

Paper of the Quarter – QII/2022 – [mitoNET](#)

Clinical implementation of RNA sequencing for Mendelian disease diagnostics

Genome Medicine. 2022 Apr 5. >>[PubMed-Link](#)<<

Vicente A Yépez, Mirjana Gusic, Robert Kopajtich, Christian Mertes, Nicholas H Smith, Charlotte L Alston, Rui Ban, Skadi Beblo, Riccardo Berutti, Holger Blessing, Elżbieta Ciara, Felix Distelmaier, Peter Freisinger, Johannes Häberle, Susan J Hayflick, Maja Hempel, Yulia S Itkis, Yoshihito Kishita, Thomas Klopstock, Tatiana D Krylova, Costanza Lamperti, Dominic Lenz, Christine Makowski, Signe Mosegaard, Michaela F Müller, Gerard Muñoz-Pujol, Agnieszka Nadel, Akira Ohtake, Yasushi Okazaki, Elena Procopio, Thomas Schwarzmayr, Joël Smet, Christian Staufner, Sarah L Stenton, Tim M Strom, Caterina Terrile, Frederic Tort, Rudy Van Coster, Arnaud Vanlander, Matias Wagner, Manting Xu, Fang Fang, Daniele Ghezzi, Johannes A Mayr, Dorota Piekutowska-Abramczuk, Antonia Ribes, Agnès Rötig, Robert W Taylor, Saskia B Wortmann, Kei Murayama, Thomas Meitinger, Julien Gagneur, Holger Prokisch

Die Einführung der Exom Sequenzierung (WES) hat die genetische Diagnostik revolutioniert, indem sowohl die diagnostische Rate erhöht als auch die Identifizierung neuer Krankheitsgene erheblich beschleunigt werden konnte. Da durch WES selten in mehr als 50% der Fälle eine Diagnosestellung gelingt, verbleiben ein Großteil der Patienten oft ohne genetische Diagnose. RNA-seq Analysen ermöglichen die genomweite Interpretation von DNA Varianten auf der RNA Ebene sowohl für kodierende als auch nicht-kodierende Bereiche.

Wir haben eine automatisierte RNA-seq pipeline implementiert und mittels dieser Transkriptom Daten aus Fibroblasten von 303 Mitochondriopathie Patienten, bei denen im Vorfeld bereits WES Diagnostik vorgenommen wurde.

Im Durchschnitt detektieren wir 12.500 Gene pro Probe einschließlich ca. 60 % aller bekannten Krankheitsgene – eine wesentlich höhere Abdeckung als in Vollblut, was einen weiteren Vorteil der verwendeten Fibroblasten hervorhebt.

Gene wurden entweder durch aberrante Expression, aberrantes Spleißen oder monoallelische Expression priorisiert. Die pipeline benötigt weniger als eine Woche von der Probenvorbereitung bis zur Mitteilung von Ergebnissen und liefert im Median acht Kandidatengene pro Patient zur weiteren Überprüfung. Eine genetische Diagnosestellung gelang in 16% der 205 ungelösten WES Fälle. Den größten Beitrag lieferten Expressions Ausreißer, darunter auch einige Fälle mit einer Reduktion von 50%, bei denen in Kombination mit monoallelischer Expression selbst die Diagnose von dominanten Erkrankungen möglich war. Aberrantes Spleißen und die Detektion von Varianten in RNA-seq Daten ermöglicht die gleichzeitige Identifikation und Validierung von Varianten, welche zu Spleißdefekten führen. Ein Großteil dieser Varianten lag außerhalb der durch WES abgedeckten Bereiche.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass durch standardisierte experimentelle- und informatische Prozesse eine Implementation von RNA-seq in die Standarddiagnostik erleichtert und beschleunigt wird und die diagnostische Rate gegenüber WES erhöht wird.

Autor/-in: Robert Kopajtich

Kontakt: robert.kopajtich@helmholtz-muenchen.de

Paper of the Quarter – QII/2022 – [mitoNET](#)

Clinical implementation of RNA sequencing for Mendelian disease diagnostics

Genome Medicine. 2022 Apr 5. >>[PubMed-Link](#)<<

Vicente A Yépez, Mirjana Gusic, Robert Kopajtich, Christian Mertes, Nicholas H Smith, Charlotte L Alston, Rui Ban, Skadi Beblo, Riccardo Berutti, Holger Blessing, Elżbieta Ciara, Felix Distelmaier, Peter Freisinger, Johannes Häberle, Susan J Hayflick, Maja Hempel, Yulia S Itkis, Yoshihito Kishita, Thomas Klopstock, Tatiana D Krylova, Costanza Lamperti, Dominic Lenz, Christine Makowski, Signe Mosegaard, Michaela F Müller, Gerard Muñoz-Pujol, Agnieszka Nadel, Akira Ohtake, Yasushi Okazaki, Elena Procopio, Thomas Schwarzmayr, Joél Smet, Christian Staufner, Sarah L Stenton, Tim M Strom, Caterina Terrile, Frederic Tort, Rudy Van Coster, Arnaud Vanlander, Matias Wagner, Manting Xu, Fang Fang, Daniele Ghezzi, Johannes A Mayr, Dorota Piekutowska-Abramczuk, Antonia Ribes, Agnès Rötig, Robert W Taylor, Saskia B Wortmann, Kei Murayama, Thomas Meitinger, Julien Gagneur, Holger Prokisch

The implementation of whole exome sequencing (WES), revolutionized genetic diagnostics by improving diagnostic yield and accelerating the discovery of novel disease genes. Diagnostic yield of WES analysis rarely exceeds 50% and hence leaves the majority of patients without a genetic diagnosis. RNA-seq analysis facilitates genome-wide DNA variant interpretation on the RNA level, for both coding and non-coding variants.

We implemented an automated RNA-seq protocol and a computational workflow with which we analyzed skin fibroblasts of 303 individuals with a suspected mitochondrial disease that previously underwent WES.

We detected on average 12,500 genes per sample including around 60% of all disease genes—a coverage substantially higher than with whole blood, supporting the use of skin biopsies. We prioritized genes demonstrating aberrant expression, aberrant splicing, or mono-allelic expression. The pipeline required less than 1 week from sample preparation to result reporting and provided a median of eight disease-associated genes per patient for inspection. A genetic diagnosis was established for 16% of the 205 WES-inconclusive cases. Detection of aberrant expression was a major contributor to diagnosis including instances of 50% reduction, which, together with mono-allelic expression, allowed for the diagnosis of dominant disorders caused by haploinsufficiency. Moreover, calling aberrant splicing and variants from RNA-seq data enabled detecting and validating splice-disrupting variants, of which the majority fell outside WES-covered regions.

Together, these results show that streamlined experimental and computational processes can accelerate the implementation of RNA-seq in routine diagnostics which will increase the diagnostic rate compared to WES alone.

Author: Robert Kopajtich

Contact: robert.kopajtich@helmholtz-muenchen.de