

medgen 2014 · 26:246–254
DOI 10.1007/s11825-014-0446-8
Online publiziert: 12. Juni 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

F. Kortüm¹ · H. Abdollahpour^{1,2} · M. Alawi^{3,4} · G.C. Korenke⁵ · E. Seemanova⁶ · S. Tinschert^{7,8} · M. Zenker⁹ · G. Rosenberger¹ · K. Kutsche¹

¹ Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

² Aktuelle Adresse: MVZ genteQ GmbH, Hamburg

³ Bioinformatics Service Facility, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

⁴ Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie, Virus Genomik, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg

⁵ Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Neuropädiatrie, Klinikum Oldenburg

⁶ Department of Clinical Genetics, Institute of Biology and Medical Genetics, University Hospital Motol, Second Medical School, Charles University Prague

⁷ Sektion für Humangenetik, Department für Medizinische Genetik, Molekulare und Klinische Pharmakologie, Medizinische Universität Innsbruck

⁸ Institut für Klinische Genetik, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, TU Dresden

⁹ Institut für Humangenetik, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Exomsequenzierung zur Identifizierung von Krankheitsgenen für seltene Syndrome

Erfahrungen aus Hamburg

Die Exomsequenzierung ist heutzutage die Methode der Wahl, um die krankheitsursächliche genetische Veränderung bei Patienten mit einer ungeklärten, nach mendelschen Regeln vererbter Krankheit aufzudecken [5, 17, 35]. Die Exomsequenzierung bietet mehrere Vorteile: sie ist schnell, effektiv, kostengünstig und ermöglicht die Aufdeckung von Mutationen bei seltenen Krankheiten, selbst ohne große Stammbäume oder Konsanguinität (wie dominante De-novo-, compound-heterozygote und X-chromosomale Mutationen; [9]). Auch somatische Mosaik (z. B. Proteus-Syndrom und Sturge-Weber-Syndrom) konnten bereits durch die Exomsequenzierung aufgeklärt werden [21, 22, 30, 37]. Methodische Probleme bei der Herstellung der DNA-Bibliotheken und/oder der Anreicherung bzw. Vervielfältigung der zu sequenzierenden Bereiche schränken das Auffinden von pathogenen Sequenzvarianten durch Exomsequenzierung ein. Limitierend ist auch die Beschränkung auf die Exons aller humanen Gene, wobei hier die derzeit bekannten proteincodierenden Gene inklusive der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen, microRNA- sowie nichtcodierende RNA-

Gene, nicht aber die Pseudogene gemeint sind. Da aktuell immer noch davon ausgegangen wird, dass 85% der krankheitsrelevanten Mutationen in codierenden bzw. funktionell wichtigen Regionen vorkommen [23], ist die Exomsequenzierung bei Patienten mit ungeklärter, wahrscheinlich monogen bedingter Krankheit dennoch die erfolgversprechendste Methode, um molekulargenetisch eine Diagnose zu stellen. Diese ermöglicht eine individuelle genetische Beratung der Patienten/Ratsuchenden sowie einen Einblick in die Pathophysiologie der Krankheit und kann, langfristig gesehen, einer besseren Patientenversorgung durch personalisierte Therapieoptionen dienen.

Etablierung der Exomsequenzierung am Institut für Humangenetik in Hamburg

Die Autoren arbeiten seit vielen Jahren an der Aufklärung seltener mendelscher Krankheiten. Mittels Bruchpunkteingrenzung von balancierten chromosomalen Aberrationen bei phänotypisch auffälligen Patienten identifizierten die Autoren in der Vergangenheit mehrere neue

Krankheitsgene [13, 18, 26]. Diese Strategie ist jedoch für viele Krankheitsbilder nicht zielführend. Beispielsweise konnten die Autoren das ursächliche Krankheitsgen für das Costello-Syndrom, dem De-novo-Funktionsgewinnmutationen (Punktmutationen) im *HRAS*-Gen zugrunde liegen, mittels Bruchpunktkartierung nicht finden [3, 24, 31, 33]. Diese Lücke wurde in Hamburg durch die Etablierung der Exomsequenzierung geschlossen: Mithilfe dieser Technologie wollen die Autoren die genetischen Ursachen verschiedener Syndrome, wie des Zimmermann-Laband-Syndroms, des Hallermann-Streiff-Syndroms, des MIDAS-Syndroms („microphthalmia with linear skin defects“, „MLS syndrome“) und der RASopathien (Noonan-, Cardio-facio-cutaneous (CFC)-, Costello-Syndrom) aufdecken. Da für diese Krankheiten Patientenkohorten zur Verfügung stehen, können aus der Exomsequenzierung von ausgewählten Patienten gewonnene Kandidatengene durch Sanger-Sequenzierung bei weiteren Betroffenen analysiert und ggf. als Krankheitsgene verifiziert werden. Sollten mehrere unterschiedliche Kandidatengene aufgedeckt werden, empfiehlt

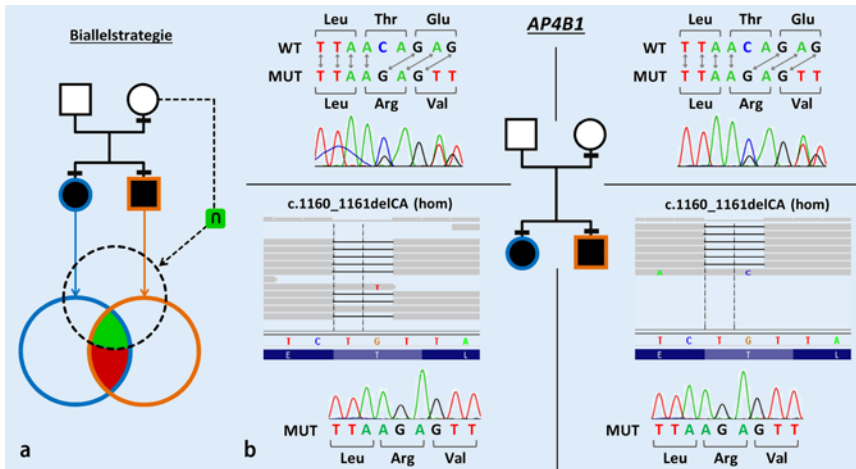


Abb. 1 ▲ Homozygote 2-bp-Deletion (c.1160_1161delCA) im *AP4B1*-Gen bei einem Geschwisterpaar mit einer syndromalen Form der Intelligenzminderung (AP4-Defizienz-Phänotyp). **a** Biallelstrategie, einem autosomal-rezessiven Erbgang folgend, nach Exomsequenzierung. Die Filterung wurde so durchgeführt, dass die betroffenen Geschwister je eine Variante (Allelfrequenz $\leq 1\%$ oder nicht annotiert) auf den beiden Allelen eines Gens (biallelisch) aufweisen. Möglichkeit 1: Die Geschwister sind compound-heterozygot für 2 Varianten und die Mutter trägt eine der beiden im heterozygoten Zustand. Möglichkeit 2: Die Geschwister sind homozygot (*hom*) und die Mutter ist für diese Variante heterozygot. Die Balken über/unter den Stammbaumsymbolen kennzeichnen Personen, bei denen eine Exomsequenzierung durchgeführt wurde. Die Kreise unterhalb des Stammbaumes repräsentieren die durch Exomsequenzierung identifizierten Varianten (*farbige Kreise* repräsentieren die Varianten bei den Betroffenen; der *gestrichelte Kreis* entspricht Varianten bei der gesunden Mutter). *n* Schnittmenge, *rote Fläche* ausgeschlossene Varianten, *grüne Fläche* durch Schnittmengenbildung eingegrenzte Varianten (putativ pathogene Sequenzvarianten). **b** Sequenzdaten der Familie. Die c.1160_1161delCA-Mutation im *AP4B1*-Gen aus der Exomsequenzierung ist bei den betroffenen Geschwister mittels Integrative Genomics Viewer (IGV) visualisiert (*links bzw. rechts* vom Stammbaumsymbol); dargestellt sind die revers-komplementäre Nukleotidsequenz sowie die reverse Aminosäuresequenz (Wildtyp, WT) im 1-Buchstaben-Code. Ausschnitte aus den Elektropherogrammen nach Sanger-Sequenzierung zeigen die c.1160_1161delCA-Mutation (p.Thr387Argfs*30) bei den betroffenen Kindern homozygot (*unten*) und bei den Eltern heterozygot (*oben*). *Über bzw. unter* den Elektropherogrammen ist jeweils die WT- und/oder die mutierte (MUT-)Sequenz angegeben. Die codierten Aminosäuren sind im 3-Buchstaben-Code angegeben

es sich zu prüfen, ob die von diesen Genen codierten Proteine eine gemeinsame zellphysiologische Aufgabe erfüllen, z. B. in den gleichen Signaltransduktionsweg eingebunden sind. Darüber hinaus verfolgen die Autoren das Ziel, bei Patienten aus der klinischen Genetik, die einen definierten, genetisch aber nicht aufgeklärten oder unklaren Phänotyp aufweisen, Exomsequenzierung durchzuführen, um die mögliche genetische Ursache zu diagnostizieren.

Im Sommer 2011 wurde die Exomsequenzierung am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) auf dem Genome Analyzer Iix (GAIIx, Fa. Illumina®) etabliert. Im Herbst 2012 wurde auf das HiSeq™2000-System (Fa. Illumina®) gewechselt, das inzwischen zum HiSeq™2500-System aufgerüstet wurde. Auf dem GAIIx wurden 18 Exome in 4 Läu-

fen, mittels HiSeq™2000-System 67 Exome in 3 Läufen und mit dem HiSeq™2500 18 Exome in 2 Läufen sequenziert. Zur Exomanreicherung wurde das Nextera™-DNA-sample-preparation-Kit verwendet; damit wurden beim letzten Exomsequenzierlauf (HiSeq™2500) über 98% aller angereicherten Basen abdeckt (horizontale „coverage“), wobei etwa 90% der Basen mindestens 10-fach (10 Reads) und etwa 50% der Basen mindestens 40-fach (40 Reads) sequenziert wurden (vertikale „coverage“). Die vertikale Abdeckung ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal bei der Exomsequenzierung, sie sollte für diagnostische Zwecke mindestens das 30-Fache betragen [38]. Eine heterozygote Sequenzvariante sollte in mindestens 20% und eine homozygote in mindestens 80% der Reads vorliegen. Weitere Qualitätskriterien für die Exomsequenzierung, wie

etwa die Güte der auf dem Sequenziergerät generierten Rohdaten oder die korrekte Zuordnung der Sequenzen anhand des Referenzgenoms (Mapping), sind in der weiterführenden Literatur ausführlich dargelegt [15, 29]. Die bioinformatische Auswertung der Exomdaten erfolgt mittels einer in der Bioinformatik Service Facility des UKE etablierten Analysepipeline, die hauptsächlich auf den Softwarepaketen „Burrows-Wheeler Aligner“ („alignment“ zum humanen Referenzgenom hg19 der University of California, UCSC, [19]), „SAMtools“ (Datenprozessierung und „variant calling“, [20]) und „Genome Analysis Toolkit“ (Datenprozessierung und „variant calling“, [25]) basiert. Im Folgenden werden 4 Fallbeispiele vorgestellt: 2 sporadische Fälle, ein betroffenes Geschwisterpaar und eine Familie mit einer über 3 Generationen vererbten Krankheit. Anhand dieser Beispiele wird gezeigt, wie durch Exomsequenzierung und verschiedene Strategien zur Priorisierung der identifizierten Sequenzvarianten eine mit hoher Wahrscheinlichkeit krankheitsursächliche Mutation aufgedeckt werden kann.

Fallbeispiele

Biallelstrategie bei familiärer syndromaler Form von Intelligenzminderung (AP4-Defizienz)

Bei einem aus Tschechien stammenden Geschwisterpaar gesunder Eltern liegen als gemeinsame klinische Merkmale eine schwere Intelligenzminderung, eine Mikrozephalie und eine spastische Tetraparese vor (■ **Abb. 1**). Bei dem Mädchen und ihrem 2 Jahre jüngeren Bruder fiel im Alter von etwa jeweils 3 Monaten eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung auf. Die Kinder hatten mit 18 bzw. 20 Monaten Laufen erlernt und erste Worte im Alter von 18 bzw. 24 Monaten gesprochen. Der Junge konnte bis zum Alter von 7,5 Jahren frei laufen, danach nur noch mit Hilfe. Ab dem Alter von 12 Jahren war er, wie seine Schwester, an den Rollstuhl gebunden. Beide Kinder hatten Fieberkrämpfe. Bei der letzten Vorstellung der Geschwister im Alter von 14 bzw. 12 Jahren wurden ein geringer Kopfumfang (-2 Standardabweichung, SD), ein kleiner Wuchs (-2 SD) und Klumpfüße dia-

gnostiziert. Beide zeigten eine spastische beinbetonte Tetraparese mit Kontrakturen, Hyperreflexie und positivem Babinski-Zeichen. Die Intelligenzminderung ist beim Jungen schwerer ausgeprägt als bei seiner Schwester; beide kommunizieren nichtverbal, sind ängstlich und schüchtern.

Da betroffene Geschwisterpaare angesichts gesunder Eltern einen autosomal-rezessiven Erbgang nahelegen, wurden die Exome der Schwester und des Bruders sowie der gesunden Mutter sequenziert. Bei diesem Lauf, einem der ersten Läufe der Autoren auf dem GAIIX, wurden über 97% aller Basen mit einer durchschnittlichen 30-fachen Abdeckung sequenziert (etwa 83% der Basen mindestens 10-fach und etwa 23% der Basen mindestens 40-fach). Pro Exom wurden etwa 35.000 Varianten gefunden. Zunächst wurden compound-heterozygote Mutationen bei Schwester und Bruder überprüft, da die Eltern nicht von einer Verwandtschaft ihrer Vorfahren berichteten. Die bioinformatische Filterung wurde so gewählt, dass die Kinder 2 heterozygote Mutationen in einem Gen tragen sollten; das Vorliegen von nur einer der beiden bei den Kindern gefundenen Varianten bei der Mutter in heterozygotem Zustand führte zum Einschluss der entsprechenden Varianten in die weitere Analyse (■ **Abb. 1**). Es wurde auf bekannte Varianten mit einer geringen Allelfrequenz ($\leq 1\%$) und auf solche, die nicht in den Datenbanken dbSNP, 1000Genomes und NHLBI Exome Sequencing Project (Exome Variant Server; EVS) annotiert sind, fokussiert. Die auf diese Weise gefilterten Exomdaten ergaben keine vielversprechenden compound-heterozygoten Varianten bei den Geschwistern. Da beide Eltern der betroffenen Kinder aus demselben Dorf stammen und eine Blutsverwandtschaft nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde in einem 2. Anlauf die Filterungsstrategie auf die Identifizierung von homozygoten Varianten bei den Geschwistern, die in heterozygoter Form bei der Mutter vorliegen, abgeändert (■ **Abb. 1**). Da die mittlere Abdeckung für diesen Exomlauf suboptimal war (30-fach), wurden auch Sequenzabschnitte mit niedriger Abdeckung (etwa 10-fach) ausgewertet und Varianten als

medgen 2014 · 26:246–254 DOI 10.1007/s11825-014-0446-8
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

F. Kortüm · H. Abdollahpour · M. Alawi · G.C. Korenke · E. Seemanova · S. Tinschert · M. Zenker · G. Rosenberger · K. Kutsche

Exomsequenzierung zur Identifizierung von Krankheitsgenen für seltene Syndrome. Erfahrungen aus Hamburg

Zusammenfassung

Hintergrund. Die Exomanalyse ist als Methode zur Identifizierung von pathogenen Sequenzvarianten bei Patienten mit einem nach den mendelschen Regeln vererbten Krankheitsbild nicht mehr wegzudenken. Sie bildet umfassend die codierenden Sequenzen eines Genoms ab und ist schnell und kostengünstig.

Problemstellung. Da die technischen Schwierigkeiten bei der Durchführung der Exomsequenzierung inzwischen weitgehend gelöst sind, stellt die Auswertung der großen Datenmenge und somit das Finden der pathogenen Sequenzvariante inmitten 10.000er Sequenzabweichungen die eigentliche Herausforderung dar. Dies kann nur mithilfe einer bioinformatischen Filterung der

Daten erfolgen, die jeweils unter Berücksichtigung der in die Analyse einbezogenen Patienten und Familienmitglieder sowie des wahrscheinlichsten Erbganges angepasst werden muss.

Lösungsansätze. Anhand von 4 Fallbeispielen werden verschiedene Priorisierungsstrategien für die Filterung der Sequenzvarianten vorgestellt, die jeweils zur Identifikation der wahrscheinlich pathogenen Veränderung bei dem jeweiligen Indexpatienten geführt haben.

Schlüsselwörter

Hochdurchsatznukleotidsequenzierung · Exom · Variantenpriorisierung · Mendelsche Krankheit · Molekulare Diagnostik

Exome sequencing for identification of disease genes for rare syndromes. Experiences from Hamburg

Abstract

Background. Whole exome sequencing (WES) is the state-of-the-art method for identification of pathogenic mutations in patients with a Mendelian disorder. WES comprehensively covers the coding sequence of the genome and is a fast and cost-effective technique.

Purpose. As most of the technical difficulties have been overcome for WES, the major issue is data processing and analysis to find the pathogenic sequence variation among tens of thousands of sequence changes. Bioinformatic analysis pipelines for filtering sequence variants have to be adapted according to the

patients and family members examined by WES and the most likely inheritance pattern underlying the disease.

Possible approaches. Based on 4 cases, different variant prioritization strategies which led to identification of the most likely causative changes in the index patients are described.

Keywords

High-throughput nucleotide sequencing · Exome · Variant prioritization · Mendelian disorder · Molecular diagnostics

homozygot deklariert, die mindestens in 80% der Reads bei den Geschwistern auftraten. Dabei fiel die in den Datenbanken nicht verzeichnete 2-Bp-Deletion c.1160_1161delCA (p.T387Rfs*30) im *AP4BI*-Gen, einem bereits bekannten Krankheitsgen, auf (■ **Abb. 1**; [2, 6]). Durch Sanger-Sequenzierung wurde die homozygote Frameshift-Mutation im Exon 7 des *AP4BI*-Gens bei den Geschwistern bestätigt und diese in heterozygotem Zustand bei beiden Eltern festgestellt (■ **Abb. 1**). *AP4BI* codiert eine von 4 Untereinheiten, AP4B1 ($\beta 1$), AP4E1 ($\epsilon 1$), AP4M1 ($\mu 1$) und AP4S1 ($\sigma 1$), des ubi-

quitär exprimierten Adaptorkomplexes AP-4, der eine wichtige Rolle bei vesikulären Transportvorgängen zwischen Golgi-Apparat und Endosomen spielt [12, 16]. Die aufgedeckte homozygote Frameshift-Mutation in *AP4BI* geht höchstwahrscheinlich mit einem Loss-of-function-Effekt einher. Aufgrund ihrer Identifikation bei dem Geschwisterpaar mit einer autosomal-rezessiven Form der Intelligenzminderung in Kombination mit spastischer Paraplegie (spastische Paraplegie Typ 47, SPG47, Mendelian Inheritance in Man, MIM, 614066) konnte eine molekulare Diagnose gestellt werden [1].

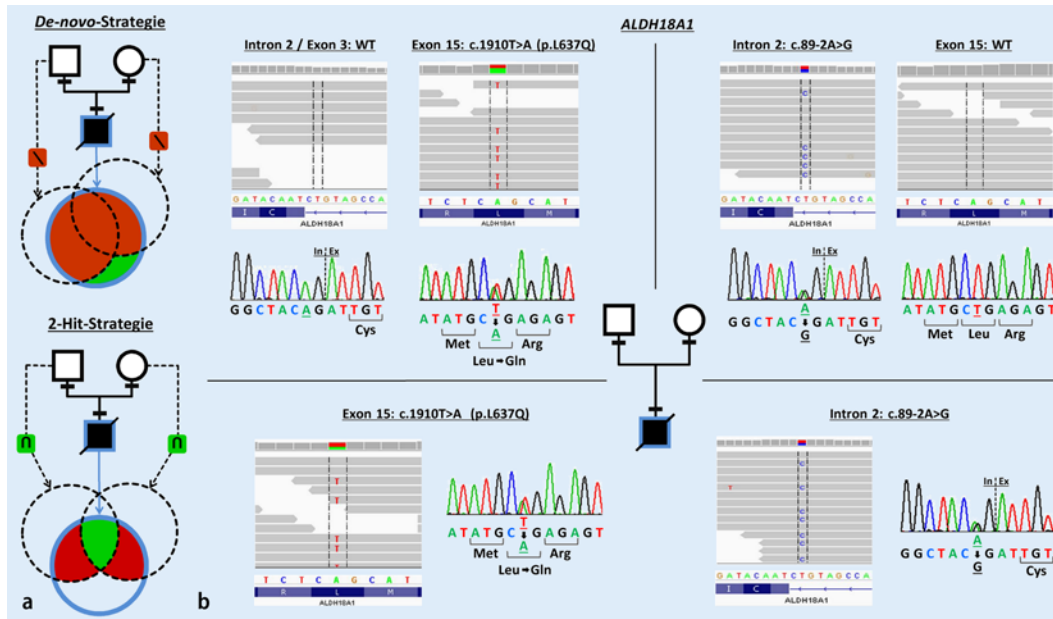


Abb. 2 ▲ Compound-heterozygote Mutationen (c.1910T>A und c.89-2A>G) im *ALDH18A1*-Gen bei einem Patienten mit klinischer Verdachtsdiagnose Hallermann-Streiff-Syndrom. **a** Filterstrategien nach Exomsequenzierung. Die initiale Filterung der Exomdaten des Trios erfolgte auf solche Varianten, die nur beim Patienten, aber nicht bei seinen Eltern vorlagen (De-novo-Strategie oben). In der 2. Filterung wurde beim Patienten nach biallelischen Varianten (Allelfrequenz $\leq 1\%$ oder nicht annotiert) gesucht, wobei jeweils eine der beiden Varianten in heterozygotem Zustand bei der Mutter bzw. beim Vater des Patienten vorliegen musste (2-Hit-Strategie unten). Die Balken über/unter den Stammbaumsymbolen kennzeichnen Personen, bei denen eine Exomsequenzierung durchgeführt wurde. Die Kreise unterhalb des Stammbaumes repräsentieren die durch Exomsequenzierung identifizierten Varianten (farbiger Kreis entspricht den Varianten beim Betroffenen; gestrichelten Kreise entsprechen Varianten bei den Eltern). \ Differenzmenge, \cap Schnittmenge, rote Flächen ausgeschlossene Varianten, grüne Flächen finale Filterergebnisse (putativ pathogene Sequenzvarianten). **b** Sequenzdaten der Familie. Die Mutationen c.1910T>A (p.L637Q) im Exon 15 und/oder c.89-2A>G im Intron 2 des *ALDH18A1*-Gens aus der Exomsequenzierung sind beim Patienten und seinen Eltern mittels Integrative Genomics Viewer (IGV) visualisiert (links und rechts von den Stammbaumsymbolen); dargestellt sind die revers-komplementäre Nukleotidsequenz sowie die reverse Aminosäuresequenz (Wildtyp) im 1-Buchstaben-Code. Ausschnitte aus den Elektropherogrammen nach Sanger-Sequenzierung zeigen die c.1910T>A- und c.89-2A>G-Mutationen jeweils heterozygot beim Patienten (unten rechts bzw. links), die heterozygote c.1910T>A-Mutation beim Vater des Patienten (oben links) und die heterozygote c.89-2A>G-Mutation bei der Mutter (oben rechts). Für die Eltern ist zusätzlich die Wildtypsequenz für den jeweiligen anderen *ALDH18A1*-Genabschnitt gezeigt. Unterhalb der Elektropherogramme ist die entsprechende Nukleotidsequenz angegeben, Sequenzveränderungen sind markiert. Die codierten Aminosäuren sind im 3-Buchstaben-Code angegeben. Ex Exon, In Intron

Darüber hinaus ist die klinische Präsentation der tschechischen Kinder gut mit dem klinischen Spektrum des in der Literatur beschriebenen AP4-Defizienz-Phänotyps vereinbar [2].

2-Hit-Strategie bei Verdacht auf Hallermann-Streiff-Syndrom

Bei einem Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose eines Hallermann-Streiff-Syndroms ermöglichte die Exomsequenzierung des Eltern-Kind-Trios eine molekulare Diagnosestellung. Diese diente als Grundlage für eine anschließende Pränataldiagnostik und lieferte darüber hinaus neue Aspekte für die klinische Diagnose.

Der Patient war nach 36+4 Schwangerschaftswochen kleinwüchsig ($-3,8$ SD), mikrozephal ($-3,2$ SD) und zu leicht (-3 SD) geboren worden. Im Alter von 3 Wochen zeigte er die für das Hallermann-Streiff-Syndrom typischen kraniofazialen Dysmorphien, wie prominente Stirn mit deutlicher Gefäßzeichnung, kleine und tiefliegende Augen, kleine spitze Nase und große tief ansetzende Ohren. Bei ihm lagen verschiedene Organfehlbildungen vor, wie beidseitige Mikrophthalmie mit kongenitalen Katarakten, Ventrikel- und Atriumseptumdefekt sowie komplexe Gehirnfehlbildungen bei Mikrozephalie. Das Kind hatte eine Hypotrichose, dünne durchscheinende Haut mit weitem Hautmantel am Hals, eine Skoliose der Wirbel-

säule und röntgenologisch grazile osteopenische Knochen. Darüber hinaus wurden eine Überbeweglichkeit der Handgelenke, beidseitige Daumenfehlstellungen und eine starke Gefäßzeichnung am ganzen Körper beobachtet. Im Verlauf zeigte sich eine schwerwiegende psychomotorische Entwicklungsstörung. Der Patient verstarb im Alter von knapp 8 Monaten. Eine Einwilligung für die Publikation von Fotos des Kindes liegt nicht vor.

Die Exomsequenzierung des Eltern-Kind-Trios auf dem GAIIX ergab etwa 40.000 genetische Varianten pro Exom. Dabei wurde jeweils $>97\%$ des Gesamtexoms abgedeckt und $>90\%$ des Exoms öfter als 20-mal sequenziert. Es wurde zunächst der Annahme gefolgt, dass das Hal-

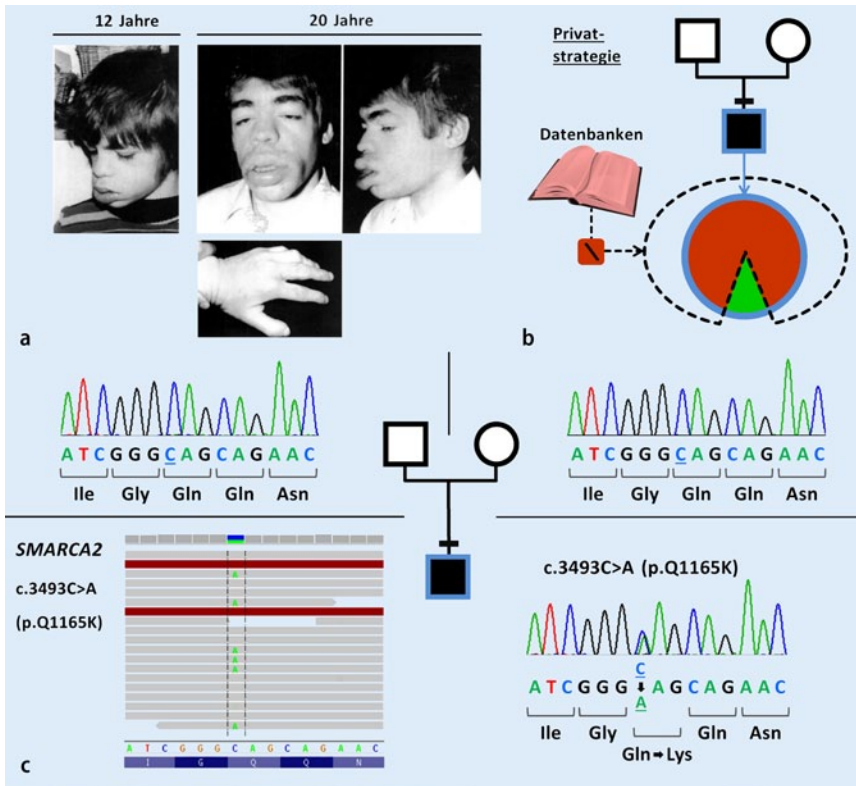


Abb. 3 ▲ De-novo-Mutation c.3493C>A (p.Q1165K) im SMARCA2-Gen bei einem Patienten mit initialer klinischer Diagnose Zimmermann-Laband-Syndrom. **a** Die Fotografien des Patienten zeigen eine Vergrößerung der Gesichtszüge, hypoplastische terminale Phalangen und Daumennägel und prominente Fingergelenke. **b** Privatstrategie nach Exomsequenzierung. Die Exomdaten des Patienten wurden auf private nicht in den Datenbanken annotierte heterozygote Varianten gefiltert, und Varianten in bekannten Krankheitsgenen wurden priorisiert. Der Balken über dem Stammbaumsymbol kennzeichnet die Durchführung einer Exomsequenzierung. Der blaue Kreis unterhalb des Stammbaums repräsentiert die durch Exomsequenzierung beim Betroffenen identifizierten Varianten; die gestrichelte Form entspricht den in den Datenbanken verzeichneten Sequenzvarianten. \ Differenzmenge, rote Fläche ausgeschlossene Varianten, grüne Fläche finales Filterergebnis (putativ pathogene Sequenzvarianten). **c** Sequenzdaten der Familie. Die Mutation c.3493C>A (p.Q1165K) im SMARCA2-Gen aus der Exomsequenzierung ist für den Patienten mittels Integrative Genomics Viewer (IGV) visualisiert (links vom Stammbaumsymbol); dargestellt sind die Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz (Wildtyp) im 1-Buchstaben-Code jeweils in Sinn-Orientierung. Ausschnitte aus den Elektropherogrammen nach Sanger-Sequenzierung zeigen die heterozygote c.3493C>A-Mutation beim Patienten (*unten rechts*), wohingegen seine Eltern für die entsprechende Basenposition die Wildtypsequenz zeigen (*oben rechts* und *links*). Unter den Elektropherogrammen ist die entsprechende Nukleotidsequenz angegeben, die Sequenzveränderung ist markiert. Die codierten Aminosäuren sind im 3-Buchstaben-Code dargestellt

lermann-Streiff-Syndrom durch eine De-novo-Mutation verursacht wird. Exomdaten des Eltern-Kind-Trios wurden daher auf solche Varianten gefiltert, die nur bei dem Patienten und nicht bei seinen Eltern vorlagen (Abb. 2). Es wurden 2 nichtsynonyme, in den Datenbanken unbeschriebene Varianten gefunden, eine davon in einem bisher nicht mit einer monogenen Krankheit assoziierten Gen und die andere in einem Krankheitsgen für eine autosomal-rezessiv erbliche Form des Usher-Syndroms bzw. von Taubheit (MIM

602083 bzw. 609533). Eine mögliche Krankheitsrelevanz der beiden Missense-Varianten und damit deren Effekt auf die jeweilige Proteinfunktion wurde mithilfe der online verfügbaren Prädiktionsprogramme PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, Zugriffen: 22. Mai 2014), SNAP (<https://www.rostlab.org/services/snap/>, Zugriffen: 22. Mai 2014), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>, Zugriffen: 22. Mai 2014) und MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>, Zugriffen: 22. Mai 2014) analysiert. Diese

Programme berücksichtigen die physikochemischen Unterschiede zwischen Wildtyp- und veränderter Aminosäure, die evolutionäre Konservierung der betroffenen Aminosäure, deren Lage im reifen Protein und die funktionelle Wichtigkeit dieser Aminosäure für spezifische Proteineigenschaften. Da die softwaregestützte Vorhersage keine konsistente Interpretation und damit keinen entscheidenden Hinweis auf eine Krankheitsrelevanz für die beiden Missense-Varianten erbrachte, wurden die Exomdaten von Eltern und Kind erneut einer bioinformatischen Filterung unterzogen, nun einem autosomal-rezessiven Vererbungsmodus folgend. Beim Patienten wurde nach bi-allelischen Varianten gesucht, von denen er jeweils eine von seiner Mutter und eine von seinem Vater geerbt hatte (Abb. 2). Durch Priorisierung auf Varianten, die bisher in keiner der bekannten Datenbanken beschrieben wurden oder eine Allelfrequenz von $\leq 1\%$ aufwiesen, wurden 89 Sequenzauffälligkeiten identifiziert, davon 23 private und 66 mit geringer Allelfrequenz. Im *ALDH18A1*-Gen erschienen 2 private Varianten, die nichtsynonyme Transversion c.1910T>A (p.L637Q) und die Spleißdonorstellenmutation c.89-2A>G (Abb. 2), hinsichtlich einer krankheitsverursachenden Auswirkung besonders vielversprechend zu sein. Tatsächlich stuften die Prädiktionsprogramme PolyPhen-2, SIFT und MutationTaster die Missense-Mutation übereinstimmend als wahrscheinlich pathogen ein, lediglich das Vorhersageprogramm SNAP klassifizierte diese Sequenzvariante als neutral. Die veränderte Spleißdonorstelle (c.89-2A>G) wurde weder von dem Spleißstellenvorhersageprogramm SpliceView noch von NetGene2 oder Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) erkannt, sodass diese Spleißstelle mit großer Wahrscheinlichkeit auch in vivo nicht genutzt wird.

Mutationen in *ALDH18A1* wurden bereits mit der autosomal-rezessiven Cutis laxa Typ IIIA (MIM 219150), einer Form des De-Barys-Syndroms, assoziiert. Es sind 3 Familien mit Betroffenen und jeweils homozygoten Mutationen, 2 Missense-Mutationen und eine Spleißdonorstellenmutation, beschrieben [7, 8, 32]. Die von Cutis laxa Typ IIIA betroffenen Personen weisen kraniofaziale Dys-

morphismen auf, zu denen eine progeroide Fazies mit tiefliegenden Augen, hoher Stirn, kleiner spitzer Nase, kleinem Kinn und spärlichem Kopfhaar gehören. Die Patienten haben überschüssige Haut mit starker Gefäßzeichnung, bilaterale Katarakte, überstreckbare Gelenke und andere Skelettanomalien. Alle Patienten zeigen eine schwere psychomotorische Entwicklungsverzögerung und einige eine prä- und/oder postnatale Wachstumsretardierung. Mikrophthalmie und komplexe Hirnfehlbildungen wurden bisher nicht beschrieben [7, 8, 32]. Dennoch ist die Überlappung des klinischen Bilds des Patienten mit dem der Cutis laxa Typ IIIA so überzeugend, dass die beiden Mutationen c.1910T>A (p.L637Q) und c.89-2A>G in *ALDH18A1* als kausal anzusehen sind. *ALDH18A1* codiert die δ 1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase (P5CS), ein bifunktionales mitochondriales Enzym, das sowohl eine aminoternale Glutamatkinasedomäne als auch eine carboxyterminale γ -Glutamylphosphatreduktasedomäne aufweist. Die durch P5CS katalysierten Reaktionen stellen wichtige Teilschritte der Prolin-, Ornithin- und Argininbiosynthese dar [27].

Kurz nach Auffinden der krankheitsrelevanten *ALDH18A1*-Mutationen wurde bekannt, dass die Mutter des Patienten erneut schwanger ist. Daraufhin wurden die Exomdaten und deren Interpretation in einem Forschungsbefund zusammengefasst und der Familie eine molekulargenetische Diagnostik für das *ALDH18A1*-Gen angeboten, für die neue Blutproben beider Eltern angefordert wurden. Beide, in den DNA-Proben aus 2 unterschiedlichen Geweben (lymphoblastoiden Zellen und Fibroblasten) des verstorbenen Kindes gefundenen compound-heterozygoten *ALDH18A1*-Mutationen wurden in DNA-Proben aus Leukozyten der Eltern jeweils in heterozygotem Zustand durch Sanger-Sequenzierung nachgewiesen (■ **Abb. 2**). Demnach wurden die Ergebnisse aus der Exomuntersuchung reproduziert und dienten als Grundlage für eine pränatale Diagnostik bei einer weiteren Schwangerschaft des Elternpaares.

Auch diese Kasuistik demonstriert, dass die Daten aus der Exomsequenzierung für die molekulare Diagnosestellung genutzt und ggf. für eine weiterführende

Diagnostik verwendet werden können. Die molekulare Diagnose gemeinsam mit einer retrospektiven Betrachtung und Reevaluierung des klinischen Erscheinungsbilds des Patienten führte letztlich zur Diagnose Cutis laxa Typ IIIA und darüber hinaus zu einer Erweiterung des klinischen Spektrums dieses Krankheitsbilds.

Privatstrategie: Fokussierung auf private Varianten in bekannten Krankheitsgenen

Bei einem bereits publizierten Patienten mit der klinischen Diagnose Zimmermann-Laband-Syndrom [28], dem 2. Sohn nicht verwandter Eltern, führte die Exomsequenzierung ebenfalls zu einer molekulargenetischen Diagnose. Die mit dem Zimmermann-Laband-Syndrom übereinstimmenden klinischen Merkmale sind (schwere) Intelligenzminderung, ab dem 10. Lebensjahr aufgetretene Vergrößerung der Gesichtszüge (■ **Abb. 3**), generalisierte Hypertrichose (ab dem 16. Lebensjahr), Gingivahyperplasie und hypoplastische terminale Phalangen und Daumennägel (■ **Abb. 3**). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Zahnfleischhyperplasie durch die Gabe von Phenobarbiturat aufgrund generalisierter Krampfanfälle entwickelt hat. Darüber hinaus zeigte der Patient eine Mikrozephalie, Kleinwuchs, supraorbitale Hyperostose und eine Hypospadie.

Das Exom des Patienten wurde auf dem HiSeq™2500-System sequenziert. Bei dieser Sequenzierung wurde mehr als 98% des Gesamtexoms erfasst, wobei über 86% des Exoms mehr als 10-mal sequenziert wurde. Das Zimmermann-Laband-Syndrom tritt überwiegend sporadisch auf, sodass von einer De-novo-Mutation ausgegangen wurde. Da das Elternpaar keiner Exomsequenzierung unterzogen wurde, wurden die Exomdaten des Patienten zunächst auf heterozygote Varianten gefiltert. Dabei wurden private nicht in den Datenbanken annotierte Varianten priorisiert (■ **Abb. 3**). Durch Anwendung von sehr strikten bioinformatischen Kriterien, wie gleichzeitige Verwendung von 2 verschiedenen Programmen für Datenprozessierung und „variant calling“ (SAMtools und GATK), Fokussierung auf bestimmte Mutationsarten, wie Missense-, Nonsense- und Spleiß-

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

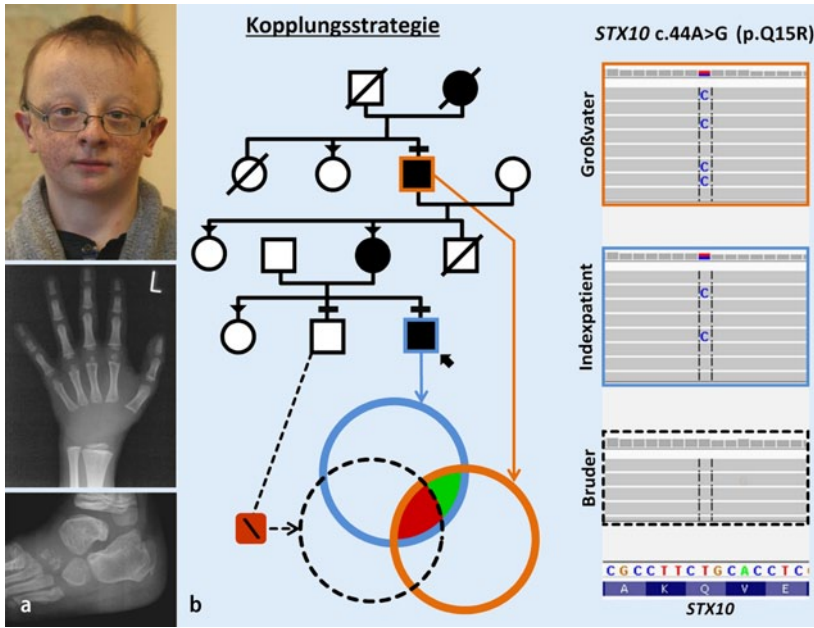


Abb. 4 ▲ Heterozygote Missense-Mutation, c.44A>G (p.Q15R), im *STX10*-Gen bei 3 in einer Familie Betroffenen mit einem unklaren Krankheitsbild. **a** Der Indexpatient zeigt im Alter von 14 Jahren eine Hypotrichose und Sommersprossen (Foto oben). Auf der Röntgenaufnahme der linken Hand im Alter von 8 Jahren sind flache Epiphysen und nichtossifizierte Handwurzelknochen zu erkennen (Mitte). Auch im Alter von 13 Jahren ist die Ossifizierung der Fußwurzelknochen noch deutlich verzögert (unten). **b** Kopplungsstrategie nach Exomsequenzierung. Die Filterung wurde, einem autosomal-dominanten Erbgang folgend, so durchgeführt, dass der Indexpatient und dessen betroffener Großvater gemeinsame heterozygote Varianten aufweisen, die jedoch nicht beim gesunden Bruder des Indexpatienten vorliegen. Die Balken über den Stammbaumsymbolen kennzeichnen Personen, bei denen eine Exomsequenzierung durchgeführt wurde. Die Kreise unterhalb des Stammbaumes repräsentieren die durch Exomsequenzierung identifizierte Varianten (farbige Kreise entsprechen den Varianten bei den Betroffenen; der gestrichelte Kreis entspricht Varianten beim gesunden Bruder des Indexpatienten). Die Dreiecke über den Stammbaumsymbolen markieren Personen, von denen DNA für eine Segregationsanalyse mittels Sanger-Sequenzierung zur Verfügung stand. \ Differenzmenge, rote Fläche durch Differenzmengenbildung ausgeschlossene Varianten, grüne Fläche finale Filterergebnisse (putativ pathogene Sequenzvarianten). Die heterozygote c.44A>G-Mutation (p.Q15R) im *STX10*-Gen aus der Exomsequenzierung ist für den Indexpatienten und seinen betroffenen Großvater mittels Integrative Genomics Viewer (IGV) visualisiert (rechts von den Stammbaumsymbolen), wohingegen der gesunde Bruder die Wildtypsequenz zeigt (rechts). Dargestellt sind die revers-komplementäre Nukleotidsequenz sowie die reverse Aminosäuresequenz (Wildtyp) im 1-Buchstaben-Code

stellenmutationen sowie Insertionen und Deletionen (Indels), und Ausschluss von sehr seltenen bekannten Sequenzvarianten, gelang eine Reduzierung der Anzahl an putativ pathogenen Varianten von 35.845 auf 46. Es wurde geprüft, ob die verbliebenen Sequenzvarianten in bekannten Krankheitsgenen liegen. Auf diese Weise wurde eine Veränderung im *SMARCA2*-Gen eingegrenzt: die Variante c.3493C>A, die in 6 von 15 Reads detektiert wurde (■ Abb. 3). Für sie wird der Aminosäureaustausch p.Q1165K vorhergesagt. Die 3 Prädiktionsprogramme PolyPhen-2, SIFT und MutationTaster klassifizierten die Missense-Mutati-

on als wahrscheinlich pathogen, während SNAP diese Aminosäureveränderung als neutral einstufte. Heterozygote De-novo-Missense-Mutationen im *SMARCA2*-Gen sind für das Nicolaides-Baraitser-Syndrom ursächlich. *SMARCA2* codiert für die ATPase des chromatinremodellierenden SWI/SNF-Komplexes, der die Transkription verschiedener Gene kontrolliert. Alle bisher beschriebenen *SMARCA2*-Mutationen betreffen hochkonservierte Motive in der katalytischen ATPase-Region des Proteins und haben vermutlich einen dominant-negativen Effekt auf die Proteinfunktion [36]. Die Mutation p.Q1165K wurde noch nicht

beschrieben, befindet sich aber in einem ultrakonservierten Proteinmotiv, in dem bereits einige pathogene Mutationen gehäuft vorkommen [36]. Mittels Sanger-Sequenzierung wurde das Vorliegen der heterozygoten *SMARCA2*-Mutation c.3493C>A (p.Q1165K) bei dem Patienten bestätigt. Diese Veränderung wurde in DNA aus Leukozyten seiner Eltern ausgeschlossen (■ Abb. 3). Demnach liegt diese Mutation bei dem Patienten de novo vor. Es liegt eine eindruckliche Überschneidung der klinischen Merkmale des Patienten mit dem Nicolaides-Baraitser-Syndrom vor, das durch schwere Intelligenzminderung, Mikrozephalie, Epilepsie, Kleinwuchs, spärliches Haar, typische Fazies, Brachydaktylie, breite distale Phalangen und prominente Fingergelenke gekennzeichnet ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die de novo vorliegende *SMARCA2*-Mutation c.3493C>A (p.Q1165K) sehr wahrscheinlich kausal für das klinische Bild des Patienten ist.

Auch dieser Fall belegt das diagnostische Potenzial der Exomsequenzierung, selbst bei individuellen Patienten, und macht den Einfluss der molekularen Diagnose auf die klinische Diagnose deutlich. Dieses „reverse phenotyping“ bzw. der „genotype-first approach“ wurde schon mehrfach in der Literatur beschrieben [4, 11] und wird wahrscheinlich in der nahen Zukunft eine immer breitere Anwendung finden.

Kopplungsstrategie bei einer Familie mit unklarem Krankheitsbild

Seit einigen Jahren suchen die Autoren nach der ursächlichen genetischen Veränderung eines komplexen wahrscheinlich monogenen Krankheitsbilds, das bei Patienten in 3 Generationen einer Familie vorkommt. Der heute 15-jährige Indexpatient zeigt als Leitsymptome sensorineurale Schwerhörigkeit, bilaterale Katarakt und Kleinwuchs (–2 SD). Noch im Alter von 8 Jahren fehlten ossifizierte Metacarpalia, die epiphysäre Reifung der kurzen Röhrenknochen war um etwa 6 Jahre retardiert. Im Alter von 13 Jahren entsprach die Entwicklung der Tarsalia einem etwa 2-jährigen Kind. Weitere klinische Merkmale sind mandibuläre Hypoplasie, Zahn-

anlagestörung, milde Hypotrichose und ungewöhnlich viele Sommersprossen bei rötlich hellem Hauttyp (■ Abb. 4). Die Mutter des Patienten ist ebenfalls relativ klein (−1,5 SD), ebenfalls sensorineural schwerhörig und hatte außerdem (operierte) bilaterale Katarakte und eine milde Hypotrichose (■ Abb. 4). Sein Großvater mütterlicherseits zeigt einen Kleinwuchs (−2,2 SD), Taubheit und Katarakte (■ Abb. 4). Selbst nach intensiver Literaturrecherche und Austausch mit erfahrenen klinischen Genetikern wurde bisher weder eine eindeutige klinische Diagnose gestellt noch wurden weitere beschriebene Patienten mit ähnlichem klinischen Bild lokalisiert. Aufgrund des offensichtlich autosomal-dominanten Erbgangs dieses Krankheitsbilds wurde eine Exomsequenzierung beim Indexpatienten, seinem betroffenen Großvater und seinem gesunden Bruder durchgeführt. Ziel der bioinformatischen Filterung war die Konzentration auf heterozygote Varianten, die beim Indexpatienten und seinem betroffenen Großvater (überlappende Varianten), nicht aber beim gesunden Bruder des Indexpatienten vorliegen (■ Abb. 4). Mit dieser Strategie konnte die Anzahl der in Frage kommenden Varianten stark reduziert werden, da Indexpatient und Großvater am weitesten entfernt verwandt sind (25% genetische Gemeinsamkeit) und bei den 3 Familienmitgliedern gemeinsam vorkommende Varianten als krankheitsursächlich ausgeschlossen wurden. Schließlich wurde aufgrund der Seltenheit dieses Krankheitsbilds auf private Varianten fokussiert.

Nach Sequenzierung mit dem HiSeq™2000-System, die bei einer 100-fachen mittleren Abdeckung etwa 37.000 Varianten pro Exom ergab, und anschließender bioinformatischer Filterung der Sequenzdaten wurden 11 nicht in den Datenbanken gelistete Varianten detektiert, davon 9 nichtsynonyme Varianten, eine Indel (2 Bp-Deletion) und eine Nonsense-Mutation. Durch Bestätigung der Varianten bei den 3 betroffenen Familienmitgliedern (Indexpatient, dessen Mutter und Großvater) und Ausschluss bei den beiden gesunden Geschwistern des Indexpatienten mittels Sanger-Sequenzierung wurden die Varianten auf 3 putativ pathogene (2 Missense-Veränderun-

gen und eine Nonsense-Variante) reduziert. Die Interpretation der Aminosäureaustausche mithilfe von Prädiktionssoftware sowie die Bewertung der biologischen Funktion der jeweiligen Genprodukte hinsichtlich des klinischen Bilds ließen die Nonsense-Variante als eher unwahrscheinlich krankheitsrelevant erscheinen. Da die In-silico-Interpretation jedoch für die 2 Missense-Varianten nicht eindeutig war, wurde eine erweiterte Segregationsanalyse durchgeführt: Aus Guthrie-Karten der gesunden Schwester des betroffenen Großvaters und der gesunden Schwester der betroffenen Mutter des Indexpatienten wurde DNA zur Typisierung der 3 Varianten gewonnen. Während die Schwester des Großvaters die Nonsense-Variante aufwies, wurde bei der Schwester der Mutter sowohl die Nonsense- als auch eine der beiden Missense-Varianten nachgewiesen. Es verblieb als einzige mit der Krankheit kosegregierende Variante eine Substitution im *STX10*-Gen, c.44A>G, für die der Aminosäureaustausch p.Q15R vorhergesagt wird (■ Abb. 4). *STX10* codiert für das integrale Membranprotein Syntaxin 10, das bei der Fusion von Membranen und damit im vesikulären Transport eine wichtige Funktion einnimmt [10]. Im Detail steuert Syntaxin 10 den Empfang (das sog. Andocken) von Vesikeln, die innerhalb der Golgi-Stapel transportiert werden. Darüber hinaus wird Syntaxin 10 auch für den retrograden Transport von endosomalen Vesikeln zum Trans-Golgi-Netzwerk benötigt [14, 34].

Durch Exomsequenzierung bei 2 betroffenen und einem gesunden Familienangehörigen und anschließender Segregationsanalyse bei 3 betroffenen und 4 gesunden Familienmitgliedern wurde eine private Missense-Variante, die mit der vermutlich autosomal-dominanten Krankheit in dieser Familie assoziiert sein könnte, eingegrenzt. Durch die Seltenheit dieses Krankheitsbilds und das Fehlen weiterer Patienten mit ähnlichen klinischen Merkmalen sind funktionelle Studien in diesem Fall das Mittel der Wahl, um eine Krankheitsrelevanz der gefundenen Missense-Variante in *STX10* zu bestätigen.

Fazit für die Praxis

- Mit der Anwendung der adäquaten Strategie für die bioinformatische Filterung der Exomdaten und anschließender Priorisierung bestehen gute Aussichten, die höchstwahrscheinlich krankheitsrelevante Sequenzvariante zu identifizieren.
- Der Zugang zu weiteren Familienangehörigen und eine dadurch mögliche Segregationsanalyse gefundener Kandidatenvarianten erhöht die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden einer möglicherweise pathogenen Variante.
- Die Exomsequenzierung kann als Routinemethode angewendet werden, um eine frühe molekulare Diagnose zu stellen. Dies ist insbesondere bei Patienten mit klinisch nicht eindeutig klassifizierbaren, jedoch teilweise mit bekannten Krankheiten überlappenden Phänotypen von Relevanz („genotype-first“ und „reverse phenotyping“).
- Die Etablierung und kontinuierliche Erweiterung von international organisierten Datenbanken ist unerlässlich, um Varianten zu klassifizieren und sich bei seltenen Krankheitsbildern über Phänotyp und Genotyp austauschen zu können.
- Die Bedeutung funktioneller Studien für die Charakterisierung putativ pathogener Varianten wird zunehmen, da nicht für jedes Krankheitsbild eine 2. Mutation zur Beweisführung des Krankheitsgens gefunden wird.

Korrespondenzadressen

Dr. G. Rosenberger

Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistr. 52, 20246 Hamburg
rosenberger@uke.de

Prof. Dr. K. Kutsche

Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistr. 52, 20246 Hamburg
kkutsche@uke.de

Danksagung. Wir bedanken uns bei allen Patienten und Familien, die an dieser Studie teilgenommen ha-

ben. Weiterhin geht unser Dank an Herrn Prof. Dr. Peter Meinecke für die immerwährende Unterstützung bei klinischen Fragestellungen, Frau Dr. Maja Hempel und Herrn Prof. Dr. Peter Meinecke für das kritische Lesen des Manuskripts sowie Frau Inka Jantke und Frau Verena Kolbe für die exzellente technische Assistenz. Die Autoren werden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (KO 4576/1-1, RO 3660/1-1, KU 1240/5-1, KU 1240/6-1 und KU 1240/9-1) und die Deutsche Stiftung für Herzforschung (F/02/13) unterstützt.

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. F. Kortüm, H. Abdollahpour, M. Alawi, G.C. Korenke, E. Seemanova, S. Tinschert, M. Zenker, G. Rosenberger und K. Kutsche geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Alle im vorliegenden Manuskript beschriebenen Untersuchungen am Menschen wurden mit Zustimmung der zuständigen Ethik-Kommission, im Einklang mit nationalem Recht sowie gemäß der Deklaration von Helsinki von 1975 (in der aktuellen, überarbeiteten Fassung) durchgeführt. Von allen beteiligten Patienten liegt eine Einverständniserklärung vor.

Alle Patienten, die über Bildmaterial oder anderweitige Angaben innerhalb des Manuskripts zu identifizieren sind, haben hierzu ihre schriftliche Einwilligung gegeben. Im Falle von nicht mündigen Patienten liegt die Einwilligung eines Erziehungsberechtigten oder des gesetzlich bestellten Betreuers vor.

Literatur

- Abdollahpour H, Alawi M, Kortüm F et al (2014) An AP4B1 frameshift mutation in siblings with intellectual disability and spastic tetraplegia further delineates the AP-4 deficiency syndrome. *Eur J Hum Genet* (Epub ahead of print)
- Abou Jamra R, Philippe O, Raas-Rothschild A et al (2011) Adaptor protein complex 4 deficiency causes severe autosomal-recessive intellectual disability, progressive spastic paraplegia, shy character, and short stature. *Am J Hum Genet* 88:788–795
- Aoki Y, Niihori T, Kawame H et al (2005) Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet* 37:1038–1040
- Arif B, Kumar KR, Seibler P et al (2013) A novel OPA3 mutation revealed by exome sequencing: an example of reverse phenotyping. *JAMA Neurol* 70:783–787
- Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW et al (2011) Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 12:745–755
- Bauer P, Leshinsky-Silver E, Blumkin L et al (2012) Mutation in the AP4B1 gene cause hereditary spastic paraplegia type 47 (SPG47). *Neurogenetics* 13:73–76
- Baumgartner MR, Hu CA, Almashanu S et al (2000) Hyperammonemia with reduced ornithine, citrulline, arginine and proline: a new inborn error caused by a mutation in the gene encoding delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthase. *Hum Mol Genet* 9:2853–2858
- Bicknell LS, Pitt J, Aftimos S et al (2008) A missense mutation in ALDH18A1, encoding Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS), causes an autosomal recessive neurocutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet* 16:1176–1186
- Boycott KM, Vanstone MR, Bulman DE, MacKenzie AE (2013) Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet* 14:681–691
- Carr CM, Rizo J (2010) At the junction of SNARE and SM protein function. *Curr Opin Cell Biol* 22:488–495
- Choi M, Scholl UI, Ji W et al (2009) Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19096–19101
- Dell'Angelica EC, Mullins C, Bonifacino JS (1999) AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* 274:7278–7285
- Endele S, Rosenberger G, Geider K et al (2010) Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nat Genet* 42:1021–1026
- Ganley IG, Espinosa E, Pfeiffer SR (2008) A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells. *J Cell Biol* 180:159–172
- Gargis AS, Kalman L, Berry MW et al (2012) Assessing the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. *Nat Biotechnol* 30:1033–1036
- Hirst J, Bright NA, Rous B, Robinson MS (1999) Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* 10:2787–2802
- Ku CS, Naidoo N, Pawitan Y (2011) Revisiting Mendelian disorders through exome sequencing. *Hum Genet* 129:351–370
- Kutsche K, Yntema H, Brandt A et al (2000) Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet* 26:247–250
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760
- Li H, Handsaker B, Wysoker A et al (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079
- Lim YH, Ovejero D, Sugarman JS et al (2014) Multilineage somatic activating mutations in HRAS and NRAS cause mosaic cutaneous and skeletal lesions, elevated FGF23 and hypophosphatemia. *Hum Mol Genet* 23:397–407
- Lindhurst MJ, Parker VE, Payne F et al (2012) Mosaic overgrowth with fibroadipose hyperplasia is caused by somatic activating mutations in PIK3CA. *Nat Genet* 44:928–933
- Majewski J, Schwartztruber J, Lalonde E et al (2011) What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 48:580–589
- Maroti Z, Kutsche K, Sutajova M et al (2002) Refinement and delineation of the breakpoint regions of a chromosome 1;22 translocation in a patient with Costello syndrome. *Am J Med Genet* 109:234–237
- McKenna A, Hanna M, Banks E et al (2010) The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20:1297–1303
- Najm J, Horn D, Wimplinger I et al (2008) Mutations of CASK cause an X-linked brain malformation phenotype with microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum. *Nat Genet* 40:1065–1067
- Perez-Arellano I, Carmona-Alvarez F, Martinez AI et al (2010) Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: from osmotolerance to rare metabolic disease. *Protein Sci* 19:372–382
- Pfeiffer RA, Seemanova E, Suss J et al (1992) The Zimmermann-Laband syndrome. *Klin Padiatr* 204:1–5
- Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P et al (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* 15:733–747
- Riviere JB, Mirzaa GM, O'Roak BJ et al (2012) De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet* 44:934–940
- Schulz AL, Albrecht B, Arici C et al (2008) Mutation and phenotypic spectrum in patients with cardiofacio-cutaneous and Costello syndrome. *Clin Genet* 73:62–70
- Skidmore DL, Chitayat D, Morgan T et al (2011) Further expansion of the phenotypic spectrum associated with mutations in ALDH18A1, encoding Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS). *Am J Med Genet* 155A:1848–1856
- Sutajova M, Neukirchen U, Meinecke P et al (2004) Disruption of the PDGFB gene in a 1;22 translocation patient does not cause Costello syndrome. *Genomics* 83:883–892
- Tang BL, Low DY, Tan AE, Hong W (1998) Syntaxin 10: a member of the syntaxin family localized to the trans-Golgi network. *Biochem Biophys Res Commun* 242:345–350
- Topper S, Ober C, Das S (2011) Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. *Clin Genet* 80:117–126
- Van Houdt JK, Nowakowska BA, Sousa SB et al (2012) Heterozygous missense mutations in SMARCA2 cause Nicolaides-Baraitser syndrome. *Nat Genet* 44:445–449, S441
- Vissers LE, Fano V, Martinelli D et al (2011) Whole-exome sequencing detects somatic mutations of IDH1 in metaphyseal chondromatosis with D-2-hydroxyglutaric aciduria (MC-HGA). *Am J Med Genet* 155A:2609–2616
- Weiss MM, Van der Zwaag B, Jongbloed JD et al (2013) Best practice guidelines for the use of next-generation sequencing applications in genome diagnostics: a national collaborative study of Dutch genome diagnostic laboratories. *Hum Mutat* 34:1313–1321