

Exomsequenzierung in der Pädiatrie

Alessandra Strom, Andrea Superti-Furga, Lausanne

Übersetzung: Rudolf Schlaepfer, La Chaux-de-Fonds

Die seit 2007 entwickelten «Hochdurchsatz»-Sequenzierungstechniken (unter verschiedenen Bezeichnungen bekannt: *NGS*, *next generation sequencing*; *deep sequencing*; *massive parallel sequencing*) haben die Forschung in medizinischer Genetik und unser diagnostisches Vorgehen bei «seltenen» und weniger seltenen Krankheiten revolutioniert. Die Forschungsergebnisse sind verblüffend – im Verlaufe der letzten fünf Jahre wurden ebenso viele pathogene Gene entdeckt wie in der ganzen Medizingeschichte zuvor und man kann voraussagen, dass bis 2020 alle pathogenen Gene bekannt sein werden. In der Pädiatrie sind die wesentlichsten Resultate wahrscheinlich im Bereiche der Entwicklungs- und autistischen Störungen (siehe unten) zu verzeichnen, doch ziehen alle Bereiche – neurologische, metabolische, Nieren-, Lungen-, Herzimmunologische Krankheiten usw. – Nutzen daraus. Ebenso stützt sich die Diagnostik von Infektionskrankheiten mehr und mehr auf die Sequenzierungstechnik der Virus- und Bakterien-DNA. Am weitesten fortgeschritten ist die Genomtechnik jedoch in der Onkologie: Tumore weisen komplexe genetische Abweichungen auf, und das bessere Verständnis dieser Anomalien ermöglicht eine genauere Kenntnis und Diagnostik dieser Krankheiten, und nicht zuletzt auch neue therapeutische Ansätze.

Exomsequenzierung in der Pädiatrie

Die Exomsequenzierung (*exome sequencing*) als diagnostisches Mittel bei Kindern mit einer angeborenen Störung oder Erwachsenen mit einer nicht diagnostizierten Krankheit ist in vielen Ländern, insbesondere in Kanada und den USA, ein «routinemässiges» Vorgehen geworden, und beginnt sich auch in Europa durchzusetzen. So erhält man immer häufiger, gleichzeitig mit klinischer Beschreibung, Blutbild und biochemischen Befunden eines Patienten, die Liste der in seinem Exom identifizierten genetischen Varianten. Wenn auch diese Resultate oft schwer zu interpretieren sind, ist die Anzahl auf diese Weise endgültig diagnostizierter Fälle eindrucklich. Dieses Mittel der molekularen Analyse wird in den nächsten Jahren ohne Zweifel zur Routine werden. Aber worum handelt es sich eigentlich?

Technische Aspekte (Tabelle 1)

Die Exomsequenzierung beruht einerseits auf der vollständigen Entzifferung des menschlichen Genoms, die zu einer Referenzsequenz aller Gene führte, und andererseits auf der

Hochdurchsatz-Sequenzierung. Mit dieser Technologie kann die Nukleotidsequenz aller «Exome», das heisst der kodierenden Teile unserer Gene erhalten werden. Obwohl sie nur 2% des menschlichen Genoms darstellen, sind die Exone der Ort der meisten pathogenen Mutationen (ca. 90%). Zur Exomsequenzierung wird eine nur kleine Menge DNA benötigt, die aus einer kleinen Blutentnahme oder – in gewissen Fällen – selbst aus einer Speichelprobe gewonnen werden kann. Die Sequenzierung benötigt eine technische Zeitspanne von ca. drei Wochen (im Notfall sind kürzere Zeiten möglich), bestehend aus der DNA-Extraktion aus Blut (oder Speichel), Sequenzierung und Herstellung einer Kartei mit den verschiedenen identifizierten Varianten. Der Preis dieser Analyse liegt derzeit zwischen Fr. 1500.– und Fr. 2500.–, ein im Vergleich zu den Kosten individueller Gensequenzierung (bisher zwischen Fr. 500.– und 5000.–) günstiger Preis! Die Sozialversicherungen können die Kosten (zumindest für den Patienten) übernehmen, unter der Bedingung, dass eine vorhergehende Zusage erfolgte und die Indikation von einem Genetiker bestätigt wurde. Diese Bedingungen sollen «wildes» Verschreiben verhindern und gewährleisten, dass die *Good Practice*-Prinzipien betreffend genetische Beratung und Patienteneinwilligung respektiert werden (siehe unten). Obwohl die Kinderärzte die klinischen und diagnostischen Aspekte gut kennen, bringen es die zahlreichen Facetten der Exomsequenzierung mit sich, dass die Zusammenarbeit mit den Genetikern, inbegriffen den Genetik-Beraterinnen (diese in der Schweiz noch wenig bekannte, in der Patientenkommunikation spezialisierte Berufsgattung ist in Kanada, den USA, Grossbritannien und Frankreich verbreitet) unbedingt notwendig ist.

Der Teufel steckt im Detail ...

Die Liste der identifizierten Varianten zu erhalten, ist nur der erste Schritt, und dieser erste Schritt hat technische Beschränkungen (die Liste ist nicht ausführlich):

1. Die Sequenzierung erfasst nicht alle Exone zudem qualitativ nicht gleichmässig. So können gewisse Abschnitte nur in begrenztem Umfang («*poor coverage*») oder gar nicht erfasst werden. Allerdings verbessert sich die diesbezügliche Technologie beinahe von Monat zu Monat.
2. Die Algorithmen zur Aneinanderreihung der bei einem Individuum erhaltenen Sequen-

Labor

- a) Isolierung der Genom-DNA (Blut, Speichel/Mundabstrich, andere)
- b) Amplifikation der Exome
- c) Sequenzierung der Exome
- d) Herstellen einer Sequenzen-Datei

Bioinformatik

- e) Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit der bekannten Sequenz
- f) Resultat: ca. 25 000 «Varianten» pro Individuum
- g) Ausscheiden synonyme Varianten (es verbleiben ca. 10 000 Varianten)
- h) Ausscheiden gemeinsamer und bei Gesunden beobachteter Varianten (es verbleiben ca. 25–200 Varianten)

Bioinformatik-klinische Diskussion

- i) Kritische Evaluation jeder Variante; «*sign-out conference*»

Tabelle 1: Workflow der Exomsequenzierung.

Anmerkung: Die Anzahl Varianten kann von Labor zu Labor und von einem Individuum zum anderen variieren! Die immer grösser werdende Zahl Befunde in den Datenbanken wird das Ausscheiden bei gesunden Personen beobachteter Varianten («h») und damit die Identifizierung pathogener Varianten zunehmend erleichtern.

- zen mit der Referenz sind nicht perfekt. Man kann Mutationen «verpassen», oder auch künstlich einführen. Ein durch Exomsequenzierung erhaltener, möglicher Befund muss deshalb oft durch konventionelle, gezielte Sequenzierung überprüft werden (mit entsprechenden Mehrkosten).
3. Die Sequenzierung ist bei Punktmutationen (*single nucleotide substitutions*) wirksam, weniger aber zur Ortung kleiner, und gänzlich unwirksam bei grösseren Insertionen oder Deletionen. Solche Mutationen sind seltener (< 10%), aber bei der Diagnosestellung nicht zu vernachlässigen.
4. Es gibt möglicherweise noch unbekannte oder schlecht definierte Gene, die durch die Sequenzierung nicht abgedeckt werden; dies ist z. B. für die Gene der Fall, welche Mikro-RNAs kodieren und ebenfalls Krankheiten verursachen können.

Wie findet man die für ein bestimmtes klinisches Bild verantwortliche Variante?

Im Mittel findet man pro Person an die 25 000 Varianten. Wie aber findet man die für einen bestimmten klinischen Phänotypus verantwortliche Mutation (oder zwei bei rezessiver Vererbung)? Dazu bedarf es eines komplexen Filtrationsprozesses. Es werden vorerst die Varianten ausgeschieden, welche keinen Einfluss auf das Protein ausüben, dann jene, die bei mehreren gesunden Individuen festgestellt wurden und somit bestimmt nicht pathogen sind. Hierbei sind die ausgiebigen, in den USA geschaffenen Datenbanken (z. B. «Exome

Aggregation Consortium») sehr hilfreich und werden auch universell benutzt. Anschliessend wird die Qualität der Sequenzierung untersucht; «schwache» Varianten (d. h. nur in einer Minderzahl Leseraster auftretend) werden fallen gelassen. Schliesslich verbleibt eine kleine, von einem Individuum zum andern variierende Zahl Varianten, zwischen 5 und 50, manchmal bis 100, die man vorerst und bis zur endgültigen Zuordnung als pathogen oder «unschuldig», als «Varianten unbekannter Bedeutung» (*variant of unknown significance*, VUS) bezeichnet. Wie kann man alle diese Varianten voneinander unterscheiden? Verschiedene Szenarien sind vorstellbar (Tabelle 2):

1. Die Analyse ergibt Mutationen in einem Gen, welches bereits mit «Syndromen» oder bekannten Krankheiten assoziiert ist, und die den Phänotyp des Patienten erklären. Manchmal findet man eine (oder zwei) Mutationen, die in Literatur oder Datenbanken bereits beschrieben sind. In diesem Idealfall ist die Reaktion oft «Heureka!» und «Warum haben wir nicht gleich daran gedacht?» Ärzte, selbst Experten sind keine unfehlbaren Diagnosemaschinen, vor allem wenn es sich um seltene Krankheiten handelt!
2. Man findet Mutationen in einem Gen, das mit einem Syndrom oder einer Krankheit assoziiert ist, und der Patient zeigt einen nur «partiellen» Phänotyp, oder eine abgeschwächte Form. Diese Situation ist eine der häufigsten! Die Erfahrung mit der Sequenzierung zeigt eindeutig, dass die «textbook cases» relativ selten sind, und zudem leicht klinisch diagnostiziert werden, wäh-

rend die wenig ausgeprägten Formen häufiger sind.

3. Man findet Mutationen in einem bekannten Gen, aber der Phänotyp des Patienten entspricht nur teilweise, oder gar nicht, dem bereits bekannten. In dieser Situation ist es wichtig, weitere Indizien zu erhalten: Zum Beispiel das Vorhandensein der Mutation(en) bei weiteren Familienmitgliedern. Allgemein wird offenbar, dass ein einziges Gen mehrere Phänotypen hervorrufen kann, je nach Art der Mutation und deren Lokalisation im Protein.
4. Man findet mehrere Varianten, aber keine scheint das klinische Bild erklären zu können. Was tun? Handelt es sich um ein technisches Problem (Sequenzierung und Filtrierung vermochten nicht, die pathogene(n) Mutation(en) zu identifizieren), oder aber die pathogene Mutation befindet sich wohl unter den identifizierten Varianten, nur ist deren pathogene Natur noch nicht bekannt? Bedenkt man, dass wir die Funktion nur eines Drittels der bekannten Gene kennen und die übrigen zwei Drittel weitgehend unbekannt sind, erscheint diese Erklärung plausibel.

Untersuchen wir noch einige Sonderfälle:

- «Trio»-Analyse, d. h. Patient und beide nicht betroffenen Eltern. In diesem Fall erhält man die Sequenzierung dreier Individuen und identifiziert Varianten, die beim Patienten vorhanden sind, bei den Eltern aber fehlen: Sogenannte «*de novo*»-Mutationen. Diese Art Analyse hat bei der Erforschung von Entwicklungsrückständen und «autistischen» Störungen wichtige Erfolge gebracht: Es hat sich ergeben, dass eine Grosszahl dieser Störungen durch *de novo*-Mutationen bedingt sind (in den meisten Fällen mit negativer Familienanamnese), in Genen, die im Gehirn, genauer gesagt in den Synapsen exprimierte Proteine kodieren. Diese Beobachtung bringt die Hoffnung neuer therapeutischer Ansätze mit sich.
- «*Phenotype matching*»: Mutationen unbekannter Bedeutung und das entsprechende klinische Bild können privat und anonym auf spezifische dafür bestimmte Webseiten hochgeladen werden: Stellt das System zwei ähnliche «Eingänge» fest, werden die betreffenden Ärzte verständigt. Sie können sich in Verbindung setzen und ihre Nachforschungen gemeinsam weiterführen. Das Feststellen gleichartiger Varianten bei Patienten mit gleichem Phänotyp ist ein starkes

1	Bekanntes Gen, bekannter klinischer Phänotypus	«Warum hat man nicht daran gedacht?»
2	Bekanntes Gen, partieller oder atypischer klinischer Phänotypus	Häufige Situation
3	Bekanntes Gen, neuer oder unerwarteter klinischer Phänotypus	Ausdehnung des klinischen Spektrums ein und desselben Gens
4	Neues Gen, bekannter oder unbekannter klinischer Phänotypus, die biologische Rolle des Gens kann den Phänotyp erklären	Kann im Rahmen eines Forschungsprojektes, aber auch in diagnostischer Situation vorkommen
5	Neues Gen, unbekannter oder nicht definierter klinischer Phänotypus	Der Befund erfordert eine funktionelle Bestätigung (d. h. im Rahmen eines Forschungsprojektes)
6	Mehrere Varianten identifiziert, Priorisierung unmöglich	Undiagnostizierter Fall; es besteht die Möglichkeit, ähnliche Fälle in den Plattformen für Befundaustausch zu suchen

Tabelle 2: Mögliche Situationen nach bioinformatik-klinischer Diskussion.

Anmerkung: Bekanntes Gen = Gen mit bekannter Assoziation mit einem klinischen Phänotypus; bekannter Phänotypus = einer bekannten spezifischen Diagnose entsprechender Phänotypus (z. B. zystische Fibrose, Rett-Syndrom).

Indiz dafür, dass es sich um pathogene Varianten handelt.

- Die Sequenzierung kann bei ein und demselben Individuum pathogene Mutationen in verschiedenen Genen feststellen: Diese Situation ist nicht selten (schätzungsweise 4–8 % Individuen!). Dies erlaubt manchmal, einen Phänotyp zu erklären, der genau genommen die Summe zweier unabhängiger Phänotypen darstellt.
- Die Sequenzierung kann manchmal unerwartete Mutationen aufzeigen, Zufallsbefunde, die nicht mit dem Phänotyp in Verbindung stehen, der zur Sequenzierung führte, die jedoch klinisch relevant sein können. Diese Situation hat wichtige ethische Konsequenzen (siehe unten).

Diese Komplexität führt dazu, dass das «Herz» der Exomsequenzierung als diagnostischer Test nicht die Sequenzierung an und für sich ist, sondern die sog. «*sign-out conference*», die Besprechung der Ergebnisse. Anlässlich dieser Konferenz besprechen Bioinformatiker und Ärzte gemeinsam die festgestellten Varianten und deren klinische Bedeutung. Es kann sich um eine einfache (wie im Fall 1.), oder um eine problematische Konferenz handeln, wenn man zu Schlussfolgerungen wie in den Fällen 3 oder 4 kommt. Die zunehmende Anhäufung von Daten in den Datenbanken macht die Interpretation «unbekannter Varianten» immer einfacher, die Trennung pathogener von «unschuldigen» Varianten wird eindeutiger. Aus der Exomsequenzierung sind drei Lehren zu ziehen: 1) Eine saubere klinische Definition und Beschreibung bringt bessere Resultate («*next-generation sequencing demands next-generation phenotyping*»). Mit einem unklaren klinischen Bild wird es nicht möglich sein, die verantwortliche Mutation zu finden; 2) Es ist mit der Exomsequenzierung einfacher, eine Diagnose zu stellen (oder zu bestätigen), als sie auszuschliessen; und 3) Wie bereits erwähnt, wurden Diagnosen von den klinischen Experten oft nicht vermutet; diese Tatsache legt nahe, dass wir nur die klinische Standardausprägung (*Textbook*) kennen, während die klinische Variabilität viel grösser ist, als vermutet.

Diese Erwägungen führen uns dazu, uns Gedanken zur Einwilligung des Patienten oder seiner Eltern (oder Vormundes) vor der Durchführung eines solchen Tests zu machen. In dieser Einwilligungserklärung, die wie bei jeder genetischen Untersuchung selbstverständlich eingeholt werden muss, können der Patient oder seine Eltern Instruktionen zu

Befunden geben, die nicht in direktem Zusammenhang mit der primären diagnostischen Abklärung stehen: Insbesondere können Patient oder Eltern entscheiden, ob sie über solche Zufallsbefunde informiert oder nicht informiert werden wollen. Der Patient muss folglich schriftlich festhalten, inwieweit und zu welchem Zeitpunkt er über einen derartigen Befund informiert werden will (siehe Einwilligungsf formular der Schweizerischen Gesellschaft für Medizinische Genetik und Bundesgesetz über genetische Untersuchungen beim Menschen). Das *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) unterhält eine gewichtete Liste von Krankheiten, bei welchen eine präventive oder therapeutische «ärztliche Massnahme» möglich ist, und empfiehlt, eventuelle diesbezügliche Entdeckungen mitzuteilen. Diese Liste umfasst zwischen 50 und 100 Gene (z. B. das Marfan-Syndrom bedingende Fibrillin, oder das für Brust- und Ovarialkrebs verantwortliche Gen BRCA1). Andererseits müssen Minderjährige vor Diagnosen geschützt werden, die im Kindesalter keine Konsequenzen haben. Diese Situationen sind deshalb oft heikel, selbst wenn die Indikation für Patient und Eltern eindeutig ist. Die Diagnose durch Exomsequenzierung muss deshalb, noch mehr als andere genetische Tests, auf einer umfassenden genetischen Beratung, und – äusserst wichtig – auf einem soliden Vertrauensverhältnis zwischen Arzt und Patient, Arzt und Eltern beruhen. Literaturdaten zeigen, dass die Familien nach einer guten genetischen Beratung vor der Sequenzierung, unerwarteten Befunden (deren Inzidenz 5–10 % ist) gegenüber mehrheitlich offener eingestellt sind und diese zu kennen wünschen. Es wäre deshalb falsch, unerwarteten Resultaten einen vorbehaltlos negativen Gehalt zuzuschreiben; ein solcher Befund kann eine für Arzt und Patient schwierige Diskussion notwendig machen, kann aber auch die Möglichkeit für Vorbeugung eröffnen und schlussendlich ein Leben retten.

Eine pragmatische Lösung: Gen-Panels

Je nach klinischem Bild und diagnostischer Fragestellung beschränken gewisse Laboratorien die Exomanalyse auf ein Panel bereits identifizierter und mit einer bestimmten Krankheit oder Krankheitsgruppe assoziierter Gene; die Anzahl Gene kann von 50 bis 300 variieren. Mit diesem selektiven Vorgehen kann man in den meisten Fällen genetische

«Zufallsbefunde», mit allen daraus entstehenden etwaigen Problemen vermeiden. Zu den am häufigsten gebrauchten Panels gehören z. B. jene für Epilepsien, Kardiomyopathien oder Knochendysplasien. Der Nachteil der Panels liegt in der Tatsache, dass die Kenntnisse über die Zusammenhänge zwischen Genen und klinischen Phänotypen so rasch ändern, dass die Panels sehr häufig revidiert werden müssen. Die Kosten liegen in derselben Grössenordnung wie jene der Exomsequenzierung.

Anwendung in der Pädiatrie

Der Erfolg der Exomsequenzierung bei der Erforschung genetischer Krankheiten hat rasch zur diagnostischen Anwendung geführt. Ist die Herausforderung angesichts eines Kindes mit einer schwer diagnostizierbaren Krankheit nicht mit diagnostischer «Forschung» vergleichbar? Nicht-diagnostizierte Fälle beim Erwachsenen und im Kindesalter (häufig!), haben deshalb schnell an dieser Technologie Nutzen gezogen. Für viele Familien bedeutet die Exomsequenzierung das Ende einer langen diagnostischen Odyssee. Zu den Anwendungsbereichen gehören: Kinder mit einem dysmorphen oder syndromalen klinischen Bild; neurologische Krankheiten: Früh auftretende, familiäre oder idiopathische Epilepsie; Entwicklungsrückstände («*developmental disability*»); Störungen des autistischen Spektrums; Mikrozephalien, periphere und viele weitere Neuropathien; Krankheiten des Gehörs und der Retina; Knochenkrankheiten; Herzmissbildungen, insbesondere solche mit zusätzlichen klinischen Symptomen; Magen-darmkrankheiten; Nierenkrankheiten u.a.m. Die Exomsequenzierung hat sich auch bei schwerkranken Neugeborenen als hilfreich erwiesen und, *last but not least*, wird bereits erwogen, die Technik der Hochdurchsatz-Sequenzierung in das Neugeborenen-screening einzuführen. Untersucht man die Resultate der grossen Zentren, so ermöglicht die Exomsequenzierung in etwa $\frac{1}{3}$ der Fälle eine definitive Diagnose, mit gewissen Nuancen: Bei wenig spezifischen Störungen (z. B. isolierter Entwicklungsrückstand) beträgt die Erfolgsrate eher $\frac{1}{4}$; bei komplexeren, spezifischen Störungen (klinische Syndrome, Stoffwechselstörungen, Knochen-, Nieren-, Immunkrankheiten usw.) hingegen bis zu 50 %. Die Erfolgsraten der verschiedenen Zentren sind auffallend vergleichbar; die Erfahrungen in Lausanne mit über 200 Fällen bestätigen diese Feststellung. Praktisch müssen gemein-

same pädiatrisch-genetische, allen betroffenen Spezialisten zugängliche Sprechstunden geplant werden, mit Fallbesprechung, genauer Beschreibung des Phänotypus und gemeinsam erarbeiteter Fragestellung an die Exomsequenzierung. Ebenso wichtig ist die Vermittlung der Befunde, unter Einbeziehung des Kinderarztes, der im Zentrum des Netzwerkes rund um Kind und Familie verbleiben und sie begleiten muss.

Perspektiven

Die Exomsequenzierung hat schwindelerregende Fortschritte in Identifizierung und Verständnis der für genetische Krankheiten verantwortlichen Gene gebracht, und damit der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze den Weg geöffnet. Wenn die Technologie und deren Anwendungsbereiche weiterhin mit derselben Geschwindigkeit fortschreiten (was angesichts der progressiv sinkenden Kosten und der Fortschritte beim Interpretieren der Befunde als wahrscheinlich erscheint), werden alle Bereiche der Medizin betroffen sein; die Zeit des *«genotype first, think after»* scheint, auch wenn dies allem entgegen geht, was wir während unserer Ausbildung gelernt haben, nicht mehr fern. Es ist faszinierend zu beobachten, dass die Rolle des Arztes dadurch nicht geschwächt wird; der Arzt verbleibt im Zentrum des diagnostischen Prozesses, er gibt eine sorgfältigen Beschreibung des Phänotypus, stellt ein Vertrauensverhältnis mit der Familie her und sichert die weitere Betreuung, die durch neue therapeutische Möglichkeiten bereichert wird. Letzterer Punkt ist vielversprechend: Immer mehr Störungen finden eine gezielte Therapie, auf dem Verständnis der genetischen und biochemischen Ursachen gründend. Misstrauen oder gar Befürchtungen dieser Entwicklung gegenüber sind deshalb unberechtigt. Die Zusammenarbeit zwischen Kinderärzten und Genetikern muss intensiver gestaltet werden; die neue Ärztegeneration wird Informationen zur Genomik in die klinische Praxis integrieren müssen. Die Pädiatrie hat im Verlaufe des 20. Jahrhunderts die Geburt der medizinischen Genetik erlebt und bleibt an vorderster Front des Fortschrittes; eine Gelegenheit, die genutzt werden muss.

Referenzen

Übersichtsarbeiten zur praktischen Anwendung der Exomsequenzierung

- Ku CS, Cooper DN, Polychronakos C, Naidoo N, Wu M, Soong R. Exome sequencing: dual role as a discovery and diagnostic tool. *Ann Neurol* 2012 Jan; 71(1): 5–14.

- Hennekam RC, Biesecker LG. Next-generation sequencing demands next-generation phenotyping. *Hum Mutat* 2012; 33: 884–6.
- Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med* 2014 Jun 19; 370(25): 2418–25.
- Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA* 2014 Nov 12; 312(18): 1870–9.
- Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, Boehm C, Sobreira N, Smith JD, et al. The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am J Hum Genet* 2015 Aug 6; 97(2): 199–215.
- Philippakis AA, Azzariti DR, Beltran S, Brookes AJ, Brownstein CA, Brudno M, et al. The Matchmaker Exchange: a platform for rare disease gene discovery. *Hum Mutat* 2015 Oct; 36(10): 915–21.
- Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med* 2015 Dec 3. doi: 10.1038/gim.2015.148. [Epub ahead of print].
- Lazaridis KN, Schahl KA, Cousin MA, Babovic-Vuksanovic D, Riegert-Johnson DL, Gavrilova RH, et al. Outcome of Whole Exome Sequencing for Diagnostic Odyssey Cases of an Individualized Medicine Clinic: The Mayo Clinic Experience. *Mayo Clin Proc* 2016 Mar; 91(3): 297–307.
- Sawyer SL, Hartley T, Dymont DA, Beaulieu CL, Schwartzentruber J, Smith A, et al. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care. *Clin Genet* 2016 Mar; 89(3): 275–84.
- Gahl WA, Mulvihill JJ, Toro C, Markello TC, Wise AL, Ramoni RB, et al. The NIH Undiagnosed Diseases Program and Network: Applications to modern medicine. *Mol Genet Metab* 2016 Jan 22. pii: S1096-7192(16)30006-3.

Übersichtsarbeiten zur Anwendung der Exomsequenzierung in der Pädiatrie

- Grody WW, Thompson BH, Hudgins L. Whole-exome/genome sequencing and genomics. *Pediatrics* 2013 Dec; 132(Suppl 3): S211–5.
- Biesecker LG, Biesecker BB. An approach to pediatric exome and genome sequencing. *Curr Opin Pediatr* 2014 Dec; 26(6): 639–45.
- Valencia CA, Husami A, Holle J, Johnson JA, Qian Y, Mathur A, et al. Clinical Impact and Cost-Effectiveness of Whole Exome Sequencing as a Diagnostic Tool: A Pediatric Center's Experience. *Front Pediatr* 2015 Aug 3; 3: 67.
- Thiffault I, Lantos J. The Challenge of Analyzing the Results of Next-Generation Sequencing in Children. *Pediatrics* 2016 Jan; 137 Suppl 1: S3–7.

Artikel zur Interpretation von Varianten und Mitteilung unerwarteter Befunde an Patient und Familie

- Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, et al. «ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing». *Genet Med* 15: 565–574 (2013).
- Burke W, Antommaria AH, Bennett R, Botkin J, Clayton EW, Henderson GE, et al. Recommendations for returning genomic incidental findings? We need to talk! *Genet Med* 2013; 15(11): 854–9.
- Lawrence L, Sincan M, Markello T, Adams DR, Gill F, Godfrey R, et al. The implications of familial incidental findings from exome sequencing: the NIH Undiagnosed Diseases Program experience. *Genet Med* 2014; 16(10): 741–50.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guideline 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(5): 405–24.

- Smith LA, Douglas J, Braxton AA, Kramer K. Reporting Incidental Findings in Clinical Whole Exome Sequencing: Incorporation of the 2013 ACMG Recommendations into Current Practices of Genetic Counseling. *J Genet Couns* 2015 Aug; 24(4): 654–62.
- Hehir-Kwa JY, Claustres M, Hastings RJ, van Ravenswaaij-Arts C, Christenhusz G, Genuardi M, et al. Towards a European consensus for reporting incidental findings during clinical NGS testing. *Eur J Hum Genet* 2015; 23(12): 1601–6.
- Amendola LM, Lautenbach D, Scollon S, Bernhardt B, Biswas S, East K, et al. Illustrative case studies in the return of exome and genome sequencing results. *Per Med* 2015; 12(3): 283–95.
- Darnell AJ, Austin H, Bluemke DA, Cannon RO 3rd, Fischbeck K, Gahl W, et al.
- A Clinical Service to Support the Return of Secondary Genomic Findings in Human Research. *Am J Hum Genet* 2016 Mar 3; 98(3): 435–41.

Exomsequenzierung und intellektuelle Behinderung

- De Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med* 2012 Nov 15; 367(20): 1921–9.
- Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T, et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* 2012 Nov 10; 380(9854): 1674–82.
- Wright CF, Fitzgerald TW, Jones WD, Clayton S, McRae JF, van Kogelenberg M, et al. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet* 2015 Apr 4; 385(9975): 1305–14.

Exomsequenzierung und Autismus

- Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, Willsey AJ, et al. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* 2012 Apr 4; 485(7397): 237–41.
- Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A, et al. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* 2012 Apr 4; 485(7397): 242–5.
- O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 2012 Apr 4; 485(7397): 246–50.
- Tammimies K, Marshall CR, Walker S, Kaur G, Thiruvahindrapuram B, Lionel AC, et al. Molecular Diagnostic Yield of Chromosomal Microarray Analysis and Whole-Exome Sequencing in Children With Autism Spectrum Disorder. *JAMA* 2015 Sep 1; 314(9): 895–903.

Neue Sequenzierungstechniken und pädiatrische Onkologie

- Beltran H, Eng K, Mosquera JM, Sigaras A, Romanel A, Rennert H, et al. Whole-Exome Sequencing of Metastatic Cancer and Biomarkers of Treatment Response. *JAMA Oncol* 2015 Jul; 1(4): 466–74.
- Parsons DW, Roy A, Yang Y, Wang T, Scollon S, Bergstrom K, et al. Diagnostic Yield of Clinical Tumor and Germline Whole-Exome Sequencing for Children With Solid Tumors. *JAMA Oncol* 2016 Jan 28. doi: 10.1001/jamaoncol. 2015.5699. [Epub ahead of print].
- Mody RJ, Wu YM, Lonigro RJ, Cao X, Roychowdhury S, Vats P, et al. Integrative Clinical Sequencing in the Management of Refractory or Relapsed Cancer in Youth. *JAMA* 2015 Sep 1; 314(9): 913–25.

- Gajjar A, Bowers DC, Karajannis MA, Leary S, Witt H, Gottardo NG. Pediatric Brain Tumors: Innovative Genomic Information Is Transforming the Diagnostic and Clinical Landscape. *J Clin Oncol* 2015 Sep 20; 33(27): 2986–98.
- Damodaran S, Berger MF, Roychowdhury S. Clinical tumor sequencing: opportunities and challenges for precision cancer medicine. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2015:e175–82.
- McCullough LB, Slashinski MJ, McGuire AL, Street RL Jr, Eng CM, Gibbs RA, Parsons DW, Plon SE. Is Whole-Exome Sequencing an Ethically Disruptive Technology? Perspectives of Pediatric Oncologists and Parents of Pediatric Patients With Solid Tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2016 Mar; 63(3): 511–5.

Anwendung der Exomsequenzierung

bei spezifischen pädiatrischen Krankheiten

- Nolan D, Carlson M. Whole Exome Sequencing in Pediatric Neurology Patients: Clinical Implications and Estimated Cost Analysis. *J Child Neurol* 2016 Feb 10. pii: 0883073815627880. [Epub ahead of print].
- Homsy J, Zaidi S, Shen Y, Ware JS, Samocha KE, Karczewski KJ, et al. De novo mutations in congenital heart disease with neurodevelopmental and other congenital anomalies. *Science* 2015 Dec 4; 350(6265): 1262–6.
- Braun DA, Schueler M, Halbritter J, Gee HY, Porath JD, Lawson JA, et al. Whole exome sequencing identifies causative mutations in the majority of consanguineous or familial cases with childhood-onset increased renal echogenicity. *Kidney Int* 2015 Oct 21. doi: 10.1038/ki.2015.317. [Epub ahead of print].
- Todd EJ, Yau KS, Ong R, Slee J, McGillivray G, Barnett CP, et al. Next generation sequencing in a large cohort of patients presenting with neuromuscular disease before or at birth. *Orphanet J Rare Dis* 2015 Nov 17; 10: 148.
- Bademci G, Foster J, Mahdieh N, Bonyadi M, Duman D, Cengiz FB, et al. Comprehensive analysis via exome sequencing uncovers genetic etiology in autosomal recessive nonsyndromic deafness in a large multiethnic cohort. *Genet Med* 2015 Jul 30. doi: 10.1038/gim.2015.89. [Epub ahead of print].
- Kelsen JR, Dawany N, Moran CJ, Petersen BS, Sarmady M, Sasson A, et al. Exome sequencing analysis reveals variants in primary immunodeficiency genes in patients with very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2015 Nov; 149(6): 1415–24.
- Petrikin JE, Willig LK, Smith LD, Kingsmore SF. Rapid whole genome sequencing and precision neonatology. *Semin Perinatol* 2015 Dec; 39(8): 623–31.
- Willig LK, Petrikin JE, Smith LD, Saunders CJ, Thiffault I, Miller NA, et al. Whole-genome sequencing for identification of Mendelian disorders in critically ill infants: a retrospective analysis of diagnostic and clinical findings. *Lancet Respir Med* 2015 May; 3(5): 377–87.
- De Franco E, Ellard S. Genome, Exome, and Targeted Next-Generation Sequencing in Neonatal Diabetes. *Pediatr Clin North Am* 2015 Aug; 62(4): 1037–53.

Danksagung

Wir danken allen an der Implementierung des klinischen Exoms beteiligten Kollegen am CHUV und der Universität Lausanne (Luisa Bonafé, Sheila Unger, Beryl Royer-Bertrand, Belinda Campos-Xavier, Lauréane Mittaz-Crettol, Frédéric Barbey, Nuria Garcia, Diana Ballhausen, Marie-Claude Addor, Laurence Fellmann, Jaqueline Pouw-Schoumans, Carlo Rivolta, Keith Harshman, Jean-Blaise Wasserfallen) für ihre Zusammenarbeit, und dass wir an ihren Erfahrungen und Meinungen teilhaben konnten.

Korrespondenzadresse

Prof. Andrea Superti-Furga
Centre Hospitalier Universitaire Vaudois
(CHUV)
1011 Lausanne
asuperti@unil.ch

Die Autoren haben keine finanzielle Unterstützung und keine anderen Interessenkonflikte im Zusammenhang mit diesem Beitrag deklariert.