Diagnostisk exomsekventering til udredning af syndromer

Elsebet Østergaard[1], Lotte Risom[1], Jakob Ek[1], Sabine Grønborg[1], Morten Dunø[1] & Flemming Skovby[2]

STATUSARTIKEL

1) Klinisk Genetisk Klinik, Rigshospitalet
2) Klinisk Genetisk Enhed, Pædiatrisk Afdeling, Sjællands Universitetshospital Roskilde

Ugeskr Læger 2017;179:V10160762

De fleste sjældne, medfødte sygdomme og syndromer, hvoraf mange er ledsaget af udviklingshæmning og andre kroniske handikap, har en genetisk årsag. Afklaring af den molekylærgenetiske defekt er en forudsætning for at kunne give de ramte familier præcis genetisk rådgivning og tilbyde undersøgelser i kommende graviditeter. Desværre har den diagnostiske succes hidtil været beskeden; selv efter omfattende klinisk, biokemisk, cytogenetisk og molekylærgenetisk udredning får kun op mod 50% af patienterne stillet en diagnose på genniveau, ofte først efter en diagnostisk odyssé på flere år [1].

I de seneste år har exom- og genomsekventering forbedret den genetiske diagnostik af syndromer. Vi giver her en status over metoder, resultater og etiske aspekter af exomsekventering, der nu er implementeret i klinisk praksis.

UDVIKLINGEN I METODER TIL DNA-SEKVENTERING

Sekventering af DNA er bestemmelsen af den nøjagtige rækkefølge af de fire nukleotider, som udgør grundstammen i DNA. Den første generation af sekventeringsteknikker var Sanger-sekventering, også kaldet dideoxymetoden [2], som blev anvendt til sekventering af det første humane genom [3]. Det blev færdiggjort i 2003 efter 13 års arbejde og er stadig verdens største biologiske samarbejdsprojekt. Projektet satte gang i udviklingen af nye effektive sekventeringsteknikker, bl.a. massiv parallelsekventering, også kaldet *next generation sequencing* (NGS).

NGS har udviklet sig med stor hast, hvilket har ført til, at både pris og tidsforbrug til sekventering er faldet markant. Hvor sekventeringen af det første fulde humane genoms tre mia. nukleotider kostede flere mia. USD, kan det i dag gøres på under to dage for omkring 1.000 USD.

Et alternativ til helgenomsekventering er targeteret (målrettet) sekventering af de proteinkodende sekvenser (exoner) i genomet kaldet helexomsekventering (WES). Samlet set udgør exoner kun ca. 1,5% af det humane genom, og det er derfor væsentligt billigere at sekventere exomet end genomet.

De fleste NGS-platforme gør brug af samme metodologi, nemlig fremstilling af et såkaldt bibliotek, klonal amplifikation, sekventering og dataanalyse. Biblioteksdelen er fremstilling af de dele af genomet, man ønsker at sekventere, f.eks. alle exoner ved WES og evt. opkoncentrering af disse fragmenter ved polymerasekædereaktionsamplifikation. Derefter følger den klonale amplifikation og selve sekventeringen, hvor nukleotiderne inkorporeres til en voksende DNA-streng, som digitalt aflæses undervejs som en sekvens. Den hyppigst anvendte NGS-platform er fra Illumina, hvis nærmeste konkurrent er Ion Torrent-platformen (Thermo Fisher Scientific) (**Figur 1**).

Nye sekventeringsplatforme, hvor sekventeringen foregår i realtid, dvs. at sekvensen aflæses undervejs, hvilket gør analysen væsentligt hurtigere og mere fleksibel, er formentlig snart på vej. I modsætning til de nuværende sekventeringsplatforme, som gør brug af korte DNA-stykker på 200-400 bp, forventes det, at man med den nyeste teknologi kan sekventere længere DNA-stykker, hvorved puslespillet med at samle hele genomer bliver meget enklere.

DATAANALYSE

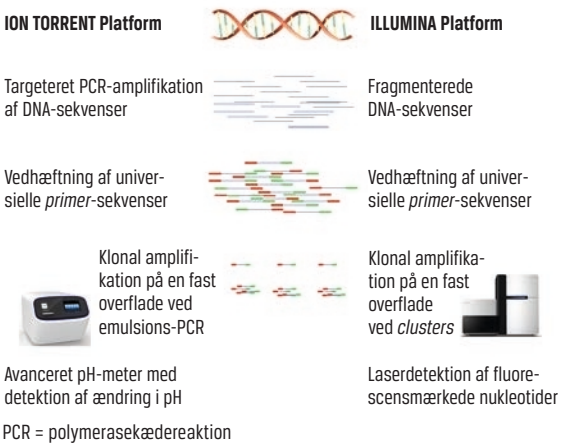
Når sekventeringen er færdig, gennemgår de rå sekvensdata adskillige bioinformatiske analysetrin. Det første er *base calling*, hvormed de individuelle korte nukleotidsekvenser identificeres. Det næste er match af disse nukleotidsekvenser til det humane referencegenom (*alignment*). I tredje trin identificeres forskelle ift. referencesekvensen (*variant calling*), og sidste trin består af annotering (identifikation af biologisk information om varianterne, f.eks. konsekvens på proteinniveau) og filtrering af de identificerede varianter (**Figur 2**). Afhængigt af den valgte filtreringsstrategi eller -pri-

HOVEDBUDSKABER

- Helexomsekventering (WES) er en screening af den proteinkodende del af genomet og anvendes i den diagnostiske udredning af f.eks. syndromer og sygdomme med genetisk heterogenitet.
- WES fører til en diagnose hos 25-30% med formodet genetisk sygdom, højere ved veldefinerede sygdomsgrupper.
- Vha. WES kan man ikke påvise trinukleotidekspansioner og visse andre mutationstyper.

FIGUR 1

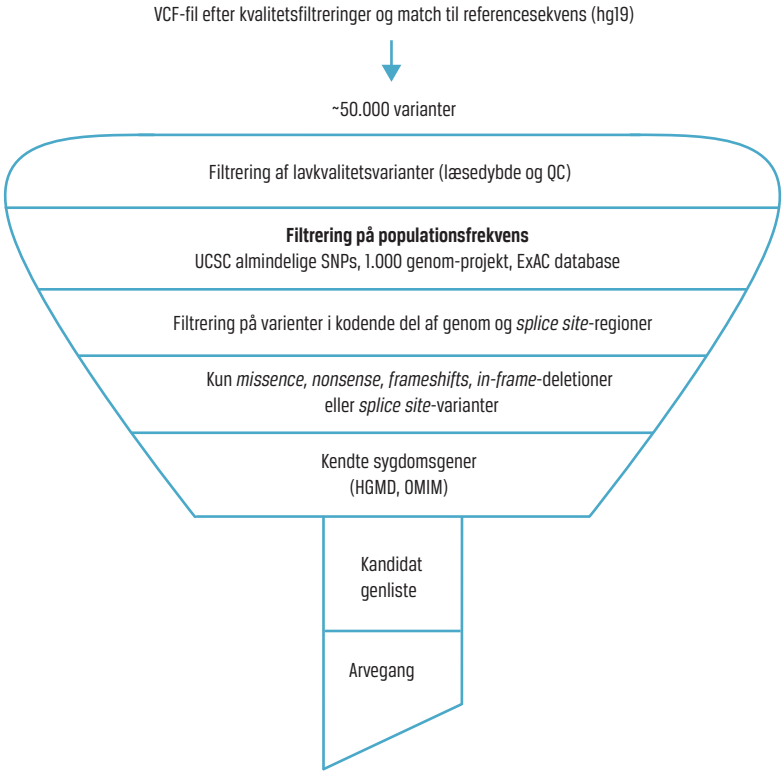
Sekventeringbiblioteket udgøres af korte DNA-fragmenter, som er repræsentative for de områder af genomet, man ønsker at sekventere. Fragmenterne indeholder specifikke sekvenser i enderne, designet til at interagere med sekventeringsplatformen, som for Illumina er overfladen på flowcellen og for Ion Torrent er små kugler. Det næste trin er klonal amplifikation af biblioteket enten ved *cluster*- (Illumina) eller emulsions-PCR (Ion Torrent). Det sidste trin er generering af den specifikke sekvens, som ved Illumina foregår ved laserdetektion i specifikke *clusters* af fluorescensmærkede nukleotider og ved Ion Torrent med et avanceret pH-meter, som detekterer ændring i pH.



PCR = polymerasekædereaktion

FIGUR 2

De forskellige trin i filtrering af data fra exomsekventering mhp. at identificere den/de varianter, som er årsag til patientens sygdom. Ved trioanalyse vil der typisk identificeres færre muligt patogene varianter.



ExAC = Exome Aggregation Consortium; HGMD = Human Gene Mutation Database; OMIM = Online Mendelian Inheritance in Man; QC = *quality control*; SNP = *single nucleotide polymorphism*; UCSC = University of California, Santa Cruz, Reference Sequences and Working Draft Assemblies for a large Collection of Genomes; VCF = *variant call format.*

oritering er antallet af varianter, dvs. mulige mutationsfund, ved WES typisk et sted mellem 2 og 200. Ved trioanalyse (undersøgelse af patient og forældre) er antallet af varianter ofte mindre, da der også filteres for f.eks. de novo-varianter.

GENETISK UDREDNING VED MISTANKE OM SYNDROM

Ved mistanke om en specifik genetisk sygdom har man traditionelt foretaget sekventering af et enkelt eller få gener med Sanger-sekventering. Ulempen er, at det kan tage lang tid, hvis flere gener skal undersøges sekventielt, hvilket tillige ofte er dyrt. Genpanelanalyser med typisk fra fem til flere hundrede gener udføres ofte med NGS, f.eks. ved mistanke om specifik sygdom, der kan skyldes mutation i mange forskellige gener.

Ved mistanke om kromosomsygdom, enten aneuploidi, f.eks. trisomi 21, eller mikrodeletions-/mikroduplikationssyndrom, f.eks. 22q11-deletionssyndrom, har man tidligere foretaget kromosomanalyse, evt. suppleret med fluorescens in situ-hybridiseringsanalyse, men dette er i høj grad erstattet af DNA-baserede metoder. Hvis man ikke på forhånd har mistanke om et specifikt syndrom, er standardudredningen kromosom-*micro array*-analyse (*array*-CGH). Denne suppleres ofte med biokemiske analyser, f.eks. screening af urin for organiske syrer og screening af lysosomal enzymaktivitet.

I en opgørelse af 500 patienter henvist til udredning på en klinisk genetisk afdeling fandt man en diagnose hos knap halvdelen (46%) ved udredning med kromosomanalyse, *micro array*-analyse, sekventering af enkeltgener eller genpaneler samt biokemiske analyser [4]. De fleste patienter fik stillet en diagnose i forbindelse med den første konsultation, hvorfor forfatterne konkluderede, at man bør overveje WES (eller helgenomsekventering) tidligt i den diagnostiske udredning, da de efterfølgende besøg og udredning ikke medførte nogen væsentlig gevinst ift. at stille en diagnose.

I løbet af de seneste ca. fem år er WES blevet indført som en metode til screening for monogene sygdomme, hvis der ikke er mistanke om en specifik sygdom, eller hvis der er tale om en genetisk heterogen sygdom, som kan skyldes mutation i mange forskellige gener.

Vha. WES kan man afdække både i forvejen kendte sygdomme med usædvanlig præsentation og sygdomme med hidtil ukendt sygdomsbillede og genetisk ætiologi. Ud af 105 familier var årsagen til den mang-

TABEL 1

Diagnostisk succesrate ved anvendelse af exomsekventering i udredning af genetiske sygdomme.

Indikationer	Total/molekylærgenetisk diagnose efter WES, n	Diagnostisk succesrate, %	Autosomal recessiv, n/N (%)	Autosomal dominant, n/N (%)	X-bunden, n/N (%)
Mistanke om genetisk sygdom, 64% børn	814/213	26	46/127[a] (36)	68/127[a] (54), heraf 63 (93) de novo-mutationer	10/127[a] (8)
Mistanke om genetisk sygdom, 88% neurologiske symptomer eller forsinket udvikling, 87% børn	2.000/504	25	181/504[b] (36)	280/504[b] (56), heraf 208 (74) de novo-mutationer	65/504[b] (13), heraf 40 (62) de novo-mutationer
Mistanke om genetisk sygdom, 100% børn	40/12	30	5/12 (42)	7/12 (58), heraf 4 (80) de novo-mutationer	0
Mistanke om genetisk sygdom, heraf 63% med neurologiske symptomer herunder mental retardering, 59% børn	51/15	29	7/15[b] (47)	10/15[b] (67), heraf 5 de novo-mutationer og 1 mosaik	0
Neurometaboliske sygdomme, 90% børn	41/28	68	16/28[b,c] (57)	12/28[b] (43), 10 de novo-mutationer og 1 mosaik	5/28[b] (18)
Mistanke om genetisk sygdom	500/152	30	51/152[b] (34)	86/152[b] (57), 68 de novo-mutationer	22/152[b] (14), 9 de novo-mutationer

mtDNA = mitokondrielt DNA; WES = helexomsekventering.
a) Der var kun detaljeret information om de 127 patienter, hvor WES er foretaget som trioanalyse.
b) Nogle af patienterne havde 2 genetiske sygdomme.
c) Det fremgår ikke af referencen, hvor mange af patienterne der havde varianter i kandidatgener.

FORTSÆTTES »

lende diagnose hos 26 familier (25%), at sygdomsbilledet var så atypisk, at man ikke klinisk havde haft mistanke om et specifikt kendt syndrom, eller at patienten var udredt meget tidligt i sygdomsforløbet, så karakteristika for syndromet endnu ikke havde manifesteret sig [5]. For ni af familierne (9%) blev genet først associeret med sygdom i løbet af udredningsforløbet med WES, og hos 23% var årsagen mutation(er) i ikke tidligere beskrevne sygdomsgener [6].

Ud over at afslutte den diagnostiske odyssé kan en diagnostisk afklaring på DNA-niveau have konsekvens for både patienten i form af forbedret forebyggelse og behandling og dermed prognose og familien i form af mulighed for prænatal diagnostik og/eller præimplantationsgenetisk diagnostik (ægsortering) [7-9].

Anvendelse af WES i udredning af syndromer kan øge det diagnostiske udbytte væsentligt (**Tabel 1**). En sammenfatning af syv studier omfattende ca. 3.500 patienter viste en diagnostiske succesrate på 25-30% [7-13] eller højere, hvis den undersøgte patientgruppe var veldefineret, f.eks. patienter med neurometaboliske syndromer, hvor succesraten var 68% [9]. WES kan omfatte DNA fra en enkelt patient eller DNA fra patient og forældre (trioanalyse). Sidstnævnte strategi kræver en større laboratoriemæssig arbejdsindsats og er mere bekostelig, men kan øge succesraten, da dataanalysen forenkles [12]. For autosomal recessive sygdomme får man kun data for varianter, som sidder på hver deres allel, og man filtrerer desuden for de novo-varianter. Dog vil der være risiko for at overse en variant, som er associeret med autosomalt dominant sygdom, hvis en af forældrene bærer varianten i mosaikform.

Godt halvdelen af mutationsfundene ved WES var associeret med autosomal dominant arvegang og lidt færre med autosomal recessiv arvegang (Tabel 1). Endvidere havde op til 18% mutationer i gener på X-kromosomet. Op til ca. en tredjedel af mutationerne, der blev påvist ved WES, var nyopståede. I disse tilfælde vil familiehistorien ikke på forhånd give noget fingerpeg om, hvilken arvegang der er tale om, men her vil en trioanalyse være nyttig, da patientens mutation ikke forekommer hos nogen af forældrene.

Hos en ikke ubetydelig andel af patienterne (op til 14%) påvistes mutationer i to forskellige gener, som begge bidrog til fænotypen (Tabel 1). Det kan være baggrunden for, at patienterne ikke har fået stillet en diagnose tidligere, da man f.eks. kan have antaget, at der var tale om et ikke tidligere beskrevet syndrom [9].

En væsentlig udfordring ved at foretage WES er vurderingen af, om en funden variant er patogen. I vurderingen inddrages bl.a. data om hyppighed i en kontrolpopulation, konservering af aminosyrer i andre arter og resultater fra celleforsøg. Fundet sættes også i relation til patientens fænotype og formodet arvegang for sygdommen. Alligevel vil man i en exomanalyse ofte ende med et antal *variants of uncertain significance* (VUS)'er, som typisk ikke rapporteres til patienten. En anden udfordring er de såkaldte tilfældighedsfund, dvs. varianter, som ikke er associeret med patientens fænotype, men som har betydning for patientens risiko for at få

TABEL 1, FORTSAT

Diagnostisk succesrate ved anvendelse af exomsekventering i udredning af genetiske sygdomme.

Anden variant, n/N (%)	Patogene varianter beskrevet tidligere[c], n/N (%)	Ønsker information om tilfældighedsfund, %	Tilfældighedsfund påvist, %	Med 2 genetiske sygdomme, n/N (%)	Reference
3/127[a] (2) kopiantalsvariant eller uniparental disomi	–	97	5: BRCA1/2, kolorektalcancergener, hjertesygdom	–	[12]
1/504[b] (0,2) mtDNA	(42)	90	4,6: BRCA1/2, kolorektalcancergener, hjertesygdom, polycystisk nyresygdom, Fabrys sygdom	23/504 (5)	[11]
–	(53)	90	7,5: Marfans syndrom, hjertesygdom, BRCA2	0	[7]
0	(32)	100 for *medically actionable*, kunne ikke fravælges 93 for anlægsbærertilstand for recessive sygdomme	5: kolorektalcancergener, hjertesygdom 7: anlægsbærere for recessive sygdomme	2/15 (13)	[10]
	7/58 (12)		2: anlægsbærere for cystisk fibrose	5/37 (14)	[9]
4/152[b] X-bunden dominant (3), 3 de novo-mutationer	–		–	11/152 (7)	[13]

andre sygdomme, f.eks. cancer. I de studier, hvor patienterne er blevet spurgt, har en høj andel, 90-97%, ønsket at få denne viden (Tabel 1). Andelen af tilfældighedsfund ligger på 2-7%, primært fordelt på to grupper: arvelig cancer (f.eks. mamma-og ovariecancer eller kolorektal cancer) og hjertesygdomme (f.eks. kardiomyopati og ledningsforstyrrelser). En anden gruppe tilfældighedsfund er anlægsbærertilstand for recessiv sygdom, f.eks. cystisk fibrose [9, 10]. Den høje andel af tilfældighedsfund betinges delvist af, at man nogle steder har valgt specifikt at søge efter varianter i 56 gener, primært relateret til cancer og hjertesygdom.

ETISKE ASPEKTER

Indførelsen af WES til brug ved klinisk diagnostik rejser etiske spørgsmål, især ift. udredning af børn og deres ret til ikkeviden om tilfældighedsfund. American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) udgav i 2013 deres anbefalinger om diagnostisk exomsekventering, som bl.a. omfattede grundig information forud for stillingtagen til WES med inddragelse af en klinisk genetiker ved information, tolkning af fund og/eller svarafgivelse [14]. I retningslinjerne anbefalede man at analysere specifikt for tilfældighedsfund i 56 gener, der langt overvejende disponerer for cancer eller hjertesygdom. Der var stor debat om dette, og ACMG har efterfølgende modificeret deres anbefalinger, så der nu er mulighed for at fravælge specifik analyse af de 56 gener, og man har i øvrigt senere revideret listen, som nu omfatter 59 gener [15, 16].

Dansk Selskab for Medicinsk Genetik udgav i 2012 et politikpapir med anbefalinger af WES-indikationsområder, som omfatter patient/aborteret foster med mulig genetisk sygdom af ukendt ætiologi eller med kendt ætiologi, hvor der er en høj grad af genetisk heterogenitet [17]. Prænatal diagnostik med WES anbefales ikke, da det er forbundet med betydelig vanskelighed at tolke data fra en ofte mindre veldefineret fænotype hos et foster og pga. det tidsmæssige aspekt. Anbefalingerne lægger op til, at information om og svar på analysen gives af en klinisk genetiker, og at patienterne på forhånd tager stilling til, hvilke typer af tilfældighedsfund de ønsker information om: alle tilfældighedsfund, tilfældighedsfund med behandlingsmæssig konsekvens eller ingen information om tilfældighedsfund. I politikpapiret beskrives desuden krav til de involverede laboratorier, herunder kvalifikationer for de kliniske laboratoriegenetikere, som er ansvarlige for analyse og tolkning af data.

PERSPEKTIVER

WES er allerede en del af den basale genetiske screening hos mange patientgrupper og anvendes også hos patienter med kendt klinisk diagnose, hvor der er betydelig genetisk heterogenitet, da det ressourcemæssigt i mange tilfælde er mere rationelt at foretage WES end Sanger-sekventering. WES vil på længere sigt blive erstattet af helgenomsekventering i takt med, at prisen på analysen falder, især fordi studieresultater tyder på, at helgenomsekventering har en højere detektionsrate og desuden kan erstatte *array*-CGH [18]. Helgenomsekventering bliver derfor formodentlig inden for relativt kort tid en del af den primære udredning for patienter, hos hvem man har mistanke om genetisk sygdom, herunder medfødte syndromer.

SUMMARY

Elsebet Østergaard, Lotte Risom, Jakob Ek, Sabine Grønborg, Morten Dunø & Flemming Skovby:

Exome sequencing for syndrome diagnostics

Ugeskr Læger 2017;179:V10160762

The majority of rare congenital disorders and syndromes have a genetic cause, but the diagnostic rate using standard workup is only around 50%. Whole exome and whole genome sequencing methods have improved the genetic diagnosis of syndromes during the latest few years. This article is a presentation of the current status of methods, results and ethical aspects, especially regarding incidental findings, of exome sequencing, which is now implemented in clinical diagnostics.

KORRESPONDANCE: *Elsebet Østergaard.*
E-mail: elsebet.ostergaard@dadlnet.dk

ANTAGET: 20. februar 2017

PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK: 24. april 2017

INTERESSEKONFLIKTER: ingen. Forfatternes ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

LITTERATUR

1. Michelson DJ, Shevell MI, Sherr EH et al. Evidence report: genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. Neurology 2011;77:1629-35.
2. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977;74:5463-7.
3. The Wellcome Trust Sanger Institute, Washington University Genome Sequencing Center, Whitehead Institute for Biomedical Research et al. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature 2004;431:931-45.
4. Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B et al. The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. Genet Med 2014;16:176-82.
5. Sawyer SL, Hartley T, Dyment DA 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;89:275-84.
6. Beaulieu CL, Majewski J, Schwartzentruber J et al. FORGE Canada Consortium: outcomes of a 2-year national rare-disease gene-discovery project. Am J Hum Genet 2014;94:809-17.
7. Valencia CA, Husami A, Holle J et al. Clinical impact and cost-effectiveness of whole exome sequencing as a diagnostic tool: a pediatric center's experience. Front Pediatr 2015;3:67.
8. Thevenon J, Duffourd Y, Masurel-Paulet A et al. Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders: toward clinical whole-exome sequencing as a first-line diagnostic test. Clin Genet 2016;89:700-7.
9. Tarailo-Graovac M, Shyr C, Ross CJ et al. Exome sequencing and the management of neurometabolic disorders. N Engl J Med 2016;374:2246-55.
10. Lazaridis KN, Schahl KA, Cousin MA et al. Outcome of whole exome sequencing for diagnostic Odyssey cases of an individualized medicine clinic: The Mayo Clinic Experience. Mayo Clin Proc 2016;91:297-307.
11. Yang Y, Muzny DM, Xia F et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. JAMA 2014;312:1870-9.
12. Lee H, Deignan JL, Dorrani N et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. JAMA 2014;312:1880-7.
13. Farwell KD, Shahmirzadi L, El-Khechen D et al. Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. Genet Med 2015;17:578-86.
14. Green RC, Berg JS, Grody WW et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. Genet Med 2013;15:565-74.
15. ACMG policy statement: updated recommendations regarding analysis and reporting of secondary findings in clinical genome-scale sequencing. Genet Med 2015;17:68-9.
16. Kalia SS, Adelman K, Bale SJ et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. Genet Med 2017;19:249-55.
17. www.dsmg.dk/index.php/dsmgs-policy-papers (26. okt 2016)
18. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. Nature 2014;511:344-7.