

Pathologe 2022 · 43:154–156  
<https://doi.org/10.1007/s00292-021-01003-x>  
Angenommen: 14. September 2021  
Online publiziert: 13. Oktober 2021  
© Springer Medizin Verlag GmbH, ein Teil von  
Springer Nature 2021

**Redaktion**

U. Lehmann, Hannover  
A. Stenzinger, Heidelberg



# Das molekularpathologische Brevier: Allelfrequenzen in der NGS-Analytik

Ulrich Lehmann<sup>1</sup> · Albrecht Stenzinger<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Molekularpathologie, Institut für Pathologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

<sup>2</sup> Molekularpathologisches Zentrum, Pathologisches Institut, Universität Heidelberg, Heidelberg, Deutschland

In der Molekularpathologie bezieht sich „Allelfrequenz“ bei der Auswertung einer Next-Generation-Sequencing(NGS)-Untersuchung auf den Anteil der mutierten Allele angegeben in Prozent. Beispielsweise heißt KRAS p.G12D, 37%: Von allen Sequenzierreads enthalten 37 % die KRAS-p.G12V-codierende DNA-Variante c.35G>T.

Synonyme: „variant allele frequency“ oder „variant allele fraction“ (VAF), „mutant allele frequency“ (MAF).

Allelfrequenzen lassen sich für Punktmutationen auch sehr präzise mit der Pyrosequenzierung bestimmen sowie mit einigen Real-Time-PCR-basierten Nachweismethoden. Werden bei der Real-Time PCR „wildtype blocker“ eingesetzt, erhöht das zwar die Sensitivität, verhindert aber eine Quantifizierung. Eine Sanger-Sequenzierung ermöglicht, wenn überhaupt, nur eine sehr grobe Abschätzung der Allelfrequenz an der mutierten Stelle, da die Signalintensitäten für die einzelnen Basen sehr stark vom Sequenzkontext abhängig sind.

Klar abzugrenzen ist der Begriff der „variant allele frequency“ (VAF) in der Analyse von Tumorgewebe vom Begriff der „Allelfrequenz“ in der Humangenetik (Abb. 1). In der Humangenetik bezieht sich Allelfrequenz auf die Häufigkeit eines Allels (z. B. der Blutgruppe AB0) in einer gegebenen Population (z. B. allen Basken). Liegt die so definierte Allelfrequenz für eine bestimmte Variante über einem bestimmten Schwellenwert (meist 1 %), geht man von einem funktionell bzw. pathognomonisch nicht relevanten Polymorphismus (SNP) aus. Daten zur Häufigkeit einzelner DNA-

Varianten (=Allele) in bestimmten Populationen sind in öffentlich zugänglichen Datenbanken hinterlegt (dbSNP, ExAC, 1000 Genomes u. a.).

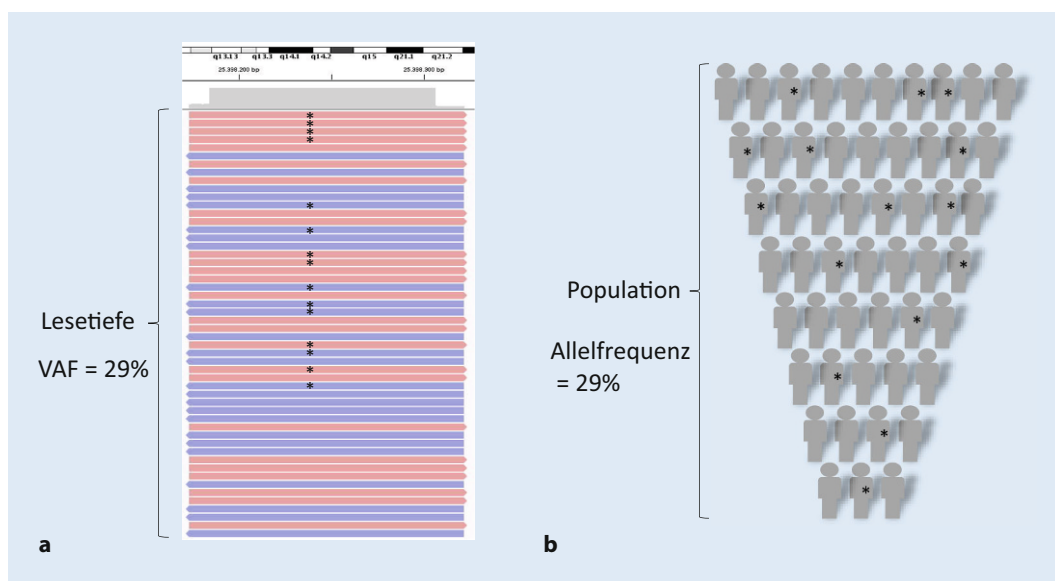
Allelfrequenzen von über 50 %, die in der Nur-Tumor(engl.: „tumor only“)-Sequenzierung detektiert werden, können unter Berücksichtigung der Ploidie auf das Vorliegen einer Keimbahnsequenz hinweisen, sind dafür aber nicht beweisend. In vielen Fällen resultieren nämlich Allelfrequenzen von über 50 % in Tumorgewebe aus dem Verlust des unmutierten zweiten Allels im Sinne eines „loss of heterozygosity“ (LOH) [1].

Beispiel: TP53 p.R248W, 78 %. In den allermeisten Fällen trägt ein Allel diese gut beschriebene Mutation in dem Tumorsuppressorgen TP53 und das zweite Allel ist, bspw. durch einen Teilverlust des Chromosoms, verloren gegangen (LOH). Ein die Mutation funktionell kompensierendes Wildtypallel fehlt somit. Da nicht alle Tumorzellen das zweite Allel verloren haben und auch unmutierte Stromazellen in die Analyse eingehen, beträgt die Allelfrequenz nach Verlust des unmutierten Wildtypallels nicht exakt 100 %, wie man dies theoretisch erwarten würde.

Allelfrequenzen von unter 50 % im Tumorgewebe schließen in den allermeisten Fällen das Vorliegen einer (konstitutionellen) Keimbahnvariante aus. Allerdings kann in seltenen Fällen ein Mosaizismus vorliegen, dem eine Mutation (Variantenbildung) in der Keimbahn-DNA während der Keimzellentwicklung zugrunde liegt [2] und zu Allelfrequenzen von unter 50 % in der Keimbahn führen kann.



QR-Code scannen & Beitrag online lesen



**Abb. 1** ◀ Allelfrequenz in der Molekularpathologie (a Anteil mutierter Sequenzierreads) und der Human-genetik (b Anteil der Individuen einer Population mit einem bestimmten Allel)

Bei der Bewertung von Allelfrequenzen ist immer auch die Probenart zu berücksichtigen. Werte von 0,1–0,5 % sind bei der Analyse frei im Blut zirkulierender Tumor-DNA-Moleküle (ctDNA) hochrelevant, während solche Werte bei der Analyse von FFPE-Gewebebiopsien (FFPE, formalinfixiert und paraffineingebettet) meist Artefakte darstellen, die beispielsweise durch formalininduzierte C>T-Transitionen in der DNA zustande kommen. Diese Deaminierungsartefakte führen zur Detektion von Mutationen (bspw. EGFR, T790M), die biologisch nicht vorhanden sind.

Bei der Analyse freier zirkulierender Tumor-DNA ist die Abgrenzung genuiner, aus dem Tumorgewebe stammender Varianten von Varianten aufgrund einer sog. klonalen Hämatopoese unklaren Potenzials (CHIP) allein aufgrund der Allelfrequenz nicht immer zweifelsfrei möglich. Eine hohe Allelfrequenz (>10 %) schließt eine CHIP-Variante zwar fast sicher aus, aber die VAF einer CHIP-Variante kann über der einer ctDNA-Variante liegen. Das bedarf im Einzelfall der Abklärung durch Sequenzierung von Leukozyten-DNA [3].

#### Korrespondenzadresse

**Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dipl.-Biochem.**

**Ulrich Lehmann**

Molekularpathologie, Institut für Pathologie,  
Medizinische Hochschule Hannover  
Carl-Neuberg-Str. 1, OE 5110, 30625 Hannover,  
Deutschland

Lehmann.Ulrich@MH-Hannover.de

#### Einhaltung ethischer Richtlinien

**Interessenkonflikt.** U. Lehmann und A. Stenzinger geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Für diesen Beitrag wurden von den Autoren keine Studien an Menschen oder Tieren durchgeführt. Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

#### Literatur

1. Ryland GL, Doyle MA, Goode D et al (2015) Loss of heterozygosity: what is it good for? BMC Med Genomics 8:45
2. Thorpe J, Osei-Owusu IA, Erlanger AB et al (2020) Mosaicism in human health and disease. Ann Rev Genet 54:487–510
3. Yaung SJ, Fuhlbrück F, Peterson M et al (2020) Clonal hematopoiesis in late-stage non-small-cell lung cancer and its impact on targeted panel next-generation sequencing. JCO Precis Oncol 4:1271–1279

Hier steht eine Anzeige.

