

Exomdiagnostik in der Neurologie

M. Zech, M. Wagner, B. Schormair K. Oexle, J. Winkelmann

Institut für Neurogenomik, Helmholtz Zentrum München

Institut für Humangenetik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine Studien an Menschen oder Tieren.

Die Aufdeckung krankheitsbestimmender Gendefekte ist eine Voraussetzung für individualisierte Patientenversorgung. Die Entwicklung neuer Hochdurchsatztechniken der DNS-Analyse („Next-Generation Sequencing“, NGS) hat die nosologische Einteilung der neurologischen Krankheiten in vielen Fällen genetisch verfeinert und sogar transformiert [1]. Mit hoher diagnostischer Effizienz bei rapide fallenden Kosten konnte NGS in die klinische Praxis einziehen. Der Untersuchung aller kodierenden DNS-Abschnitte (Exons), der „Whole Exome“-Sequenzierung (WES), kommt derzeit die führende Rolle in der NGS-gestützten Diagnostik zu, da die Exons den Großteil der aktuell beurteilbaren genetischen Varianten beherbergen.

Seit Aufkommen NGS-basierter Mutationsanalyseverfahren vor etwa 10 Jahren wurde eine größere Anzahl neuer pathogener Genveränderungen und genetisch-determinierter Entitäten beschrieben als in der gesamten Medizingeschichte zuvor [2]. Erfreulicherweise sanken in jüngerer Zeit die Kosten für NGS-basierte Tests, sodass eine WES heute weniger als 1,000€ kostet.

„WES ist heute für <1,000€ durchführbar“

Die Methode ist nicht mehr nur in akademischen Forschungsinstitutionen sondern auch in privaten Zentren für Laborationsmedizin verfügbar und bietet eine effiziente Möglichkeit, die Grundlagen hereditärer Krankheiten zu entschlüsseln. Die durch WES

gewonnenen Erkenntnisse tragen den Bestrebungen nach personalisierter Medizin Rechnung und stellen eine wesentliche Verbesserung des neurologischen Krankenmanagements dar [3,4].

Indikationen und Aufklärungsraten

Primärer Anwendungsbereich der WES ist die Mutationssuche bei seltenen Erkrankungen, welche auf Defekte einzelner Gene zurückzuführen sind (d.h., den Mendelschen Regeln folgend dominant oder rezessiv vererbt werden) [5]. Seltene Erkrankungen treten mit einer Prävalenz von unter 5/10,000 auf und beruhen in ~80% der Fälle auf genetischen Ursachen. Obwohl für sich genommen jeweils rar, betreffen die vielen verschiedenen seltenen Erkrankungen zusammen ein beträchtliches Patientenkollektiv. Allein in Deutschland wird die Zahl von Individuen mit seltenen neurologischen Erkrankungen mit 150,000 beziffert (bei jährlich ~8,000 Neuerkrankungen) (<http://www.dasne.de/>). Die Mehrzahl seltener neurologischer Erkrankungen manifestiert sich mit uncharakteristischen Symptomen, sodass selbst Spezialisten der Rückschluss auf spezifische genetische Ursachen nur selten gelingt. In der Tat können gängigen Erscheinungsbildern in der Neurologie seltene genetische Erkrankungen zugrunde liegen. Aktuelle Veröffentlichungen legen dar, dass bei einem relevanten Anteil von Patienten mit allgemeinen Leitsymptomen wie Epilepsie, Bewegungsstörung oder Ataxie ursächliche Mutationen in den unterschiedlichsten Genen zu finden sind [6-8]. Prominente neurologische Krankheitsentitäten können offenbar ein Konglomerat seltener genetischer Erkrankungen darstellen, welche mit identischem Erscheinungsbild auftreten.

„Gängigen neurologischen Erscheinungsbildern können seltene genetische Erkrankungen zugrunde liegen“

Angesichts dieses Phänomens, in der Humangenetik als Heterogenie oder Lokusheterogenität bezeichnet, etabliert sich die WES-Diagnostik in der Neurologie als ein hypothesenfreies Verfahren zur Erkennung vieler bzw. potentiell aller bekannter molekularer Ursachen eines jeweiligen Krankheitsbildes.

Zu den sinnvollen Indikationen für WES in der Neurologie können gerechnet werden:

- Entwicklungsstörungen, Mikrozephalien, geistige Behinderungen

- unklare Leukenzephalopathien
- zerebrale Malformationen
- ungeklärte Epilepsien
- Bewegungsstörungen (Dystonien, Parkinson-Syndrome)
- Ataxien
- Spastische Paraparesen
- Mitochondriopathien und andere metabolische Störungen
- neuromuskuläre Erkrankungen
- präsenile Demenzen

Die Sinnhaftigkeit einer WES-Diagnostik muss allerdings im Einzelfall geprüft werden. Generell lassen folgende Faktoren an eine erbliche Form der aufgelisteten Krankheitsgruppen denken:

- Blutsverwandtschaft der Eltern: Risikofaktor für rezessive Erkrankungen
- positive Familienanamnese: dominante, rezessive, X-chromosomale Transmission
- früher Erkrankungsbeginn: Kindheit, Jugendzeit, junges Erwachsenenalter
- schwere bzw. komplexe Manifestation: Zusammentreffen mit anderen neurologischen oder systemischen Auffälligkeiten

Eine Kombination der genannten Faktoren erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine genetische Erkrankung (mit nachweisbarer Mutation). So erbringt die WES z.B. in der Gruppe der Dystonien am häufigsten bei Kindern mit generalisierter Dystonie und multisystemischen Komplikationen einen Mutationsnachweis [9] und am seltensten bei Erwachsenen mit spät-einsetzender fokaler Dystonie und isoliertem Befall. Dennoch schließt das sporadische, also nicht-familiäre Auftreten einer neurologischen Krankheit bei einem Erwachsenen eine genetische Ursache bedingt durch z.B. eine Neumutation nicht aus.

Erste Studien zur klinischen Anwendung der WES erlauben eine vorläufige Abschätzung der Diagnoseraten in unterschiedlichen Patientenkohorten [6-13]. Über diverse neurologische Indikationen hinweg beträgt diese etwa 30% [14] (**Tabelle 1**), wobei das Design der zugrundeliegenden Untersuchungen sowie Ausnahmen zu berücksichtigen sind. In vielen Studienkohorten erfolgte eine Anreicherung genetisch-

vermittelter Patienten (z.B. besonders früh oder familiär vorbelastete Fälle), sodass die tatsächlichen Aufklärungsraten niedriger sein werden. Des Weiteren fällt der Prozentsatz gelöster Fälle bei gewissen Indikationen derzeit noch gering aus (z.B. beim früh beginnenden Parkinson-Syndrom) [11]. Die der Originalliteratur entnommenen Aufklärungsquoten in **Tabelle 1** spiegeln die Erfahrungen der spezialisierten Zentren aus jüngerer Zeit wieder. Mit der Ausweitung der WES-Indikation und der weiterhin wachsenden Zahl der potentiell ursächlichen Gene kann diese Quote in zukünftigen Studien niedriger oder höher liegen.

Methodik und Limitationen

Durch WES lässt sich nahezu die gesamte für Proteine kodierende Nukleotidsequenz (1-2% des Genoms, verteilt über >20,000 Gene bzw. >200,000 Exons) in nur einem Untersuchungsgang ermitteln [15,16]. Die Analysezeit kann weniger als eine Woche betragen. Aus typischerweise einer EDTA-Blutprobe wird dafür genomische DNS extrahiert. Der stufenweise Ablauf einer WES ist in **Abbildung 1** illustriert. Für WES stehen kommerziell vertriebene Reagenzien und Geräte mit z.T. differierender Wirkweise zur Verfügung. Im Folgenden sollen die gebräuchlichste Vorgehensweise erläutert werden.

Im ersten Schritt werden die exomischen DNS-Regionen angereichert („Enrichment“) [17]. Dies geschieht mittels sequenzspezifischer Hybridisierung, bei der sich die Doppelhelices der fragmentierten DNS in Einzelstränge auftrennt („Dehybridisierung“) und dann die exomischen Zielsequenzen („Targets“) durch „Rehybridisierung“ mit komplementären Köder-Sequenzen, die auf einem Enrichmentsubstrat fixiert sind, aus der übrigen DNS herausgefischt werden („Capturing“). Im zweiten Schritt erfolgt die Hochdurchsatz-Sequenzierung des angereicherten Exoms mittels NGS-typischer „massiver paralleler Sequenzierung“ [18], und zwar indem die verschiedenen DNS-Fragmente zufällig („Random Sequencing“), aber im mikroskopischen Maßstab räumlich streng getrennt sequenziert und somit spezifisch „gelesen“ werden. Die Zuordnung der zufälligen „Reads“ erfolgt danach im Computer durch Vergleich mit der Referenz-Sequenz des Humangenoms („Read Mapping“). Dabei werden eventuelle Abweichungen von der Referenz erkannt („Variant Calling“). Derzeit erfolgt die Fragment-Sequenzierung noch als mikroskopische Analogie zum herkömmlichen „Sequencing-By-Synthesis“, alternative Verfahren wie die Sequenzerkennung während der Wanderung von DNS-Einzelsträngen durch individuell erfasste Nano-

Poren drängen allerdings auf den Markt. Während die beiden vorgestellten Schritte standardisierten Protokollen folgen, verlangt die Prozessierung der anfallenden Rohdatenflut (~8-20Gb) ein hohes Maß an spezifischer bioinformatischer Expertise. In den Bereich der Bioinformatik fallen dabei neben dem „Read Mapping“ und dem „Variant Calling“ die Bestimmung des zu erwartenden Varianteneffekts auf Proteinebene („Variant Annotation“) und, soweit automatisierbar, die Bestimmung der Wahrscheinlichkeit, mit welcher die aufgefundenen Varianten pathogen sind [15,16]. Die Implementierung der WES in der klinischen Diagnostik verlangt, deren Sensitivität und Spezifität zu maximieren. Beide hängen entscheidend davon ab, dass die Sequenziertiefe (Abdeckung, „Coverage“) genügend ist, also alle Zielregionen ausreichend oft gelesen und dabei mit Reads „abgedeckt“ werden [19]. Für diagnostische Zwecke sollten mehr als 98% des Exoms eine mehr als 20-fache Abdeckung aufweisen. Da die Varianz der Abdeckung durch die zufällig erzeugten Reads mindestens die eines Poisson-Prozesses ist bzw. deutlich übertrifft, ist die erforderliche Sequenziertiefe im Mittel über das gesamte Exom bei hochqualitativer WES mindestens 100fach (**Abbildung 2**).

„Ein zentraler Qualitätsparameter ist die Sequenziertiefe“

Es ist wichtig zu wissen, dass durch die derzeit eingesetzte WES-Methodik meist nur Varianten einzelner DNS-Buchstaben („Single Nucleotide Variants“) sowie kleine Insertionen oder Deletionen („Indels“ bis ~50 Nukleotide) der proteinkodierenden DNS nachgewiesen werden können [15,16]. Andere, potentiell krankheitsverursachende Variationen entziehen sich meist der WES-basierten Exploration, was mit weiteren nachfolgend aufgeführten Aspekten zu den Limitationen der Methode zählt:

- WES ist keine Methode zur zuverlässigen Diagnose von größeren Insertionen oder Deletionen, Repeat-Expansionen, chromosomalen Rearrangements oder intronischen Veränderungen, sodass entsprechende Erkrankungen wie z.B. der M. Huntington nicht durch WES diagnostiziert werden können.
- WES beinhaltet üblicherweise das „Capturing“ etablierter proteinkodierender Bereiche, sodass Varianten in funktionell unzureichend charakterisierter DNS (z.B. Mikro-RNS-kodierende Sequenzen) keine Beachtung finden.
- WES erfasst nicht alle Exone gleichermaßen (uneinheitliche Sequenziertiefen), sodass Mutationen in kodierender Sequenz übersehen werden können.

Sequenzauswertung – Identifizierung ursächlicher Mutationen

In den kodierenden DNS-Bereichen ist pro Individuum mit ~25,000 Varianten, d.h. Abweichungen von der Referenz-Sequenz zu rechnen, welche durch WES registriert werden können. Die Herausforderung einer WES-Analyse besteht in der Filtration und Bewertung dieser Varianten mit dem Ziel, eine krankheitsrelevante Mutation aufzufinden [5,20] (**Abbildung 2**). Hierzu bedarf es neben Wissen über klinische Details einer ausgereiften Auswertepipeline. Entsprechende Pipelines sind häufig Eigenentwicklungen der WES-Laboratorien und integrieren eine Vielzahl von Datenbanken und Algorithmen (**Tabelle 2**). Folgende Auswerteprinzipien können herausgestellt werden [18,21].

„Bei WES ist pro Individuum mit ~25,000 Varianten zu rechnen, unter denen die krankheitsverursachende Mutation zu suchen ist“

Der erste übergeordnete Schritt beinhaltet die Varianten-Priorisierung. Hierbei werden zunächst stufenweise Varianten ausgeschlossen, die (1) eine geringe Sequenzier-Qualität erkennen lassen, (2) in der Population zu häufig sind, also eine zu hohe Allelfrequenz haben, um als Ursache einer monogenen seltenen Krankheit in Frage zu kommen, und (3) keine Auswirkung auf die Menge oder die Struktur des Proteins haben, welches von der Variante in seinem Gen betroffen ist. Allelfrequenzen können öffentlichen Referenzdatensätzen internationaler Konsortien (z.B. *Exome Aggregation Consortium*, ExAC) [22] oder laboreigenen Datensammlungen entnommen werden. Der Ausschlussprozess (1)-(3) reduziert die Zahl zu beachtender Varianten pro Exom auf ~100-500. Diese können im Weiteren durch webbasierte Plattformen hinsichtlich potentiell schädigender Wirkung evaluiert werden. Für „Missense“-Varianten (Varianten, die zum Austausch einzelner Aminosäuren einer Proteinsequenz führen) stehen Prädiktoralgorithmen zur Verfügung, die anhand von Kriterien wie der evolutionären Konservierung der substituierten Aminosäure Voraussagen zur Variantenpathogenität treffen. Für „Loss-of-Function“ („LoF“)-Varianten, d.h. „Nonsense“- , „Frameshift“- und „Splicing“-Varianten, die durch Erzeugung eines Stoppkodons einen Proteinkettenabbruch oder einen „Nonsense-mediated RNA decay“ bedingen, kann geprüft werden, ob diese in Gene fallen, welche in den oben erwähnten Referenzdatensätzen deutlich seltener als erwartet solche LoF-Varianten

aufweisen und daher als evolutionär intolerant gegenüber dieser Variantenklasse einzustufen sind. Ist das Maß der LoF-Intoleranz hoch, kann es sein, dass schon heterozygote, also nur ein Allel betreffende LoF-Varianten krank machen und damit einen dominanten Erbgang erklären [22]. Die Varianten-Priorisierung berücksichtigt schließlich die Stammbaumstruktur (Suche nach monoallelischer Variante bei dominanter Vererbung, Suche nach biallelischen Varianten bei rezessiver Vererbung) sowie Kandidatengenlisten (hohe Priorität für Varianten in diesen Genen). Letztere werden in einem interdisziplinären Ansatz erstellt und enthalten nach Möglichkeit alle bekannten, mit den Krankheitszeichen des Patienten assoziierten Gene [6,9]. Die Auswahl der Kandidatengene (je nach Phänotyp wenige Dutzend bis einige Hundert) erfolgt auf Basis der Originalliteratur und Genotyp-Phänotyp-korrelierender Datenbanken (z.B. *Online Mendelian Inheritance In Man* [OMIM]).

Der zweite übergeordnete Schritt in der Auswertung umschließt die klinische Varianten-Interpretation. Ist eine seltene, bioinformatisch als schädigend eingestufte Variante identifiziert, die ein Phänotyp-relevantes Gen betrifft, ist deren medizinische Signifikanz zu klassifizieren. Weithin akzeptiert ist der Vorschlag des *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) gemäß „pathogen“, „wahrscheinlich pathogen“, „Variante unklarer Signifikanz“ (VUS), „wahrscheinlich benigne“ und „benigne“ zu unterscheiden [23].

„Es werden fünf interpretative Variantenkategorien unterschieden: pathogen – wahrscheinlich pathogen – Variante unklarer Signifikanz (VUS) – wahrscheinlich benigne – benigne“

Als „pathogen“ ist z.B. eine Variante zu bezeichnen, die bereits zuvor eindeutig als Krankheitsursache beschrieben wurde. Eine Dokumentation bekannter Krankheitsmutationen ist globalen Datensätzen (z.B. *HGMD* oder *ClinVar*) zu entnehmen. Ein häufiges Szenario ist die Detektion von Veränderungen der VUS-Kategorie (insbesondere „Missense“-Varianten, deren funktioneller Effekt nur durch aufwendige Experimente zu validieren wäre). Leider kompliziert die hohe Zahl auffindbarer VUS die Routineanwendung von WES, da die Zusammenhänge dieser Varianten mit den untersuchten Krankheitsfällen ungewiss bleiben. Es empfiehlt sich eine periodische Re-Analyse entsprechender WES-Daten, da durch aufkommende

Erkenntnisse Varianten eventuell von „VUS“ zu „pathogen“ bzw. zu „benigne“ umklassifiziert werden können [24].

Das Auffinden ursächlicher Mutationen wird durch WES mehrerer Mitglieder eines untersuchten Stammbaums erleichtert [21]. Bei dominant vererbter Erkrankung bietet es sich an, Exome möglichst entfernt verwandter Betroffener zu sequenzieren, da hierdurch die Menge gemeinsamer monoallelischer Varianten minimiert und die ursächliche Mutation nur unter den verbleibenden überlappenden Varianten zu suchen ist. Eine erfolgreiche Strategie für rezessive Erkrankungen besteht in der Sequenzierung betroffener Geschwister, bei denen die Suche nach ursächlicher Mutation auf gemeinsame biallelische Varianten fokussiert werden kann. Ein besonderes Design bei negativer Familienanamnese, also „sporadisch“ auftretenden Krankheitsfällen stellt die Trio-WES dar, die neben dem Patienten beide gesunde Eltern einbezieht, da hier die Wahrscheinlichkeit einer ursächlichen Mutation unter den wenigen Neumutationen des Betroffenen hoch ist [25]. Der Trio-Ansatz erlaubt die Ermittlung dieser „de novo“-Mutationen. Literaturdaten zeigen, dass „de novo“-Mutationen einen großen Anteil der sporadisch auftretenden neurologischen Erkrankungsfälle erklärt.

„De novo-Mutationen erklären eine große Anzahl sporadischer Erkrankungsfälle“

Pro Trio-WES ist im Schnitt mit lediglich 0-3 „de novo“-Veränderungen zu rechnen [25], sodass Teile der aufwändigen Varianten-Priorisierung/-Interpretation entfallen. Da durch Erhalt exomweiter Segregationsinformationen zudem die Auswertung bei rezessivem Vererbungsmodell verbessert wird, entwickelt sich die Trio-Strategie zunehmend zum Goldstandard bei WES.

Anforderungen an die Praxis

Bei der Durchführung einer WES sind das Gendiagnostik-Gesetz (GenDG) und die Datenschutzgrundverordnung (EU-DSGVO) zu beachten. Vor der Untersuchung muss der Patient über deren Wesen, Bedeutung und Tragweite in einem ärztlichen Aufklärungsgespräch informiert werden. Das schließt die Grundlagen der Methodik und den zu erwartenden Wissensgewinn ein. Eine Beratung durch einen mit dem Verfahren vertrauten Arzt ist also notwendig. Außerdem ist festzulegen, wie mit

Zusatzbefunden zu verfahren ist, d.h. inwieweit klinisch relevante Varianten, die nicht in Bezug zur Indikation stehen (z.B. unerwartete Mutationen in Krebsprädispositionsgenen), kommuniziert werden sollen [26,27]. Die Erfassung unerwarteter Befunde führte unter Kritikern zu Vorbehalten gegenüber WES [26]. Dem ist zu entgegnen, dass klinisch-relevante Überschussinformationen bisweilen auch bei anderen Tests (z.B. Bildgebung) erhalten werden und dass möglicher praktischer Nutzen (z.B. spezifische Vorbeugemaßnahmen) die Befundung und Mitteilung derartiger Informationen rechtfertigt. Ein Katalog von 50-100 Zusatzbefund-relevanten Genen wird durch das ACMG angeboten [23]. Das GenDG legt fest, wie die Befundmitteilung aus dem Labor über den verantwortlichen Arzt an den Patienten zu erfolgen hat und wie bzw. durch wen letzterer zu beraten ist. Die kürzlich erlassene EU-DSGVO hat außerdem den einzuhaltenden Standard im Umgang mit Bioproben und Patientendaten vorgegeben. Offensichtlich rücken bei medizinischen „big data“-Methoden wie der WES Klinik und Forschung zusammen. Die Arbeitsgruppe „Consent“ der Medizininformatik-Initiative des BMBF ist beauftragt, eine entsprechende Patienteninformation und Einwilligungserklärung zu erarbeiten. Im Fluss befindet sich außerdem die Klärung der Kostenübernahme für WES. Während viele private Versicherungen die Kosten regelhaft erstatten, ist WES bisher keine Standardleistung der gesetzlichen Kassen (Antrag auf Kostenerstattung vorab erforderlich).

„WES ist bisher keine Standardleistung der gesetzlichen Kassen“

In Anbetracht der unübertroffenen Kombination von Aussagekraft und Zeit- und Kosteneffizienz ist der Einzug der NGS-Methoden in die klinische Routine [28] und daher die Kostenerstattung durch alle Kassen allerdings absehbar.

Klinische Konsequenzen und Ausblick

Studienresultate lehren den hohen Stellenwert der Identifizierung krankheitsauslösender Mutationen mittels WES für Patient und Familie [29]. Eine akkurate Diagnosestellung schafft durch Vermeidung invasiver Untersuchungen und diagnostischer Irrfahrten Entlastung, ermöglicht den Austausch mit anderen Betroffenen und eröffnet Informationen zu Krankheitsverlauf und Prognose. Schließlich verweisen schon heute einige molekulare Läsionen auf zielgerichtete

Vorsorgeuntersuchungen und Therapien [10]. Es ist zu erwarten, dass WES das Wissen über die Pathophysiologie neurologischer Erkrankungen konsequent bereichern wird und somit mutationsspezifische Behandlungsstrategien Realität werden können. Die Rolle des Neurologen wird in dieser Ära der Präzisionsmedizin bedeutend sein [14]: wichtiger denn je werden die Charakterisierung des klinischen Erscheinungsbildes, die Beschreibung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen, der vertrauensvolle Umgang mit dem Patienten im Rahmen der Indikationsstellung und der Weiterbetreuung nach genetischer Diagnosefindung, sowie die Erstellung von personalisierten Behandlungsprotokollen.

Fazit für die Praxis

- **Indikationen für WES sind seltene Erkrankungen bzw. gängige klinische Erscheinungsbilder, die häufig Ausdruck seltener Erkrankungen sind (z.B. Dystonien). Die mittlere Aufklärungsrate beträgt ~30%.**
- **Methodisch gliedert sich WES in (1) Anreicherung des Exoms, (2) Sequenzierung des Exoms und (3) Datenanalyse. WES weist Punktmutationen und kleine Insertionen/Deletionen in kodierender DNS nach.**
- **Die WES-Datenanalyse stellt Ansprüche an klinische, genetische und bioinformatische Kompetenz. „Variants of Unknown Significance“ (VUS) stellen eine besondere Herausforderung für Befundung dar. Familienbasierte WES (z.B. Trio-Design) erleichtert die Identifikation ursächlicher Varianten.**
- **Vor WES ist der Umgang mit Nebenbefunden zu klären. WES-Resultate sollten im Rahmen einer humangenetischen Beratung übermittelt werden (GenDG).**
- **Eine erfolgreiche WES-Diagnostik wird von Patienten und Familie als entlastend empfunden und kann unmittelbare klinische Konsequenzen haben. WES liefert einen wichtigen Beitrag zur Präzisionsmedizin.**

Zusammenfassung – Abstract

„Exomdiagnostik in der Neurologie“

Nach beträchtlichen Erfolgen als Forschungsinstrument findet die „Whole-Exome“-Sequenzierung (WES) wegen hoher diagnostischer, zeitlicher und wirtschaftlicher Effizienz zunehmend klinische Anwendung. WES ist diagnostisches Mittel der Wahl bei Krankheitsbildern, die durch viele verschiedene monogene Ursachen bedingt sein können. Neurologische Indikationen sind z.B. Bewegungsstörungen, insbesondere bei frühem Symptombeginn, familiärer Häufung und komplexer Manifestation. Ausgehend von einer Blutprobe werden mittels Anreicherung und Sequenzierung des Exoms alle kodierenden DNS-Bereiche auf Punktmutationen und kleine Insertionen/Deletionen hin analysiert. Die Identifikation einer krankheitsverursachenden Variante erfordert eine professionelle Auswertepipeline, Varianten-Priorisierungsschemata sowie Varianten-Klassifikationsdatenbanken. Während bereits viele Varianten zuverlässig als „pathogen“ oder „benigne“ eingestuft werden können, können „Varianten unklarer Signifikanz“ (VUS) den Kliniker vor Herausforderungen stellen und erfordern eine periodische Re-Analyse von WES-Daten. Als genetische Untersuchung verlangt die WES adäquate Patientenaufklärung, die speziell auch mögliche Nebenbefunde und Datensicherheit thematisieren sollte. Ein positiver molekularer Befund beendet diagnostische Irrfahrten, ermöglicht präzise genetische Beratung und kann auf gezielte Vorsorgemaßnahmen und Therapien hinweisen. WES trägt erheblich zum Verständnis der genetischen Architektur und Pathophysiologie neurologischer Erkrankungen bereichern und ermöglicht Präzisionsmedizin.

Schlüsselwörter: Exomsequenzierung; genetische Heterogenität; Variantenidentifikation; Variantenklassifikation; Präzisionsmedizin

“Exome diagnostics in neurology practice”

After most successful application in research, whole-exome sequencing (WES) now enters the clinics due to its high diagnostic, time, and economic efficiency. WES is most appropriate in conditions that may be due to many different monogenic causes. Neurological indications include movement disorders, especially in case of early symptom onset, familial clustering, and complex manifestation. Starting from a blood sample, enrichment and sequencing of the exome allow for the examination of all coding DNA regions for point mutations and small insertions/deletions. The identification of a disease-causing variant requires a professional evaluation pipeline, variant prioritization schemes and variant classification databases. Many variants can

be classified reliably as "pathogenic" or "benign". "Variants of unclear significance" (VUS) remain a challenge for the clinical evaluation and necessitate a periodic re-analysis of WES data. As a genetic examination, WES requires adequate patient information which in particular should address possible secondary findings as well as data security. A positive molecular finding ends diagnostic odyssey, allows for accurate genetic counseling, and can point to targeted preventive measures and therapies. WES contributes significantly to the understanding of the genetic architecture and pathophysiology of neurological diseases, enriching and enabling precision medicine.

Keywords: exome sequencing; genetic heterogeneity; variant identification; variant classification; precision medicine

Literatur

1. Singleton AB: Exome sequencing: a transformative technology. *Lancet Neurol* 2011;10:942-946.
2. Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, et al.: The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am J Hum Genet* 2015;97:199-215.
3. Majewski J, Schwartzenuber J, Lalonde E, et al.: What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 2011;48:580-589.
4. Lazaridis KN, McAllister TM, Babovic-Vuksanovic D, et al.: Implementing individualized medicine into the medical practice. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2014;166C:15-23.
5. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, et al.: Unlocking Mendelian disease using exome sequencing. *Genome Biol* 2011;12:228.
6. Helbig KL, Farwell Hagman KD, Shinde DN, et al.: Diagnostic exome sequencing provides a molecular diagnosis for a significant proportion of patients with epilepsy. *Genet Med* 2016;18:898-905.

7. Neveling K, Feenstra I, Gilissen C, et al.: A post-hoc comparison of the utility of sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. *Hum Mutat* 2013;34:1721-1726.
8. Sawyer SL, Schwartzenuber J, Beaulieu CL, et al.: Exome sequencing as a diagnostic tool for pediatric-onset ataxia. *Hum Mutat* 2014;35:45-49.
9. Zech M, Boesch S, Jochim A, et al.: Clinical exome sequencing in early-onset generalized dystonia and large-scale resequencing follow-up. *Mov Disord* 2017;32:549-559.
10. Retterer K, Juusola J, Cho MT, et al.: Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med* 2016;18:696-704.
11. Schormair B, Kemlink D, Mollenhauer B, et al.: Diagnostic exome sequencing in early-onset Parkinson's disease confirms VPS13C as a rare cause of autosomal-recessive Parkinson's disease. *Clin Genet* 2018;93:603-612.
12. Wortmann SB, Koolen DA, Smeitink JA, et al.: Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *J Inherit Metab Dis* 2015;38:437-443.
13. Klein CJ, Middha S, Duan X, et al.: Application of whole exome sequencing in undiagnosed inherited polyneuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85:1265-1272.
14. Need AC, Goldstein DB: Neuropsychiatric genomics in precision medicine: diagnostics, gene discovery, and translation. *Dialogues Clin Neurosci* 2016;18:237-252.
15. Mardis ER: A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 2011;470:198-203.
16. Metzker ML: Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010;11:31-46.
17. Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, et al.: Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods* 2010;7:111-118.
18. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, et al.: Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009;461:272-276.
19. Sims D, Sudbery I, Illott NE, et al.: Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet* 2014;15:121-132.
20. Choi M, Scholl UI, Ji W, et al.: Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:19096-19101.

21. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, et al.: Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 2012;20:490-497.
22. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al.: Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016;536:285-291.
23. Richards S, Aziz N, Bale S, et al.: Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-424.
24. Need AC, Shashi V, Schoch K, et al.: The importance of dynamic re-analysis in diagnostic whole exome sequencing. *J Med Genet* 2017;54:155-156.
25. Epi KC, Epilepsy Phenome/Genome P, Allen AS, et al.: De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature* 2013;501:217-221.
26. Directors ABo: Points to consider in the clinical application of genomic sequencing. *Genet Med* 2012;14:759-761.
27. Jamal SM, Yu JH, Chong JX, et al.: Practices and policies of clinical exome sequencing providers: analysis and implications. *Am J Med Genet A* 2013;161A:935-950.
28. Kingsmore SF, Saunders CJ: Deep sequencing of patient genomes for disease diagnosis: when will it become routine? *Sci Transl Med* 2011;3:87ps23.
29. Amendola LM, Lautenbach D, Scollon S, et al.: Illustrative case studies in the return of exome and genome sequencing results. *Per Med* 2015;12:283-295.

Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1 WES-gestützte Aufklärungsraten in unterschiedlichen neurologischen Indikationen (Auswahl)

| Indikation | Originalstudie | Aufklärungsrate |
|------------------------------------|----------------|-----------------|
| Neurologisches Entwicklungsdefizit | [10] | 31% |
| Kindliche Epilepsie | [6] | 33% |
| Bewegungsstörung (allgemein) | [7] | 20% |
| Generalisierte Dystonie | [9] | 38% |
| Früh-beginnendes Parkinson-Syndrom | [11] | 11% |
| Früh-beginnende Ataxie | [8] | 46% |
| Mitochondriopathie | [12] | 39% |
| Familiäre Polyneuropathie | [13] | 33% |

Tabelle 2 Zur Sequenzauswertung herangezogene Datenbanken und Algorithmen

| | Bezeichnung | Online-Verfügbarkeit | Bedeutung für die Auswertung |
|------------------------------|---|---|---|
| Varianten- Priorisierung | Exome Aggregation Consortium (ExAC) Browser | http://exac.broadinstitute.org/ | Referenzdatensatz zur Ermittlung von Allelfrequenzen |
| | PolyPhen2 | http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/ | Plattform zur Prädiktion von Variantenpathogenität |
| | Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) | https://omim.org/ | Datenbank für genetische Erkrankungen, Erstellung von Kandidatengenlisten |
| Varianten- Interpretation | ClinVar | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/ | Datenbank zur Ermittlung bereits bekannter Mutationen |
| | The Human Gene Mutation Database (HGMD) | http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php | Datenbank zur Ermittlung bereits bekannter Mutationen |
| | American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Standards and Guidelines | https://www.acmg.net/docs/Standards_Guidelines_for_the_Interpretation_of_Sequence_Variants.pdf | Schema zur standardisierten Variantenklassifikation (pathogen – wahrscheinlich pathogen – VUS – wahrscheinlich benigne – benigne) |

Abbildung 1 WES-Flussdiagramm

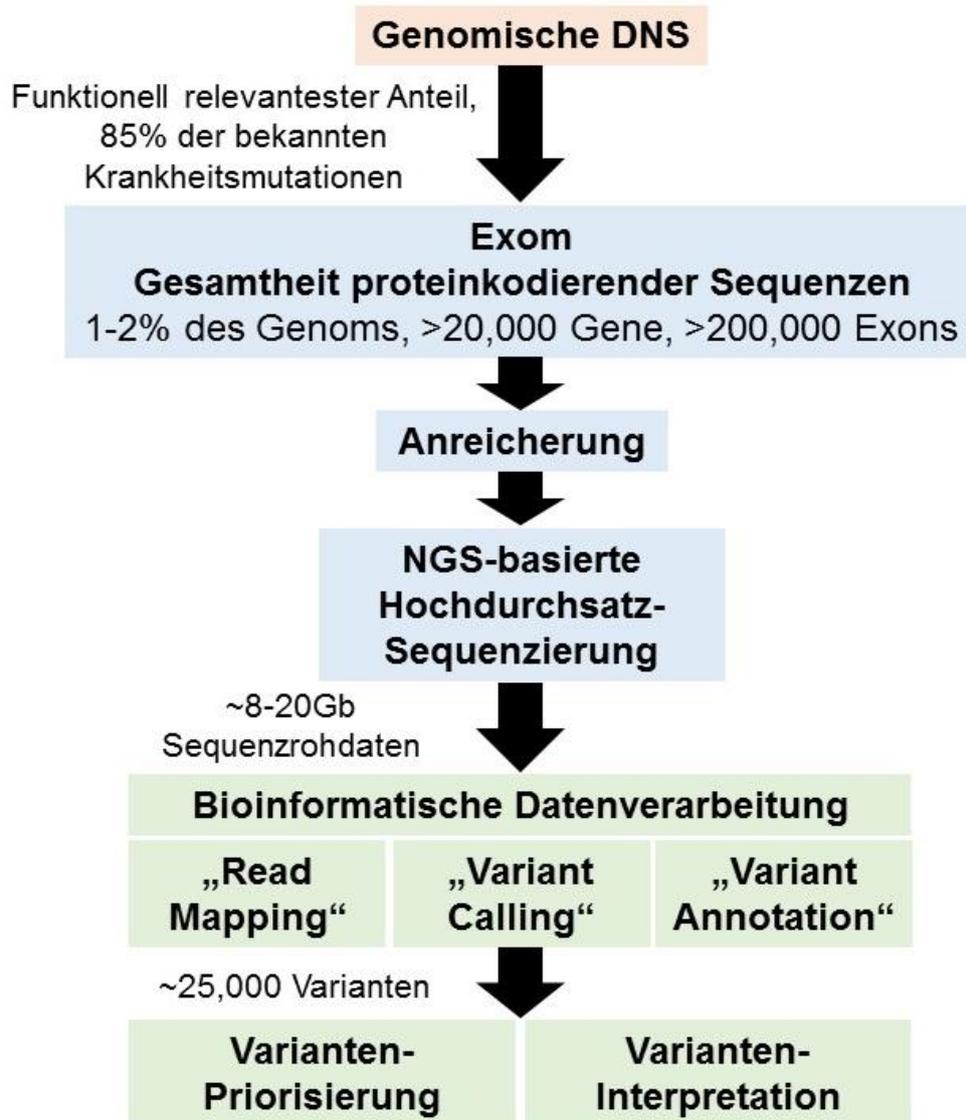
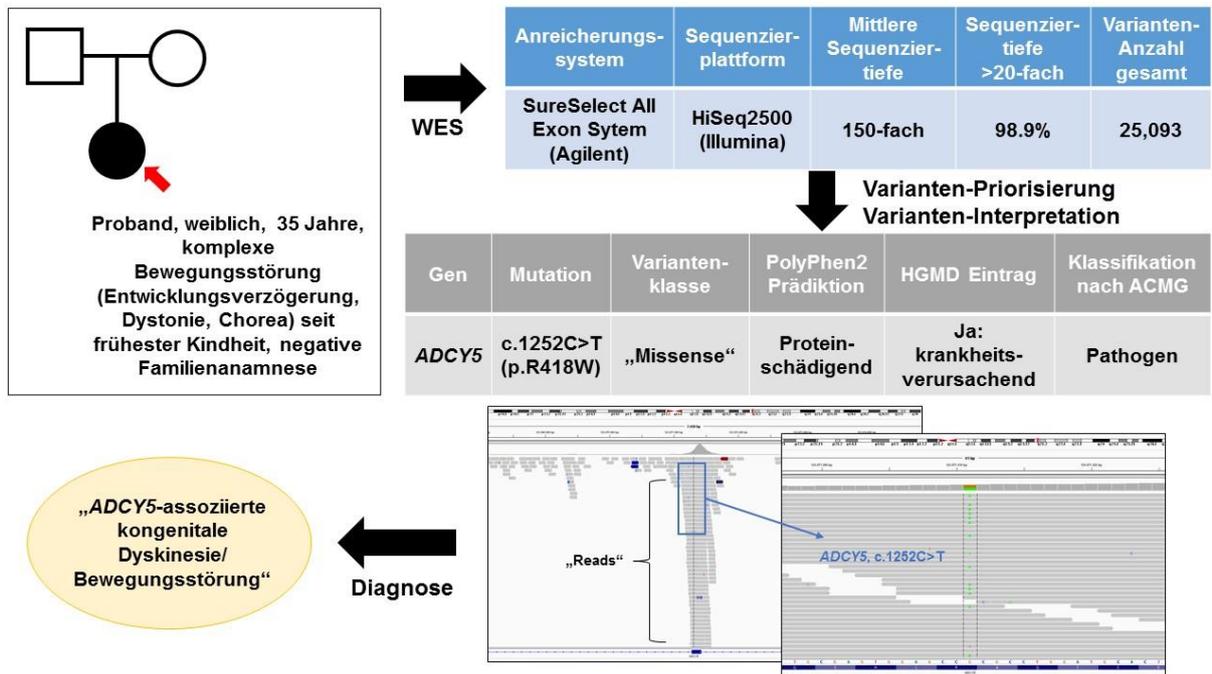


Abbildung 2 Molekulare Diagnosestellung durch WES (Institut für Neurogenomik, Helmholtz Zentrum München)



Als Anwendungsbeispiel ist die Identifikation einer pathogenen Mutation im Krankheitsgen *ADCY5* bei einer Patientin mit komplexer Bewegungsstörung gezeigt.