid-Sonden werden entfernt. Die fluoreszierenden Marker werden durch Laserlicht angeregt, die optischen Signale durch integrierte Kameras aufgenommen und von einer Software in eine Sequenz übersetzt [20].

die Nanoball-Technologie basiert auch auf dem Sequencing-by-ligation

einsträngige kreisförmige DNA wird erzeugt, die als Vorlage für die rolling circle replication dient, bei der DNA-Nanoballs entstehen

die Nanoballs binden an eine positiv geladene Fließzelle

markierte Nukleotid-Sonden binden an den DNA-Strang, emittierte optische Signale werden durch Kameras aufgenommen

Neue Ansätze und Weiterentwicklung der Technologien

Der NGS-Markt ist sehr lebendig, es gibt laufend neue Hersteller und Plattformen, welche die etablierten Technologien weiterentwickeln und neue Ansätze verfolgen. Ebenso arbeiten die derzeit führenden Hersteller wie Illumina, Thermo Fisher und PacBio an Innovationen und Verbesserungen ihrer Technologien. Beispiele für rezente Entwicklungen sind die Sequenzierer von Element Biosciences (das AVITI System verwendet eine modifizierte Chemie, die als *avidity sequencing*TM bezeichnet wird und den Einbau und die Identifikation der Nukleotide trennt [21, 22]), Singular Genomics (das G4 Sequencing System mit einem speziellen Fließzellen-Design und einer Plattform, die NGS und *spatial sequencing* vereint [23]) und Ultima Genomics (der UG 100™ verwendet Silizium-Wafer anstelle herkömmlicher Fließzellen und verspricht besonders hohen Durchsatz bei geringen Kosten [24]) [25, 26].

der NGS-Markt ist sehr lebendig

etablierte Technologien werden weiterentwickelt, neue Ansätze erforscht

Das *Sequencing-by-hybridization* (SBH) wurde ursprünglich auch zu den Hochdurchsatz-Technologien gezählt [8, 27, 28], wurde mittlerweile jedoch von den anderen Technologien weitgehend verdrängt. Die Hybridisierung findet jedoch im Rahmen des NGS beim *hybridization-based target enrichment* (oder *hybrid capture target enrichment*) weiterhin Anwendung, um nur jene Regionen des Genoms zu erfassen und zu sequenzieren, die tatsächlich von Interesse sind [29, 30].

das Sequencing-by-hybridization (SBH) wurde mittlerweile von den anderen Technologien verdrängt

Tabelle 1-2: Charakteristika verschiedener NGS-Technologien

| Sequencing principle | Technology/ Company | Amplification | Detection | Austria-relevant information based on expert input |
|-------------------------|--|------------------------------------|-----------------------|--|
| Sequencing-by-synthesis | Illumina SBS/ Illumina | Bridge amplification | Fluorescent | Austrian genetic institutes almost exclusively use Illumina sequencers. Other methods such as Ion Torrent or SOLiD are obsolete. Possibly other methods are used for specific research questions (for example in laboratory medicine). There are ongoing discussions to introduce newer devices in diagnostics (e.g. AVITI devices). |
| | Semiconductor Sequencing with CMOS Technology/ Illumina | Bridge amplification | Fluorescent | |
| | Ion Torrent (Semiconductor sequencing)/ ThermoFisher | Emulsion PCR | Ion | |
| | Pyrosequencing/ 454 Life Sciences (Roche, discontinued), Qiagen | Emulsion PCR | Light (pyrophosphate) | |
| | G4 Sequencing System/ Singular Genomics | Optional PCR | Fluorescent | |
| | UG 100™/ Ultima Genomics | Emulsion PCR | Fluorescent | |
| Sequencing-by-binding | PacBio Onso system/ PacBio (Pacific BioSciences®) | Optional PCR | Fluorescent | |
| | Avidity sequencing: AVITI™ System/ Element Biosciences | Rolling circle amplification (RCA) | Fluorescent | |
| Sequencing-by-ligation | DNA Nanoball technology (DNBSEQ)/ Complete Genomics | Rolling circle replication (RCR) | Fluorescent | |
| | SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection)/ ThermoFisher | Emulsion PCR | Fluorescent | |

Quellen: [1, 10, 19, 22, 31-34]

Abkürzungen: CMOS - complementary metal-oxide semiconductor; PCR – polymerase chain reaction; SBS – sequencing-by-synthesis

Third Generation Sequencing-Technologien: Long-read Sequencing

Beim TGS handelt es sich um Technologien, die entwickelt wurden, um längere *reads* und eine Sequenzierung ohne vorherige Amplifikation zu ermöglichen. Einige der oben beschriebenen Nachteile von *short read*-Technologien können von TGS gelöst werden, jedoch gibt es auch bei diesen Technologien Herausforderungen zu überwinden.

Vor- und Nachteile von TGS- Technologien

Der bedeutendste Vorteil von TGS ist die im Vergleich zum NGS deutlich größere Leselänge, welche die vollständige Erfassung struktureller Veränderungen des Genoms (beispielsweise größere Insertionen oder Deletionen) sowie die Erfassung von Bereichen repetitiver DNA oder von Pseudogenen ermöglicht. Außerdem ist so das komplette *Phasing* von Allelen möglich, also der Nachweis, ob zwei Varianten auf dem gleichen Chromosomenstrang (*in cis*) oder auf den beiden unterschiedlichen Chromosomensträngen (*in trans*) vorliegen. Dies ist notwendig, um beispielsweise im Rahmen der Pharmakogenomik Haplotypen zu bestimmen [1, 2, 7, 35]. Die Nanopore-Sequenzierung ermöglicht die Analyse der Daten in Echtzeit und erlaubt dadurch gegebenenfalls eine kürzere Laufzeit [1, 11]; eine Amplifikation der DNA ist nicht nötig, womit Schwierigkeiten und Fehler, die mit der PCR verbunden sind, vermieden werden können [1, 19]. Ein weiterer Vorteil dieser Technologie sind die besonders kleinen und portablen Geräte [1]. Allerdings hat die Nanopore-Sequenzierung noch eine vergleichsweise hohe Fehlerrate, was den Einsatz in der genetischen Diagnostik für viele Fragestellungen ausschließt. Demgegenüber hat die SMRT-Sequenzierung bei etwas geringeren Leseweite eine sehr hohe Genauigkeit, was den Einsatz sowohl für die verlässliche Sequenzierung als auch für den Nachweis größerer struktureller Veränderungen erlaubt⁸.

Generelle Nachteile von TGS-Technologien im Vergleich zum NGS sind ein niedrigerer Durchsatz und deutlich höhere Kosten [1, 11], wobei der Durchsatz durch Weiterentwicklung der Technologie deutlich gesteigert wurde [31]. Noch mehr als beim NGS werden durch TGS riesige Datenmengen generiert, die gespeichert und mit größerem zeitlichem und finanziellem Aufwand bioinformatisch analysiert werden müssen [11]. Die bislang entwickelten bioinformatischen Auswerteprogramme sind in der Regel für NGS ausgelegt und müssen an TGS-Applikationen aufwendig angepasst werden. Die Verwendung dieser Technologien beschränkt sich daher aktuell noch auf große akademische Einrichtungen⁹.

TGS erreicht längere reads und benötigt keine Amplifikation vor Sequenzierung

der bedeutendste Vorteil des TGS ist die deutlich größere Leselänge

die Echtzeit-Analyse von Daten ermöglicht eine kürzere Durchlaufzeit

PCR-basierte Fehler werden vermieden, der Durchsatz wird erhöht und die Bearbeitungszeit verkürzt

höhere Fehlerraten und niedrigerer Durchsatz im Vergleich zum NGS konnten weitgehend behoben werden, riesige Datenmengen sind eine Herausforderung

⁸ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

⁹ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

Derzeit gibt es zwei große *long read*-Technologien: das *Single Molecule Real-Time (SMRT) Sequencing* und das *Nanopore Sequencing*.

Single Molecule Real-Time (SMRT) Sequencing

beim SMRT Sequencing wird native DNA sequenziert

Die von PacBio entwickelte *SMRT Sequencing*-Technologie ermöglicht die Sequenzierung und Detektion eines einzelnen nativen DNA (oder RNA)-Moleküls ohne vorherige Amplifikation. Es handelt sich dabei grundsätzlich um eine SBS-Technologie.

es handelt sich um eine SBS-Technologie

Die Funktionsweise im Detail:

die Polymerisation passiert um eine kreisförmige einsträngige SMRTbell

Wie beim NGS muss auch hier zunächst eine Library, die sogenannte *SMRTbell library*, vorbereitet werden, für welche hochmolekulare DNA eingesetzt wird: Die doppelsträngigen DNA-Fragmente werden beidseitig mit einsträngigen haarnadelförmigen Adaptern geschlossen, an denen die Primer anlagern. Diese ermöglichen die Polymerisation um die einsträngige, kreisförmige *SMRTbell*. Beim *SMRT Sequencing* werden winzige Reaktionskammern, sogenannte *zero-mode waveguides (ZMWs)*, eingesetzt, die millionenfach auf einem Siliziumchip, der *SMRT Cell*, vorhanden sind, und eine immobilisierte Polymerase enthalten.

beim Einbau der Nukleotide wird Licht emittiert, welches gemessen wird

Einzelne DNA-Moleküle werden in die ZMWs verteilt; während dem Einbau fluoreszierend markierter Nukleotide durch die Polymerase wird Licht emittiert, der Nukleotid-Einbau wird so anhand spezifischer Emissions-Spektren der Nukleotide in Echtzeit gemessen. Die Reaktionen werden anschließend analysiert. Die kreisförmigen *SMRTbells* ermöglichen mehrere Durchgänge der Polymerisation und ergeben sogenannte *continuous long reads (CLRs)*, die verwendet werden, um *subreads* zu erstellen, die mehrere *reads* des DNA-Moleküls in beide Richtungen darstellen [1, 11, 35, 36]. Durch die Einführung von *high-fidelity (HiFi) sequencing* wurde eine Sequenziergenauigkeit nahe 99,99 % erreicht [35]. Die Leselänge der Sequenzierung liegt aktuell typischerweise bei 15-25.000 Nukleotiden¹⁰.

mehrere Durchgänge ergeben continuous long reads

hohe Genauigkeit durch HiFi sequencing

Nanopore Sequencing

auch die Nanopore-Sequenzierung arbeitet mit einzelnen nativen DNA-Molekülen

Auch die von Oxford Nanopore Technologies entwickelte Nanopore-Sequenzierung erfordert keine Amplifikation der DNA; jedes einzelne native DNA (oder RNA)-Molekül wird für sich sequenziert; die Technologie basiert auch nicht auf dem Einsatz einer Polymerase, sondern auf der Messung von Änderungen im Ionenfluss durch eine Nanopore.

es kommt keine Polymerase zum Einsatz
eine Änderung im Ionenfluss innerhalb der Pore wird gemessen

Die Funktionsweise im Detail:

es können sehr lange reads generiert werden

Auch bei dieser Technologie erfolgt zunächst die Fragmentierung der DNA. Die Basenabfolge des DNA-Moleküls wird analysiert, indem die doppelsträngige DNA zunächst von einem Motorprotein (einem Enzym) aufgetrennt und die einsträngige DNA dann durch eine Nanopore geführt wird; diese Pore befindet sich auf einer nicht leitfähigen Polymermembran, an die eine Spannung angelegt wird. Dadurch entsteht ein Ionenfluss, der durch die in der Pore befindlichen Basen verändert wird. Die Änderung, die für jede Base charakteristisch ist, wird von Sensorproteinen in Echtzeit gemessen und dient der Generierung einer Basensequenz. Mehrere hundert bis tausend Poren befinden sich auf einer Fließzelle und analysieren dabei parallel mehrere zehntausend DNA-Moleküle nacheinander [1, 7, 11, 35]. Mit

¹⁰ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

der Nanopore-Sequenzierung können längere Fragmente sequenziert werden, als das mit dem *SMRT Sequencing* möglich ist, allerdings mit deutlich schlechterer Genauigkeit. *Ultralong reads* mit mehreren Megabasenpaaren Länge können generiert werden [1, 35]. Dabei ist die Qualität und Länge der zu untersuchenden DNA-Fragmente der limitierende Faktor: die Gewinnung der entsprechenden Proben benötigt aufwendige schonende DNA-Extraktionsverfahren und ist im Allgemeinen weder realistisch möglich noch notwendig¹¹.

¹¹ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

Tabelle 1-3: Charakteristika verschiedener TGS-Technologien

| Sequencing principle | Company | Detection | Austria-relevant information based on expert input |
|--|----------------------------------|-------------------------|---|
| SMRT sequencing (single molecule real-time) | PacBio (Pacific BioSciences®) | Fluorescent | not reported |
| Nanopore sequencing | Oxford Nanopore Technologies® | Electrical Conductivity | |

Quellen: [1, 10, 31, 35, 37]

Anwendungsbereiche der massiv-parallelen Sequenzierung

Die Technologien der massiv-parallelen Sequenzierung sind vielfältig einsetzbar und können Genome (DNA), Transkriptome (RNA) und Epigenome (Methylierung) analysieren [4]. Diese Erfassung der vererbten Varianten in der Keimbahn und/oder erworbenen somatischen Varianten in bestimmten Organen oder zum Beispiel Tumoren von Patient*innen kann wichtige diagnostische, prognostische und/oder prädiktive Informationen für bestimmte Erkrankungen liefern [5].

Zu den möglichen Anwendungsgebieten der NGS-Tests zählen die genetische Diagnostik (Genomsequenzierung, Exomsequenzierung, Gen-Panel-Diagnostik), die Tumordiagnostik und Krebsgenomik (*Tumorprofiling*, Tumormutationslast, *Liquid Biopsy*), die Transkriptomik (*RNA-Sequencing*, *single-cell RNA-Sequencing*), die Epigenomik (DNA-Methylierungsanalyse, ATAC-Seq), die Pathogendetektion, die Mikrobiomanalyse, die Pharmakogenomik, die Populationsgenetik, und die nicht-invasive Pränataldiagnostik [5, 6, 10, 13, 19, 38]. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Anwendungsgebiete näher beschrieben.

Medizinisch-genetische Diagnostik

Durch den Einsatz von NGS- und TGS-Technologien ist es potenziell möglich, die gesamte DNA-Sequenz des Genoms (engl. *[whole] genome sequencing*, WGS), alle proteinkodierenden Sequenzen bzw. das Exom (engl. *[whole] exome sequencing*, WES) oder eine Auswahl von Genen durch die Gen-Panel-Diagnostik (engl. *targeted gene panels*) zu bestimmen [39].

Mit Einführung des NGS ist die Analyse des kompletten humanen Erbguts in einem vertretbaren zeitlichen Rahmen möglich geworden. Dabei wird die Gesamtheit der Nukleotidsequenzen (ca. 3,1 Mrd. DNA-Bausteine) aller 23 Chromosomenpaare (22 Autosomenpaare sowie ein Paar der beiden Geschlechtschromosomen X und Y) sequenziert und im Anschluss bioinformatisch analysiert. WGS stellt somit eine sehr umfangreiche genetische Analyse dar, die vor allem in der Erforschung von komplexen seltenen Erkrankungen, Erkrankungen mit unbekanntem Ursprung und gegebenenfalls zur genauen Charakterisierung von Tumoren eingesetzt wird [40]. Während die Kosten für die Sequenzierung eines einzelnen Genoms (im Jahr 2001) bei etwa 2-3 Milliarden USD lagen, ist es mittlerweile möglich, ein Genom bei Verwendung entsprechender Hochdurchsatzstrukturen zu Kosten von wenigen Hundert Euro zu sequenzieren [8].

Genome, Transkriptome und Epigenome können analysiert werden

wichtige Informationen für bestimmte Erkrankungen

mögliche Anwendungsgebiete sind z.B. genetische Diagnostik, Tumordiagnostik, Pharmakogenetik

massiv-parallele Sequenzierung ermöglicht unterschiedliche diagnostische Ansätze

zeitnahe Analysen des kompletten humanen Erbguts (WGS)

sehr umfangreiche Analyse

die Kosten sind durch NGS stark gesunken

WES sequenziert die protein-kodierenden Bereiche von Genen

85% der pathogenen Mutationen sind hier zu finden

WES deutlich kostengünstiger als Genomsequenzierung (aktuell das am weitesten verbreitete Verfahren der genetischen Diagnostik)

Genpanel-Sequenzierung: Beschränkung auf bekannte, relevante Gene

die genomische Abdeckung variiert nach NGS-Test

WGS deckt auch intergene Regionen ab

Bei der Exom-Sequenzierung werden vor der eigentlichen Sequenzierung zunächst mit speziellen Verfahren (meist Hybridisierung an DNA-Sonden) gezielt die kodierenden Bereiche der ca. 20.000 proteinkodierenden Gene im Genom angereichert, also die Gesamtheit aller Exone bzw. das Exom. Es umfasst nur etwa 1-2% des gesamten Genoms und ist in seiner Sequenz sehr viel höher konserviert als viele nicht-kodierende Bereiche der DNA. In diesem Bereich sind auch ca. 85 % der bekannten krankheitsverursachenden Mutationen zu finden [41]. Nicht erfasst bei der Exomsequenzierung sind jedoch die nicht-kodierenden Bereiche dieser Gene, welche ebenfalls Krankheitsentitäten enthalten können, sowie die 20-25.000 nicht-proteinkodierenden Gene (RNA-Gene), welche ebenfalls als Ursache von Krankheiten bzw. individueller Variabilität infrage kommen. Die Exomsequenzierung ist jedoch deutlich kostengünstiger als eine Genomsequenzierung und ohne Investitionen in sehr teure Sequenzierer möglich. Die Exomsequenzierung ist daher das aktuell am weitesten verbreitete Laborverfahren der genetischen Diagnostik. Aufgrund der Herausforderungen der Interpretation genetischer Varianten beschränkt sich die Auswertung der Exom-Datensätze bei den meisten Krankheiten auf die bekannten, klinisch infrage kommenden Gene bzw. virtuelle Genpanels¹².

Bei der eigentlichen Genpanel-Sequenzierung beschränkt sich die Anreicherung von Zielsequenzen auf die bekannten, infrage kommenden relevanten Gene. Dabei werden typischerweise Gene abgedeckt, die mit medizinischen Indikationen (z.B. vererbaren Erkrankungen) einhergehen [39]. Genpanel-Sequenzierungen erlauben die Verwendung von kleinen, kostengünstigen Sequenzierern und sind daher vergleichsweise preiswert. Allerdings ist zwingend eine Standardisierung der Analytik notwendig, und im Gegensatz zu den Exom-basierten virtuellen Genpanels ist bei der Genpanel-Anreicherung eine Ausweitung anderer ggf. interessanter oder „neuer“ Gene im Verlauf nicht möglich. Aufgrund der kontinuierlich sinkenden Kosten werden die früher oft verwendeten Genpanel-Sequenzierungen in der humangenetischen Diagnostik meist nur noch für wenige spezifische Indikationen verwendet¹³. Öfter verwendet werden sie zum Teil in der Molekularpathologie, zum Beispiel für spezifische Erkrankungen (z.B. myeloische Leukämie) oder eine umschriebene Kategorie von Krankheiten (z.B. Karzinome) [38].

¹² Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

¹³ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

Sowohl die Exomsequenzierung als auch die Panelsequenzierung benötigen eine Anreicherung von Zielsequenzen, welche bei der Genomsequenzierung wegfällt. Dies muss bei der Abwägung von Sensitivität, Gerätekosten, Sequenzierkosten und bioinformatischem Aufwand berücksichtigt werden¹⁴. Die Exom-Sequenzierung deckt grundsätzlich alle proteinkodierenden Gene und damit die Mehrheit der mit Krankheiten assoziierten Gene ab, darüber hinaus auch der Gene, mit welchen noch keine Erkrankungen in Verbindung gebracht wurden. Die Genomsequenzierung erfasst sowohl die nicht-kodierenden Abschnitte der einzelnen Gene und nicht-proteinkodierenden Gene als auch intergene Regionen (Abschnitte, die zwischen zwei Genen liegen). Beispielsweise kann ein Gen-Panel möglicherweise ein mutiertes Gen nicht inkludieren, und ein Exom-Test kann tiefe intronische Mutationen übersehen. Zu berücksichtigen ist dabei jedoch, dass mit den herkömmlichen Short Read (NGS) Technologien ein substantieller Anteil klinisch relevanter Gene (bis zu 10 % des Genoms) aufgrund von Pseudogenen und repetitiven Sequenzen nicht erfasst werden [39]. Mittelfristig ist zu erwarten, dass kostengünstige *long read* Sequenzierverfahren generell für vollständige genomische Analysen herangezogen werden¹⁵.

Eine aktuell laufende Studie untersucht den Nutzen der familienbasierten (Trio-)Ganzgenomsequenzierung für Krebsprädisposition bei Kindern und Jugendlichen mit neu diagnostizierten Krebserkrankungen. Dabei werden auch die Auswirkungen auf die Familienmitglieder ermittelt. Das Ziel ist die Identifizierung der zugrunde liegenden Krebsdispositionssyndrome [Clinical Trial ID: NCT04903782].

Molekularpathologie

Massiv-parallele Sequenzierungen haben eine zunehmende Bedeutung für molekularpathologische Analysen insbesondere in der Charakterisierung von Tumoren. Mittels NGS-Tests kann ein Tumor auf somatische Mutationen analysiert und dessen Kopienzahlvariationen (engl. *copy number variation*) erfasst werden, um damit strukturelle Tumorvarianten zu bestimmen [5, 10]. Ein dadurch berechenbarer Parameter ist die Tumormutationslast (engl. *tumor mutational burden*), welche die Anzahl der erworbenen Mutationen pro Megabase (Mut/Mb) im Erbgut eines Tumors bezeichnet (Biomarker in der Onkologie) [5, 38]. Ein weiterer Parameter ist die minimale Resterkrankung (engl. *minimal residual disease*, MRD). Die MRD beschreibt die geringe Anzahl verbleibender Tumorzellen nach einer Behandlung im Blut oder Knochenmark [10]. Ein Beispiel für eine Anwendung im Bereich des molekularen Tumorprofilings ist das FoundationOne für solide Tumoren oder hämatologische Erkrankungen, mittels Ermittlung von krebsassoziierten genetischen Veränderungen [42].

Vorteil der Genomsequenzierung: keine Anreicherung von Zielsequenzen notwendig

Genpanel-Sequenzierung relativ preiswert, aber meist nur noch für wenige spezifische Indikationen verwendet

mittelfristige Erwartung: generelle Verwendung von long read Sequenzierung

eine laufende Studie untersucht die Krebsprädisposition bei Kindern und Jugendlichen mittels NGS

die Tumormutationslast kann mit Hilfe von NGS-Tests berechnet werden

auch die minimale Resterkrankung (MRD) kann gemessen werden

¹⁴ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

¹⁵ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

die Liquid biopsy erfasst und analysiert zirkulierende Tumor-DNA, Tumor-Zellen, zellfreie Krebs-RNA oder Exosomen in flüssigen Gewebeproben

erste Tests von der FDA zugelassen

der klinische Nutzen der Liquid biopsy ist noch unzureichend belegt

laufende Studien zur Liquid biopsy zur Messung der ctDNA im Behandlungsverlauf

RNA kann mittels NGS-Technologien analysiert werden, um die Dynamik der Genexpression zu untersuchen

weitere Anwendungsgebiete: z.B. die Analyse des alternativen Spleißens, von langen nicht-kodierenden oder kleinen RNAs oder das Transkriptom-Assembly

eine laufende Studie untersucht Gene, die bestimmte Erkrankungen verursachen können

Ein weiteres Anwendungsgebiet der NGS-Technologien ist die *Liquid Biopsy*. Dadurch können zirkulierende Tumor-DNA (engl. *circulating tumor DNA*, ctDNA) und zirkulierende Tumor-Zellen (engl. *circulating tumor cells*, CTCs) erfasst und analysiert werden [5, 6, 10, 38]. Auch zirkulierende zellfreie Krebs-RNA oder Exosomen sollen durch die *Liquid Biopsy* erfasst werden. Als Probenmaterial kann Blut oder andere Körperflüssigkeiten (wie Urin oder Liquor) untersucht werden. Die *Liquid Biopsy* kann mehrere Ziele verfolgen: Nachweis der MRD, die Echtzeitüberwachung des Krankheitsverlaufs, die Therapiewahl und die Krebsdiagnose in frühen Stadien der Erkrankung. Während bereits erste Tests durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassen sind, sind laut einem gemeinsamen Review der American Society of Clinical Oncology (ASCO) und des College of American Pathologists (CAP) weitere Nachweise erforderlich, um den klinischen Nutzen der *Liquid Biopsy* zu belegen. Herausforderungen bestehen demnach im geringen Anteil der von Krebs stammenden DNA in Blutplasma Proben und dem Bedarf an modifizierten Probenvorbereitungsmethoden und tieferer Sequenzabdeckung für ausreichende Sensitivität [10]. Darüber hinaus kann es durch die *Liquid Biopsy* durch andere somatische Ereignisse zu falsch-positiven Ergebnissen kommen, etwa durch die klonale Hämatopoese (das Auftreten von Mutationen in Leukozyten des peripheren Blutes bei Personen ohne hämatologische Erkrankung) [5].

Ein Beispiel einer laufenden Studie stellt die Studie zu *Liquid Biopsy* für die Diagnose und Überwachung von immunvermittelten lymphoproliferativen Erkrankungen dar. Dabei erfolgt die Messung der ctDNA im Plasma und eine anschließende Analyse mittels NGS auf minimale Resterkrankung (MRD) [NCT05803616]. Eine weitere Studie beobachtet die Entwicklung der ctDNA während der Krebsbehandlung bei Patient*innen mit fortgeschrittenem HER2-positivem Magenkrebs [NCT04520295].

Transkriptomik

Für die Transkriptomik kann RNA mittels NGS-Technologien analysiert werden. Dazu zählt vor allem die mRNA- oder RNA-Sequenzierung (RNA-Seq), welche die Sequenzierung und Quantifizierung von mRNA-Molekülen beinhaltet, und eine Momentaufnahme der exprimierten Gene einer biologischen Probe liefert. Damit kann die Dynamik der Genexpression über die Zeit oder in verschiedenen Geweben oder Zelltypen untersucht werden.

Weitere Anwendungsgebiete sind die Analyse des alternativen Spleißens (ein Prozess, bei dem ein einzelnes Gen mehrere mRNA-Isoformen erzeugen kann), die Analyse von langen nicht-kodierenden RNAs und kleinen RNAs (diese spielen eine Rolle in der posttranskriptionalen Genregulation), das Transkriptom-Assembly und die Transkriptom-Annotation, die Einzelzell-RNA-Sequenzierung (Untersuchung von Genexpressionsprofilen auf Ebene einzelner Zellen) und die integrative Transkriptomik (Kombination der NGS-Daten aus Transkriptomik mit Daten der Genomik, Epigenomik, oder Proteomik) [19].

Ein Beispiel einer Studie zur Transkriptomik stellt die RNA-Sequenzierung in der Framingham Heart Study (Kohortenstudie) dar. Dabei sollen Gene untersucht werden, die mit bestimmten Erkrankungen und Gesundheitszuständen in Zusammenhang stehen, darunter Herz- und

Kreislaufkrankungen, Lungenerkrankungen, Bluterkrankungen, Gedächtnisverlust und Krebserkrankungen [NCT03225183].

Epigenomik

Die NGS-Technologien eignen sich zur Anwendung von Methyl-Seq, um DNA-Methylierungen für epigenetische Untersuchungen zu analysieren. Diese DNA-Methylierungsanalysen spielen sowohl bei physiologischen Prozessen wie auch bei Erkrankungen eine Rolle [6]. Das DNA-Methylierungs-Profiling kann etwa in der Taxonomie von Tumorerkrankungen des Nervensystems angewandt werden [43].

Mittels CHiP-Seq (*Chromatin Immuno Precipitation DNA Sequencing*) können die DNA-Protein-Interaktionen mittels Chromatin-Immunpräzipitation und Sequenzierung regulatorischer Sequenzen der DNA analysiert werden. Die Interaktion zwischen DNA und Proteinen reguliert die Genexpression und ist für das Verständnis physiologischer und pathologischer Prozesse von Bedeutung [6]. Ein weiteres Beispiel sind Assays für Transposase-zugängliches Chromatin mittels Sequenzierung (ATAC-Seq) zur Bestimmung der Chromatin-Zugänglichkeit im gesamten Genom [8].

In Bezug auf Analysen von DNA-Methylierungen untersucht eine laufende Studie über Diabetes Mellitus Typ 1 bei Kindern und Jugendlichen die epigenetischen Veränderungen der DNA-Expression. Das Ziel der Studie ist die Analyse des Methylierungsstatus der DNA in der Promoterregion spezifischer Anfälligkeitsgene (wie Protein-Tyrosin-Phosphatase, Non-Receptor Type 22, Insulin (INS) und Humanes Leukozyten Antigen G (HLA-G)) [NCT04139369].

Mikrobielle Genomik

Noch vor Verfügbarkeit von NGS-Technologien wurde bakterielle DNA und RNA sequenziert, um Krankheitserreger zu identifizieren und mögliche Resistenzgene zu analysieren. Durch den Einsatz von NGS-Technologien sind diese Analysen mit höherer Geschwindigkeit möglich [10]. Dabei gibt es drei Hauptanwendungen: mikrobielle genomische Analyse, gezielte Metagenomsequenzierung und Shotgun-Metagenomsequenzierung [37].

Mit zielgerichteter NGS können Panels bekannter Erregersequenzen zum Screening verwendet werden-Gen-Panels kann spezifisch nach Erregern gesucht werden, von denen bekannt ist, dass sie an bestimmten Krankheiten beteiligt sind (z.B. gastrointestinale oder respiratorische Erkrankungen). Einzelne dieser Panels sind für die Verwendung für bestimmte Probenotypen (z.B. Liquor) optimiert. Die Vorteile dieser Panels sind höhere Spezifität und schnellere Durchlaufzeit. Dem gegenüber stehen jedoch begrenzte Anwendungsbereiche und Limitationen in Bezug auf neue Krankheitserreger oder Antibiotikaresistenzmarker. Weitere Möglichkeiten sind das WGS zur Sequenzierung des gesamten Pathogenoms, oder die gezielte Metagenomsequenzierung (mNGS) um Proben von Patient*innen auf alle darin vorkommenden Organismen zu analysieren [10].

DNA-Methylierungen können analysiert werden (Methyl-Seq)

Anwendung z.B. bei Tumoren des Nervensystems

CHIP-Seq analysiert DNA-Protein-Interaktionen, ATAC-Seq die Chromatin-Zugänglichkeit im Genom

eine laufende Studie untersucht epigenetische Veränderungen der DNA-Expression bei Diabetes

NGS ermöglicht schnelle Analysen bakterieller DNA und RNA

Krankheitserreger können durch NGS mit Panels bekannter Erregersequenzen erkannt werden

Limitationen bei neuen Erregern und Antibiotika-Resistenzmarkern

**Analyse des
Mikrobioms,
epidemiologische
Analysen von
Pathogenen**

Durch NGS-Technologien ist zudem die Analyse des Mikrobioms (Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung im menschlichen Darm) möglich [5]. Weitere Anwendungen in der mikrobiellen Genomik umfassen epidemiologischen Analysen von Pathogenen innerhalb und außerhalb von Krankenhaussystemen: zur Identifizierung und epidemiologischen Verfolgung von lebensmittelbedingten Erkrankungen, zur Identifizierung und zur Analyse von Übertragungen von multiresistenten nosokomialen Infektionen [37].

**laufende Studie zu
Erregern von
muskuloskelettalen
Infektionen**

In einer laufenden Studie wird der Einsatz eines Bluttests untersucht, welcher mittels NGS ausgewertet wird. Das Ziel ist, festzustellen, ob bei Kindern mit muskuloskelettalen Infektionen der Infektionserreger nachgewiesen und gemessen werden kann [NCT03846804].

Pharmakogenetik

**Einfluss von Genen
auf die Wirkung von
Medikamenten wird
untersucht**

Bei pharmakogenetischen Tests (PGx-Tests) wird untersucht, wie genetische Varianten bei Patient*innen die Wirkung von bestimmten Medikamenten beeinflussen können. Auf diese Weise lässt sich ein Medikament und dessen Dosierung genauer anpassen [2].

**30% weniger
schwerwiegende
Nebenwirkungen bei
personalisierter
Medikamentendosis**

Eine multizentrische Implementierungsstudie aus sieben europäischen Ländern zu einem 12-Gen-Paneltest (unter Beteiligung der Medizinischen Universität Wien) ergab, dass Patient*innen, deren Medikamentendosis entsprechend der pharmakogenetischen Ergebnisse eingestellt wurde, etwa 30 Prozent weniger schwerwiegende Nebenwirkungen aufwiesen, als Patient*innen, denen eine Standarddosis an Medikamenten verschrieben wurde („*Ubiquitous Pharmacogenomics*“) [44].

**Evidenz nicht für alle
PGx-Indikationen
gleich hoch**

Eine Analyse des belgischen Health Care Knowledge Center (KCE) hielt fest, dass die wissenschaftliche Evidenz nicht für alle PGx-Indikationen gleich hoch ist und es Diskrepanzen zwischen Leitlinien der pharmakogenetischen Konsortien und klinischen Leitlinien gibt. Die Studie fordert die Weiterentwicklung evidenzbasierter Leitlinien für die klinische Praxis, eine stringenter Auswahl pharmakogenetischer Tests für die Erstattungsfähigkeit und entsprechende Schulungen der Gesundheitsdienstleister*innen [2].

**evidenzbasierte
Leitlinien, stringente
Auswahl und
Schulungen nötig**

**laufende Studie zu
Pharmakogenetik im
perioperativen Setting**

Ein Beispiel einer laufenden Studie ist der Einsatz von Pharmakogenetik im perioperativen Setting. Dabei soll in einer randomisiert kontrollierten Pilotstudie getestet werden, ob pharmakogenetische Tests für in der Anästhesie üblicherweise eingesetzte Arzneimittel (personalisierte perioperative Versorgung) die Genesungsqualität der Patient*innen im Vergleich zur Standardversorgung (ohne Pharmakogenomik) verbessern können [NCT04615234].

Populationsgenetik

**Erforschung von
Vererbungswege
innerhalb definierter
Populationen mittels
RADSeq**

Die Populationsgenetik erforscht Vererbungswege innerhalb definierter Populationen und untersucht die relative Häufigkeit von homologen Genen (die Genfrequenz). Mittels NGS-Technologien ist die restriktionsstellen-assoziierte DNA-Sequenzierung möglich (RADSeq). Die RADSeq ist für Genome jeder Größe geeignet, erfordert kein Referenzgenom und ermöglicht ökologische und evolutionäre Studien an Nicht-Modellorganismen [45, 46].

Nicht-invasive Pränataldiagnostik

Die NGS-Technologien können zudem bei der nicht-invasiven Pränataldiagnostik zur Anwendung kommen, zum Beispiel zur Erkennung von chromosomalen Aneuploidien oder vereinzelt auch monogener Krankheiten [47, 48]. Detailliertere Informationen zum pränatalen Screening und zu diagnostischen Tests auf fetale Anomalien finden sich im HTA-Projektbericht Nr. 103 (2018): Screening mit nicht-invasiven pränatalen Tests (NIPTs) auf fetale Trisomien T21, 18, 13 [49] und dem AIHTA Policy Brief Nr. 012 (2022): Regelung und Finanzierung von pränatalen Screening- und diagnostischen Untersuchungen auf fetale Anomalien in ausgewählten europäischen Ländern [50].

Einsatz von NGS bei der nicht-invasiven Pränataldiagnostik

HTA-Berichte zu NIPTs aus 2018 und 2022

Laufende Studien

Durch die Suche auf clinicaltrials.gov konnten 560 laufende Studien zu NGS- und TGS-Technologien identifiziert werden. Nach Ausschluss der Studien, welche im Studienregister einen abgebrochenen oder unbekanntem Studienstatus angeben, blieben 394 aktuell laufende Studien. Eine Auswahl dieser laufenden Studien ist im Ergebniskapitel *Anwendungsbereiche* exemplarisch erwähnt. Die vollständige Liste dieser aktuell laufenden Studien kann von den Autor*innen angefragt werden.

560 Studien zu NGS und TGS identifiziert

394 aktuell laufend

Diskussion

Die Hochdurchsatz-Sequenzierung zahlreicher einzelner Nukleinsäuremoleküle im gleichen Analysenansatz wird analytisch beschreibend als massiv-parallele Sequenzierung bezeichnet. Die zur Verfügung stehenden Technologien erlauben die gleichzeitige (parallele) Analyse von Millionen oder Milliarden einzelnen DNA-Fragmenten, und dadurch die umfassende Untersuchung von zehntausenden Genen bzw. großen Genomen. In Abgrenzung zu den Sequenzier-Technologien der „Ersten Generation“ (Sanger-Sequenzierung, Maxam-Gilbert-Sequenzierung) und im historischen Sprachgebrauch werden dabei die *Next Generation Sequencing*-Technologien (NGS) und die *Third Generation Sequencing*-Technologien (TGS) unterschieden. Das NGS, mit Bezug auf die mögliche Leselänge der DNA-Fragmente inzwischen auch als *short read sequencing* bezeichnet, umfasst das *Sequencing-by-synthesis* (SBS), das *Sequencing-by-ligation* und das *Sequencing-by-binding* (SBB). Das TGS, auch *long read sequencing* genannt, umfasst das *SMRT* (*single molecule real-time*) *sequencing* und die Nanoporen-Sequenzierung. Diese Technologien werden sowohl in der Forschung als auch teilweise schon in der medizinischen Diagnostik, insbesondere im Bereich der Humangenetik und der Molekularpathologie, eingesetzt und haben die genetische Diagnostik enorm verändert.

Massiv-parallele Sequenzierung: Überbegriff für NGS- und TGS-Technologien (in Abgrenzung zur Sequenzierung der „ersten Generation“)

Millionen oder Milliarden einzelner DNA-Fragmente können parallel analysiert werden

es gibt unterschiedliche Technologien und Anwendungsgebiete

es gibt einige Herausforderungen bei der Implementierung:

enorme Datenmengen, Validierung der Tests, Anstieg an Zusatzbefunden, erhöhte Kosten für Gesundheitssystem und Versicherungen

demgegenüber stehen Erfassung wichtiger Krankheitsrisiken und die Möglichkeit Früherkennungs- und Vorsorgemaßnahmen einzuleiten

gleiche Anforderungen wie für andere Screenings

ethische Aspekte müssen berücksichtigt werden

zuständiges Gesundheitspersonal braucht fachliche Kompetenz und laufende Weiterbildung

Hochdurchsatz-Sequenzierung wird in vielen Bereichen eingesetzt

zunehmende Bedeutung zeigt sich in der Anzahl laufender Studien

Auch wenn die stetig weiterentwickelten Technologien eine Reihe an Vorteilen gegenüber den Technologien der ersten Generation aufweisen, so sind mit ihrer Implementierung auch einige Herausforderungen verbunden. Die unweigerlich entstehenden und erwünschten enormen Datenmengen verlangen nach geeigneter technischer Infrastruktur für deren gesetzes- und leitlinienkonforme Speicherung und bioinformatische Analyse [5, 6]. Die Validierung der Tests ist ebenso erforderlich und kann insbesondere für kleine Labore herausfordernd sein [10].

Durch einen umfassenderen Einsatz der massiv-parallelen Sequenzierung kann es – sofern diese Daten nicht gezielt ausgeblendet werden – zum Nachweis von Zusatz- oder Zufallsbefunden kommen (*incidental findings*), die die ursprüngliche Fragestellung nicht betreffen, für Patient*innen oder deren Familien aber dennoch gesundheitlich relevant sein können. Die korrekte Interpretation solcher Befunde erhöht die Analysenkosten und kann die österreichweit zur Verfügung stehenden Diagnostikstrukturen überfordern, kann aber andererseits durch Erfassung wichtiger Krankheitsrisiken und Einleitung von effizienten Früherkennungs- und Vorsorgemaßnahmen substantielle Vorteile haben. Dies muss unter anderem mit den ggf. durch notwendige weiterführende Untersuchungen verursachten erhöhten Kosten im Gesundheitswesen und bei den Krankenversicherungen abgewogen werden. Für Analyseverfahren im Rahmen der genetischen Diagnostik gelten insofern die gleichen Anforderungen wie für alle Screeningverfahren in der Medizin¹⁶.

Zudem gilt es, die damit verbundenen ethischen Aspekte zu berücksichtigen: im Rahmen des vor und nach einer Genanalyse verpflichtenden Beratungsgesprächs muss auch der Umgang mit unklaren Ergebnissen (Varianten, die nicht als eindeutig gutartig oder pathogen klassifiziert werden können) sowie mit identifizierten genetischen Dispositionen (welche nicht zwingend zu einer zukünftigen Erkrankung führen) geklärt werden. Vom zuständigen Gesundheitspersonal sind fachliche Kompetenz (Interpretation der Ergebnisse, Beratung der untersuchten Personen) und laufende Weiterbildung hinsichtlich der schnellen technologischen Entwicklungen gefordert [6].

Die massiv-parallelen Sequenzierungstechnologien werden in einer Reihe von Anwendungsfeldern eingesetzt. Dazu zählen die medizinisch-genetische Diagnostik, die Molekularpathologie, die Transkriptomik, die Epigenomik, die Pathogendetektion, die Mikrobiomanalyse, die Pharmakogenetik, die Populationsgenetik, und die nicht-invasive Pränataldiagnostik.

Die zunehmende Bedeutung dieser Technologien wird durch die hohe Anzahl derzeit laufender Studien hervorgehoben. Der Großteil der laufenden Studien befasst sich mit Studien zur genetischen Diagnostik, sowie der Tumordiagnostik und der Krebsgenomik. Es ist weiters zu erwarten, dass die Pathogendetektion, die Mikrobiomanalyse und die nicht-invasive Pränataldiagnostik durch massiv-parallele Sequenzierungen zunehmend nicht nur in der Forschung, sondern auch im klinischen Alltag durchgeführt werden können.

¹⁶ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

In Bezug auf die Technologien ist davon auszugehen, dass die Entwicklung der Sequenzier-Plattformen in Zukunft weiter in Richtung Verkleinerung der Geräte und Verkürzung der Durchlaufzeiten geht; schon jetzt ist es möglich, DNA-Sequenzen in Echtzeit zu bestimmen, einige Geräte von Oxford Nanopore sind nicht größer als ein USB-Stick. Eine neue Anwendung ist das intra-operative Sequenzieren, um beispielsweise Tumorgewebe direkt im OP-Saal zu analysieren¹⁷; Publikationen dazu wurden bereits veröffentlicht [51].

Die medizinisch-genetische Versorgung in Österreich wird im österreichischen Strukturplan Gesundheit primär den sechs Zentren für medizinische Genetik (ZMG) zugeordnet, welche den Universitätskliniken Wien, Graz, Linz, Salzburg und Innsbruck sowie dem Hanusch-Krankenhaus in Wien zugeordnet sind. An diesen Zentren sind neben vollständigen Ambulanzstrukturen für die klinisch-genetische Diagnostik und genetische Beratung auch diagnostische Labors für alle relevanten Indikationen etabliert, wobei Umfang und Spektrum der etablierten Analysen abhängig von der Größe der unterschiedlichen ZMGs variiert. Die Mehrheit der ZMGs übernimmt auch tumorzytogenetische Untersuchungen und zum Teil molekulargenetische Tumoranalysen bis hin zur Liquid Biopsy. Die Kosten für alle medizinisch indizierten genetischen Analysen in Österreich im ambulanten Bereich werden von den Sozialversicherungsträgern ohne Selbstbehalt übernommen. Die ZMGs übernehmen auch umfassende klinische Versorgungsaufgaben in den jeweiligen Regionen, zum Beispiel durch Satellitensprechstunden in anderen Spitälern, und stehen für die Interpretation und interdisziplinäre Besprechung von komplexen Fällen zur Verfügung. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Funktion für die diagnostische Abklärung bei Menschen mit seltenen Erkrankungen¹⁸.

In Deutschland startete mit Juli 2024 das Modellvorhaben Genomsequenzierung („Modellvorhaben zur umfassenden Diagnostik und Therapiefindung mittels Genomsequenzierung bei seltenen und bei onkologischen Erkrankungen“), welches als Teil der Nationalen Strategie für Genommedizin dazu beitragen soll, genetische Veränderungen bei Personen mit seltenen Erkrankungen oder Krebserkrankungen zu identifizieren. Ziel ist eine frühzeitige Diagnose und personalisierte Therapiefindung. Über einen Zeitraum von fünf Jahren wird die Genomsequenzierung einheitlich in teilnehmenden Universitätskliniken ermöglicht und von den gesetzlichen Krankenkassen finanziert; langfristig soll die Genomsequenzierung als Kassenleistung in die Gesundheitsversorgung integriert werden [52, 53].

Die französische Haute Autorité de Santé (HAS) untersuchte den Einsatz von NGS zum Nachweis von Veränderungen des RET-Gens bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (im Hinblick auf die Verschreibung von Arzneimitteln der Klasse der Tyrosinkinase-Inhibitoren, die spezifisch auf die Transkripte abzielen). Die HAS befürwortet die Erstattung der Kosten für den „Nachweis von Veränderungen des RET-Gens durch eine neue Technologie (NGS)“ [54]. Laut dem aktuellen Arbeitsprogramm der HAS laufen zudem Erhebungen zur Analyse von Gen-Panels durch NGS für die Indikationen Lungenkrebs, gastrointestinale Stromatumore und chronische lymphatische Leukämien [55].

Entwicklung Richtung kleinerer Geräte und kürzerer Durchlaufzeit

Trend zum intraoperativen Sequenzieren

in Österreich: sechs Zentren für medizinische Genetik (ZMGs)

Kostenübernahme aller medizinisch indizierten genetischen Analysen durch Sozialversicherungen

tumorzytogenetische Untersuchungen, molekulargenetische Tumoranalysen und Liquid biopsy in Mehrheit der ZMGs durchgeführt

Start des Modellvorhabens Genomsequenzierung in Deutschland

Genomsequenzierung wird für fünf Jahre einheitlich ermöglicht und finanziert

Erstattung von NGS in Frankreich für Nachweis von Veränderungen des RET-Gens

weitere Erhebungen laufen

¹⁷ Information aus externer Expert*innenbefragung.

¹⁸ Information durch die externe Begutachtung hinzugefügt.

Guidelines der FDA zu NGS-basierten IVDs und Datenverarbeitung von NGS-Daten

mehrere NGS-basierte Tests und Therapien zugelassen

Belgien: PGx-Tests können von Ärzt*innen angefordert werden, Kostenerstattung für 20 Indikationen

Refundierung von NGS-Tests in Onkologie und Hämato-Onkologie

Österreich: Gendiagnostik im Leistungskatalog enthalten

Limitationen: Beschränkung auf Handsuche, keine Bewertung von Sensitivität oder Spezifität der Verfahren

NGS und TGS haben die DNA- und RNA-Sequenzierung enorm verändert und zugänglich gemacht

Die U.S. Food and Drug Administration (FDA) hat bereits 2018 bzw. 2019 Guidelines veröffentlicht, die sich mit dem Design, der Entwicklung und der Validierung von NGS-basierten *In Vitro Diagnostics* (IVDs) und mit der Datenverarbeitung von NGS-Daten befassen [56-58]. Mehrere NGS-basierte Tests und zielgerichtete Therapien (*targeted therapies*) wurden zugelassen [10]. NGS als diagnostischer Labortest wird in den USA von den Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS) für Patient*innen mit erblichen Krebserkrankungen erstattet [10, 59].

Pharmakogenetische Tests (PGx-Tests) können in Belgien von allen Ärzt*innen angefordert werden, und für etwa 20 Indikationen werden die Kosten erstattet. Mehr als die Hälfte der im Jahr 2022 in Belgien durchgeführten 8.500 PGx-Tests betrafen onkologische Indikationen (hauptsächlich zur Vorhersage der Toxizität bestimmter Krebsmedikamente). Die Kosten für die im Jahr 2022 durchgeführten PGx-Tests beliefen sich auf knapp 1.500.000 € [2]. Im Juli 2019 wurde in Belgien eine auf fünf Jahre zeitlich begrenzte, temporäre Erstattung von NGS-Tests in der Onkologie und Hämato-Onkologie festgelegt. Mit Juli 2024 ist ein neues Abkommen in Kraft getreten, welches nun eine dauerhafte Refundierung vorsieht – für NGS-Tests von DNA und RNA-Seq-Analysen für ausgewählte solide Tumore (28 Codes) und hämatologische Krebserkrankungen (23 Codes) [60].

Im Österreichischen Leistungskatalog des Bundesministeriums für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz (BMSGPK) von 2023 ist die Gendiagnostik unter der Codierung ZX840 im Kapitel Laboruntersuchungen enthalten und umfasst die Pharmakogenetik, Humangenetik und die hämatologische Genetik [61].

Eine Limitation des vorliegenden Rapid Reviews ist die Beschränkung auf eine Handsuche nach relevanter Literatur via PubMed, auf den Websites von HTA-Institutionen des INAHTA-Netzwerks und auf den Websites von Herstellern der beschriebenen Sequenzier-Plattformen. Eine systematische Literatursuche oder Durchsicht aller aktuell laufenden Studien war aufgrund der umfassenden Fragestellung im begrenzten zeitlichen Rahmen eines Rapid Reviews nicht durchführbar. Der Review beschränkt sich zudem auf eine Übersicht derzeit verfügbarer Sequenzier-Technologien und deren Anwendungen und enthält keine Bewertung der Sensitivität oder Spezifität der Verfahren.

Schlussfolgerung

Die Technologien der massiv-parallelen Sequenzierung haben in den vergangenen Jahren die DNA- und RNA-Analyse enorm verändert und durch gesteigerten Durchsatz, kürzere Laufzeiten und gesenkte Kosten einer Vielzahl von Anwendungsbereichen zugänglich gemacht. Laufende Weiterentwicklung der etablierten Technologien sowie Innovationen auf dem Gebiet machen den Markt äußerst lebendig.

Auch wenn die Implementierung der massiv-parallelen Sequenzierung mit Herausforderungen verbunden ist, werden diese Verfahren in Zukunft weiter an Bedeutung gewinnen und auch abseits der Forschung in der Routineversorgung zunehmend zur Anwendung kommen.

Trotz vieler Möglichkeiten darf ein kritischer Blick zum tatsächlichen Nutzen für Patient*innen nicht vernachlässigt werden.

**auch abseits der
Forschung zunehmende
Bedeutung**

**tatsächlicher Nutzen
für Patient*innen kritisch
zu prüfen**

2 Anhang

Literatursuche INAHTA-Datenbank und HTA-Websites

Suchbegriffe:

Next generation sequencing; Third generation sequencing; Pharmakogenetik; Pharmacogenetic; Genom

| | Treffer |
|-------|--|
| IQWIG | <ul style="list-style-type: none"> • (Powerpoint) Genetische Tumordiagnostik und personalisierte Medizin aus der System-Perspektive (2022): https://www.iqwig.de/veranstaltungen/hs-2022-tumordiagnostik-schillinger.pdf |
| NICE | <ul style="list-style-type: none"> • clonoSEQ for minimal residual disease assessment in multiple myeloma, acute lymphoblastic leukaemia and chronic lymphocytic leukaemia (2021): https://www.nice.org.uk/advice/mib278 • Next-generation sequencing panel for solid tumour cancers in children (2018): https://www.nice.org.uk/advice/mib133/chapter/Summary • HTG EdgeSeq ALKPlus Assay EU for ALK status testing in non-small-cell lung cancer (2017): https://www.nice.org.uk/advice/mib128/chapter/Summary |
| KCE | <ul style="list-style-type: none"> • Study 2024-09 (HTA) Economic evaluation of whole genome sequencing for children with developmental disorders (planned study): https://kce.fgov.be/en/ongoing-and-planned-projects/planned-projects/study-2024-09-hta-economic-evaluation-of-whole-genome-sequencing-for-children-with-developmental • Pharmacogenetic tests in Belgium (2024): https://kce.fgov.be/en/publications/all-reports/pharmacogenetic-tests-in-belgium • The use of whole genome sequencing in clinical practice: challenges and organisational considerations for Belgium (2018): https://kce.fgov.be/en/publications/all-reports/the-use-of-whole-genome-sequencing-in-clinical-practice-challenges-and-organisational-considerations • Next generation sequencing gene panels for targeted therapy in oncology and haemato-oncology (2015): https://kce.fgov.be/en/publications/all-reports/next-generation-sequencing-gene-panels-for-targeted-therapy-in-oncology-and-haemato-oncology |
| CADTH | <ul style="list-style-type: none"> • An Overview of Pharmacogenomic Testing for Psychiatric Disorders (2023): https://www.cadth.ca/overview-pharmacogenomic-testing-psychiatric-disorders • Pharmacogenomic Testing in Depression: A 2021 Update (2021): https://www.cadth.ca/pharmacogenomic-testing-depression-2021-update • Pharmacogenomic Testing in Depression: A Review of Clinical Effectiveness, Cost-Effectiveness, and Guidelines (2020): https://www.cadth.ca/pharmacogenomic-testing-depression-review-clinical-effectiveness-cost-effectiveness-and-guidelines • Pharmacogenomic testing for medication selection: A rapid Qualitative Review (2020): https://www.cadth.ca/pharmacogenomic-testing-medication-selection-rapid-qualitative-review • In Brief: Genome-Wide Sequencing for Unexplained Developmental Delays and Multiple Congenital Anomalies (2020): https://www.cadth.ca/brief-genome-wide-sequencing-unexplained-developmental-delays-and-multiple-congenital-anomalies • Genome-Wide Sequencing: Ethical Considerations (2019): https://www.cadth.ca/genome-wide-sequencing-ethical-considerations |

| | |
|--------------|---|
| HTA Wales | <ul style="list-style-type: none"> • Pre-emptive pharmacogenetic (PGx) testing using a multiple gene panel to guide treatment and reduce adverse drug reactions (2023): https://healthtechnology.wales/reports-guidance/pre-emptive-pharmacogenetic-pgx-testing-using-a-multiple-gene-panel-to-guide-treatment-and-reduce-adverse-drug-reactions/ • Next generation sequencing for DLBCL classification (HTG EdgeSeq DLBCL Cell of Origin Assay) (2021): https://healthtechnology.wales/reports-guidance/next-generation-sequencing-for-dlbcl-classification/ • Pharmacogenetic testing to identify the risk of adverse reactions to anti-epileptic medications (2019): https://healthtechnology.wales/reports-guidance/pharmacogenetic-testing/ |
| AGENAS | <ul style="list-style-type: none"> • Survey of genomics activities in the Regions and in accredited public and private structures (2024)¹⁹: https://www.agenas.gov.it/comunicazione/primo-piano/2437-ricognizione-delle-attivita-di-genomica-nelle-regioni-e-nelle-strutture-pubbliche-e-private-accreditate • AGENAS starts the reconnaissance of genomics activities in the Regions and in accredited public and private structures (2023)²⁰: https://www.agenas.gov.it/comunicazione/primo-piano/2285-agenas-avvia-la-ricognizione-delle-attivita-di-genomica-nelle-regioni-e-nelle-strutture-pubbliche-e-private-accreditate • HTA Report – Next Generation Sequencing (NGS) (2017): https://www.agenas.gov.it/images/agenas/hta/report_hta/nuovi/5_NGS_%20HTA%20report.pdf |
| Avalia-t | <ul style="list-style-type: none"> • No relevant results identified. |
| HAS | <ul style="list-style-type: none"> • HAS work program (2024)²¹: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2024-01/programme_de_travail_has_2024.pdf • (without English summary) Chromosomal analysis on DNA microarray (ACPA) in postnatal context (2023): https://www.has-sante.fr/jcms/p_3453213/fr/analyse-chromosomique-sur-puce-a-adn-acpa-en-contexte-postnatal • (without English summary) Detection of RET gene alterations using next generation sequencing (NGS): non-small cell lung cancer and medullary thyroid cancer (2022): https://www.has-sante.fr/jcms/p_3356304/fr/detection-d-alterations-du-gene-ret-par-la-technique-de-sequencage-nouvelle-generation-ngs-cancer-bronchique-non-a-petites-cellules-et-cancer-medullaire-de-la-thyroide |
| NIPH | <ul style="list-style-type: none"> • NOR-WGS: Improved infrastructure for whole genome sequencing (programme will last until 31.12.2025): |

¹⁹ As part of the inter-institutional coordination table for Genomics in Public Health and in implementation of the Plan for the innovation of the Health System based on omics sciences, AGENAS carried out the first survey of genomics activities in the Regions and in accredited public and private structures. The data collected also concerned the number of laboratories carrying out genomic analyzes in each structure, the year in which the genomics activity was started, the type of tests carried out and platforms used, the service activity, the biobanks and the bioinformatic analysis carried out by the structures. Link: <https://stat.agenas.it/web/index.php?r=public%2Findex&report=25>

²⁰ The reconnaissance aims to obtain a mapping of regional organizational models, geographical accessibility, volumes, the type of genomic analyzes performed and the diffusion of massive sequencing technologies (next generation sequencing).

²¹ Evaluation of the sequencing and analysis of one or several gene panels using high throughput sequencing (or Next Generation sequencing) to search for somatic alterations, in the medical management of lung cancer / gastrointestinal stromal tumor / chronic lymphocytic leukaemia.

| | |
|--------|--|
| | https://www.fhi.no/en/hd/laboratorie-analyser/nor-wgs-improved-infrastructure-for-whole-genome-sequencing/ |
| ZIN | <ul style="list-style-type: none"> • (without English summary) Report - Tipping-point research for molecular diagnostics implementation process (part 1) (2023): https://www.zorginstituutnederland.nl/publicaties/rapport/2023/08/11/tipping-point-onderzoek-voor-uitvoeringstraject-moleculaire-diagnostiek-deel-1 • (without English summary) Second progress report on the implementation process of Molecular diagnostics (2022): https://www.zorginstituutnederland.nl/publicaties/rapport/2022/10/06/tweede-voortgangsrapportage-uitvoeringstraject-moleculaire-diagnostiek • (without English summary) Implementation test for phase 2 Molecular diagnostics (2021): https://www.zorginstituutnederland.nl/publicaties/publicatie/2021/08/24/uitvoeringstoets-tranche-2-moleculaire-diagnostiek • (without English summary) Moleculaire diagnostiek in de oncologie (2021): https://www.zorginstituutnederland.nl/publicaties/adviezen/2021/04/13/moleculaire-diagnostiek-in-de-oncologie |
| HIQA | <ul style="list-style-type: none"> • No relevant results identified. |
| AOTMiT | <ul style="list-style-type: none"> • No relevant results identified. |
| SBU | <ul style="list-style-type: none"> • No relevant results identified. |

Suchstrategie Studienregister

ClinicalTrials.gov (Expert search)

Datum der Suche: 21.05.2024

Suchstrategie:

| |
|--|
| AREA[InterventionSearch] (next generation sequencing OR third generation sequencing) |
|--|

560 trials identified

3 Literatur

- [1] Hu T., Chitnis N., Monos D. and Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol.* 2021;82(11):801-811. Epub 20210319. DOI: 10.1016/j.humimm.2021.02.012.
- [2] Bourgeois J C. E., Devos C, Hulstaert F, Luyten J, Ombelet S, Thiry N. Pharmacogenetic Tests in Belgium (KCE Report 382). Health Services Research (HSR) Brussels: Belgian Health Care Knowledge Centre (KCE), 2024. Available from: https://kce.fgov.be/sites/default/files/2024-05/KCE382_Pharmacogenetic_tests_in_Belgium.pdf.
- [3] Universitätsklinikum Dresden. Next-Generation-Sequencing. 2024 [cited 06.06.2024]. Available from: <https://www.uniklinikum-dresden.de/de/das-klinikum/kliniken-polikliniken-institute/kge/forschung/methoden-1/ngs>.
- [4] Uniklinikum Erlangen. Next Generation Sequencing. 2024 [cited 06.06.2024]. Available from: <https://www.humangenetik.uk-erlangen.de/aerzte-und-zuweiser/molekulargenetische-diagnostik/methoden/next-generation-sequencing/>.
- [5] Larson N. B., Oberg A. L., Adjei A. A. and Wang L. A Clinician's Guide to Bioinformatics for Next-Generation Sequencing. *J Thorac Oncol.* 2023;18(2):143-157. Epub 20221112. DOI: 10.1016/j.jtho.2022.11.006.
- [6] Baumgartner-Parzer S. NGS (next generation sequencing) oder die gute alte Sanger-Sequenzierung? – Was ist zu beachten? *Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel.* 2022;15(4):145-151. DOI: 10.1007/s41969-022-00180-1.
- [7] Kraft F. and Kurth I. Long-read sequencing in human genetics. *Medizinische Genetik.* 2019;31(2):198-204. DOI: doi:10.1007/s11825-019-0249-z.
- [8] Uhlen M. and Quake S. R. Sequential sequencing by synthesis and the next-generation sequencing revolution. *Trends Biotechnol.* 2023;41(12):1565-1572. Epub 20230721. DOI: 10.1016/j.tibtech.2023.06.007.
- [9] Illumina Inc. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. *Journal.* 2017. Epub Epub Date. Original Publication.
- [10] Zhong Y., Xu F., Wu J., Schubert J. and Li M. M. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Annals of Laboratory Medicine.* 2021;41(1):25-43. Epub 2021/01/01. DOI: 10.3343/alm.2021.41.1.25.
- [11] Szakállas N., Barták B. K., Valcz G., Nagy Z. B., Takács I. and Molnár B. Can long-read sequencing tackle the barriers, which the next-generation could not? A review. *Pathol Oncol Res.* 2024;30:1611676. Epub 20240516. DOI: 10.3389/pore.2024.1611676.
- [12] Illumina Inc. Illumina CMOS Chip and One-Channel SBS Chemistry. 2018 [cited 01.07.2024]. Available from: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/techspotlights/cmos-tech-note-770-2013-054.pdf>.
- [13] Ghemrawi M., Tejero N. F., Duncan G. and McCord B. Pyrosequencing: Current forensic methodology and future applications-a review. *Electrophoresis.* 2023;44(1-2):298-312. Epub 20221011. DOI: 10.1002/elps.202200177.
- [14] Qiagen. Pyrosequencing Technology and Platform Overview. 2024 [cited 02.07.2024]. Available from: <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/technology-and-research/pyrosequencing-resource-center/pyrosequencing-technology-and-platform-overview>.
- [15] PacBio. Next-level discovery: Setting a new standard for short reads with the Onso™ system. 2024 [cited 03.07.2024]. Available from: <https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Onso-brochure.pdf>.
- [16] PacBio. Sequencing 101: SBB sequencing. 2023 [cited 03.07.2024]. Available from: <https://www.pacb.com/blog/sbb-sequencing/>.
- [17] Thermo Fisher. SOLiD® Next-Generation Sequencing Chemistry. 2024 [cited 04.07.2024]. Available from: <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/sequencing/next-generation->

- sequencing/solid-next-generation-sequencing/solid-next-generation-sequencing-systems-reagents-accessories/solid-next-generation-sequencing-chemistry.html.
- [18] Applied Biosystems. Application Fact Sheet SOLiD™ System. 2008 [cited 04.07.2024]. Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/cms_057511.pdf.
- [19] Satam H., Joshi K., Mangrolia U., Waghoo S., Zaidi G., Rawool S., et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology (Basel)*. 2023;12(7). Epub 20230713. DOI: 10.3390/biology12070997.
- [20] Complete Genomics. How does DNBSEQ compare to traditional methods? : 2024 [cited 03.07.2024]. Available from: <https://www.completegenomics.com/technology/>.
- [21] Arslan S., Garcia F. J., Guo M., Kellinger M. W., Kruglyak S., LeVieux J. A., et al. Sequencing by avidity enables high accuracy with low reagent consumption. *Nature Biotechnology*. 2024;42(1):132-138. DOI: 10.1038/s41587-023-01750-7.
- [22] Element Biosciences. Introducing AVITI. 2024 [cited 05.07.2024]. Available from: <https://www.elementbiosciences.com/products/aviti>.
- [23] Singular Genomics. Discover G4. 2024 [cited 05.07.2024]. Available from: <https://singulargenomics.com/g4/>.
- [24] Ultima Genomics. Introducing the UG 100™. 2024 [cited 05.07.2024]. Available from: <https://www.ultimagenomics.com/ug-100>.
- [25] LeMieux J. What Will 2024 Mean for NGS and Genomics? : 2024 [cited 05.07.2024]. Available from: <https://www.genengnews.com/topics/omics/what-will-2024-mean-for-ngs-and-genomics/>.
- [26] Atha B. A Review of Current Sequencing Technologies. 2024 [cited 05.07.2024]. Available from: <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/611045-A-Review-of-Current-Sequencing-Technologies/>.
- [27] Drmanac R., Drmanac S., Chui G., Diaz R., Hou A., Jin H., et al. Sequencing by hybridization (SBH): advantages, achievements, and opportunities. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2002;77:75-101. DOI: 10.1007/3-540-45713-5_5.
- [28] Lizardi P. M. Next-generation sequencing-by-hybridization. *Nat Biotechnol*. 2008;26(6):649-650. DOI: 10.1038/nbt0608-649.
- [29] Thermo Fisher. Targeted Sequencing Approaches for NGS. 2024 [cited 08.07.2024]. Available from: <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/next-generation-sequencing-information/ngs-basics/targeted-sequencing-approaches.html>.
- [30] Illumina Inc. What is Target Enrichment? : 2024 [cited 08.07.2024]. Available from: <https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/target-enrichment.html>.
- [31] Satam H., Joshi K., Mangrolia U., Waghoo S., Zaidi G., Rawool S., et al. Correction: Satam et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology* 2023, 12, 997. *Biology (Basel)*. 2024;13(5). Epub 20240424. DOI: 10.3390/biology13050286.
- [32] PacBio. Sequencing 101: SBB sequencing. 2023 [cited 20.6.2024]. Available from: <https://www.pacb.com/blog/sbb-sequencing/>.
- [33] Singular Genomics. Adapters and Indices for the G4 Sequencing Platform. 2022 [cited 09.09.2024]. Available from: <https://singulargenomics.com/wp-content/uploads/2022/10/Adapters-and-Indices-for-G4-600007-087.pdf>.
- [34] Almogly G., Pratt M., Oberstrass F., Lee L., Mazur D., Beckett N., et al. Cost-efficient whole genome-sequencing using novel mostly natural sequencing-by-synthesis chemistry and open fluidics platform. *bioRxiv*. 2022:2022.2005.2029.493900. DOI: 10.1101/2022.05.29.493900.
- [35] Warburton P. E. and Sebra R. P. Long-Read DNA Sequencing: Recent Advances and Remaining Challenges. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2023;24:109-132. Epub 20230419. DOI: 10.1146/annurev-genom-101722-103045.
- [36] PacBio. Sequencing 101: from DNA to discovery — the steps of SMRT sequencing. 2020 [cited 06.06.2024]. Available from: <https://www.pacb.com/blog/steps-of-smrt->

sequencing/#:~:text=At%20the%20heart%20of%20SMRT%20sequencing%20is%20the,and%20nu
cleotide%20incorporation%20is%20measured%20in%20real%20time.

- [37] Hilt E. E. and Ferrieri P. Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. *Genes*. 2022;13(9):1566.
- [38] Qin D. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology and Medicine*. 2019;16(1):4-10. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055.
- [39] Adams David R. and Eng Christine M. Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(14):1353-1362. DOI: 10.1056/NEJMr1711801.
- [40] Universitätsklinikum Dresden. Gesamt-Genom-Sequenzierung (WGS). 2024 [cited 17.07.2024]. Available from: <https://www.uniklinikum-dresden.de/de/das-klinikum/kliniken-polikliniken-institute/kge/forschung/methoden-1/gesamt-genom-sequenzierung-wgs>.
- [41] Universitätsklinikum Dresden. Exom-Sequenzierung (WES). 2024 [cited 17.07.2024]. Available from: <https://www.uniklinikum-dresden.de/de/das-klinikum/kliniken-polikliniken-institute/kge/forschung/methoden-1/exom-sequenzierung-wes>.
- [42] Universitätsspital Zürich. FoundationOne / Molekulares-Tumorprofiling. 2024. Available from: <https://www.usz.ch/fachbereich/pathologie-molekularpathologie/angebot/molekulares-tumorprofiling/>.
- [43] Pratt D., Sahm F. and Aldape K. DNA methylation profiling as a model for discovery and precision diagnostics in neuro-oncology. *Neuro-Oncology*. 2021;23(Supplement_5):S16-S29. DOI: 10.1093/neuonc/noab143.
- [44] Swen J. J., van der Wouden C. H., Manson L. E. N., Abdullah-Koolmees H., Blagec K., Blagus T., et al. A 12-gene pharmacogenetic panel to prevent adverse drug reactions: an open-label, multicentre, controlled, cluster-randomised crossover implementation study. *The Lancet*. 2023;401(10374):347-356. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01841-4.
- [45] Davey J. W. and Blaxter M. L. RADSeq: next-generation population genetics. *Brief Funct Genomics*. 2010;9(5-6):416-423. DOI: 10.1093/bfpg/elq031.
- [46] Andrews K. R., Good J. M., Miller M. R., Luikart G. and Hohenlohe P. A. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*. 2016;17(2):81-92. DOI: 10.1038/nrg.2015.28.
- [47] Papasavva T., van Ijcken W. F. J., Kockx C. E. M., van den Hout M. C. G. N., Kountouris P., Kythreotis L., et al. Next generation sequencing of SNPs for non-invasive prenatal diagnosis: challenges and feasibility as illustrated by an application to β -thalassaemia. *European Journal of Human Genetics*. 2013;21(12):1403-1410. DOI: 10.1038/ejhg.2013.47.
- [48] Xu X.-P., Gan H.-Y., Li F.-X., Tian Q., Zhang J., Liang R.-L., et al. A Method to Quantify Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma Using Next Generation Sequencing: Its Application in Non-Invasive Prenatal Chromosomal Aneuploidy Detection. *PLOS ONE*. 2016;11(1):e0146997. DOI: 10.1371/journal.pone.0146997.
- [49] EUnetHTA. Screening mit nicht-invasiven pränatalen Tests (NIPTs) auf fetale Trisomien T21, 18, 13. EUnetHTA-Bericht. HTA-Projektbericht 103.: 2018 [cited 17.07.2024]. Available from: <https://eprints.hta.lbg.ac.at/1153/>.
- [50] Reinsperger I. Regelung und Finanzierung von pränatalen Screening- und diagnostischen Untersuchungen auf fetale Anomalien in ausgewählten europäischen Ländern. AIHTA Policy Brief 012.: 2022 [cited 17.07.2024]. Available from: <https://eprints.aihta.at/1369/>.
- [51] Wadden J., Newell B. S., Bugbee J., John V., Bruzek A. K., Dickson R. P., et al. Ultra-rapid somatic variant detection via real-time targeted amplicon sequencing. *Communications Biology*. 2022;5(1):708. DOI: 10.1038/s42003-022-03657-6.
- [52] Deutsches Ärzteblatt. Modellvorhaben Genomsequenzierung startet. 2024 [cited 11.07.2024]. Available from: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/152706/Modellvorhaben-Genomsequenzierung-startet?rt=cc353c8fc1baa317caf816e92c564f65>.

- [53] Koordinationsstelle für das Projekt genomDE. Informationen des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) zum Modellvorhaben. 2024 [cited 11.07.2024]. Available from: <https://www.genom.de/de/informationen-des-bundesinstituts-fuer-arzneimittel-und-medizinprodukte-bfarm-zum-modellvorhaben>.
- [54] Haute Autorité de Santé. Détection d'altérations du gène RET par la technique de séquençage nouvelle génération (NGS) : cancer bronchique non à petites cellules et cancer médullaire de la thyroïde. 2022 [cited 04.07.2024]. Available from: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3356304/fr/detection-d-altérations-du-gene-ret-par-la-technique-de-sequençage-nouvelle-generation-ngs-cancer-bronchique-non-a-petites-cellules-et-cancer-medullaire-de-la-thyroïde.
- [55] Haute Autorité de Santé. Programme de travail 2024. 2024 [cited 04.07.2024]. Available from: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2024-01/programme_de_travail_has_2024.pdf.
- [56] U.S. Food and Drug Administration. Considerations for Design, Development, and Analytical Validation of Next Generation Sequencing (NGS) – Based In Vitro Diagnostics (IVDs) Intended to Aid in the Diagnosis of suspected Germline Diseases. 2018 [cited 11.07.2024]. Available from: <https://www.fda.gov/media/99208/download>.
- [57] U.S. Food and Drug Administration. Submitting Next Generation Sequencing Data to the Division of Antiviral Products. 2019 [cited 11.07.2024]. Available from: <https://www.fda.gov/media/129126/download>.
- [58] Luh F, and Yen Y. FDA guidance for next generation sequencing-based testing: balancing regulation and innovation in precision medicine. NPJ Genom Med. 2018;3:28. Epub 20181003. DOI: 10.1038/s41525-018-0067-2.
- [59] Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS). National Coverage Determination (NCD 90.2): Next Generation Sequencing (NGS) for Medicare Beneficiaries with Germline (Inherited) Cancer. CMS Manual System: 2020 [cited 12.07.2024]. Available from: <https://www.cms.gov/files/document/r10346ncd.pdf>.
- [60] MTRC. Permanent reimbursement for next-generation sequencing (NGS) in oncology launched in Belgium. 2024 [cited 17.07.2024]. Available from: <https://mtrconsult.com/news/permanent-reimbursement-next-generation-sequencing-ngs-oncology-launched-belgium>.
- [61] Bundesministerium für Soziales G., Pflege und Konsumentenschutz (BMSGPK),. Leistungskatalog BMSGPK 2023. Journal. 2023. Epub Epub Date. Original Publication.



HTA Austria
Austrian Institute for
Health Technology Assessment
GmbH