

Perspektiven und Grenzen der genetischen Diagnostik

Jahrestagung Schweizerische Arbeitsgemeinschaft von Ärzten für Menschen mit geistiger oder mehrfacher Behinderung Olten, 07.06.2018

Deborah Bartholdi

Abteilung für Humangenetik Universitätsklinik für Kinderheilkunde, Bern

The Hype



Exom Sequenzierung

Personalisierte Medizin

Gentest übers Internet

Translationelle Medizin

Genom Sequenzierung

Precision Medicine

Genomische Medizin

Genom Sequenzierung

Nicht Invasiver Pränataltest

Präimplantationsdiagnostik

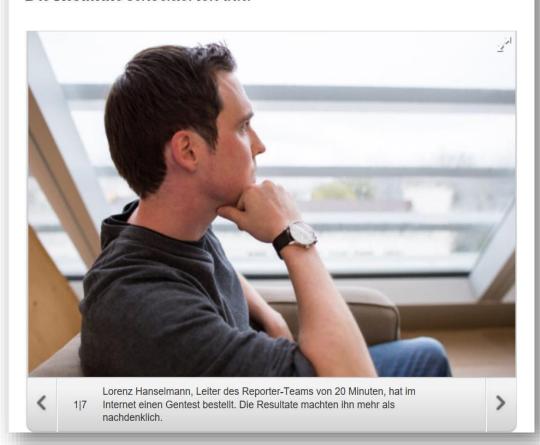
23andMe

Nutrigenomics

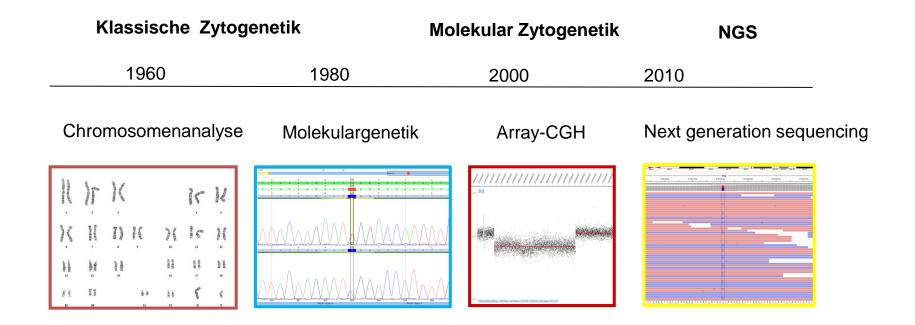


Als ich erfuhr, wie ich sterben werde

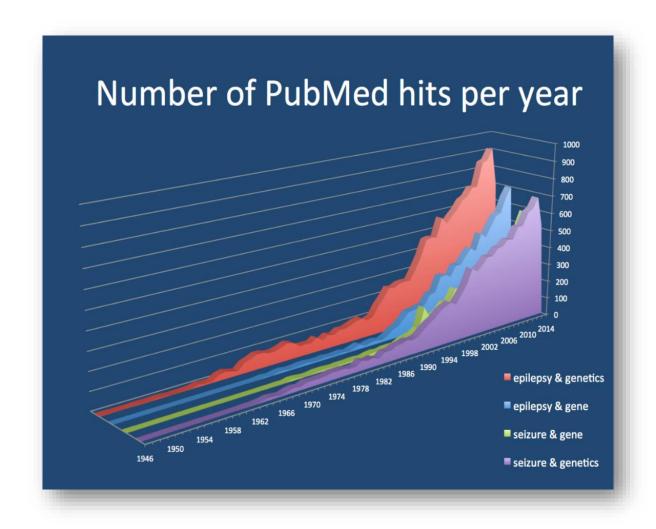
von L. Hanselmann - Ein Mitarbeiter von 20 Minuten hat seine Gene auf Krankheiten testen lassen. Er hätte es lieber nicht getan: Die Resultate schockierten ihn.



Technische Revolution in der Medizinischen Genetik



Genetics / Genomics of Epilepsies



Genetics / genomics

The three stages of epilepsy genetics First gene findings Frequent gene Genetic data rare treatments based Rare variants Big data on genetic findings regarded causative Strict criteria for Make genetics accessible to larger genetic causality patient population Main challenge: Main challenge: Main challenge: **Extensive efforts** Telling causative When can we trust required to identify variation from genomic genetic findings to make treatment noise genes decisions? Genetic literacy becomes more important

Indikation für genetische Abklärung -> Diagnosestellung

Schwere Spastizität, neu Epilepsie

Retinitis pigmentosa -> Prognose?

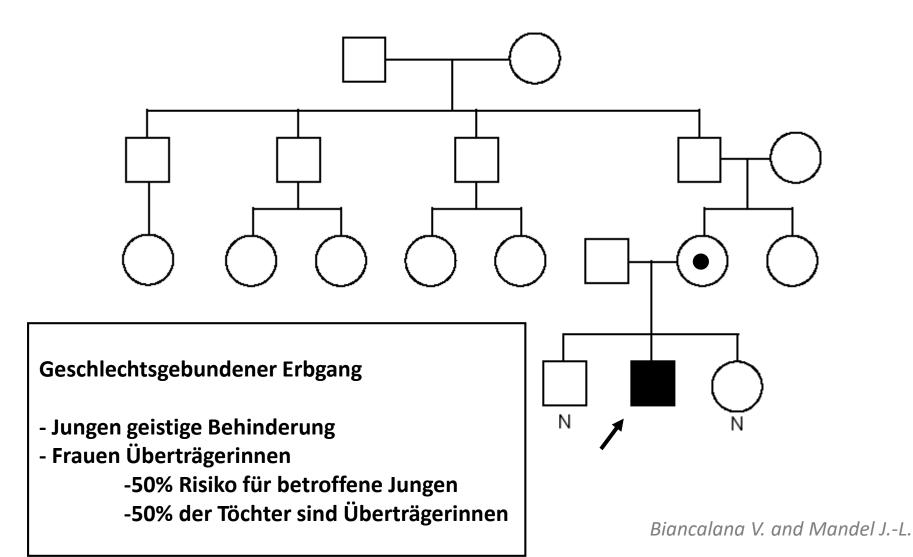
Schlecht einstellbarer
Diabetes und
Niereninsuffizienz

Schwester schwanger, Wiederholungsrisiko?

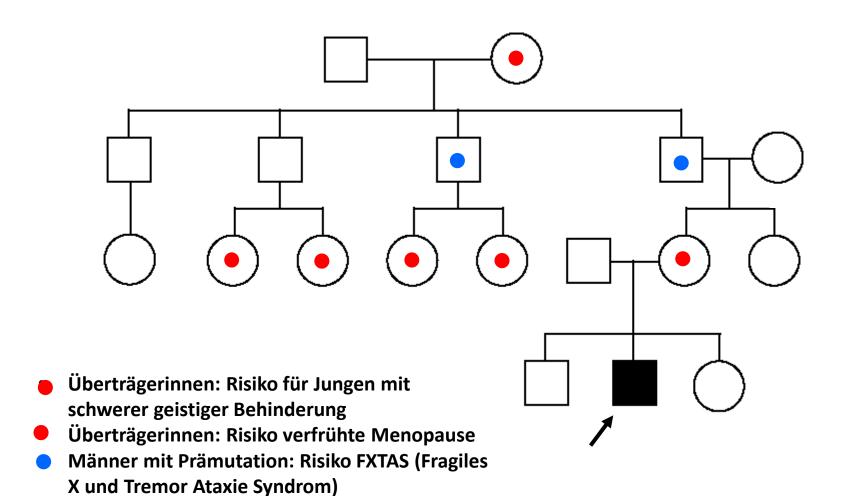
Diagnostellung

- kann unmittelbare therapeutische Konsequenzen für den Patienten haben
- kann ein Aussage zur Prognose machen
- Diagnosefindung -> "Recht des Patienten auf eine Diagnose"
- Kann Familienplanung der gesunden Geschwister beeinflussen

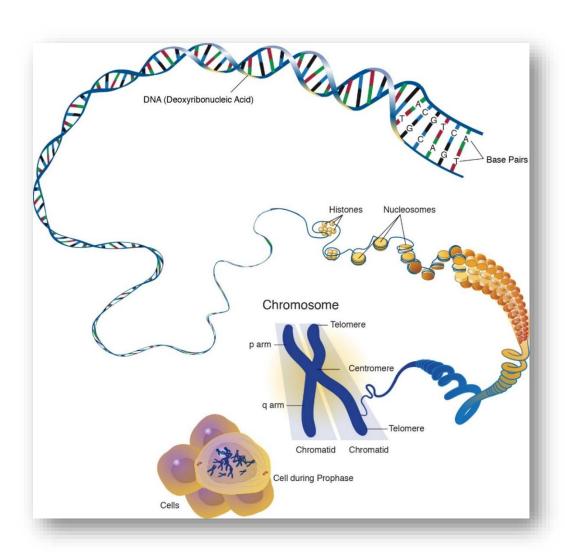
Beispiel geschlechtsgebundener Erbgang-> Fragiles X-Syndrom



Diagnose Fragiles X-Syndrom -> Implikationen für die Familie



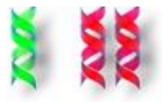
Einteilung genetische Erkrankungen



- 46 Chromosomen
 - Chromosomenstörungen, (Trisomien, Mikrodeletionen,...)
- ~20'000 Gene
 - Monogene Erkrankungen
 - (Cystische Fibrose, Rett Syndrom, ...)
- Modifizierung der DNA
 - Epigenetische Erkrankungen

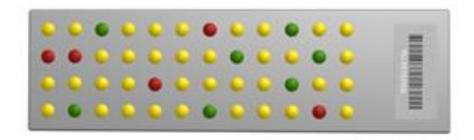
Array-CGH Technologie

Patienten DNA Kontrolle Patienten DNA Kontrolle Patienten DNA Kontrolle







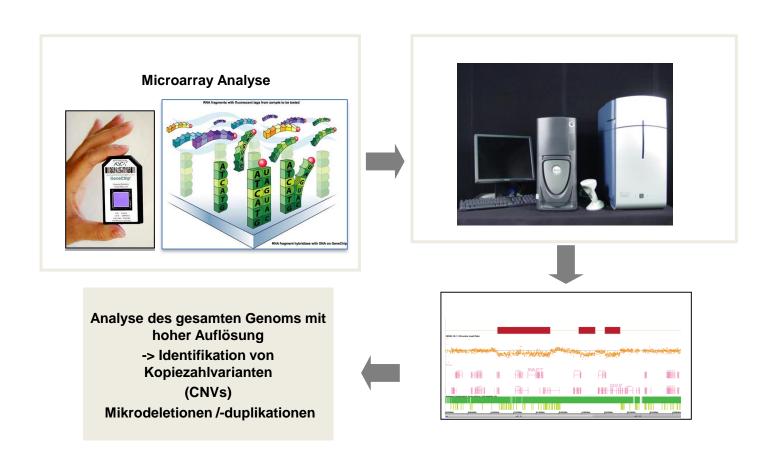


Gelb:normal

• Grün: Duplikation

Rot: Deletion

Prinzip Microarray-Analyse



Detektionsrate mittels Microarra-Analyse

ISCA Konsortium (Miller et al. 2010, AJHG)

- Patienten mit
 - Geistiger Behinderung, multiplen Fehlbildungen, Autismus-Spektrum-Störung
- 33 Studien, 21'698 Patienten eingeschlossen
 - Detektionsrate Microarray Analyse: ~15%
 - (Detektionsrate konventionelle Chromosomenanalyse: ~ 3%)

ARTICLE

Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies

David T. Miller,^{1,*} Margaret P. Adam,^{2,3} Swaroop Aradhya,⁴ Leslie G. Biesecker,⁵ Arthur R. Brothman,⁶ Nigel P. Carter,⁷ Deanna M. Church,⁸ John A. Crolla,⁹ Evan E. Eichler,¹⁰ Charles J. Epstein,¹¹ W. Andrew Faucett,² Lars Feuk,¹² Jan M. Friedman,¹³ Ada Hamosh,¹⁴ Laird Jackson,¹⁵ Erin B. Kaminsky,² Klaas Kok,¹⁶ Ian D. Krantz,¹⁷ Robert M. Kuhn,¹⁸ Charles Lee,¹⁹ James M. Ostell,⁸ Carla Rosenberg,²⁰ Stephen W. Scherer,²¹ Nancy B. Spinner,¹⁷ Dimitri J. Stavropoulos,²² James H. Tepperberg,²³ Erik C. Thorland,²⁴ Joris R. Vermeesch,²⁵ Darrel J. Waggoner,²⁶ Michael S. Watson,²⁷ Christa Lese Martin,² and David H. Ledbetter^{2,*}

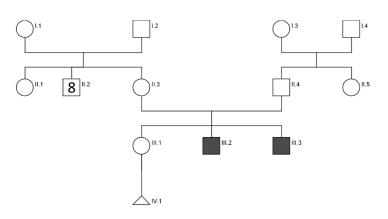
Microarray analysis in patients with developmental disability

Hochstenbach et al. 2011

Patient cohort	Median probe spacing	Number of studies	Number of patients studied
selected	0.5-1.5 Mb	16 ^k	1,749
selected	30-70 kb	9	1,223
selected	6-12 kb	8	598
unselected	targeted	9	16,143
unselected	30-70 kb	3	1,703
unselected	8–12 kb	2	416

13.7% 12.4% 17.7% 6.7% 10.0% 13.9%

Beispiel: Junge Schwangere mit 2 geistig behinderten Brüdern





Coffin-Lowry Syndrom (CLS)

- Brüder in der Kindheit Diagnose Coffin-Lowry Syndrom (CLS)
- CLS: Geschlechtsgebundene Erkrankung, für Schwester bestünde ein Risiko von 50%, Überträgerin zu sein, Hälfte ihrer Jungen wären betroffen
- Microarray-Analyse zeigt Microduplication 16p13.3
- ->Risiko für schwangere Schwester sehr klein, betroffene Kinder zu haben

Beispiel Junge mit Entwicklungsretrdierung

Anamnese

- 5-jähriger Junge mit deutlichem Entwicklungsrückstand (IQ 55)
- Freundlich, lebhaft
- 2 gesunde jüngere Schwestern
- Grenzwertige Mikrozephalie, keine anderen Fehlbildungen
- Dysmorphologischer Status unauffällig
- Eltern wünschen Diagnose, "um eine Antwort zu haben"

Microarray-Analyse

- Heterozygote Deletion 17p13.2-p131, umfasst 5 Mb de novo, erklärt Entwicklungsrückstand
- Deletion umfasst TP53-Gen
- TP53-Gen: Tumorsuppressor-Gen
- Mutationen: Nebennierenkarzinome, Osteosarkome, Hirntumore, können bereits im Kindesalter auftreten

Konsequenzen

- Tumorvorsorgeuntersuchungen
- Starke Beunruhigung der Eltern

Beispiel Mädchen mit Epilepsie

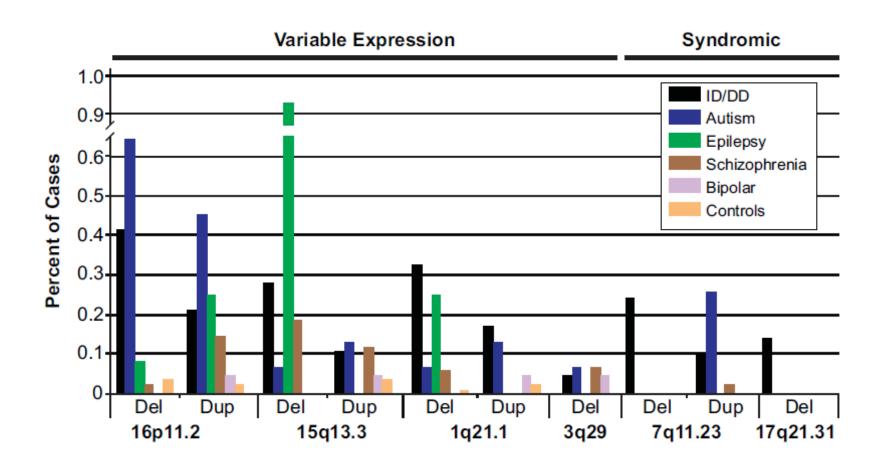
Anamnese

- Unauffällige Schwangerschaft, Geburt und Neonatalperiode
- 3-Monate: West Syndrom
- Gutes Ansprechen auf medikamentöse
 Therapie
- Entwicklung in allen Bereichen knapp altersentsprechend
- Wiederholungsrisiko?

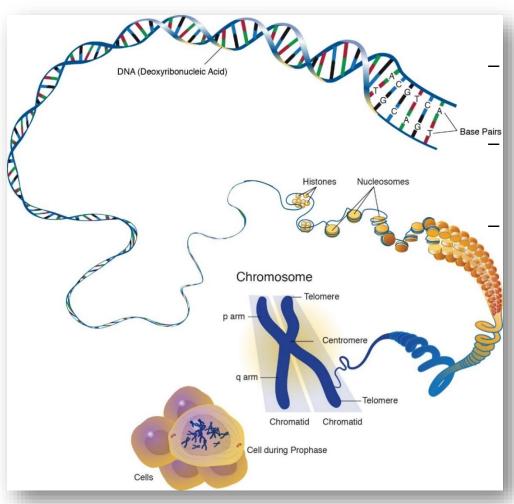
Befund Microarray

- Mikrodeletion 15q13.3, pat
- Vater mit sozialer Phobie
- Väterlicher Onkel mit Autismus und Epilepsie

Reduzierte Penetranz und variable Expressivität von Mikrodeletionen / -duplikationen



Next Generation Sequencing (NGS)



46 Chromosomen

 Chromosomenstörungen, (Trisomien, Mikrodeletionen,...)

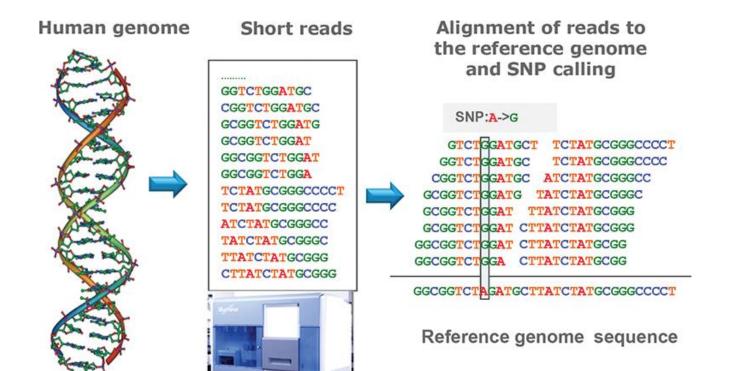
~20'000 Gene

- Monogene Erkrankungen
- (Cystische Fibrose, Rett Syndrom, ...)

Modifizierung der DNA

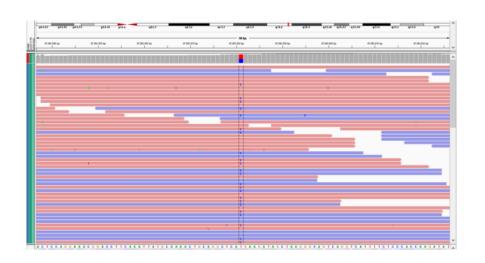
 Epigenetische Erkrankungen

Next generation sequencing (NGS)



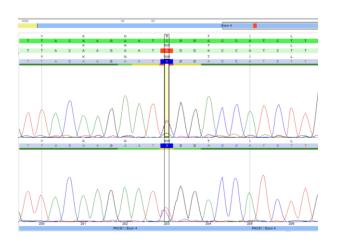
Next Generation Sequencing versus Sanger Sequenzierung

Next Generation Sequencing



"random" sequencing, mapping of reads

Sanger Sequenzierung



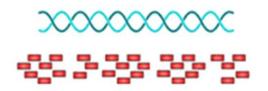
Sequenzierung einer spezifischen Sequenz

Next generation sequencing (NGS) Terminologie / Technologien

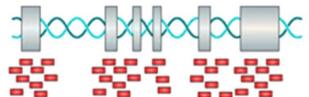
- Panel-Diagnostik
 - «targeted exome analysis» TES, «targeted resequencing analysis (TRS),
 «clinical exome sequencing» CES
 - Analyse einer Gruppe von Genen (Ataxien, Myopathien, Retinopathien, Skelettdysplasien....)
 - Typischerweise 5-100 Gene
- Whole exome sequencing, WES
 - Sequenzierung aller 20'000 Gene
 - Sequenzierumfang: 45 Mb
- Whole genome sequencing, WGS
 - Sequenzierung des gesamten Genoms (Exone und Introne)
 - Sequenzierumfang: 3.2 Milliarden Basenpaare

Whole Genome sequencing (WGS), Whole Exome Sequencing (WES), Targeted Sequenzing (Panel)

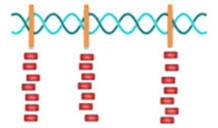
Whole genome sequencing



Whole exome sequencing



Targeted sequencing



- Sequencing region : whole genome
- Sequencing Depth: >30X
- Covers everything can identify all kinds of variants including SNPs, INDELs and SV.

- Sequencing region: whole exome
- Sequencing Depth: >50X ~ 100X
- Identify all kinds of variants including SNPs, INDELs and SV in coding region.

- Sequencing region: specific regions (could be customized)
- Sequencing Depth: >500X
- Identify all kinds of variants including SNPs, INDELs in specific regions

Exome sequencing, proof of principle

ARTICLES

genetics

Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder

Sarah B Ng^{1,10}, Kati J Buckingham^{2,10}, Choli Lee¹, Abigail W Bigham², Holly K Tabor^{2,3}, Karin M Dent⁴, Chad D Huff⁵, Paul T Shannon⁶, Ethylin Wang Jabs^{7,8}, Deborah A Nickerson¹, Jay Shendure¹ & Michael J Bamshad^{1,2,9}

Exome sequencing, proof of principle Identification of gene for Miller syndrome



Kindre	ds 1+2	Kindreds	1+2+3	
Dominant	Recessive	Dominant F	Dominant Recessive	
3,099	1,810	2,654	1,525	
105	25	63	21	
117	7	38	4	
26	1*	8	1*	
5	0	2	0	

- 4 affected individuals in 3 unrelated families
- 1 candidate gene: DHODH
- confirmed as the Miller syndrome gene

How to establish a diagnosis, "traditional approach"

Pattern recognition

combination of malformations/ dysmorphic features clinical examination, history, family history, additional findings (e.g. developmental assessment, X-rays, brain MRI, muscle biopsy, biochemical testing,...)

• Prerequisite: reliable clinical assessment



Establish differential diagnosis

-> experience, computer programs, colleagues



Targeted genetic testing, driven by hypothesis

-> diagnosis confirmed / not confirmed

How to establish a diagnosis in the genomic era, "reverse phenotyping"

Genetic testing as a first step, "screening" approach no or vague differential diagnosis / hypothesis

-Next generation sequencing approach (whole exome, whole genome analysis)

hypothesis on inheritance pattern -> filtering steps



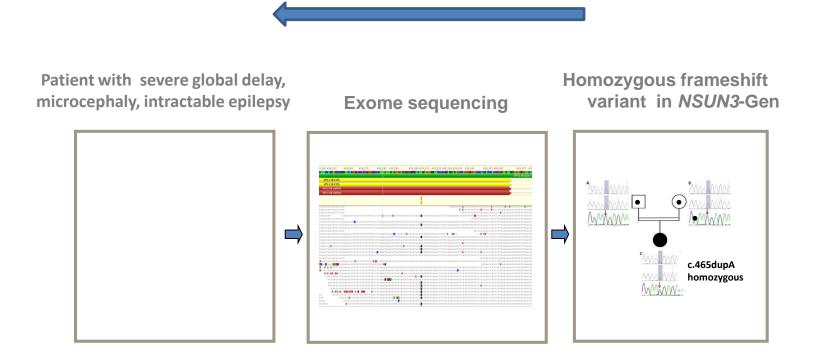
Interpretation of variants

-> Check back on phenotype



-> Diagnosis established / still no diagnosis

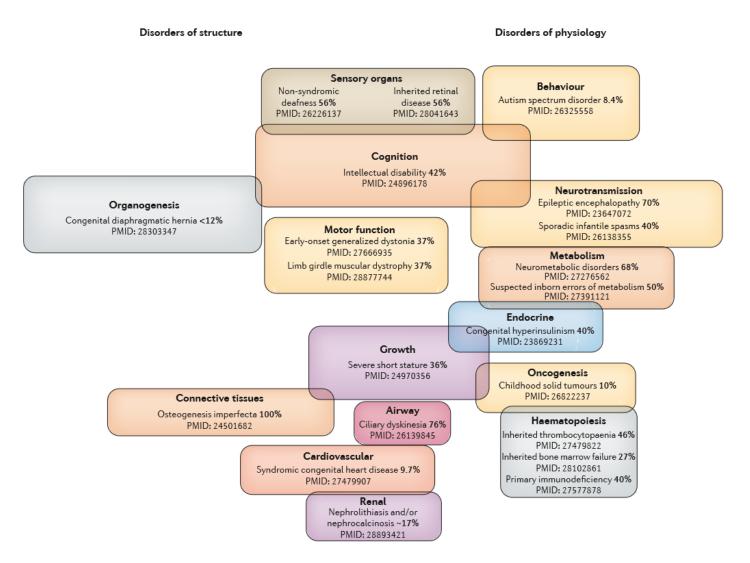
Example "reverse phenoyping"



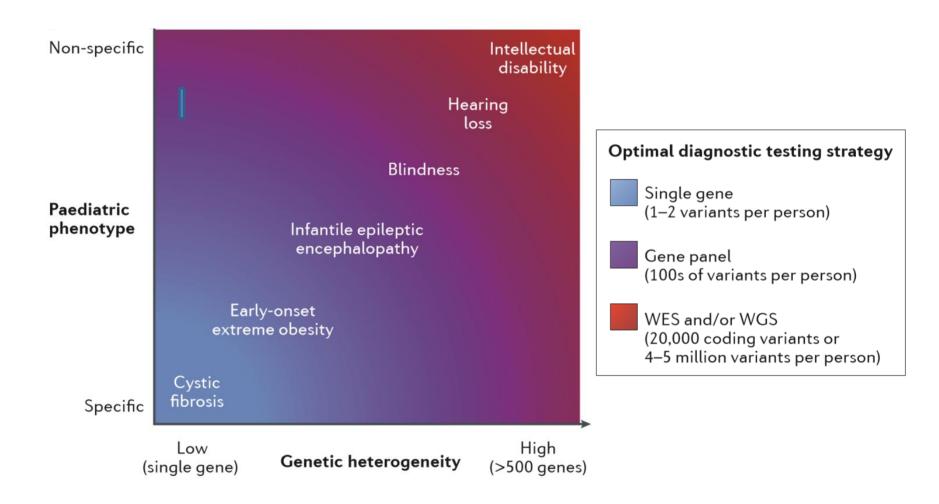
NSUN3-Gen:

- Mitochondriopathie, bis jetzt erst ein Patient in der Fachliteratur beschrieben
- Spielt wichtige Rolle bei der Methylierung der mt-tRNA
- Ist nicht mit den üblichen paraklinischen Befunden einer Mitochondriopathie assoziiert

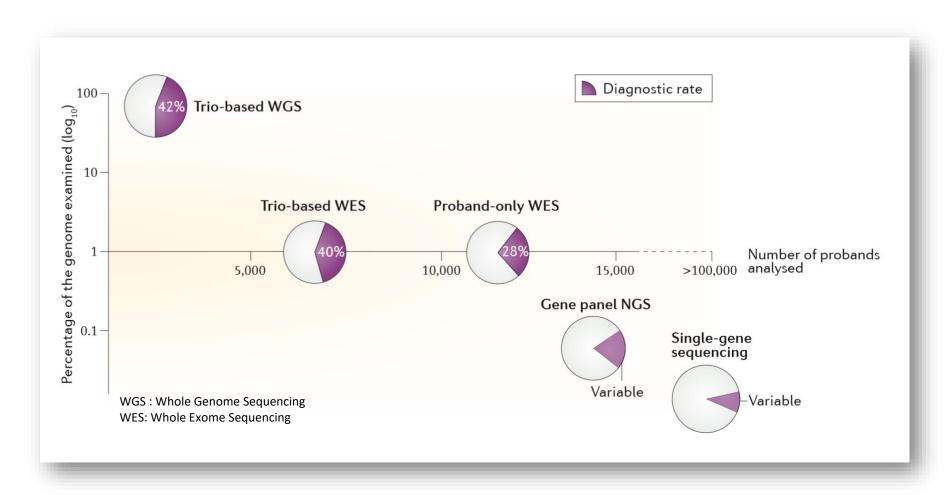
Detektionsrate genomische Testung in Abhängigkeit des Krankheitsbildes



Beste genomische Testmethode in Abhängigkeit vom Krankheitsbild



Detektionsrate in Abhängigkeit der angewandten genomischen Testmethode



Canadian Study: Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey

Sawyer et al., Clinical Genetics 2016



- Nation-wide effort to identify mutations for childhood-onset disorders using whole exome sequencing
- 362 families includes who had received standard of care evaluation, end of diagnostic odyssey
- Outcome: novel gene discovery, identification of mutations in known disease genes
- Diagnostic yield ~29%

Canadian Study: Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey Sawyer et al., Clinical Genetics 2016

Explanation for missed diagnosis:

Table 2. Explanations for families who received a molecular diagnosis in FORGE using WES who had not been diagnosed during standard-of-care clinical genetics evaluation

Explanation	Number of families ($N = 105$)
Genetic heterogeneity	49
Atypical presentation	26
Missed by another method	9
Gene identified while in the pipeline	e 9
Extremely rare condition	5
Conflation	4
Limited access to testing	3

FORGE, Finding Of Rare Disease GEnes; WES, whole-exome sequencing.

Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (2016)

Minimum list includes 59 medically actionable genes

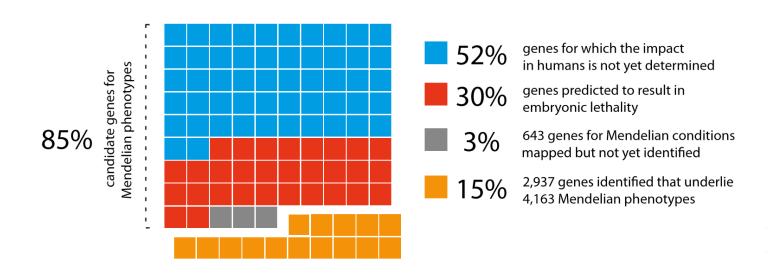
BRCA1 or BRCA2 Breast/ovarian cancer MSH6, PMS2, CHD1 GI cancer LDLR Hypercholesterolemia LMNA1, MYBPC3, DSG2, Cardiomyopathy MYH7, MYL2, MYL3, PKP2, TNNI3, TNNT2 RYR1 Malignant hyperthermia KCNQ1, SCN5A Arrhythmia Multiple endocrine neoplasia RET TP53 Li-Fraumeni syndrome DSC2, DSP Arrhythmogenic right ventricular dysplasia

ACMG gene total

Non-ACMG genes SERPINA1 Lung disease PROC Protein C deficiency **PROS** Protein S deficiency ATP7B Wilson disease Hereditary hemorrhagic ENG, ACVRL1 telangiectasia **FLCN** Birt-Hogg-Dube DMD Cardiomyopathy KCNE1, KCNE2 Arrhythmia SLC7A9 Cystinuria Porphyria **HMBS** PTCH1 Basal cell nevus syndrome

Relationship between human protein-coding genes and Mendelian phenotypes

Chong et al. AJHG 2015



~20,000 protein-coding genes are predicted to exist in the human genome Only a minority are linked to a Mendelian phenotype

VINSELSPITAL UNIVERSITÄTSSPITAL BERN HOPITAL UNIVERSITAIRE DE BERNE BERN UNIVERSITY HOSPITAL

Zusammenfassung genetische Diagnostik

- Die großen technologische Fortschritte erlauben eine immer umfassendere und schnellere genetische Diagnostik bei Kindern/Erwachsenen mit einer Behinderung
- Mittels genomischer Analysen (Microarray / Panel Analyse und Exom/Genom Sequenzierung) gelingt es, bei ca. 50% der Patienten eine klare Diagnose zu stellen
- Eine korrekte Diagnose ist die Grundlage für die medizinische Betreuung von Menschen mit einer Behinderung und die Stellung einer Diagnose kann u.U. weitreichende Konsequenzen für andere Familienmitglieder haben
- Genomische Analysen können unklare Befunde liefern (VOUS; Variants Of Unknown Significance), welche zu grosser Verunsicherung und einer Flut von (unnötigen?) Abklärung führen können
- Bei umfassenden genomischen Analysen besteht ein Risiko von bis zu 0.5%, einen Zufallsbefund zu erheben, welcher Implikationen für das medizinische Management hat ("actionable findings")
- Parallel zum technischen Fortschritt steigt der Bedarf nach kompetenter genetischer Beratung (Prätest und Posttest) und interdisziplinärer Zusammenarbeit, die "genetic literacy" wird immer wichtiger