

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

**Beurteilung der Effektivität der Panel-Diagnostik bei
seltenen Lebererkrankungen im Kindesalter**

**Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Herz, Mareike Elena, geb. Schies

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. E. Sturm, Ph. D.

2. Berichterstatter: Professorin Dr. L. Springer

Tag der Disputation: 30.04.2025

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINFÜHRUNG	1
1.1 Seltene Lebererkrankungen des Kindesalters	1
1.2 Herausforderungen der Diagnostik	1
1.3 Ablauf der klinischen Diagnostik	3
1.4 Potential und Grenzen der konventionellen Diagnostik	6
1.5 Lebererkrankungen im klinischen Alltag	15
1.6 Genetische Diagnostik	21
1.7 Elektronische Priorisierung mittels Deep Phenotyping	27
1.8 Fragestellung	28
2. METHODIK	29
2.1 Patienten und Einschlusskriterien	29
2.2 Unterteilung der Patienten in Kategorien	29
2.3 Genetische Diagnostik	30
2.4 Deep Phenotyping	35
2.5 Transkriptom	35
2.6 Diagnostisches Konzept	37
2.7 Statistik	37
3. ERGEBNISSE	38
3.1 Patienten	38
3.2 Effektivität der Panel-Diagnostik	45
3.3 Effektivität der Panel-Diagnostik nach Kategorien	48
3.4 Latenz und Verlaufskontrolle	50
3.5 Effektivität der Segregations- und Trio-Exom-Analyse	51
3.6 Deep Phenotyping mittels <i>Phenolyzer</i>	53
3.7 Transkriptom-Analyse	55
4. DISKUSSION	60
4.1 Schlussfolgerung	69
5. ZUSAMMENFASSUNG	70
6. LITERATURVERZEICHNIS	72
7. ANHANG	79
8. EIGENANTEIL	82
9. VERÖFFENTLICHUNGEN	83

1. EINFÜHRUNG

1.1 Seltene Lebererkrankungen des Kindesalters

Eine seltene Erkrankung ist, laut Definition der Europäischen Union, eine Krankheit mit einer Prävalenz $\leq 5:10.000$. Insgesamt gelten ca. 8.000 Krankheiten als selten. Zählt man die betroffenen Patienten zusammen, leben in Deutschland etwa 4 Millionen Menschen mit einer seltenen Erkrankung [1].

Ca. 80% der seltenen Erkrankungen sind genetisch bedingt und bei den meisten seltenen Erkrankungen (50-75%) sind bereits Kinder betroffen. Ein Drittel der Kinder mit einer seltenen Erkrankung stirbt vor dem Erreichen des 5. Lebensjahres [2].

Zu den seltenen Erkrankungen im Kindesalter zählen auch viele Lebererkrankungen. Der Verlauf kindlicher Lebererkrankungen ist variabel: akut oder chronisch, transient mit nachfolgender Regeneration oder zum Leberversagen führend [3]. Kinder und Jugendliche mit akuten oder chronischen Leberversagen bedürfen häufig einer Transplantation.

Je nach Ätiologie lassen sich kindliche Lebererkrankungen in Gruppen einteilen: Störungen der Entwicklung, Stoffwechselerkrankungen, Entzündungen, Virusinfektionen oder Autoimmunerkrankungen. Manche Erkrankungen treten bereits im Säuglingsalter auf, andere werden erst im Jugendlichen- oder Erwachsenenalter symptomatisch.

1.2 Herausforderungen der Diagnostik

Die Diagnosestellung gestaltet sich bei seltenen Erkrankungen besonders schwierig. Dies wird deutlich, wenn man beachtet, dass in der Vergangenheit trotz ausführlicher Untersuchungen bei 10-15% der Kinder, welche mit erhöhten Transaminasen in einer Notaufnahme vorstellig wurden, keine Ursache gefunden werden konnte [4, 5] Dadurch kann es zu Fehl- und Unterversorgung betroffener Patienten kommen [6]. Dies liegt zum einen daran, dass seltene Erkrankungen in Routine-Untersuchungen oft nicht identifiziert werden. Zum anderen ist durch die niedrige Prävalenz das Wissen über Diagnosestellung oder Therapie vielen

Ärzten nicht vertraut bzw. das Wissen oft nur in Zentren mit hoher Expertise verankert [7]. Hinzu kommt, dass die Pathophysiologien seltener Erkrankungen oft noch nicht ganz verstanden sind, da hierüber weniger geforscht wird und somit weniger Veröffentlichungen publiziert werden. Aussagekräftige Studien sind bei einer geringen Patientenzahl, die sich zudem überregional verteilt, nur schwer durchführbar [8].

Eine weitere Schwierigkeit entsteht dadurch, dass viele Symptome erst nach einer gewissen Zeit auftreten oder zu Beginn der Erkrankung noch sehr unspezifisch sind. So werden beispielsweise Patienten, welche an M. Wilson (eine Stoffwechselerkrankung, welche später noch genauer beschrieben wird) erkrankt sind und sich mit neurologischen Symptomen präsentieren, oft erst im frühen Erwachsenenalter vorstellig, wenn die Symptome weit fortgeschritten und teilweise nicht mehr reversibel sind [9].

Dies hat zur Folge, dass oft eine lange Zeit vergeht, bis die korrekte Diagnose gestellt wird. Eine hohe Latenz (Dauer bis zur Diagnosestellung) kann für den Patienten gravierende Folgen haben, da sie genau wie inkorrekte oder fehlende Diagnosen dazu beiträgt, dass zahlreiche seltene Erkrankungen des Kindesalters eine ungünstige Prognose haben. Durch eine frühe Diagnosestellung können irreversible Folgeschäden verringert oder ganz vermieden werden.

Die genaue Ursache einer Erkrankung zu kennen ist auch für neue spezifische Therapien entscheidend, welche zukünftig vermutlich eine immer größere Rolle spielen werden.

Für die Patienten und ihre Familien ist die Zeit bis zur Diagnosestellung häufig geprägt von Unwissenheit über Krankheitsverlauf und Prognose und damit sehr belastend. Eine Diagnose trägt zur Aufklärung bei und kann helfen diese Unsicherheiten zu beseitigen. Außerdem besteht die Möglichkeit bei Bedarf gezielt nach Hilfe zu suchen, z.B. über Selbsthilfe- oder Angehörigengruppen und auch der Zugang zu finanziellen Unterstützungen wird erleichtert.

1.3 Ablauf der klinischen Diagnostik

Die Symptome der verschiedenen seltenen Lebererkrankungen sind bei Kindern und Jugendlichen häufig unspezifisch. Manche seltene Lebererkrankungen manifestieren sich bereits im Säuglingsalter. Betroffene Patienten entwickeln beispielsweise eine Hyperbilirubinämie und fallen mit prolongiertem Neugeborenen-Ikterus auf. Entfärbte, acholische Stühle können entscheidende Hinweise auf eine Cholestase liefern.

Bei Jugendlichen zeigen sich Leberfunktionsstörungen (wie beispielsweise bei M. Wilson, Autoimmunhepatitiden oder Steatosen) oft schleichend mit Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit und unklar erhöhten Transaminasen (Transaminitis). Im späten Stadium zeigen sich Symptome einer Leberzirrhose mit Komplikationen wie Ösophagusvarizen oder Hypersplenismus.

Die unspezifischen frühen Symptome können als harmlos fehlgedeutet werden. Weitere Symptome sind Hypoglykämie, Hyperbilirubinämie oder Gerinnungsstörungen (ein in diesem Kontext auftretender Vitamin K Mangel kann besonders bei Neugeborenen häufig mit schweren, intrazerebralen Blutungen einhergehen) [10].

Um die Diagnosestellung möglichst effektiv durchzuführen, haben Nicastro et al. [11] und Sturm et al. [12] 2018 bzw. 2019 einen Algorithmus für die Herangehensweise bei neonatalem Ikterus vorgestellt, der schrittweise und risikoadaptiert diagnostische Methoden sinnvoll zeitlich aufeinander aufbauend darstellt. Ein solcher Algorithmus ist wichtig, um frühestmöglich eine korrekte Diagnose stellen und somit eine entsprechende Therapie beginnen zu können. Dieser Algorithmus wird in Abbildung 1 dargestellt und ist bei allen Neugeborenen und Kindern anwendbar, welche über einen Zeitraum von mehr als zwei Wochen eine direkte Hyperbilirubinämie aufweisen und bei welchen vorher eine Koagulopathie oder Leberinsuffizienz ausgeschlossen wurde. Anschließend erfolgt eine Unterteilung anhand der Färbung des Stuhls. Bei Patienten mit hypo- oder acholischen Stühlen wird zunächst ein α_1 -Antitrypsinmangel sowie eine Zystische Fibrose ausgeschlossen. Da bei der Ablaufplanung der Diagnostik der vorgegebene zeitliche Rahmen zur optimalen Therapie einer Gallengangatresie beachtet werden muss

(dieses Krankheitsbild wird zu einem späteren Zeitpunkt ausführlich beschrieben), wird bei acholischen Stühlen eine endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) und, je nach individuellen Befunden, anschließend eine Leberbiopsie durchgeführt. Zeigt sich im histologischen Bild eine Riesenzellhepatitis, so ist der nächste Schritt eine genetische Untersuchung mittels Panel-Analyse. Bei Patienten mit gefärbten Stühlen ist neben der Basis-Abklärung (beispielsweise auf infektiöse Genese) die γ -Glutamyltransferase (γ GT) entscheidend. Bei einem hohen γ GT-Wert erfolgt ebenfalls eine Panel-Analyse. Ist die γ GT hingegen erniedrigt wird eine Massenspektromie der Gallensäuren empfohlen, um eine Gallensäuresynthesestörung detektieren zu können. Die Potentiale und Grenzen dieser einzelnen Diagnoseschritte werden in den nächsten Absätzen weiter erläutert.

Diagnostik-Algorithmus

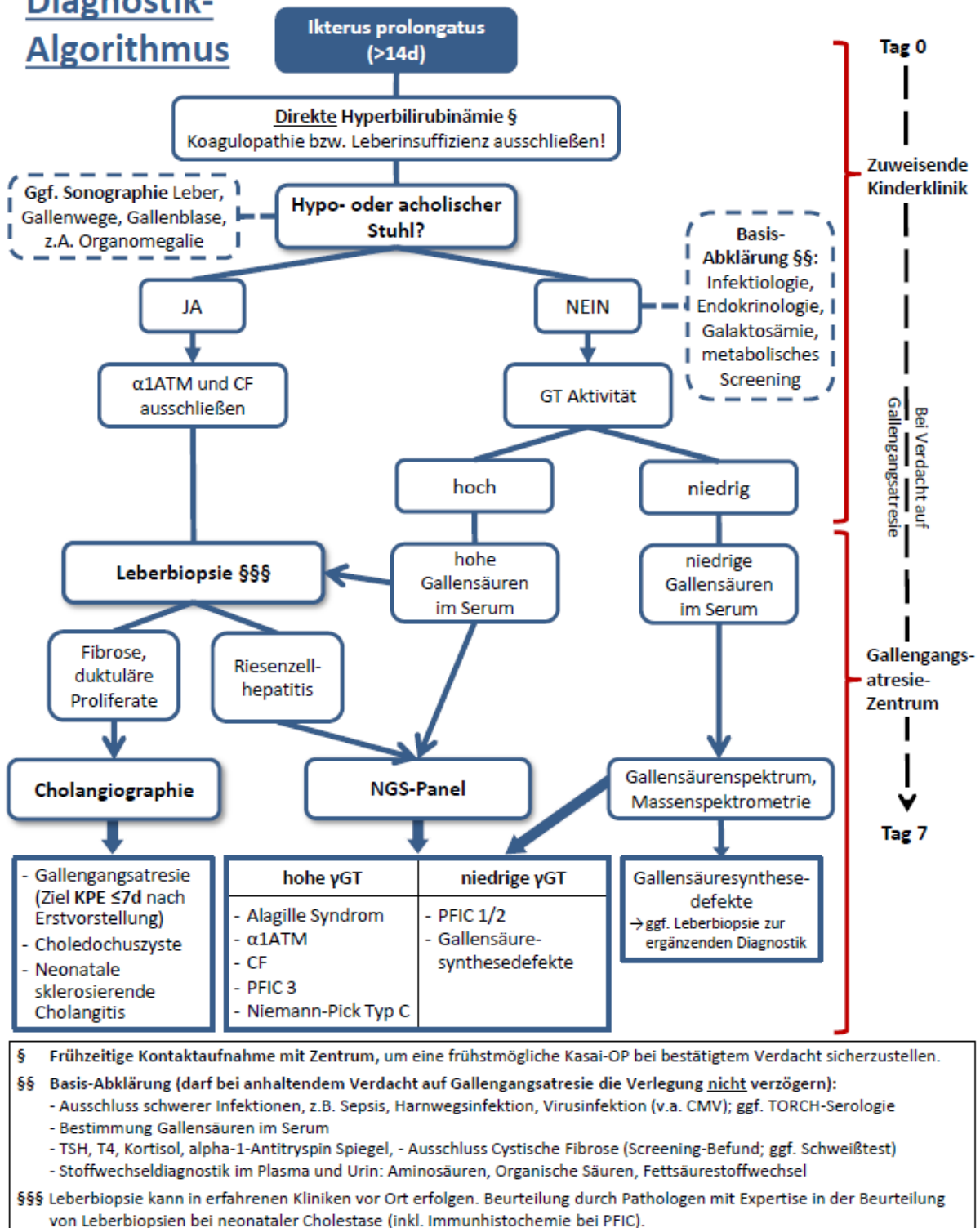


Abbildung 1: Algorithmus der diagnostischen Herangehensweise bei Ikterus prolongatus adaptiert nach Nicastro et al. [11] und Sturm et al. [12].

1.4 Potential und Grenzen der konventionellen Diagnostik

Phänotyp und klinische Symptome

Der erste Schritt der Diagnostik ist eine ausführliche Anamnese. Wichtig sind hierbei Auffälligkeiten während der Schwangerschaft oder Geburt sowie die Familienanamnese. Bei Säuglingen oder Kleinkindern dient das Untersuchungsheft als nützliche Quelle für Vorbefunde (z.B. Vitamin K-Gabe, Neugeborenen-Screening sowie Perzentilenverläufe von Körpergröße, Kopfumfang und Körpergewicht). Der genaue Zeitpunkt des Auftretens von Symptomen und Veränderungen im Verlauf sind wichtig. Bei Verdacht auf eine Lebererkrankung ist ein besonderer Schwerpunkt auf Blutungszeichen (vermehrtes Nasenbluten, Petechien, Hämatome), Ess- und Trinkverhalten, Ernährung, besondere Schläfrigkeit sowie Veränderungen der Stuhl- oder Urinfarbe zu legen. Zur Überprüfung der Stuhlfarbe wurde eine Stuhlfarbenkarte entworfen, welche seit Ende 2023 Teil der U2-Elterninformation im Untersuchungsheft ist. Hierauf sind verschiedene physiologische und pathologische Stuhlfarben abgebildet, wodurch Eltern für Auffälligkeiten sensibilisiert werden [13].

In einer ausführlichen körperlichen Untersuchung ist der Gesamteindruck wichtig. Auffälligkeiten des Hautturgors, das Kolorit der Haut- und Schleimhäute, Blutungszeichen, Vergrößerung von Leber oder Milz, Leberhautzeichen wie vermehrte Venenzeichnung oder Palmar- bzw. Plantarerytheme sowie Aszites können den Verdacht auf eine Lebererkrankung lenken.

Laborchemische Parameter

Mit Hilfe einer Blutentnahme können neben dem großen Blutbild, Elektrolyte, Leber- und Nierenwerte bestimmt werden. Auch die Schilddrüsenwerte sollten untersucht werden, da eine Hypothyreose sich unter anderem mittels einer Cholestase manifestieren kann [14]. Die Leberenzyme (Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT)) können einen Hinweis auf eine Leberzellschädigung geben. Parameter der Lebersynthesfunktion (Albumin, Gerinnungswerte: Quick/INR, aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)), sowie Abbauprodukte der Leber, die bei einer gestörten Funktion akkumulieren (direktes und indirektes Bilirubin) helfen die Ausprägung des Leberschadens

einzuschätzen. Eine Konzentration des direkten/konjugierten Bilirubins von >1 mg/dl weist mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf eine klinisch relevante Leberfunktionsstörung hin [12]. Eine Störung des Gallenflusses zeigt sich durch erhöhte Cholestaseparameter (Bilirubin, γ -Glutamyltransferase (γ GT), Alkalische Phosphatase (AP), Gallensäuren). Bei Verdacht auf portale Hypertension sind Leukozyten, Thrombozyten und Hämoglobin-Werte relevant. Ein erhöhter Ammoniakspiegel kann ebenfalls ein Hinweis auf eine Lebererkrankung sein, da das Abbauprodukt des Harnstoffzyklus hauptsächlich in der Leber entsteht. Bei Verdacht auf eine infektiöse Genese sollten die Entzündungswerte (C-reaktives Protein und Leukozyten) bestimmt, sowie eine serologische und/oder DNA-Untersuchung auf das Zytomegalievirus (CMV) bzw. je nach anamnestischen Hinweisen auch auf die Hepatitisviren A, B und C (HAV, HBV, HCV), Herpes- und Enteroviren durchgeführt werden. Röteln, Syphilis oder Toxoplasmose können bei Neugeborenen zu einer Cholestase führen und sollten bei der Untersuchung berücksichtigt werden. Hinweise zum serologischen Status der Mutter befinden sich im Mutterpass [12]. Eine Urinuntersuchung kann einen Harnwegsinfekt (präsentiert sich bei Neugeborenen potentiell mit einer Cholestase), eine erhöhte Kupferausscheidung (typisch für M. Wilson ab dem Schulalter) oder eine CMV-Infektion aufdecken [15]. Um Stoffwechselerkrankungen auszuschließen, sollten Acylcarnitin und Carnitin (erhöht bzw. erniedrigt bei Carnitin-Acylcarnitin-Translokase-Mangel), sowie Aminosäuren im Blut bestimmt werden. Ein Mangel an α_1 -Antitrypsin führt zu einem schweren Krankheitsbild, geschädigt werden vor allem die Lunge, durch Zerstörung der Lungenarchitektur, und die Leber, durch Akkumulation atypisch konfigurierter Eiweißkonglomerate. Der Spiegel dieses Enzyms kann ebenfalls im Blut bestimmt werden. Die Bestimmung der Triglyceride und Lipoproteine (LDL, HDL) erlaubt eine Beurteilung über Störungen des Fettstoffwechsels. Die Untersuchung der organischen Säuren im Urin liefert weitere Hinweise (beispielsweise erhöhtes Succinylaceton bei Tyrosinämie Typ I). Die Bestimmung der Pankreas-Elastase im Stuhl gibt Aufschluss über die exokrine Pankreasfunktion, welche beispielsweise bei Mukoviszidose eingeschränkt ist.

Spezifische Analysen

Bei Verdacht auf bestimmte Erkrankungen können spezifische Analysen durchgeführt werden. Ein Beispiel ist der Filipin-Test, der bei Verdacht auf M. Niemann Pick Typ C durchgeführt wird. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine lysosomale Speicherkrankheit, bei der sich Cholesterin in den Zellen anlagert. Cholesterin ist ein wichtiger Membranbestandteil und wird zur Synthese von Steroidhormonen und Gallensäuren benötigt. Die Symptome können sehr unterschiedlich sein (Ikterus, Hepato- / Splenomegalie, Entwicklungsverzögerung, progressive Neurodegeneration oder psychiatrische Beeinträchtigungen) und sich von der Perinatalperiode bis hin ins Erwachsenenalter manifestieren [16]. Die Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt. Bei 95% der Erkrankten ist eine Mutation im NPC1-Gen ursächlich, ca. 5% haben eine Mutation im NPC2-Gen [17].

Beim Filipin-Test handelt es sich um ein aufwändiges Testverfahren, welches nur in speziellen Zentren durchgeführt wird. Filipin besteht aus vier verschiedenen fluoreszierenden Molekülen, welche an Cholesterin binden können. Mit Hilfe einer Hautbiopsie können bei betroffenen Patienten perinukleäre Ablagerungen, welche dem intrazellulär abgelagerten Cholesterin entsprechen, fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden [18]. Gerade bei uneindeutigen oder nur schwach positiven Testergebnissen stellt sich die Diagnosestellung allein durch den Filipin-Test als schwierig dar. Heterozygote Patienten, welche die Mutation nur auf einem Allel tragen, oder andere Erkrankungen, wie beispielsweise M. Niemann Pick Typ A oder B, können zu leicht positiven Testergebnissen führen [19]. Auch Erkrankungen, die sekundär einen Einfluss auf die lysosomale Cholesterinausschüttung nehmen, wie beispielsweise das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom, können zu auffälligen Testergebnissen führen [19].

Ein weiterer spezifischer Test stellt die Untersuchung auf die Aktivität der lysosomalen sauren Lipase dar. Hierfür wird eine Blutprobe des Patienten benötigt, welche auf eine Trockenblutkarte aufgetragen wird. Durch die Zugabe eines spezifischen Inhibitors der sauren Lipase (Lalistat 2), kann die Aktivität der sauren Lipase von der Aktivität anderer Lipasen unterschieden werden [20, 21].

Patienten, welche am Krankheitsbild des lysosomalen saure Lipase-Defizits, kurz LAL-D, erkrankt sind, weisen eine deutlich verringerte Enzymaktivität auf.

Hierbei handelt es sich um eine seltene, autosomal rezessiv vererbte, lysosomale Speicherkrankheit, bei welcher es aufgrund des Enzymmangels zu einem gestörten Fettabbau kommt. Durch das Ansammeln der Fette (Cholesterinester und Triglyceride) in den Lysosomen, fehlt es dem Körper an freiem Cholesterin, wodurch die Neubildung angeregt wird. Durch diese Dyslipidämie lagern sich Fette in den Organen, vor allem in Leber, Milz und dem Herz-Kreislaufsystem, an [22].

Ursächlich für den Enzymdefekt sind Mutationen im LIPA-Gen, wobei hier mehr als 120 krankheitsverursachende Mutationen bekannt sind [20]. Der Verlauf der Erkrankung hängt vom Trägerstatus und der damit einhergehenden Enzymrestaktivität ab. Homozygote Träger, die <1% Enzymaktivität aufweisen, erkranken bereits im Neugeborenenalter an M. Wolman. Die betroffenen Patienten präsentieren sich mit Diarrhoe, Erbrechen, Hepatosplenomegalie und Nebennierenverkalkungen. Sie entwickeln schnell eine Leberzirrhose und versterben untherapiert meist innerhalb der ersten sechs Lebensmonate an Multiorganversagen [20, 23, 24]. Bei Patienten mit komplex heterozygoten Mutationen tritt die Erkrankung als Cholesterinester-Speicherkrankheit (cholesteryl ester storage disease, CESD) aufgrund einer Enzymrestaktivität von 1-10% erst im Kleinkind- oder jungen Erwachsenenalter auf. Die Patienten leiden an einer Verfettung der Leber (Steatosis hepatis), Splenomegalie und vorzeitiger Atherosklerose, welche zu Schlaganfällen und Myokardinfarkten führt. Auch hier ist der Verlauf progredient und endet ohne Therapie bei 50% noch vor dem 21. Lebensjahr tödlich [20, 22, 24, 25].

Aufgrund von unspezifischen Symptomen und Laborwerten (erhöhte LDL-, bei gleichzeitig erniedrigten HDL-Cholesterinwerten), welche bei vielen weit verbreiteten kardiovaskulären Stoffwechsel- oder Lebererkrankungen auftreten sowie der Seltenheit dieser Erkrankung (geschätzte Inzidenz 1:40.000-1:300.000 [22]) wird von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen [23, 24].

Eine frühe Diagnose und ein damit einhergehender Therapiebeginn, unter anderem mit einer Enzyersatztherapie, sind entscheidend für die Prognose dieser lebensgefährlichen Erkrankung [26, 27].

Bei dem Test nach Hamilton et al. [21] handelt es sich um ein genaues und kostengünstiges Verfahren, bei welchem gesunde Personen von Trägern bzw. an LAL-D Erkrankten unterschieden werden können [20]. Es eignet sich für Screeningverfahren und könnte zukünftig zu den Tests, welche beim Neugeborenen Screening durchgeführt werden, mit aufgenommen werden [23]. Für ein aussagekräftiges Testergebnis ist jedoch ein zeitnaher Transport der Probe wichtig, da die messbare LAL-Aktivität bei Raumtemperatur abnimmt und die Ergebnisse somit verfälscht werden können [21]. Zudem ist eine Unterscheidung zwischen M. Wolman und CESD mit diesem Test nicht möglich [23].

Bildgebung

Neben Anamnese, Labor-Analyse und spezifischen Tests, spielt auch die Bildgebung eine wichtige Rolle in der konventionellen klinischen Diagnostik. Ein erster Schritt hierzu ist die Sonographie des Abdomens, um sich einen Überblick über die Organbeschaffenheit und -größe sowie obstruktive Veränderungen zu verschaffen. Im nüchternen Zustand lässt sich die gefüllte Gallenblase darstellen, so dass Gallensteine, Zysten oder dilatierte Gallenwege nachgewiesen werden können. Eine sehr kleine oder nicht darstellbare Gallenblase, kann ein Hinweis auf eine Gallengangsatriesie sein. Eine darstellbare Gallenblase schließt jedoch im Umkehrschluss eine Gallengangsatriesie nicht aus [28]. Auch die Pfortaderperfusion kann sonographisch beurteilt werden.

Die Echokardiographie kann bei Verdacht auf Herzfehlbildungen durchgeführt werden, welche bei 24% der Patienten mit dem Alagille-Syndrom und teilweise auch bei Patienten mit Gallengangsatriesie vorkommen [29].

In einer Röntgenaufnahme des Thorax können weitere Fehlbildungen, beispielsweise des Skeletts beim Alagille-Syndrom, festgestellt werden.

Mit Hilfe der Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) kann die Flüssigkeit in den Gallengängen und Pankreas dargestellt werden, hierdurch

können viele intra- und extrahepatische Gallengangsveränderungen erkannt werden. Der Patient sollte dafür nüchtern sein. Die Bildaufnahme erfolgt mittels Magnetresonanztomographie (MRT). Um Bewegungsartefakte zu minimieren, werden jüngere Kinder für die Zeit der Untersuchung sediert. Weitere Störfaktoren sind Herz- und Atembewegungen, welche eine negative Auswirkung auf die Schärfe des Bildes haben. Bei älteren Kindern kann ein gezieltes Atemmanöver dieser Bewegungsunschärfe entgegenwirken [30]. Dieses Verfahren eignet sich gut zur Beurteilung von Tumoren, Gefäßveränderungen oder fortgeschrittenen Gallenwegserkrankungen [12]. Durch eine geringe Füllung der Gallengänge kann jedoch auch fälschlicherweise ein pathologischer Befund vermutet werden [31]. Bei einer endoskopischen retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP) wird mittels eines Endoskops retrograd über das Duodenum Kontrastmittel über die Papilla Vateri in die Gallengänge (Ductus choledochus) und das Pankreas (Ductus pancreaticus) appliziert. Die Darstellung erfolgt anschließend mittels Röntgendurchleuchtung. Für diese Untersuchung muss der Patient ebenfalls nüchtern sein und erhält zudem eine Narkose. Ein Vorteil der ERCP ist die direkte Möglichkeit zur Intervention, beispielsweise bei Choledocholithiasis oder zur Entnahme einer Biopsie. Für die Durchführung einer ERCP im Kleinkindes- oder Säuglingsalter wird besonders geschultes Personal und entsprechendes endoskopisches Material, welches sich zur Untersuchung von Kleinkindern eignet, benötigt [32]. Es gilt zu beachten, dass die technische Applikation von Kontrastmittel, besonders bei kleinen Kindern zu Artefakten führen kann, welche die Interpretation der Ergebnisse erschweren können [31].

Bei einer ERCP handelt es sich um einen etwas risikoreicheren Eingriff im Vergleich zur MRCP. Zu den möglichen Komplikationen gehören Pankreatitiden, Infektionen, Blutungen sowie allergische Reaktionen auf Kontrast- oder Narkosemittel. Hinzu kommt die Strahlenexposition. Bei jungen Kindern ist die Häufigkeit der Komplikationen allerdings gering [33, 34].

Bei der ERCP ist im Vergleich zur MRCP eine genauere Darstellung der Gallengänge möglich [31], die sich sehr gut eignet, um eine Gallengangsatresie auszuschließen [32, 33, 35]. Die ERCP bietet sich somit an, falls weniger invasive

Untersuchungsmethoden diagnostisch nicht zielführend waren und eine Gallengangsatriese nicht hinreichend ausgeschlossen werden konnte. Durch den Einsatz der ERCP bei dieser Fragestellung können Laparotomien mit intraoperativer Cholangiographie zum Ausschluss einer Gallengangsatriese vermieden werden [32].

Histologie

Eine weitere invasive diagnostische Maßnahme stellt die Leberbiopsie dar. Auch sie wird in Betracht gezogen, sobald andere weniger invasive Verfahren zur Diagnosestellung nicht ausreichend waren. Neben diagnostischen Indikationen kann eine Biopsie auch aus prognostischen Gründen, um den Schweregrad einer diagnostizierten Erkrankung zu bestimmen, oder als Verlaufskontrolle zur Überwachung einer Progredienz erfolgen [36]. Sie ist gerade bei Speicher- oder Stoffwechselerkrankungen mit unklarem laborchemischem Bild von Bedeutung. Zusätzlich kann sie dazu beitragen die Zelltypen der Leber, an denen sich eine Erkrankung vornehmlich abspielt, zu beurteilen und ein vorwiegend hepatozelluläres Schädigungsbild von einer Gallenwegserkrankung abzugrenzen. Histologische Beispiele hierzu finden sich in den Abbildungen 2 und 3.

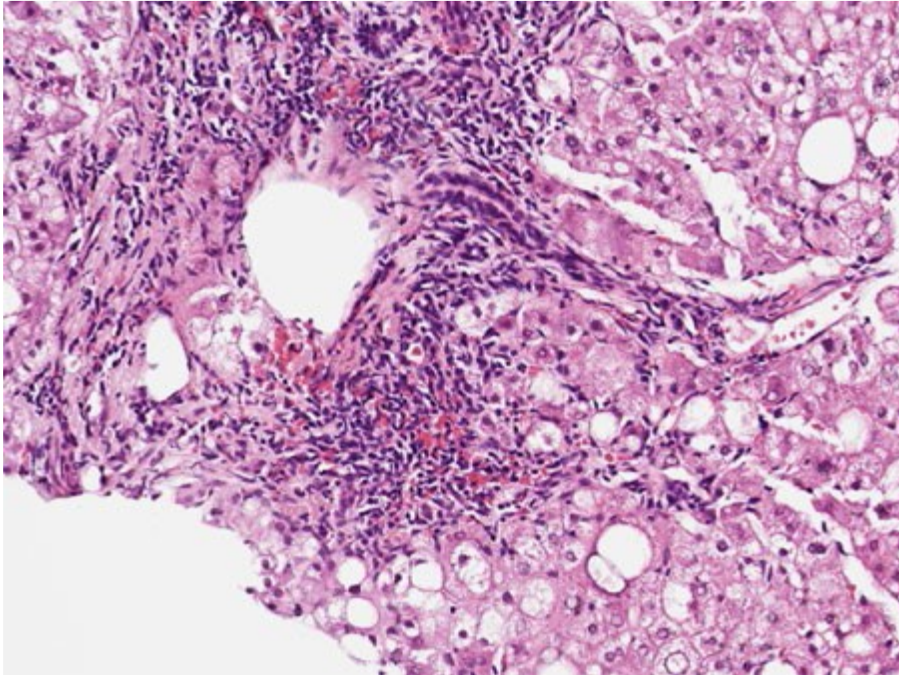


Abbildung 2: Hepatozelluläres Schädigungsbild bei M. Wilson mit morphologischen Veränderungen wie bei chronischer Hepatitis. (H&E). Fibrosiertes und verbreitertes Portalfeld und lymphozytäre Infiltration. Entnommen aus Lackner und Knisely [37].

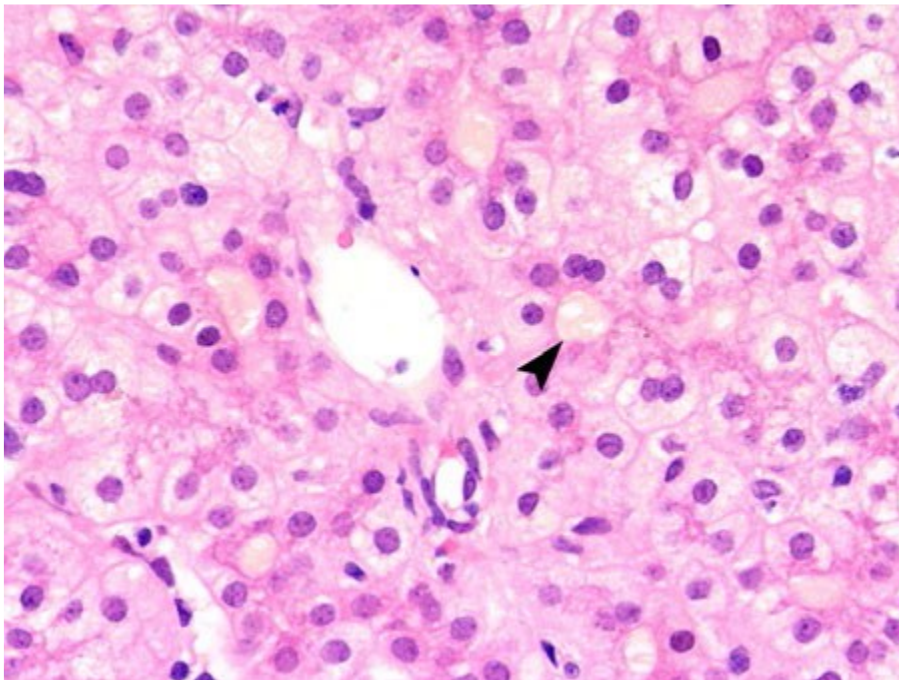


Abbildung 3: Die erhöhte Anzahl an Hepatozyten um ein vergrößertes Lumen eines Gallenkanälchens zeigt sich als „cholestatische Rosette“ in zentrolobulärem Läppchenabschnitt bei FIC-1-Defizienz (H&E). Entnommen aus Lackner und Knisely [37].

Vor der Durchführung sollte das Abdomen sonographisch untersucht werden. Je nach individuellem Risiko empfiehlt sich zusätzlich eine sonographisch gesteuerte Durchführung. Bei Erwachsenen konnte gezeigt werden, dass dies mit einer geringeren Anzahl von Krankenhausaufenthalten assoziiert ist [36]. Die Biopsie erfolgt meist perkutan unter Lokalanästhesie bzw. je nach Alter des Patienten zusätzlich in Sedierung und gilt als sichere Maßnahme. Trotzdem ist sie invasiv und kann zu Komplikationen wie Blutungen, Infektionen oder Perforation von Organen führen. Die Letalität liegt unter 0,1% [36]. Bei Patienten mit einem erhöhten Blutungsrisiko, beispielsweise bei Leberversagen, kann die Biopsie transjugulär durchgeführt werden. Hierbei wird die V. jugularis interna unter sonographischer Kontrolle punktiert. Mit Hilfe von Kontrastmittel wird ein Katheter unter Röntgendurchleuchtung in eine V. hepatica vorgeschoben, um dort die Probe zu entnehmen [38]. Dadurch bleibt die Leberkapsel intakt, wodurch das Risiko einer Blutung reduziert wird [39]. Der Patient ist während des Eingriffs an einen EKG-Monitor angeschlossen, da bei Passieren des rechten Vorhofs Arrhythmien entstehen können [39]. Transjuguläre Biopsien werden mittlerweile in vielen Zentren durchgeführt, sind jedoch gerade bei kleinen Kindern technisch anspruchsvoll [38]. Die Gewebeproben können anschließend histopathologisch sowie immunhistochemisch untersucht werden. Je nach Krankheitsbild hat die Diagnosestellung mittels Histologie eine hohe Genauigkeit.

Entsprechend der Verdachtsdiagnose können spezifische immunhistochemische Färbungen vorgenommen werden. So lassen sich bei LAL-D die schaumzelligen Kupfer-Zellen in der Diastase-PAS-Färbung und anschließend in der immunhistochemischen Färbung gegen CD68 besonders gut darstellen [22].

Das histologische Bild einer Gallengangsatresie ähnelt sowohl dem Bild der zystischen Fibrose als auch dem des α_1 -Antitrypsinmangels, sodass eine Diagnose ausschließlich auf der Basis einer histologischen Untersuchung schwierig bis nahezu unmöglich ist [40, 41]. Immunhistochemische Färbungen können bei der Diagnosestellung unterstützend wirken. Die Färbung von Cytokeratin 19 zeigt bei einer Gallengangsatresie eine verminderte Expression an, während die Expression von Cytokeratin 7 aufgrund der Duktulusproliferation hochreguliert wird [12].

Bei den progressiven intrahepatischen Cholestasen hilft die immunhistochemische Färbung von MDR3, BSEP und TJP2, um die Lokalisation oder das Fehlen bestimmter Proteine nachzuweisen und die unterschiedlichen Krankheitsbilder diagnostizieren zu können [42, 43]. Doch auch Proteine, die exprimiert werden aber in ihrer Funktion gestört sind, können das gleiche Krankheitsbild auslösen. Diese werden durch die Immunhistochemie nicht erkannt und können zu falsch negativen Ergebnissen führen [44]. Solche krankheitsverursachenden Gendefekte und -mutationen können durch genetische Diagnostik identifiziert werden. Eine weitere Schwierigkeit stellt die Ähnlichkeit mancher Erkrankungen im histologischen Bild dar. Gerade Stoffwechselerkrankungen, bei welchen in der Leber Fett angehäuft wird, führen in histopathologischen Untersuchungen zu ähnlichen Bildern, sodass beispielsweise M. Gaucher, M. Niemann-Pick oder LAL-D als Fettleberhepatitis (NASH) oder nichtalkoholische-Fettlebererkrankung (NAFLD) / Metabolically Associated Liver Disease (MALD) fehlinterpretiert werden können [22].

Hinzu kommt, dass sich manche Veränderungen erst nach einer längeren Zeit zeigen, so dass eine frühe Diagnosestellung mittels Histologie nur erschwert möglich ist. Dies betrifft beispielsweise α_1 -Antitrypsinmangel, Alagille-Syndrom oder M. Niemann-Pick [36].

1.5 Lebererkrankungen im klinischen Alltag

Trotz den oben beschriebenen ausführlichen und vielseitigen Diagnosemethoden ist eine Diagnosestellung nicht immer möglich. Besonderes Augenmerk kann dann auf die seltenen Erkrankungen gelegt werden, welche etwas häufiger auftreten. Je nach geographischer Lage sind diese unterschiedlich [45]. Mit 25-40% ist die Gallengangsatresie in Deutschland die häufigste Ursache eines cholestatischen Ikterus in den ersten Lebensmonaten. An zweiter Stelle stehen mit 25% monogenetische Erkrankungen [46]. Diese differentialdiagnostisch zu berücksichtigenden, wichtigen Krankheitsbilder werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

Gallengangsatresie

Bei der Gallengangsatresie handelt es sich um einen fortschreitenden entzündlich-obliterativen Verschluss der extrahepatischen und später auch der intrahepatischen Gallengänge. Als mögliche Ursache werden genetische Faktoren, virale Infekte (beispielsweise mit Zytomegalie-Viren), umwelttoxische Bedingungen oder gestörte Differenzierungen in der Embryonalentwicklung diskutiert. Die genaue Ursache ist zum heutigen Zeitpunkt jedoch noch ungewiss [47]. Das Krankheitsbild ist in einem Teil der Fälle mit anderen Fehlbildungen, wie beispielsweise Situs inversus oder Polysplenie assoziiert. Die Neugeborenen präsentieren sich mit einer Hyperbilirubinämie, welche mit insgesamt 2,4 - 15% auch bei gesunden Neugeborenen häufig vorkommt und je nach Ausmaß innerhalb der ersten zwei Wochen als physiologisch anzusehen ist. Bildet sich der Ikterus innerhalb dieser Zeit jedoch nicht zurück (prolongierter Neugeborenen-Ikterus), so sollten weitere diagnostische Schritte veranlasst werden [48]. Eine dunkle Verfärbung des Urins sowie acholische Stühle werden häufig von Eltern übersehen [49]. Der Verlauf der Gallengangsatresie ist progredient und erfordert innerhalb der ersten zwei bis drei Lebensmonate eine operative Hepato-Porto-Jejunostomie nach Kasai. Eine frühe Diagnose und operative Korrektur sind wichtig für die Prognose und das Überleben mit der eigenen Leber [50]. Bei Komplikationen wie Leberzirrhose, Cholangitis oder weiterhin bestehenden Wachstumsstörungen kann eine Lebertransplantation notwendig werden [51].

Es handelt sich um eine schwerwiegende Erkrankung, denn ohne operative Therapie verläuft die Krankheit bei der Mehrzahl der Patienten innerhalb der ersten drei Lebensjahre tödlich [52]. Und auch nach erfolgreicher operativer Korrektur benötigen 60-70% der Kinder noch vor dem Erwachsenenalter eine Lebertransplantation [50]. Insgesamt handelt es sich bei der Gallengangsatresie um die häufigste Indikation für Lebertransplantationen bei Kindern [51].

Morbus Wilson

M. Wilson zählt mit einer Prävalenz von 1:30.000 zu den seltenen Lebererkrankungen [53]. Es handelt sich um eine monogenetisch vererbte Kupferspeicher-

Erkrankung, welche durch Varianten in dem Gen, welches für das Kupfer-Transport-Protein ATP7B kodiert, entsteht [54]. Durch ein defektes ATP7B-Protein akkumuliert Kupfer und lagert sich im Nervensystem, in der Leber und anderen Organen ab [53]. Während die Leberbeteiligung häufig schon im Kindesalter auftritt, manifestieren sich die neurologischen Symptome wie z.B. Tremor, Dysarthrie, Dystonie, parkinsonartige oder psychiatrische Symptome typischerweise erst im 2. oder 3. Lebensjahrzehnt [9].

Ohne eine spezifische Therapie mittels Chelaten oder Kupferabsorptionshemmern verläuft M. Wilson progressiv und endet tödlich [55]. Eine späte Diagnose ist die häufigste Todesursache [56].

Alagille-Syndrom

Beim Alagille-Syndrom handelt es sich um eine monogenetische Multisystemerkrankung mit diversen Fehlbildungen (u.a. in Augen und Herz). Bei 90% der Patienten ist eine Mutation im JAG1 (Jagged Canonical Notch Ligand 1) Gen ursächlich [28], welches eine wichtige Rolle in der Regulation der Organentwicklung spielt. Die Prognose ist individuell sehr unterschiedlich und abhängig von den Herz- und Nierenfehlbildungen [28]. Etwa die Hälfte dieser Patienten entwickelt eine schwere Leberfunktionsstörung durch eine Hypoplasie der Gallengänge oder eine Leberzirrhose und benötigt bis zum Alter von 18 Jahren eine Lebertransplantation [57].

Progressive Familiäre Cholestase (PFIC)

Zu den monogenetischen Lebererkrankungen zählen auch die Krankheitsbilder der PFIC. Hierbei handelt es sich um einen Überbegriff für autosomal-rezessiv vererbte Krankheitsbilder mit ähnlichem Phänotyp. Die drei bekanntesten Subtypen (PFIC1-3) sind mit einer Prävalenz von 1:100.000 selten und machen in Deutschland ca. 10% der neonatalen Cholestasen aus [42, 58]. Die einzelnen Subtypen unterscheiden sich unter anderem anhand des mutierten Gens. Der Pathomechanismus dieser drei häufigsten Subtypen wird in Abbildung 4 dargestellt.

PFIC 1 entsteht durch Varianten im Gen ATP8B1, welches für das Protein FIC1 (familial intrahepatic cholestasis 1) kodiert. FIC1 ist eine Aminophospholipid-Flippase und sorgt für eine asymmetrische Verteilung der Phospholipide in der kanalikulären Hepatozytenmembran [42]. Bei PFIC 1 kommt es häufig in den ersten Lebensjahren zu einer Cholestase, in vielen Fällen mit ausgeprägtem Juckreiz [29]. Zusätzlich können die betroffenen Patienten an schwerer Diarrhoe, Pankreatitis und Hörverlust leiden [59]. Wenn die Progression der Erkrankung nicht gestoppt werden kann, entwickelt sich innerhalb der ersten 10 Jahre nach Diagnosestellung eine Zirrhose, welche eine Lebertransplantation notwendig macht [28].

Das Krankheitsbild der PFIC 2 entsteht durch Varianten im ABCB11-Gen, welches für das BSEP (bile salt export pump) Protein kodiert. BSEP befindet sich in der den Gallenkanalikululi zugewandten Membran der Hepatozyten und ist für die Sekretion der Gallensäure verantwortlich [59]. Bei ausgeprägter Transportstörung akkumuliert Gallensäure in den Hepatozyten und das Risiko ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC) zu entwickeln erhöht sich. Dies betrifft vor allem Patienten, bei denen trunkierende Mutationen vorliegen, welche zu einem verkürzten Genprodukt führen. Bei vielen Patienten ist, je nach Ausprägung der krankheitsverursachenden Varianten und vor allem bei fehlendem Ansprechen auf die medikamentöse oder chirurgische Therapie, innerhalb der ersten 10 Jahre eine Lebertransplantation notwendig [60, 61].

Durch Varianten im ABCB4 Gen und eine dadurch entstehende Beeinflussung der Phospholipid-Floppase (MDR3-multidrug resistance-associated protein 3) entsteht das Krankheitsbild der PFIC3 [42]. MDR3 transportiert Phospholipide innerhalb der kanalikulären Membran, so dass diese durch Gallensäure aus der Membran gelöst werden können [42, 62]. Bei Patienten mit PFIC 3 ist daher die Konzentration von Phospholipiden in der Galle niedrig. Phospholipide dienen der Mizellenbildung mit Cholesterin und Gallensalzen. Wenn Phospholipide in der Galle fehlen, greifen die nicht gebunden Gallensalze das Gallengangsepithel an und es kommt zu einer chronischen Cholangitis. PFIC 3 unterscheidet sich von den anderen beiden Subtypen durch eine Erhöhung der γ GT, weniger stark ausgeprägtem Juckreiz und Auftreten einer portalen Hypertonie bei biliärer Fibrose,

häufig erst ab der zweiten Lebensdekade [28, 58, 63]. Anamnestisch kann eine Schwangerschaftscholestase der Mutter auf eine PFIC3 hinweisen [64].

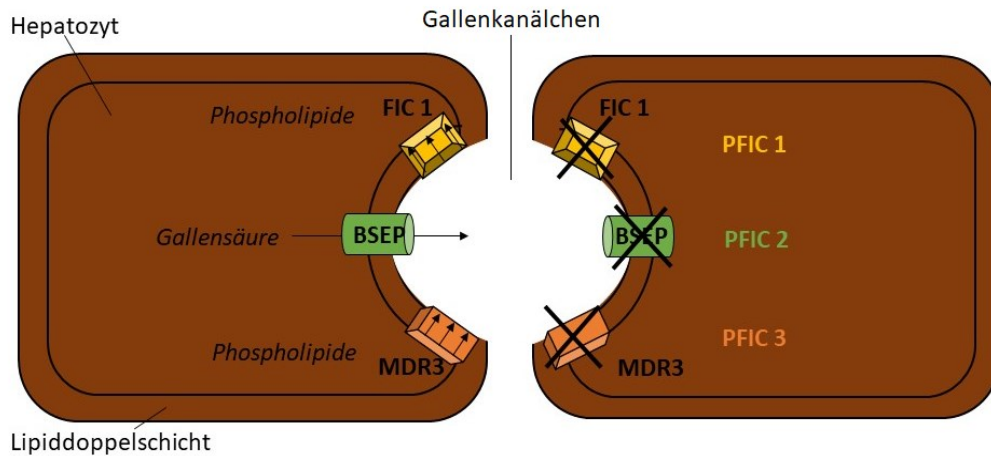


Abbildung 4: Darstellung eines gesunden (links) und eines an PFIC erkrankten Hepatozyten (rechts). Die jeweils betroffenen Transportproteine verursachen bei Ausfall die farblich zugeordnete Krankheit.

Je nach Mutation in diesen Genen können auch andere Krankheitsbilder entstehen. So sind bestimmte Varianten in allen drei Genen mit Schwangerschaftscholestase assoziiert. Eine Mutation im Gen *ATP8B1* kann neben einer PFIC 1 auch zu schwächeren Ausprägungen wie einer benignen rekurrenten Cholestase oder einer transienten neonatalen Cholestase führen [65]. Bestimmte Varianten im Gen *ABCB11* können neben einer PFIC2 das Risiko erhöhen Gallensteine zu entwickeln [42].

Varianten im Gen *ABCB4* können neben einer PFIC3 auch ein LPAC-Syndrom (low phospholipid associated cholelithiasis) mit vermehrter Gallensteinbildung, oft trotz Cholezystektomie, verursachen [66].

Die Charakteristika der oben genannten differentialdiagnostisch wichtigen Erkrankungen werden in Tabelle 1 hervorgehoben.

Tabelle 1: Charakteristika einzelner monogenetischer Erkrankungen.

Erkrankung	Gen	Protein	Phänotyp
Morbus Wilson	ATP7B	ATP7B	Hepatitis, Leberzirrhose, neurologisch-psychiatrische Symptome, Kayser-Fleischer-Kornealring, Arthropathie, tubuläre Dysfunktion
Alagille-Syndrom	JAG1	JAG1	Cholestase, Fehlbildungen in Herz, Niere, Auge, Gesichtsdysmorphien, Skelettanomalien, mentale und Wachstumsretardierung
	NOTCH2	NOTCH2	
PFIC 1	ATP8B1	FIC1	Manifestation in ersten Lebensjahren, Cholestase, ausgeprägter Juckreiz, Extrahepatische Manifestation (Diarrhoe, Pankreatitis, Hörverlust)
PFIC 2	ABCB11	BSEP	Manifestation in ersten Lebensjahren, Cholestase, ausgeprägter Juckreiz, erhöhtes Risiko für HCC
PFIC 3	ABCB4	MDR3	Manifestation in zweiter Lebensdekade, Cholestase, chronische Cholangitis, Erhöhung γ GT, weniger stark ausgeprägter Juckreiz, portale Hypertonie, biliäre Fibrose

PFIC (Progressive familiäre intrahepatische Cholestase); γ GT (Gamma-Glutamyltransferase).

Fast 50% der chronischen Lebererkrankungen im Kindesalter sind auf Veränderungen des Erbguts zurückzuführen [67]. Viele dieser genetisch verursachten Erkrankungen sind, wie die oben genannten Erkrankungen M. Wilson, Alagille-Syndrom und PFIC, monogenetischen Ursprungs [68]. Kinder mit monogenetischen Lebererkrankungen machen fast 20% der pädiatrischen Lebertransplantationen aus [11]. Die krankheitsverursachenden Varianten lassen sich im Erbgut nachweisen. Dadurch ergibt sich mit der Genanalyse eine weitere vielversprechende diagnostische Methode. Durch die kontinuierliche Weiterentwicklung der genanalytischen Verfahren hat die Gendiagnostik in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen und wird im Folgenden dargestellt.

1.6 Genetische Diagnostik

Die genetische Analyse stellt bei vielen Erkrankungen einen wichtigen diagnostischen Schritt dar. Für Patienten, bei welchen durch die bisherige Diagnostik, beispielsweise durch ein auffälliges Testergebnis der Aktivität der lysosomalen sauren Lipase, eine konkrete klinische Verdachtsdiagnose gestellt werden konnte, dient die Gendiagnostik einer Bestätigung dieses Verdachts. Verursachende Mutationen können detektiert und in einem zweiten Schritt Familienmitglieder auf ihre Trägerschaft untersucht werden (Segregationsanalyse). Bei Patienten, deren Phänotyp lediglich eine Eingrenzung auf eine Gruppe von Erkrankungen erlaubt oder wenn gar keine vorläufige Assoziation zu einem Krankheitsbild möglich ist, kann die Gendiagnostik wegweisend in der Diagnosestellung sein. Zusätzlich gibt eine genetische Untersuchung Aufschluss über die Vererbungsart und somit über das Risiko, weiterer Familienmitglieder zu erkranken oder die Erkrankung an zukünftige Nachkommen zu vererben.

Vor der humangenetischen Diagnostik ist eine Aufklärung gemäß des Gendiagnostikgesetzes zwingend erforderlich. Durch die klinische Untersuchung sowie einer ausführlichen Anamnese kann in manchen Fällen bereits eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Die Familienanamnese sowie Informationen über Konsanguinität oder einen auffälligen Schwangerschaftsverlauf, wie z.B. eine mütterliche Cholestase, sind hierbei von besonderer Bedeutung.

Je nach Krankheitsbild und Anforderung an die Gendiagnostik sollten unterschiedliche Sequenziermethoden in Betracht gezogen werden. Bei einer Sequenzierung wird anhand einer Blutprobe die Basenabfolge der Patienten-DNA aus Lymphozyten bestimmt, wodurch potenziell krankheitsverursachende Varianten identifiziert werden können.

Gefundene Varianten werden hinsichtlich der Art der Mutation, der Vererbung und der Auswirkung auf den Phänotyp untersucht [69]. Anschließend werden die Varianten mit vorhandenen Datenbanken und Literatur abgeglichen. Sie werden mit Daten von gesunden Kontrollpersonen verglichen und auf die Häufigkeit in der Bevölkerung untersucht. Durch softwaregestützte Auswertung kann die Auswirkung einer Mutation auf die Funktion des zu kodierenden Proteins abgeschätzt

werden [68]. Um die Relevanz der gefundenen Varianten für den einzelnen Patienten beurteilen zu können, ist ein interdisziplinärer Austausch zwischen Molekulargenetikern und Klinikern hilfreich [69].

In einem Gen können verschiedene Mutationen zu unterschiedlich stark ausgeprägten Krankheitsbildern und zeitlichem Auftreten führen. Missense-Varianten, bei welchen im Protein eine Aminosäure durch eine andere ersetzt wird, führen meist zu mildereren, selbstlimitierenden oder episodisch auftretenden Verläufen. Dies ist auch bei heterozygoten Varianten der Fall, da der Patient sowohl eine gesunde als auch eine mutierte Version des Gens besitzt [42]. Bei Nonsense-Mutationen entstehen Stopp-Codons an dafür nicht vorgesehenen Stellen. Wenn diese homozygot (auf beiden Allelen) oder compound heterozygot (unterschiedliche Varianten am gleichen Genlokus auf beiden Allelen) vorliegen, kann es zu schwerwiegenden Verläufen mit frühem Krankheitsbeginn führen. Ebenso bei Frameshift-Varianten, bei welchen durch Insertion oder Deletion einer nicht-durch-drei-teilbaren Anzahl von Nukleotiden, ein Rasterschub entsteht. Dadurch werden alle darauffolgenden Nukleotide verändert abgelesen und führen zu falschen Aminosäuren und nicht exprimierten Proteinen [42].

Zur Beurteilung der Mutationen werden diese anhand der Leitlinien des *American College of Medical Genetics (ACMG)* [70] in die folgenden fünf Klassen eingeteilt: pathogen, wahrscheinlich pathogen, unklare Signifikanz, wahrscheinlich benigne und benigne. Wobei bei einer Zuteilung zur Gruppe „wahrscheinlich pathogen bzw. wahrscheinlich gutartig“ eine Sicherheit von über 90% gegeben sein sollte. Im Folgenden werden unterschiedliche genanalytische Verfahren aufgezeigt.

Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung nach Sanger, auch bekannt als Kettenabbruchmethode, stammt bereits aus den 70er Jahren [71]. Bei der traditionellen Sequenzierung nach Sanger wird das Genom meist gezielt nach bestimmten Exonen (für ein Protein kodierende Bereiche) und angrenzenden Intronen (nicht-kodierende Bereiche) untersucht. Hierfür werden relevante DNA-Bereiche mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert.

Neben Desoxyribonukleosidtriphosphaten werden fluoreszenzmarkierte Terminatoren, Didesoxyribonukleosidtriphosphate ohne 3'OH-Gruppe, in die neue DNA eingebaut. Dadurch entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, deren radioaktiv markierte Enden spezifisch für die jeweilige Terminatorsequenz sind [42, 72]. Der Ablauf wird schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

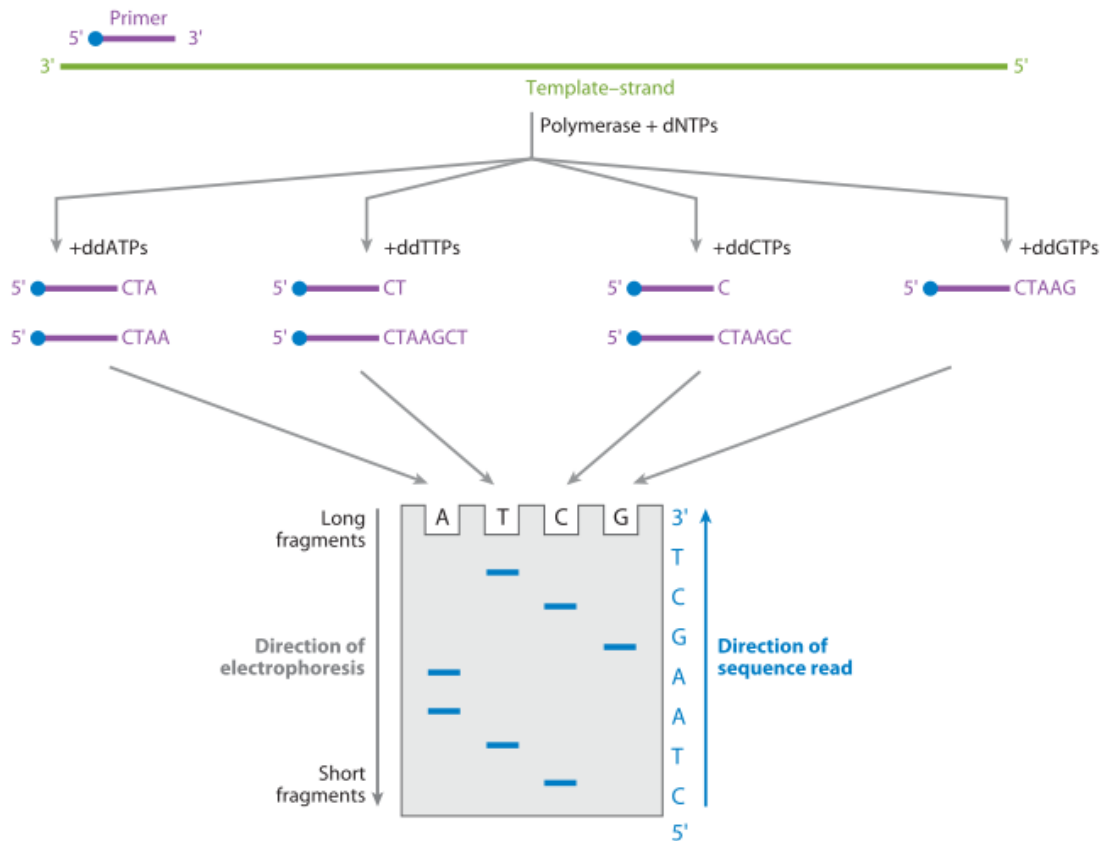


Abbildung 5: Sequenzierung nach Sanger. dNTPs = Desoxynukleosidtriphosphate; ddATPs = Didesoxyadenosintriphosphate; ddTTPs = Didesoxythymidintriphosphate; ddCTPs = Didesoxycytidintriphosphate; ddGTPs = Didesoxyguanosintriphosphate; A= Adenin; T= Thymin; C = Cytosin; G = Guanin. Entnommen aus [72].

Diese Methode eignet sich, um in einzelnen Sequenzen gezielt nach Mutationen zu suchen, beispielsweise zur Überprüfung der Eltern auf Trägerschaft einer beim Patienten gefundenen heterozygot vorliegenden Variante mittels Segregationsanalyse. Für eine breitere Analyse ist sie jedoch eher ungeeignet, da bei mehreren Gentargets mehrere Durchläufe benötigt werden, um eine Diagnose

stellen zu können [67]. Daher erfordert diese Analyse vorab eine genaue phänotypische Untersuchung, um die Auswahl krankheitsverursachender Gene vorher einzugrenzen. Dies ist besonders in einem frühen Stadium der Krankheit schwierig, wenn noch nicht alle krankheitsspezifischen Merkmale ausgeprägt sind [69]. Die Sequenzierung nach Sanger gilt als die genaueste Sequenzierungsmethode, ist aufgrund der oftmals benötigten Wiederholungen jedoch sehr zeitaufwendig [73].

Next Generation Sequencing

Durch die Entwicklung moderner Sequenzieretechniken (Next Generation Sequencing, NGS) ist die parallele Analyse mehrerer DNA-Abschnitte möglich. Dies führt dazu, dass die Analysen schneller durchgeführt und somit größere Mengen an DNA analysiert werden können. Die Analyse ist zudem im Vergleich zur Sequenzierung nach Sanger kostengünstiger [73]. Durch die kontinuierliche Weiterentwicklung von NGS in der Vergangenheit wurde eine weit verbreitete Anwendung in klinischen Bereichen ermöglicht [74].

Es gibt drei wichtige Stufen der NGS-Genanalyse, welche sich in ihrem Umfang unterscheiden: Die Analyse aller Gene (Genom-Sequenzierung, Whole-Genome-Sequencing, WGS), aller Exone (proteinkodierende Abschnitte, Exom-Sequenzierung, Whole-Exome-Sequencing, WES) oder die Analyse anhand krankheitsspezifischer Genpanel.

Bei der Genom- und Exom-Sequenzierung ergeben sich große Datenmengen, welche die Befundung erschweren. Das kann zu Fehlinterpretationen und falschen Diagnosen führen [67]. Bei der Exom-Sequenzierung werden alle Exone und somit 1-2% des Genoms untersucht, welche jedoch 85% der bekannten krankheitsverursachenden Genmutationen enthalten [75]. Diese Untersuchungsmethode eignet sich besonders für Patienten mit komplexen Phänotypen und wird beispielsweise im neuropädiatrischen Bereich bei Kindern mit unspezifischen Entwicklungsverzögerungen durchgeführt [76, 77].

Eine spezielle Form der Exom-Sequenzierung ist die Trio-Exom-Analyse.

Hierbei werden zusätzlich zum Patienten auch die Eltern oder Geschwister genetisch untersucht, wodurch weiterführende Informationen über

Vererbungsmuster oder Wiederholungsrisiken weiterer Familienmitglieder gewonnen werden können. Außerdem können so beim Patienten neu aufgetretene Mutationen (sogenannte „de novo- Mutationen“) sicher identifiziert werden [77]. Dadurch entsteht eine etwa doppelt so hohe Erfolgschance im Vergleich zur Einzel-Exom-Diagnostik [78].

Bei beiden Untersuchungen ist die anschließende genetische Beratung wichtig, um den Patienten über Relevanz und Aussagekraft der gefundenen Mutationen aufzuklären und um Angst und Verunsicherung zu vermeiden.

Genpanel-Sequenzierung: Hierunter versteht man die Analyse der Patienten-DNA auf Varianten in allen bekannten, mit einem bestimmten Krankheitsbild assoziierten Genen. Dies beinhaltet sowohl bekannte Introne als auch Exone, wobei sowohl häufige als auch seltene Gene untersucht werden können [79]. Bei der Genpanel-Analyse handelt es sich um eine hoch sensitive Untersuchungsmethode (Sensitivität >99,3 - 99,9%, Spezifität >99,9%) [76]. Sowohl die Auswahl eines Panels als auch die anschließende Beurteilung der Ergebnisse basiert auf den Symptomen des Patienten [80, 81]. Eine detaillierte Beschreibung des Phänotyps kann die Auswahl eines geeigneten Panels erleichtern. Hierdurch ergibt sich, im Gegensatz zur Diagnostik durch Genom- und Exom-Analyse, eine Schwierigkeit für Patienten mit unspezifischen Symptomen. Ein weiterer Nachteil ist, dass nur bereits bekannte krankheitsassoziierte Gene in die Panel-Analyse mit einbezogen werden können und noch unbekannte, krankheitsassoziierte Gene nicht analysiert werden [80].

Um Ergebnisse zu bestätigen oder besser bewerten zu können, kann eine anschließende Segregationsanalyse hilfreich sein, um die Spezifität und Sensitivität noch weiter zu erhöhen [80]. Dies kann auch unter Einbeziehung der elterlichen DNA erfolgen. Gerade bei Varianten, welche beim Patienten heterozygot vorliegen, kann eine Segregationsanalyse der Eltern Informationen über die Pathogenität liefern. Konnte bei einem symptomatischen Patienten durch die Panel-Analyse keine den Phänotyp erklärende Variante detektiert werden, kann eine breitere Analyse, ebenfalls unter Einbeziehung der elterlichen DNA, mittels Trio-Exom-Analyse hilfreich sein [82].

Transkriptom-Sequenzierung: Je nach Bedarf und Funktion einer Zelle werden unterschiedliche Teile der DNA bzw. unterschiedliche Gene transkribiert und somit in RNA umgeschrieben. Bei der Transkriptom-Sequenzierung wird die RNA, welche sich zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem Gewebe befindet, untersucht. Das Vorhandensein und die Menge bestimmter RNA-Sequenzen lassen Rückschlüsse auf den metabolischen Zustand, sowie die Expression einzelner Proteine der Zellen zu.

In der Transkriptom-Analyse können wichtige Veränderungen detektiert werden, welche zur Beurteilung der Pathogenität einer Variante hilfreich sind. Dazu gehören Veränderungen der Genexpression und der Spleiß-Mechanismen. Neben abweichender Genexpression werden auch Allel-spezifische Informationen über die Expression erhalten, wodurch eine monoallele Expression (MAE), bei welcher von zwei Allelen nur eines exprimiert wird, detektiert werden kann. Dies kann vor allem bei der Interpretation von heterozygot vorliegenden Varianten mit autosomal-rezessivem Vererbungsmuster relevant sein.

Als Untersuchungsmaterial eignet sich hierfür Patientenblut oder Biopsieproben. Bei Lebererkrankungen empfiehlt es sich das Material einer Leberbiopsie zu verwenden. Es kann zwischen dem Coding-Transcriptome-Sequencing (CTS) und dem Whole-Transcriptome-Sequencing (WTS) unterschieden werden. Beim CTS wird ausschließlich die mRNA untersucht, welche als Informationsträger für die Erstellung von Proteinen dient und 1-5% der gesamten RNA ausmacht. Beim WTS wird die gesamte RNA, also sowohl die kodierende RNA als auch die nicht-kodierende RNA untersucht. Dadurch kann die Auswirkung von Varianten in Exonen, Intronen und in den Regionen dazwischen, welche beispielsweise Hinweise auf Spleiß-Mechanismen liefern können, beurteilt werden [83, 84].

Aus klinischer Sicht stellt die Transkriptom-Analyse somit beispielsweise eine Möglichkeit für Patienten dar, bei welchen in der Panel- und Trio-Exom-Analyse in mehreren Genen Varianten mit unklaren Signifikanzen gefunden wurden. Durch die Transkriptom-Analyse kann untersucht werden, wie sich diese Varianten in der Expression der mRNA widerspiegeln, wodurch sich weitere Erkenntnisse über deren Ursächlichkeit für den Phänotyp ergeben. Hierbei können vor allem auch Varianten in nicht-kodierenden Sequenzen (Introne) berücksichtigt

werden. Laut einer Metaanalyse liegt hier vermutlich der größte Vorteil der Transkriptom-Analyse [85, 86].

1.7 Elektronische Priorisierung mittels Deep Phenotyping

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, entstehen vor allem bei Genom- und Exom-Sequenzierungen eine Vielzahl an Daten, wobei der Großteil davon für die Diagnostik nicht relevant ist. In der Vergangenheit wurden daher viele computer-basierte Verfahren entwickelt, um möglicherweise relevante Gene in dieser großen Datenmenge zu finden. Eine Methode, die hierbei vielversprechende Ergebnisse liefern konnte, ist der von Yang et al. entwickelte „*Phenolyzer*“ [87]. Der Name *Phenolyzer* leitet sich aus „*phenotype-based gene analyzer*“ ab. Es handelt sich um ein Programm, welches anhand spezifischer phänotypischer Merkmale entsprechende betroffene Gene, die an der Krankheitsentstehung beteiligt sein können, vorschlägt. Bei dieser Anwendung, welche als Web-Applikation zur Verfügung steht, wird eine Rangliste von für bestimmte Krankheiten oder Phänotypen relevanten Genen erstellt. Der *Phenolyzer*-Algorithmus führt für diese Berechnung die folgenden Schritte aus: Im ersten Schritt werden die vom Benutzer eingegebenen Symptome des Patienten mit verschiedenen Datenbanken abgeglichen, um spezifische Krankheitsnamen zu identifizieren. Anschließend werden Datenbanken, in denen diese spezifischen Krankheiten mit Genen verknüpft sind, durchsucht, um mit den Krankheiten und Phänotypen assoziierte Gene zu identifizieren. Hierfür wird für jedes Gen eine Wertung von 0 bis 1 vorgenommen, wobei eine Assoziierung mit spezifischeren Krankheiten stärker gewichtet wird. Diese gewichteten Gene werden im nächsten Schritt als Startpunkte (Start-Gen) gewählt, um in weiteren Datenbanken nach Gen-Gen-Verbindungen (z.B. Protein-Protein-Interaktionen, gleiche Genfamilie, gemeinsames Genregulationsnetzwerk) zu suchen. Die Wertung der einzelnen Start-Gene wird hierbei in den Gen-Gen-Verbindungen berücksichtigt. Zum Schluss wird für jedes Gen eine abschließende Wertung, basierend auf der initialen Start-Gen-Gewichtung und den Gen-Gen-Verbindungen berechnet und eine normalisierte Rangliste der möglicherweise interessanten Gene erstellt.

Hierfür werden alle Gewichtungen mit der höchsten Gewichtung normiert, damit das relevanteste Gen die Wertung 1 erhält und alle anderen Wertungen relativ dazu sind.

Der *Phenolyzer* könnte mit Hilfe einer Vorabanalyse eine Möglichkeit darstellen, Patienten, welche phänotypisch nicht gut einzuordnen sind, gezielter genetisch analysieren zu können [88]. Mit Hilfe des *EHR-Phenolyzer* (electronic health record), wird der Schritt der manuellen Eingabe des Phänotyps übersprungen und die Begriffe mittels Deep Learning direkt aus dem Arztbrief gefiltert. Dieses Programm ist bisher allerdings nur für englischsprachige Texte verfügbar [89].

1.8 Fragestellung

Durch die oben beschriebene Standarddiagnostik kann eine möglichst genaue Phänotypisierung vorgenommen werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob dadurch eine zielgenauere, effektivere Genpanel-Diagnostik, welche zu einer präzisen Therapieplanung beiträgt, durchgeführt werden kann.

Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- 1. Wie effektiv war die Diagnosestellung mittels Algorithmus und anschließender Panel-Analyse?**
- 2. Verbessert eine möglichst genaue Phänotypisierung die Erfolgchancen der Panel-Analyse?**
- 3. Können die Ergebnisse der Panel-Analyse durch anschließende Segregationsanalyse oder Trio-Exom-Analyse der Eltern verbessert werden?**
- 4. Kann die Effektivität in der Diagnosestellung durch unterstützende Methoden der Phänotypisierung (*Phenolyzer*) gesteigert werden?**

2. METHODIK

2.1 Patienten und Einschlusskriterien

In dieser Arbeit wurden die Daten von 56 Patienten, welche im Zeitraum von 2014 bis 2020 aufgrund des Verdachts auf eine seltene Lebererkrankung in der Universitäts-Kinderklinik Tübingen bzw. in einer externen Praxis oder einem Krankenhaus vorstellig wurden, untersucht. Alle Patienten erhielten eine Leber-Panel-Diagnostik durch die CeGaT GmbH (Tübingen) und waren zum Zeitpunkt der Analyse unter 18 Jahre alt. Eine Zustimmung zur Nutzung der Daten für wissenschaftliche Zwecke, welche größtenteils bereits vor der Genanalyse gegeben wurde, war Voraussetzung.

Die Symptome, Anamnese sowie laborchemischen Werte der Patienten wurden den Arztbriefen sowie dem Klinikinformationssystem entnommen. Externe Ärzte, welche Patienten zu CeGaT überwiesen haben, wurden kontaktiert und um die entsprechenden Arztbriefe gebeten. Zur Analyse der Effektivität der Panel-Diagnostik, wurden die Daten der einzelnen Patienten direkt vor und ungefähr ein Jahr nach der Genanalyse untersucht. Das Bestehen von Beschwerden sowie der Bedarf weiterer therapeutischer Maßnahmen wurden hier als Fortbestehen der Erkrankung gedeutet.

Die genetische Untersuchung sowie die retrospektive Auswertung der Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung der Richtlinien nach Richards [70] und Matthijs [90] sowie der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Analyse wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt (Projekt Nr. 892/2019BO2).

2.2 Unterteilung der Patienten in Kategorien

Die Genanalyse hat in der Diagnosestellung je nach Symptomen und Krankheitsbild einen unterschiedlichen Stellenwert. Um die Ergebnisse besser bewerten zu können, wurden die Patienten nach Phänotypisierung anhand ihrer klinischen Verdachtsdiagnosen in drei Kategorien unterteilt:

Zu **Kategorie 1** gehören Patienten mit einem gut zu einer Verdachtsdiagnose zuordenbaren Phänotyp. Die Genanalyse dient hier der Bestätigung dieser Verdachtsdiagnose. Das trifft bei Krankheitsbildern zu, die einen eindeutigen Phänotyp haben oder eindeutige Parameter, welche in der Diagnostik gezielt untersucht werden können. Als beispielhafte Krankheitsbilder sind hier Morbus Wilson und das Alagille-Syndrom zu nennen.

Bei Patienten der **Kategorie 2** lässt der Phänotyp eine Zuordnung zu einer Erkrankungsgruppe zu. Die Genotyp-Analyse ist erforderlich, um eine bestimmte Erkrankung aus dieser zu diagnostizieren. Diese präzise Diagnosestellung ist von Bedeutung für eine individuelle Therapieplanung oder Abschätzung der Prognose. Hierzu gehören die PFIC Erkrankungen.

In **Kategorie 3** wurden Patienten eingeteilt, deren Phänotypen nicht ohne weiteres einer Erkrankung oder Erkrankungsgruppe zuzuordnen sind. Hier könnte die Genanalyse einen Aufschluss über die Diagnose und daraus entstehende neue Therapiemöglichkeiten geben. Erkrankungen, die dieser Patientengruppe entsprechen, sind beispielsweise der Prolidase-Mangel oder mitochondriale Erkrankungen.

Um den Einfluss des Alters auf die Effektivität der Panel-Analyse zu beurteilen, wurden die Patienten aller Kategorien in vier Gruppen anhand ihres Alters bei der genetischen Analyse eingeteilt. Hieraus ergeben sich folgende Gruppen: 1 (1-2 Monate, n=12), 2 (3-6 Monate, n=14), 3 (7-45 Monate, n=16), 4 (47-210 Monate, n=14).

2.3 Genetische Diagnostik

Bei der Leber-Panel-Diagnostik wurden anhand des Phänotyps bestimmte Sub-Panel ausgewählt. Die Sub-Panel (LIV01-08) bestehen aus Gensets mit jeweils 5 bis 59 verschiedenen Genen. Die Bezeichnung der einzelnen Sub-Panel richtet sich nach dem vermuteten Krankheitsbild bzw. der gezeigten Symptomatik: LIV01: Familiäre Cholestase; LIV02: Hypercholämie und Gallensäuresynthesedefekte; LIV03: Transportstörungen in Hepatozyten und Cholangiozyten;

LIV04: Störungen der Organomorphogenese; LIV05: Stoffwechselstörungen der Hepatozyten (inklusive Tyrosinämie, Glykogenspeicherkrankheiten, Hyperammonämien, Shwachman-Diamond-Syndrom, Fettsäureoxidationsstörungen und peroxisomale Erkrankungen); LIV06: Lysosomale Speichererkrankungen; LIV07: Rezidivierendes akutes Leberversagen; LIV08: Hepatische Mitochondriopathien [76].

Die Aufstellung der Gene dieser Gensets werden jährlich von Klinikern und Genetikern auf ihre Relevanz hin überprüft und gegebenenfalls nach ausführlicher Literaturrecherche revidiert oder ergänzt. Die Patienten, welche 2014 bis 2018 eine Panel-Diagnostik bekommen haben, wurden auf Gene der Panel-Version 1 untersucht. Anfang 2019 wurde diese Panel-Version überarbeitet, sodass alle Patienten von 2019 bis 2020 auf die Gene der zweiten Panel-Version untersucht wurden. Eine Übersicht der untersuchten Gene befindet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2: Auflistung der einzelnen Gene innerhalb der Sub-Panel bis 2018, sowie nach der Überarbeitung 2019.

Sub-Panel	bis 2018 <i>(2019 nicht mehr integrierte Gene sind kursiv gedruckt)</i>	ab 2019 <i>(neu integrierte Gene sind kursiv gedruckt)</i>
LIV01 Familiäre Cholestase	ABCB11, ABCB4, ABCG5, ABCG8, ATP8B1, NR1H4, MYO5B, DCDC2,	ABCB11, ABCB4, ABCG5, ABCG8, ATP8B1, NR1H4, MYO5B, DCDC2, <i>TJP2</i>
LIV02 Hypercholämie und Gallensäuresynthesedefekte	ABCD3, AKR1D1, AMACR, BAAT, CYP27A1, CYP7A1, CYP7B1, EPHX1, HSD3B7, SLC10A2, TJP2	ABCD3, <i>ACOX2</i> , AKR1D1, AMACR, BAAT, CYP27A1, CYP7A1, CYP7B1, EPHX1, HSD3B7, SLC10A2, <i>SLC27A5</i> , TJP2
LIV03 Transportstörungen in Hepatozyten und Cholangiozyten	ABCC2, ATP7B, CFTR, <i>CIRH1A</i> , SERPINA1, VIL1, VIPAS39, VPS33B	ABCC2, ATP7B, CFTR, SERPINA1, VIL1, VIPAS39, VPS33B
LIV04 Störungen der Organomorphogenese	CC2D2A, CLDN1, INVS, JAG1, NOTCH2, PKD1, PKD2, PKHD1, RPGRIP1L, TMEM67, ZIC3	CC2D2A, CLDN1, INVS, JAG1, NOTCH2, PKD1, PKD2, PKHD1, RPGRIP1L, TMEM67, ZIC3
LIV05 Stoffwechselstörungen der Hepatozyten, inklusive Tyrosinämie,	ACADM, ACADVL, ADK, AGL, AGPAT2, ALAD, ALDOB, ASL, ASS1, BSCL2, CCDC115, COG1, COG6, COG7, CPS1,	ACADM, ACADVL, ADK, AGL, AGPAT2, ALAD, ALDOB, ASL, ASS1, BSCL2, CCDC115, COG1, COG6, COG7, CPS1,

Glykogenspeicherkrankheiten, Hyperammonämien, Shwachman-Diamond-Syndrom, Fettsäureoxidationsstörungen und peroxisomale Erkrankungen	ETFA, ETFB, ETFDH, FAH, G6PC, GAA, GALE, GALT, GBE1, GYS2, IARS, KRT18, KRT8, LMNA, MPI, NGLY1, NR1H4, OTC, PEX1, PEX12, PEX13, PEX14, PEX16, PEX19, PEX2, PEX26, PEX3, PEX5, PEX6, PEX7, PGM1, PHKA1, PHKA2, PHKB, PHKG2, PKLR, PMM2, PTRF, PYGL, SBDS, SLC37A4, SLC39A8, STT3B, TTC37	ETFA, ETFB, ETFDH, FAH, G6PC, GAA, GALE, GALT, GBE1, GYS2, IARS, KRT18, KRT8, LMNA, MPI, NGLY1, NR1H4, OTC, PEX1, PEX12, PEX13, PEX14, PEX16, PEX19, PEX2, PEX26, PEX3, PEX5, PEX6, PEX7, PGM1, PHKA1, PHKA2, PHKB, PHKG2, PKLR, PMM2, PTRF, PYGL, SBDS, SLC37A4, SLC39A8, STT3B, TTC37
LIV06 Lysosomale Speichererkrankungen	GBA, LIPA, NPC1, NPC2, SMPD1	GBA, LIPA, NPC1, NPC2, SMPD1
LIV07 Rezidivierendes akutes Leberversagen	DLD, EIF2AK3, HMGCL, LARS, NBAS, TRMU	DLD, EIF2AK3, HMGCL, LARS, NBAS, SCYL1, TRMU
LIV08 Hepatische Mitochondriopathien	BCS1L, C10orf2, CPT1A, CPT2, DGUOK, FARS2, GFM1, HADHA, MPV17, MRPS16, POLG, SCO1, SLC25A20, SU- CLG1, TRMU, TSFM, TYMP	BCS1L, C10orf2, CPT1A, CPT2, DGUOK, FARS2, GFM1, HADHA, MPV17, MRPS16, POLG, SCO1, SLC25A20, SU- CLG1, TRMU, TSFM, TYMP

Für die von CeGaT durchgeführte Genpanel-Analyse wurden Illumina NovaSeq und MiSeq (Illumina®, San Diego, U.S.A.) verwendet [76]. Die Sequenzierung der DNA erfolgt hier Nukleotid für Nukleotid während der Synthese des Stranges („Sequencing-by-Synthesis“) [91]. Die Durchführung lässt sich in drei Schritte unterteilen, welche in Abbildung 6 veranschaulicht werden:

1. Die Erstellung einer DNA-Bibliothek: Die DNA wird fragmentiert und an beiden Enden Adapter mit bestimmten Sequenzmotiven angebracht (siehe Abb. 6a).
2. Klonale Amplifikation: Die Technologie von Illumina basiert auf einer Technik, die als „Bridge Amplification“ bezeichnet wird. Diese findet an einer Glasoberfläche, ähnlich einem Objektträger, auf welcher sich zwei Typen

von Oligonukleotiden befinden, statt. Oligonukleotide sind kurze DNA-Bruchstücke, bestehend aus 10-100 Nukleotiden (Nukleinbase + Pentose + Phosphatgruppe). Diese Oligonukleotide sind komplementär zu den Enden der Adapter der DNA-Fragmente. Sie dienen als Primer und werden mittels reverser Transkriptase anhand des DNA-Fragments komplementär verlängert. Anschließend wird das DNA-Fragment entfernt. Der neu entstandene, an der Glasoberfläche befestigte, DNA-Strang verbindet sich mit seinem freien Ende mit dem komplementären zweiten Typ von Oligonukleotiden auf der Glasoberfläche, so dass eine „Brücke“ entsteht. Das zweite Oligonukleotid wird anschließend anhand des „Brückenstrangs“ komplementär synthetisiert. So entstehen zwei komplementäre, gegenläufige Stränge (reverse und forward), welche beide mit einem Ende an der Glasoberfläche fixiert sind (siehe Abb. 6b). Dieser Prozess wird um ein Vielfaches wiederholt, so dass gleichzeitig Millionen Vervielfältigungen eines DNA-Fragments entstehen. Die reversen-Stränge werden wiederum entfernt.

3. Die Sequenzierung nach Illumina erfolgt durch Synthese („Sequencing-by-Synthesis“) und basiert auf der Cyclic Reversible Termination Methode. Die Sequenzierung findet anschließend an den, an der Glasoberfläche fixierten, „forward“ Strängen statt. Die vier unterschiedlichen Nukleotide sind mit Terminator-Gruppen versehen und fluoreszenzmarkiert. Bei Einbau wird ein Fortführen der Synthese verhindert und ein je nach Base charakteristisches fluoreszierendes Signal ausgesendet (siehe Abb. 6c). Anschließend werden die Markierung und die Terminatorsequenz abgespalten und ein neuer Syntheszyklus beginnt [68, 76, 92].

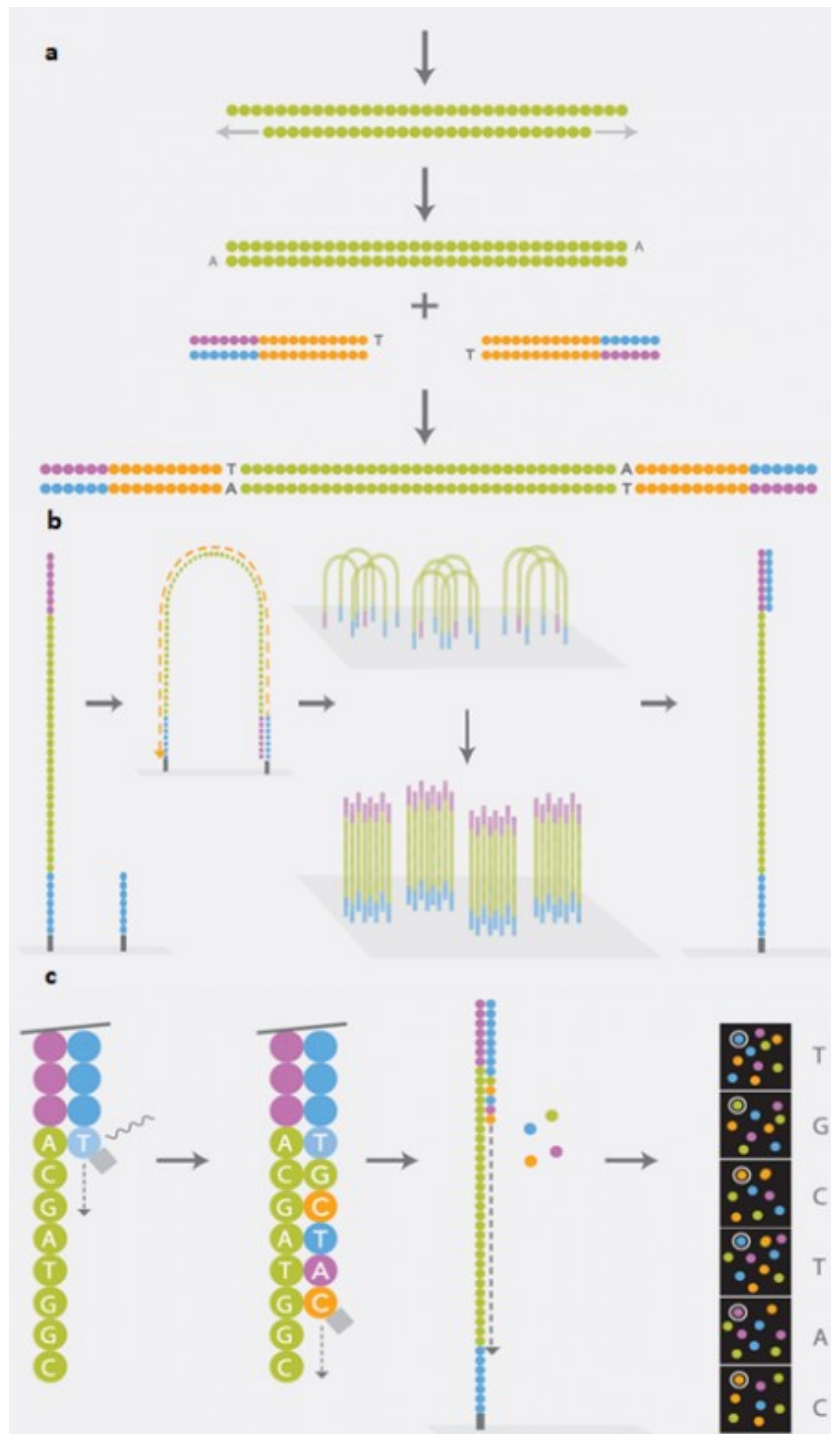


Abbildung 6: Handlungsschritte des Next Generation Sequencing, adaptiert an Methoden von Illumina®. Erstellung einer DNA- Bibliothek (a); Amplifikation (b); Sequenzierung (c) [14].

2.4 Deep Phenotyping

Beispielhaft wurde bei sechs Patienten der *Phenolyzer* [87] angewandt. Bei zwei dieser Patienten konnte vorher durch die Panel-Analyse bereits eine Diagnose gestellt werden (Patienten Nr. 12 und 14). Die Diagnose eines Patienten (Nr. 8) ist aufgrund unklarer Signifikanz der genetischen Variante als vermutlich ursächlich anzusehen. Alle drei weisen einen unspezifischen Phänotyp auf und lassen sich somit der Kategorie 3 zuordnen. Bei den drei anderen Patienten (Patienten Nr. 5, 16 und 46, jeweils einer aus Kategorie 1,2 und 3) konnte durch die zuvor durchgeführten genetischen Analysen (alle Panel-Analyse, einmal zusätzlich Trio-Exom-Analyse) keine Diagnose gestellt werden.

Die Patienten wurden randomisiert aus den entsprechenden Kategorien ausgewählt. Die Patienten der Kategorie 3 entsprechen hierbei den Patienten, welche vermutlich am meisten von dem *Phenolyzer* profitieren können. Ein unspezifischer Phänotyp erschwert eine genaue Panelauswahl, wobei der *Phenolyzer* unterstützend wirken kann.

Für die Anwendung wurde das *Phenolyzer* Web-Interface benutzt [88]. Die den Arztbriefen sowie dem Klinikinformationssystem entnommenen Symptome, sowie die an den *Phenolyzer* übergebenen Begriffe sind in Tabelle A1 aufgelistet.

2.5 Transkriptom

Um den potenziellen Beitrag der Transkriptom-Analyse sowie die Möglichkeit einer Interpretation darzustellen, wurde beispielhaft ein weiterer Patient als Fallstudie analysiert. Bei diesem Patienten wurden bereits mehrere genetische Analysen durchgeführt und in mehreren Genen Varianten gefunden, welche seinen Phänotyp jedoch nicht ausreichend erklärten. Aufgrund des klinischen Verdachts einer Krankheitsassoziation mit einem bestimmten Gen, wurde eine erweiterte Analyse der Eltern auf Trägerschaft mittels Trio-Exom-Analyse durchgeführt. Die Ursächlichkeit der Varianten konnte dadurch nicht eindeutig bestätigt werden, weshalb eine Transkriptom-Analyse (WTS) durchgeführt wurde.

Diese kann zur Priorisierung der gefundenen Varianten eingesetzt werden. Durch die Quantifizierung einzelner RNA-Abschnitte lassen sich Hinweise auf die Expression einzelner Gene untersuchen. Da pathogene Varianten einen hohen Einfluss auf die Expressionsstärke haben, können durch die Fokussierung auf Transkripte mit stark abweichenden Expressionsstärken mögliche Zusammenhänge gefunden werden [93]. Somit können bisher unbekannte Varianten möglicherweise als potentiell pathogen eingestuft werden. Auch möglicherweise krankheitsursächliche Veränderungen der Spleiß-Mechanismen können detektiert und beurteilt werden. Durch diese kann es beispielsweise zum Überspringen eines Exons (Exon-Skipping) oder zur Exon-Extension, wobei die Region nach einem Exon fälschlicherweise als Teil des Exons angesehen wird, kommen, wodurch veränderte, nicht funktionsfähige oder krankheitsverursachende Proteine entstehen [93]. Bei Patienten mit seltenen genetischen Erkrankungen betreffen schätzungsweise bis zu 10% der pathogenen Varianten Spleißvorgänge [94]. Für die Analyse wurde von CeGaT das Illumina NovaSeq 6000 Sequencing System verwendet [83]. Die RNA wird dabei zuerst fragmentiert und in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Mit Hilfe von Adaptoren werden die RNA-Fragmente anschließend mittels PCR amplifiziert und sequenziert [95].

Um die Expressionsstärke einzelner Gene anschließend zu quantifizieren, eignet sich der TPM-Wert (transcript per million). Dieser normiert die Anzahl der vorliegenden Transkripte im Bezug zur Größe (je größer ein Gen, desto mehr Fragmente entstehen) und Sequenziertiefe (diese gibt an, wie oft ein bestimmtes Gen sequenziert wurde und bestimmt somit die Empfindlichkeit der Sequenzierung) eines Gens. Als TPM-Wert bezeichnet man die Anzahl der Transkripte eines Gens, die entstehen würden, wenn insgesamt eine Million Transkripte sequenziert werden würden. Dieser Wert wurde anschließend mit den TPM-Werten von Kontrollpersonen in einer Datenbank (*Genotype Tissue Expression, GTEx* [96]) verglichen. Zur Beurteilung veränderter Spleiß-Mechanismen lassen sich Exon-Verbindungen anschaulich mit einem Sashimi-Plot darstellen. Hierbei werden die Expressionsstärken der Exone in der vertikalen Achse dargestellt, die Anzahl der Reads der Verbindungen zwischen Exonen wird über die Stärke der verbindenden Linie visualisiert.

2.6 Diagnostisches Konzept

Zusammenfassend lässt sich der Ablauf der Diagnostik mit dem in Abbildung 7 gezeigtem Schema darstellen. Mittels Basisdiagnostik wurde eine möglichst genaue Phänotypisierung vorgenommen, der eine darauf basierende gezielte Panel-Analyse folgte. Die mögliche Unterstützung durch den *Phenolyzer* erfolgte in dieser Arbeit retrospektiv, um einen möglichen Nutzen zu analysieren. Zukünftig wäre eine prospektive Anwendung denkbar.

Darauf aufbauend können die gefundenen Varianten mittels Segregationsanalyse der Eltern verifiziert werden. Konnte bei der Panel-Analyse kein passender Genotyp identifiziert werden, bietet die Trio-Exom-Analyse der Eltern oder Geschwister eine weitere Möglichkeit die Treffsicherheit der Genanalyse zu erhöhen. Als nächste Eskalationsstufe, für Patienten, bei denen die bisher genannten Diagnoseschritte nicht erfolgsversprechend waren, kann eine Transkriptom-Analyse Auskunft über die RNA-Expression und somit über den metabolischen Zustand der Zellen geben. In Zusammenschau aller Ergebnisse erfolgt die Diagnosestellung.

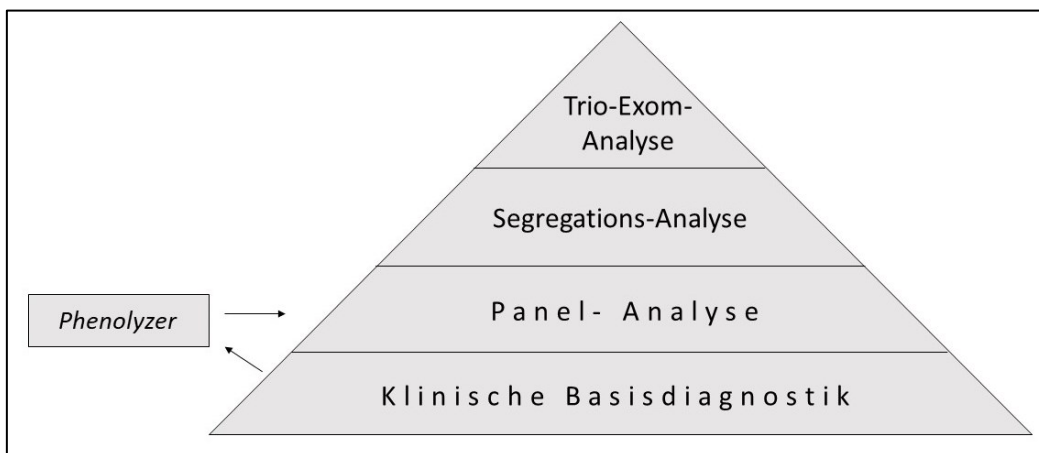


Abbildung 7: Ablauf der stufenweise durchgeführten, aufeinander aufbauenden genetischen Diagnostik, basierend auf einer ausführlichen klinischen Basisdiagnostik zur genauen Spezifizierung des Phänotyps. Möglichkeit einer unterstützenden Anwendung des Phenolyzers [87].

2.7 Statistik

Die Daten wurden mit Excel (Microsoft, Office 16, Version 2206) erfasst und analysiert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Patienten

Die demographischen sowie klinischen Daten aller Patienten werden in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Demographische und klinische Daten sowie Laborwerte aller 56 Patienten.

Merkmale, Laborwerte vor Analyse	Anzahl (n = 56)
Geschlecht, weiblich/männlich	24/32
Primär am Universitätsklinikum Tübingen vorstellig	37
	Mittelwert (\bar{X}) (Spannweite (R))
Alter bei Symptombeginn [Monate]	25,2 (0-192)
Alter bei Analyse [Monate]	47,5 (1-210)
	Mittelwert (\bar{X}) (\pm Standardabweichung (σ))
Gesamtbilirubin [mg/dl]	4,2 (\pm 4,7)
Konjugiertes Bilirubin [mg/dl]	3,1 (\pm 3,7)
AST [U/l]	189,1 (\pm 237,7)
ALT [U/l]	162,1 (\pm 183,7)
AP [U/l]	427,0 (\pm 243,1)
γ GT [U/l]	162,7 (\pm 222,0)

AST (Aspartat-Aminotransferase); ALT (Alanin-Aminotransferase); AP (Alkalische Phosphatase); γ GT (Gamma-Glutamyltransferase).

Zur Konsanguinität lagen von 20 Patienten Daten vor, bei drei davon sind die Eltern konsanguin. Zur Familienanamnese lagen Daten von 38 Patienten vor, wobei sechzehn davon eine auffällige Familienanamnese bezüglich Erkrankungen der Leber oder Gallenwege aufwiesen (16 von 38; 42,1%). Bei vierzehn (25%) Patienten sind vor der Analyse acholische Stühle aufgefallen.

Die einzelnen Patienten und ihre Phänotypen sowie das Ergebnis der Panel-Analyse werden in Tabelle 4 dargestellt. Die häufigsten gestellten Diagnosen sind die progressiven familiären Cholestasen (PFIC, zehn Patienten) und Alagille-Syndrom (vier Patienten) [97].

Tabelle 4: Darstellung der einzelnen Patienten mit ihrem Phän- und Genotyp.

Pat.-ID	Phänotyp	Gen	Variante	Effekt	Zygotie	Beurteilung der Varianten in Panel-Analyse
1	Splénomegalie, Cholestase mit niedriger γ GT, erhöhte Transaminasen	ABCB11	c.1966_1967delT; p.Leu656Alafs*9	Frameshift, verfrühtes Stoppcodon	Heterozygot	Pathogen
			c.3722T>C; p.Leu1241Pro	Austausch Aminosäure innerhalb von Transporter, Funktion gestört	Heterozygot	Unklare Signifikanz
2	Hepatomegalie, Splénomegalie, Cholestase mit niedriger γ GT	MYO5B	c.3046C>T; p.Arg1016	Verfrühtes Stoppcodon	Heterozygot	Vermutlich, unklare Signifikanz
			c.2395C>T; p.Arg799Trp	Keine Angabe, Variante bei ähnlichem Phän beschrieben	Heterozygot	Vermutlich, unklare Signifikanz
3	Hepatomegalie, Splénomegalie, Cholestase mit niedriger γ GT, erhöhte Transaminasen	ABCB11	c.3647G>A; p.Gly1216Glu	Keine Angabe	Heterozygot	Vermutlich, unklare Signifikanz
4	Hepatomegalie, Splénomegalie, erhöhte Transaminasen	PHKA2	c.2395delC; p.His799Thrfs*18	Frameshift, verfrühtes Stoppcodon	Hemizygot	Vermutlich, bisher nicht beschrieben
5	Hepatomegalie, Cholestase mit niedriger γ GT, erhöhte Transaminasen	BAAT	c.409G>A; p.Val137Ile	Variante bisher nicht beschrieben	Heterozygot	Keine ursächliche Variante gefunden
6	Leberzirrhose Ösophagusvarizen I°, Femurfraktur bei Vitamin D Mangel	ATP7B	c.2332C>T; p.Arg778Trp	Austausch Aminosäure, beeinträchtigter Kupfertransport	Homozygot	Pathogen
		ABCC2	c.4058+6T>C; p. ?	Keine Angabe	Homozygot	Unklare Signifikanz
7	Hepatomegalie, Splénomegalie, Cholestase, erhöhte Transaminasen	TJP2	c.1877C>G; p.Thr626Ser	Keine Angabe	Heterozygot	Vermutlich, unklare Signifikanz

8	Splenomegalie, erhöhte Transaminasen	ABCB11	c.2617G>A; p.Gly873Ser	Austausch Aminosäure	Heterozygot	Vermutlich, unklare Signi- fikanz
		ABCB4	c.1529A>G; p.Asn510Ser	Reduzierte Proteinstabili- tät	Heterozygot	Vermutlich, unklare Signi- fikanz
		NR1H4	c.268C>T; p.Arg90Cys	Keine An- gabe, Vari- ante noch nicht be- schrieben	Heterozygot	Unklare Sig- nifikanz
9	Hepatomegalie, Splenomegalie, Cholestase mit niedriger γ GT, erhöhte Transaminasen					Keine ursächliche Variante gefunden
10	Cholestase					Keine ursächliche Variante gefunden
11	Cholestase mit niedriger γ GT, erhöhte Transaminasen					Keine ursächliche Variante gefunden
12	Cholestase, erhöhte Transaminasen	JAG1	c.236_251del; p.Leu79Profs*77	Frameshift, verfrühtes Stoppcodon	Heterozygot	Pathogen
13	Splenomegalie, Cholestase, erhöhte Transaminasen					Keine ursächliche Variante gefunden
14	Cholestase mit niedriger γ GT	SLCO1B1	Deletion p-Arm, partiell		Homozygot	Pathogen
		SLCO1B3	Deletion p-Arm, partiell		Homozygot	Pathogen
15	Hepatomegalie, Splenomegalie	ABCB11	c.3166G>A; p.Asp1056Asn	Bisher nicht beschrieben	Heterozygot	Vermutlich ursächlich
16	Erhöhte Transaminasen					Keine ursächliche Variante gefunden
17	Erhöhte ALT					Keine ursächliche Variante gefunden

18	Splenomegalie	ATP8B1	Deletion Exon 3-12		Homozygot	Pathogen, vermutlich ur- sächlich
		HBB	c.118C>T; p.Q40	Nonsense- Mutation	Heterozygot	Pathogen (β - Thalassaemia minor), evtl. additiv zur Krankheits- ausprägung
		FGA	c.1119G>A; p.W373	Stoppcodon	Heterozygot	Wahrschein- lich pathogen
		AKR1D1	c.706C>T; p.P236S	Bisher nicht beschrieben	Heterozygot	Unklare Signifikanz
		ANKS6	c.2197A>C; p.T733P	Bisher nicht beschrieben	Heterozygot	Unklare Signifikanz
19	Hepatomegalie, Sple- nomegalie, Cholestase mit niedriger γ GT, er- höhte Transaminasen					Keine ursäch- liche Variante gefunden
20	Hepatomegalie, er- höhte Transaminasen					Keine ursäch- liche Variante gefunden
21	Splenomegalie, er- höhte Transaminasen	GATA4	Mikrodeletion 8p.23.1		Heterozygot	Pathogen
22	Erhöhte AP					Keine ursäch- liche Variante gefunden
23	Cholestase mit niedri- ger γ GT, erhöhte Transaminasen					Keine ursäch- liche Variante gefunden
24	Splenomegalie	PKHD1	c.1342G>C; p.Gly448Arg	Missense Mu- tation	Heterozygot	Unklare Signifikanz, Phänotyp nur anteilig über- lappend
			c.9576C>T; p=	Bisher nicht beschrieben	Heterozygot	Unklare Signifikanz, vermutlich benigner Po- lymorphismus
		ABCB4	c.217C>G; p.Leu73Val	Missense Mu- tation in Transmem- brandomäne	Heterozygot	Vermutlich ursächlich, unklare Signi- fikanz
		NOTCH2	c.390G>A; p		Heterozygot	Vermutlich ursächlich, unklare Signi- fikanz

		SMPD1	c.340G>A; p.Val114Met		Heterozygot	Vermutlich ursächlich, unklare Signi- fikanz
25	Cholestase mit niedri- ger γ GT, erhöhte Transaminasen	SLC10A2	c.80A>G; p.Asn27Ser	Austausch Aminosäure in extrazellu- läerer Domäne	Heterozygot	Vermutlich, unklare Signi- fikanz
			c.910T>C; p.Phe304Leu	Austausch Aminosäure in Transmem- brandomäne	Heterozygot	Vermutlich, unklare Signi- fikanz
26	Hepatomegalie, er- höhte Transaminasen	PHKA2	c.875G>A; p.Gly292Glu	Missense Mu- tation	Hemizygot	Vermutlich, unklare Signi- fikanz
27	Splenomegalie, er- höhte Transaminasen					Keine ursäch- liche Variante gefunden
28	Cholestase mit niedri- ger γ GT, erhöhte Transaminasen					Keine ursäch- liche Variante gefunden
29	Persistierende Diar- rhoe, verzögerte Ge- rinnung					Keine ursäch- liche Variante gefunden
30	Hepatomegalie, Sple- nomegalie, erhöhte Transaminasen	ATP7B	c.3207C>A; p.His1069Gln	Faltung des Proteins gestört	Heterozygot	Pathogen
			c.3402delC; p.Ala1135Glnfs* 13	Frameshift	Heterozygot	Pathogen
31	Erhöhte ALT					Keine ursäch- liche Variante gefunden
32	Hepatomegalie, Cho- lestase, erhöhte Transaminasen	ABCC2	c.3196C>T; p.Arg1066	Entstehung Stoppcodon	Heterozygot	Vermutlich, da heterozy- got jedoch nicht krank- heitsverursa- chend, vermutlich weitere Vari- ante, die bis- her nicht beschrieben wurde
33	Erhöhte Transamina- sen					Keine ursäch- liche Variante gefunden

34	Cholestase mit niedriger γ GT, erhöhte Transaminasen					Keine ursächliche Variante gefunden
35	Splenomegalie	JAG1	c.601C>T; p.Arg201Cys	Austausch Aminosäure (in wichtiger Domäne für NOTCH-Signalweg)	Heterozygot	Pathogen
36	Cholestase mit niedriger γ GT, erhöhte Transaminasen					Keine ursächliche Variante gefunden
37	Keine Laborwerte vorhanden	IVD	c.941C>T; p.A314V		Homozygot	Pathogen
		JAG1	c.2699_2715dup; p.K906Dfs*45		Heterozygot	Möglicherweise pathogen
		NOTCH2	c.1543C>T; p.R515C		Heterozygot	Kann nicht abschließend geklärt werden
		VPS33B	c.357G>A; p.K119K		Heterozygot	
38	Keine Laborwerte oder Untersuchungsbericht vorhanden					Keine ursächliche Variante gefunden
39	Cholestase mit niedriger γ GT, erhöhte ALT	TJP2	c.115-2A>G; p.?		Heterozygot	Pathogen
40	Indirekte Hyperbilirubinämie					Keine ursächliche Variante gefunden
41	Cholestase, erhöhte ALT					Keine ursächliche Variante gefunden
42	acholischer, dünner Stuhl					Keine ursächliche Variante gefunden
43	Erhöhte Transaminasen					Keine ursächliche Variante gefunden
44	Hepatomegalie, Cholestase, erhöhte Transaminasen					Keine ursächliche Variante gefunden
45	Hepatomegalie, Cholestase mit niedriger γ GT, erhöhte AST	ATP8B1	c.2854C>T;p.Arg952,		Heterozygot	Pathogen
			c.2600G>A; p.Arg867His		Heterozygot	Pathogen

46	Erhöhte Transaminasen					Keine ursächliche Variante gefunden
47	Cholestase	TMEM67	c.1700A>G; p.Tyr567Cys,		Heterozygot	Vermutlich, bisher nicht beschrieben
48	Hepatomegalie, Splenomegalie	ABCB4	c.1283T>A; p.Val428Asp		Homozygot	Vermutlich, unklare Signifikanz
49	Erhöhte ALT					Keine ursächliche Variante gefunden
50	Erhöhte Transaminasen	ABCB11			Heterozygot	Vermutlich, unklare Signifikanz
51	Hepatomegalie	PHKA2				Vermutlich, unklare Signifikanz
		PYGL				
		SLC37A4				
52	Erhöhte Transaminasen	JAG1				Pathogen
53	Cholestase	NOTCH2				Pathogen
54	Hepatomegalie, Splenomegalie, Pankreatitis	CFTR	c.1634G>A; p.Gly545Glu			Vermutlich, unklare Signifikanz
55	Hepatomegalie, Splenomegalie, Cholestase, erhöhte Transaminasen	DCDC2	c.705-9_706dup; p.Gln236Leufs*14	Frameshift mit verfrühtem Stoppcodon, durch Duplikation	Homozygot	Pathogen
56	Hepatomegalie, Splenomegalie, Cholestase, erhöhte Transaminasen	PEPD	c.793C>T; p.Arg265*	Verfrühtes Stoppcodon	Homozygot	Pathogen

AST (Aspartat-Aminotransferase); ALT (Alanin-Aminotransferase); AP (Alkalische Phosphatase); γ GT (Gamma-Glutamyltransferase).

Als cholestatisch wurden die Patienten mit einem Gesamt-Bilirubin <5 mg/dl und direktem Bilirubin >1 mg/dl oder mit einem Gesamt-Bilirubin >5 mg/dl und direktem Bilirubin >20% des Gesamt-Bilirubins gezählt [86].

3.2 Effektivität der Panel-Diagnostik

Bei 30 (53,6%) aller untersuchten Patienten konnte anhand der Ergebnisse der Panel-Analyse ein Therapie-Konzept erstellt werden [97]. Aus dieser Gruppe lassen sich folgende Untergruppen ableiten:

- Patienten, bei welchen die klinische Assoziation des Phänotyps mit einem Genotyp bestätigt wurde.
- Patienten mit Varianten, welche vermutlich ursächlich für die Erkrankungen sind. Aus genetischer Sicht reicht das Ergebnis jedoch aufgrund unbekannter Vererbungsmuster oder unklarer Signifikanz (eine Einstufung als pathogen oder benigne ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich) nicht aus, um eine Diagnose zu stellen.
- Patienten mit Varianten, welche aus genetischer Sicht vermutlich ursächlich für das Krankheitsbild sind, aber bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurden.

Bei 26 (46,4%) Patienten ergab sich durch die Panel-Analyse keine Diagnose.

Die Patienten wurden anhand der Ergebnisse der Panel-Analyse verglichen. Die Daten werden in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Vergleich der Patienten anhand ihrer Ergebnisse in der Panel-Analyse.

Assoziation mit genetischer Diagnose:	Anzahl Patienten	Bestätigte Verdachtsdiagnosen	Alter bei Symptombeginn \bar{X} , (R), [Monate]	Alter bei Analyse \bar{X} , (R), [Monate]
Gesichert	15 (26,8%)	8	3,3 (0-11)	41,6 (1-183)
Wahrscheinlich	12 (21,4%)	8	49,0 (0-190)	78,3 (1-205)
Wahrscheinlich, bisher nicht beschrieben	3 (5,4%)	1	16,5 (1-32)	22,5 (2-43)
Keine vorhanden	26 (46,4%)	-	25,1 (0-192)	40,2 (1-210)

Die gefundenen Varianten sind „Gesichert“: Sicher ursächlich für das klinische Krankheitsbild; „Wahrscheinlich“: Vermutlich ursächlich, unklare Signifikanz; „Wahrscheinlich, bisher nicht beschrieben“: Vermutlich ursächlich, diese Varianten wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben; „Keine vorhanden“: Es wurde keine Variante gefunden, die das Krankheitsbild erklärt.

In Abbildung 8 wird die Verteilung der Panel-Ergebnisse innerhalb der vier unterschiedlichen Altersklassen (bei genetischer Analyse) graphisch dargestellt. Den größten Anteil an Diagnosestellung nach Panel-Analyse hat die Altersgruppe 3 (7 bis 45 Monate; 11 von 16; 69%). Die Patienten, welche das größte Risiko haben kein klinisch relevantes Ergebnis zu erhalten, sind im Alter von 3 bis 6 Monaten. Die Erfolgsrate liegt hier bei 29%.

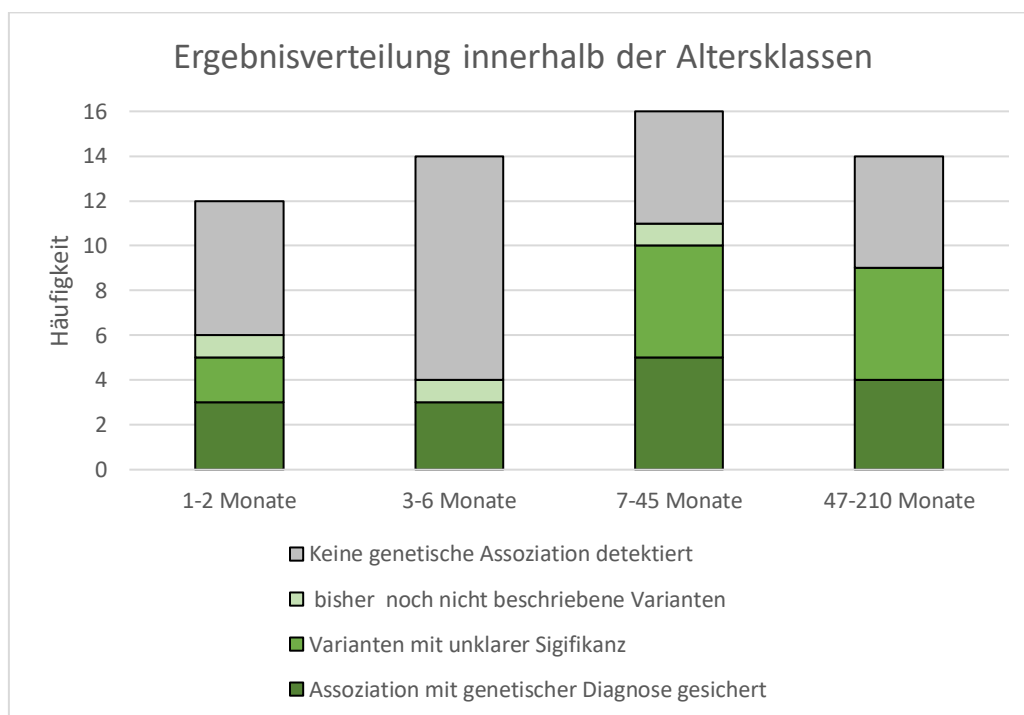


Abbildung 8: Darstellung der Panel-Ergebnisse innerhalb von vier Altersklassen 1-4 (von links nach rechts).

In Tabelle 6 werden die Daten der Patienten aufgelistet, bei welchen durch die Panel-Analyse eine Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp sicher hergestellt werden konnte.

Tabelle 6: Daten der Patienten, bei welchen mittels Genpanel-Analyse eine genetisch gesicherte Diagnose gestellt werden konnte.

Pat. - ID	Alter bei Analyse [Monate]	Klinisches Bild	Labor	Klinische Verdachtsdiagnose	Gen mit krankheitsassoziiertem Variante	Genetisch gesicherte Diagnose
1	3	Splenomegalie, Juckreiz, Ikterus	Bilirubin gesamt ↑ direkt ↑, AST ↑, ALT ↑	PFIC 2	ABCB11	PFIC 2
6	183	Ösophagusvarizen I°, Femurfraktur bei Vitamin D Mangel, Leberzirrhose	(Bilirubin direkt ↑)	M. Wilson	ATP7B	M. Wilson
12	1	Juckreiz, Ikterus, Duktopenie, kleine Gallenblase	Bilirubin gesamt ↑, direkt ↑, γGT ↑, AST ↑, ALT ↑	Neonatale Cholestase, intrahepatische Duktopenie	JAG1	Alagille-Syndrom
14	2	Sklerenikterus	Bilirubin gesamt ↑, direkt ↑, Ammoniak ↑	Neonatale Cholestase	SLCO1B1 SLCO1B3	Rotor-Syndrom
18	159	Z.n. 2 Lebertransplantationen, Splenomegalie, Juckreiz, Sklerenikterus, Trommelschlägelfinger	(Bilirubin direkt ↑), INR ↑, Quick ↓	PFIC 1	ATP8B1	PFIC 1
21	9	Splenomegalie, Juckreiz	Bilirubin gesamt ↑ (+ direkt ↑) γGT ↑, AST ↑, ALT ↑, INR ↑, Quick ↓	-	GATA4	8p23.1 Mikrodeletions-syndrom
30	110	Hepato- + Splenomegalie, Juckreiz	γGT ↑, AST ↑, ALT ↑	M. Wilson	ATP7B	M. Wilson
35	41	Geringe Splenomegalie	-	Familiäre Cholestase	JAG1	Alagille-Syndrom
37	47	k.A.	k.A.	Isovalerianazidämie, unklare Cholestaserkrankung	IVD JAG1	Isovalerianazidämie, Alagille-Syndrom (zusätzlich, Variante könnte pathogen sein)

39	6	Juckreiz, histopatholo- gisch: Eisenver- mehrung	Bilirubin gesamt ↑, direkt ↑, ALT ↑	unklare Hepatopathie	TJP2	PFIC4
45	6	Hepatomegalie, Juckreiz, Ikte- rus, verklebte gerötete Augen	Bilirubin gesamt ↑, direkt ↑, AST ↑, Albumin ↓, Ammoniak ↑	PFIC	ATP8B1	PFIC1
52	32	Juckreiz, Ikterus	γGT ↑, AST ↑, ALT ↑, AP ↑	Alagille- Syndrom	JAG-1	Alagille- Syndrom
53	2	Ikterus	Bilirubin gesamt ↑, direkt ↑, γGT ↑	Alagille- Syndrom	NOTCH2	Alagille- Syndrom
55	12	Hepato- + Sple- nomegalie, Le- berzirrhose	Bilirubin gesamt ↑, direkt ↑, AST ↑, ALT ↑, AP ↑, γGT ↑	Lysosomale Speicher- krankheit	DCDC2	neonatale sklerosierende Cholangitis
56	11	Hepato- + Sple- nomegalie, Rie- senzellhepatitis	Bilirubin gesamt ↑, direkt ↑, γGT ↑, AST ↑, ALT ↑, Albumin ↓, Panzytopenie	Lysosomale Speicher- krankheit	PEPD	Prolidase Mangel

AST (Aspartat-Aminotransferase); ALT (Alanin-Aminotransferase); AP (Alkalische Phosphatase); γGT (Gamma-Glutamyltransferase); PFIC (Progressive familiäre intrahepatische Cholestase)

k.A.: keine spezifischen Angaben bzw. Werte verfügbar, externer Patient. Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp ist trotzdem als gesichert anzusehen, da die, vor der genetischen Untersuchung formulierte, klinische Verdachtsdiagnose mit dem genetischen Befund übereinstimmt; „()“: nur geringfügig erhöht, Abweichung um 0,1 vom Grenzwert, bezogen auf die Referenzwerte der Uniklinik Tübingen.

3.3 Effektivität der Panel-Diagnostik nach Kategorien

Die Patienten wurden zur weiteren Analyse anhand ihrer Phänotypen und der daraus folgenden klinischen Verdachtsdiagnosen in die oben genannten drei Kategorien eingeteilt. Eine Übersicht der Ergebnisse [97] innerhalb der einzelnen Kategorien befindet sich in Tabelle 7.

Tabelle 7: Vergleich der Patienten innerhalb der Kategorien.

Kategorie	Anzahl Pat.	Diagnose nach Panel-Analyse aus klinischer Sicht	Assoziation mit genetischer Diagnose:			Alter bei Symptombeginn \bar{x} , (R), [Monate]	Alter bei Analyse \bar{x} , (R), [Monate]
			Ge-sichert	Wahr-scheinlich	Wahr-scheinlich, bisher nicht beschrieben		
1	14	9 (64,3%)	5 (35,7%) [5]	2 (14,3%) [2]	2 (14,3%) [1]	52,0 (1-192)	88,3 (2-210)
2	19	8 (42,1%)	4 (21,1%) [3]	4 (21,1%) [4]	-	30,2 (0-192)	41,2 (2-194)
3	23	13 (56,5%)	6 (26,1%) [0]	6 (26,1%) [1]	1 (4,4%) [0]	8,5 (0-102)	27,8 (1-205)

Kategorie 1: Patienten mit einem gut zu einer Verdachtsdiagnose zuordenbaren Phänotyp. Kategorie 2: Patienten, deren Phänotyp einer Erkrankungsgruppe zugeordnet werden kann. Kategorie 3: Zuordnung zu Erkrankung oder Erkrankungsgruppe zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

Bei den Zahlen in den eckigen Klammern handelt es sich jeweils um die bestätigten Verdachtsdiagnosen.

Sieben Patienten der Kategorie 1 hatten die klinische Verdachtsdiagnose M. Wilson, bei zwei davon wurde ein passender Genotyp gefunden. Bei drei wurde die Verdachtsdiagnose Alagille-Syndrom angegeben, zwei davon wurden genetisch bestätigt. Drei Patienten zeigten den Phänotyp einer Glykogenose, alle drei wiesen einen passenden Genotyp auf. Ein Patient wurde mit der Verdachtsdiagnose Isovalerianazidämie untersucht, welche auch bestätigt wurde.

Bei allen neunzehn Patienten der Kategorie 2 lautete die Verdachtsdiagnose progressive familiäre intrahepatische Cholestase bzw. allgemein „familiäre Cholestaseerkrankung“, bei sieben wurden diese Verdachtsdiagnosen genetisch bestätigt.

Weitere, detailliertere Auflistungen der Patienten der jeweiligen Kategorien finden sich im Anhang (Tabelle A2).

3.4 Latenz und Verlaufskontrolle

Eine hohe Latenz und somit lange Dauer bis zur Diagnosestellung kann zur Verzögerung des Beginns einer geeigneten Behandlung führen. Deshalb wurde untersucht, ob nach Diagnosestellung eine ausreichende Symptomkontrolle und nach wie vor Bedarf an einer medikamentösen Therapie bestand. Von 38 Patienten liegen Daten der Verlaufskontrolle nach ca. einem Jahr ($9,9 \pm 3,8$ Monate) vor. Bei 74% (28 von 38 Patienten) wurden in den Arztbriefen und im Klinikinformationssystem weiterhin Beschwerden oder Bedarf an therapeutischen Maßnahmen genannt, bei Patienten mit einer gesicherten genetischen Diagnose war dies bei 100% (10 von 10 Patienten) der Fall. Bei den Patienten, bei welchen durch Genanalyse keine Diagnose gestellt werden konnte, hatten 65% (11 von 17 Patienten) nach einem Jahr weiterhin Beschwerden oder Therapiebedarf.

In den unterschiedlichen Altersgruppen liegen bei 60% (Gruppe 1; 3 von 5), 69% (Gruppe 2; 9 von 13), 75% (Gruppe 3; 9 von 12) und 88% (Gruppe 4; 7 von 8) noch Beschwerden oder therapeutischer Interventionsbedarf vor.

Um zu prüfen, ob die Latenz abhängig von der Ausprägung des Phänotyps ist, wurde die Latenz innerhalb der oben beschriebenen Kategorien untersucht. Bei den Patienten aus Kategorie 1 liegt der Mittelwert der Latenz bei 34,5 Monaten, mit einer Spannweite von 138 [0-138], bei Patienten aus Kategorie 2 bei 6,3 Monaten [0-40] und bei Patienten aus Kategorie 3 bei 14,9 Monaten [1-183].

Abbildung 9 zeigt die durchschnittliche Zeitspanne von Symptombeginn bis zur genetischen Analyse anhand der einzelnen Kategorien.

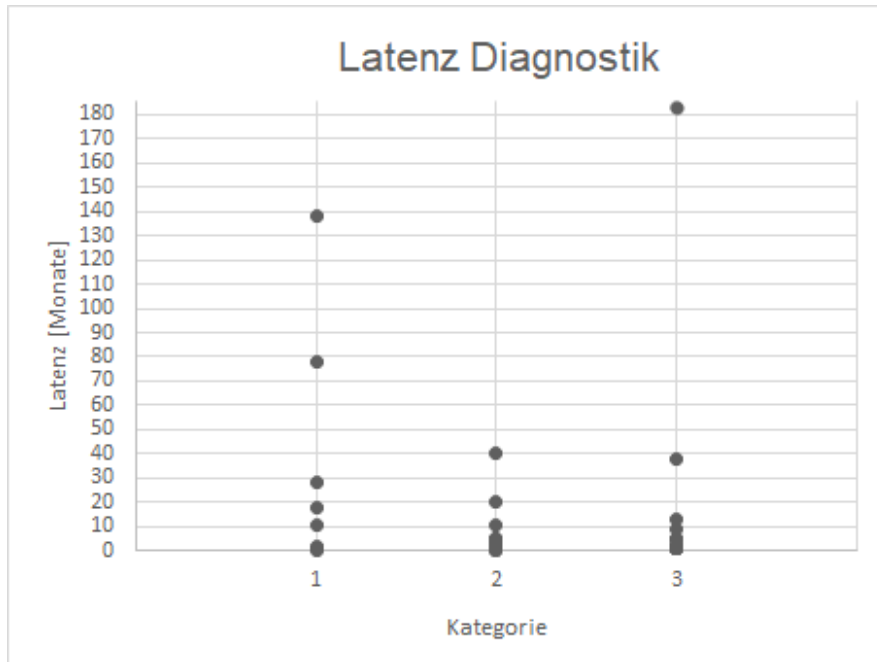


Abbildung 9: Darstellung der Latenz von Symptombeginn bis zur genetischen Analyse bzw. Diagnosestellung innerhalb der einzelnen Kategorien. Kategorie 1: Patienten mit einem gut zu einer Verdachtsdiagnose zuordenbaren Phänotyp. Kategorie 2: Patienten, deren Phänotyp einer Erkrankungsgruppe zugeordnet werden kann. Kategorie 3: Zuordnung zu Erkrankung oder Erkrankungsgruppe zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

3.5 Effektivität der Segregations- und Trio-Exom-Analyse

Durch Einbeziehung der elterlichen DNA in die genetische Analyse können weitere Hinweise über Vererbungsmuster oder neu aufgetretene, möglicherweise als pathogen einzustufende, Mutationen gewonnen werden.

Bei 32 Patienten wurde zur weiteren Verifizierung der Diagnose bzw. des Diagnoseverdachts eine weitere genetische Untersuchung mittels Trio-Exom-Analyse (siebzehn Patienten) oder Segregationsanalyse nach Sanger (fünfzehn Patienten) empfohlen. Bei acht Patienten (ein Patient Trio-Exom-, sieben Patienten Segregationsanalyse) liegen Daten über die Durchführung bzw. deren Ergebnisse vor. Bei fünf Patienten konnte durch die Segregationsanalyse der Familie eine Diagnose gestellt bzw. bestätigt werden. Bei allen fünf Patienten reichte das Ergebnis der Panel-Analyse bereits aus, um ein klinisches Behandlungskonzept zu erstellen. Durch die weiterführende Analyse gilt die Diagnose auch aus genetischer Sicht als gesichert. Diese Patienten werden in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Patienten, bei denen mittels Segregationsanalyse eine Diagnose gestellt werden konnte.

Pat.- ID	Ergebnis Segregationsanalyse	Trägerschaft bei Probanden in der Segregationsanalyse	Ergebnis vorangegangener Panel-Analyse
2	PFIC bestätigt Gen: MYO5B Varianten compound heterozygot	Untersuchung beider Eltern <ul style="list-style-type: none"> Vater: Klinisch gesund Träger Variante in MYO5B (c.3046C>T; p.Arg1016) Mutter: Klinisch gesund Trägerin Variante in MYO5B (c.2395C>T; p.Arg799Trp) 	Vermutlich PFIC, Variante mit unklarer Signifikanz
24	Caroli-Syndrom Gen: PKHD1 Varianten compound heterozygot (Zusätzliche) Ursächlichkeit der Variante in Gen ABCB4 konnte derzeit nicht eindeutig geklärt werden.	Untersuchung beider Eltern und eines Bruders <ul style="list-style-type: none"> Vater: Klinisch gesund Träger Variante in PKHD1 (c.9576C>T; p.=), ABCB4, NOTCH2, SMPD1 Mutter: Klinisch gesund Trägerin Variante PKHD1 (c.1342G>C; p.Gly448Arg) Bruder: Klinisch gesund Träger Variante PKHD1 (c.1342G>C; p.Gly448Arg), ABCB4 	Mehrere Varianten in unterschiedlichen Genen mit unklarer Signifikanz (PKHD1, ABCB4, NOTCH2, SMPD1) Nur anteilige Überlappung der, durch detektierte Varianten in PKHD1 hervorgerufenen Erkrankungen, mit Phänotyp
26	Glykogenose IX Gen: PHKA2 Bruder mit ähnlicher Symptomatik ist Träger gleicher Variante	Gen x- chromosomal gelegen, Untersuchung männlicher Geschwister <ul style="list-style-type: none"> Bruder 1: ähnliche abgeschwächte Symptomatik wie Indexpatient Träger gleicher Variante Bruder 2: Klinisch gesund kein Träger der Variante 	Vermutlich Glykogenose IX, Variante mit unklarer Signifikanz
30	M. Wilson Gen: ATP7B compound heterozygot	Untersuchung beider Eltern und einer Schwester <ul style="list-style-type: none"> Vater: Klinisch gesund Träger Variante in ATP7B (c.3207C>A; p.His1069Gln) Mutter: Klinisch gesund Trägerin Variante in ATP7B (c.3402delC; p.Ala1135Glnfs*13) Schwester: Klinisch gesund kein Nachweis einer Variante in ATP7B 	M. Wilson
39	PFIC 4 Gen: TJP2 compound heterozygot	Untersuchung beider Eltern	PFIC 4

PFIC (Progressive familiäre intrahepatische Cholestase).

3.6 Deep Phenotyping mittels *Phenolyzer*

Um den möglichen Nutzen einer computer-basierten Vorabanalyse bei der Wahl der zu untersuchenden Gene zu beurteilen, wurde beispielhaft für sechs Patienten nach der genetischen Diagnostik eine Analyse mittels *Phenolyzer* durchgeführt. Hierbei waren besonders die Patienten aus Kategorie 3, welche phänotypisch nicht gut einzuordnen sind, relevant, um genetische Analysen möglicherweise gezielter anwenden zu können.

Die Ergebnisse des *Phenolyzers* werden in Tabelle 9 aufgeführt. Sie enthält die fünf für den Patienten relevantesten Gene sowie die jeweilige Relevanz.

Tabelle 9: Patienten mittels Phenolyzer analysiert.

Pat. - ID	Kategorie	Gen-Vorschläge durch <i>Phenolyzer</i> (Relevanz)					Ergebnis Panel-Analyse (Relevanz laut <i>Phenolyzer</i>)
8	3	GCK (1)	AKT2 (0,92)	ABCC8 (0,92)	HADH (0,91)	ETFB (0,89)	NR1H4 (0,49) ABCB4 (0,48) ABCB11 (0,47)
12	3	UGT1A1 (1)	SLCO1B1 (0,81)	SLCO1B3 (0,8)	ABCC2 (0,69)	HBB (0,49)	JAG (0,26) Alagille-Syndrom
14	3	UGT1A1 (1)	SLCO1B1 (0,85)	SLCO1B3 (0,84)	SLC25A15 (0,68)	ABCC2 (0,65)	SLCO1B1 (0,85) SLCOB1B3 (0,84) Rotor-Syndrom
5	2	HSD3B7 (1) Kongenitaler Gallensäure-synthesedefekt Typ 1 (BAS Typ 1)	RFX6 (0,7)	CYP7B1 (0,61)	PTPN3 (0,56)	AMACR (0,44)	Kein Ergebnis
16	1	ATP7B (1)	ATP6V0A2 (0,66)	TMEM199 (0,65)	SLC33A1 (0,63)	CCDC115 (0,63)	Kein Ergebnis
46	3	RBM8A (1)	ZNHIT3 (0,96)	CCDC88A (0,93)	HSD3B7 (0,35)	CYP7B1 (0,33)	Kein Ergebnis

Die Zahl in Klammern stellt die Relevanz des entsprechenden Gens dar. Die Einschätzung erfolgt durch den Phenolyzer in Abhängigkeit von gefundener Literatur und übereinstimmenden Schlagworten und beträgt 0-1, wobei 1 die beste Übereinstimmung und somit das relevanteste Gen darstellt.

Bei den Patienten 8, 12 und 14, alle aus der Kategorie 3, konnte durch genetische Panel-Analyse ein krankheitsassoziiertes Gen identifiziert werden. Die durch den *Phenolyzer* eingeschätzte Relevanz des durch die Genanalyse identifizierten Gens ist zusätzlich in der rechten Spalte aufgelistet.

Bei Patient 5, aus der Kategorie 2, wurden drei der fünf vom *Phenolyzer* vorgeschlagenen Gene mit höchster Relevanz auch von den Klinikern und Genetikern in Betracht gezogen und in der Panel-Analyse untersucht. Allerdings konnte weder durch Panel- noch durch Trio-Exom-Analyse eine Diagnose gestellt werden. Die Verdachtsdiagnose M. Wilson konnte bei Patient 16, Kategorie 1, durch die Panel-Analyse nicht bestätigt werden. Zwei der fünf relevantesten vom *Phenolyzer* vorgeschlagenen Gene wurden bereits in der Panel-Analyse berücksichtigt (ATP7B, CCDC115). Die Daten wurden nachträglich auf Veränderungen in weiteren Genen (ATP6V0A2, TMEM199 und SLC33A1) überprüft, es wurden jedoch keine krankheitsverursachenden Varianten detektiert. Da allerdings auch ohne genetische Bestätigung alle Diagnosekriterien erfüllt wurden, wurde bereits vor der Panel-Analyse erfolgreich mit der Therapie für M. Wilson begonnen, worauf sich ein gutes Ansprechen zeigte. Die Diagnose ist somit anderweitig als klinisch gesichert zu betrachten.

Patient 46, aus Kategorie 3, zeigte zusätzlich zu den Symptomen einer Lebererkrankung unspezifische Symptome in anderen Organsystemen, welche nicht direkt mit einer Lebererkrankung in Zusammenhang stehen (Fuß- und Lidödeme). Die ersten drei vom *Phenolyzer* vorgeschlagenen, möglicherweise ursächlichen, Gene beziehen sich hauptsächlich auf die Symptome, welche keine deutliche Assoziation zu den klinischen Veränderungen einer Lebererkrankung haben, und sind somit für die Diagnostik der Lebererkrankung von geringerer Bedeutung. Genaue Angaben der eingegebenen Schlagworte für die Anwendung des *Phenolyzers* findet sich im Anhang (Tabelle A1).

Das *Phenolyzer*-Ergebnis von Patient 5 wird in Abbildung 10 graphisch dargestellt. Die dichte Vernetzung der einzelnen Symptome zeigt die Komplexität einer solchen Analyse.

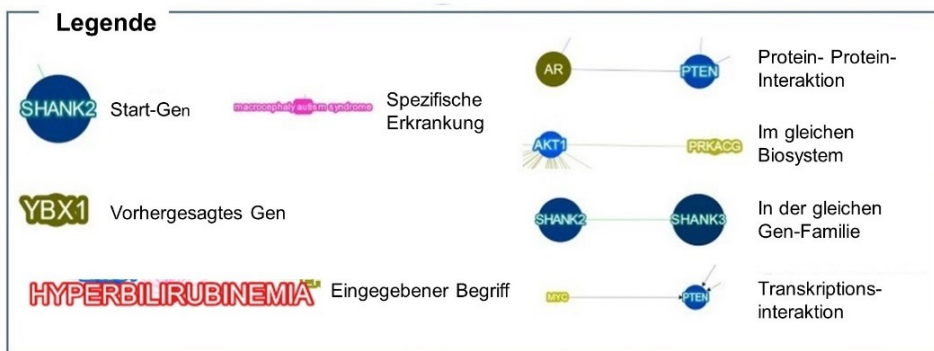
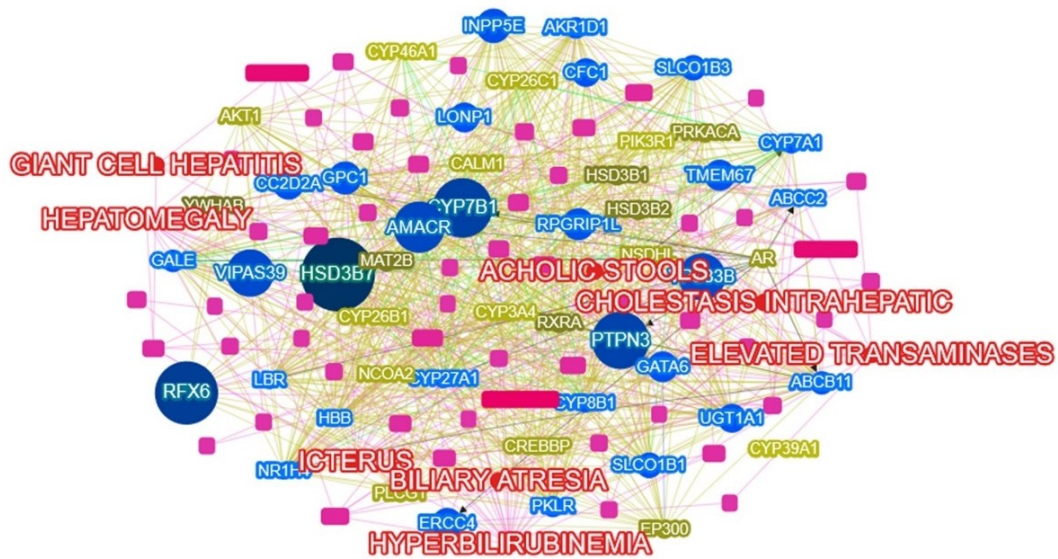


Abbildung 10: Visuelle Darstellung des Phenolyzer-Ergebnisses von Patient Nr. 5.

3.7 Transkriptom-Analyse

Viele Menschen sind Träger seltener genetischer Varianten, welche vermutlich zum individuellen Krankheitsrisiko beitragen. In genomweiten Assoziationsstudien werden DNA-Sequenzen gesunder Probanden mit denen von Erkrankten verglichen. Dadurch können häufige genetische Varianten, welche mit einer Krankheitsanfälligkeit assoziiert sind, erfolgreich identifiziert werden. Für die Beurteilung seltener Varianten sind diese Studien nicht aussagekräftig.

Schädliche protein-kodierende Allele können durch Betrachtung des genetischen Codes identifiziert werden und von gutartigen unterschieden werden [98-100]. Für nicht-kodierende Varianten, gibt es jedoch kein vergleichbares Schema, weshalb die Identifizierung seltener Varianten mit phänotypischer Auswirkung eine

Herausforderung darstellt. Seltene nicht-kodierende Varianten wurden in Studien an einzelnen Gewebeproben mit extremer Genexpression in Verbindung gebracht [101-105]. Anhand eines Beispiels soll hier geprüft werden, ob eine nicht-kodierende Variante Einfluss auf die Transkription des Gens DGUOK hat und dies in der Transkriptom-Analyse zum Ausdruck kommt.

Der Patient T1 zeigt klinisch das Bild einer mitochondrialen Lebererkrankung mit progredienter Hepatopathie, welche eine Lebertransplantation erforderlich machte. Bei der Panel-Analyse konnten mehrere heterozygot vorliegende Varianten mit unklarer Relevanz in verschiedenen Genen, sowie eine pathogene Variante im Gen DGUOK, detektiert werden (siehe Tabelle 10), welche jeweils allein nicht krankheitsursächlich sein können. Nebenbefundlich wurde ein Karyotyp XYY festgestellt, welcher mit dem Phänotyp in keinem Zusammenhang steht.

In einer Genom-Sequenzierung wurde im Gen DGUOK eine weitere Variante im intronischen Bereich detektiert, welche einen Einfluss auf das Splicing haben könnte. Varianten in diesem Gen wurden bereits mehrfach als Ursache einer, zum Phänotyp passenden, Mitochondriopathie beschrieben. Die intronische Variante könnte somit in Kombination mit der exonischen Variante krankheitsursächlich sein. Um den Effekt der intronischen Variante auf das Splicing zu untersuchen, wurde eine Transkriptom-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen werden in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Patient T1, bei welchem aufbauend auf bereits durchgeführte genetische Analysen eine Transkriptom-Analyse, zur Beurteilung einer zusätzlichen intronischen Variante, durchgeführt wurde.

Demographische Daten	m, Alter bei Symptombeginn: 12 Monate, Alter bei Analyse: 33 Monate
Phänotyp	V.a. Mitochondriopathie Unklare Hepatopathie mit Leberzirrhose, muskuläre Hypotonie, Kachexie, Hypothyreose, persistierend leichte Laktaterhöhung, Hypertrichose
Ergebnis Panel-, Trio-Exom-, Genom-Analyse	Karyotyp 47, XYY DGUOK: <ul style="list-style-type: none"> • c.130G>A, p.Glu44Lys <ul style="list-style-type: none"> ○ Pathogen ○ Compound heterozygot ○ Maternal vererbt →Anlagenträgerschaft, allein nicht krankheitsauslösend • c.592-26A>G, p.? <ul style="list-style-type: none"> ○ Unklare Signifikanz ○ Compound heterozygot ○ Paternal vererbt →Möglicherweise Einfluss auf Splicing ALG3: <ul style="list-style-type: none"> • c.1024C>A; p.Leu342Ile <ul style="list-style-type: none"> ○ Heterozygot ABCC2: <ul style="list-style-type: none"> • c.11A>G; p.Lys4Arg <ul style="list-style-type: none"> ○ Heterozygot POLG: <ul style="list-style-type: none"> • c.460G>A; p.Ala154Thr <ul style="list-style-type: none"> ○ Heterozygot SLCOB1: <ul style="list-style-type: none"> • c.170G>A; p.Arg57Gln <ul style="list-style-type: none"> ○ Heterozygot
Ergebnis Transkriptom-Analyse	Kein Hinweis auf pathogene Expressionsveränderungen des Gens DGUOK. Kein Hinweis auf Auswirkung der Variante (c.592-26A>G, p.?) auf das Splicing.

Das Gen DGUOK, in welchem mehrere, möglicherweise in Zusammenhang zum Phänotyp stehende Varianten detektiert wurden, weist einen TPM-Wert von 9,23 auf. Die *GTE*x-Vergleichswerte liegen, wie in Abbildung 11 dargestellt, mit einem Median von 17,66 (n= 226) in einem ähnlichen Bereich. Somit lässt sich kein eindeutiger Hinweis auf eine möglicherweise pathogene Expressionsveränderung ableiten.

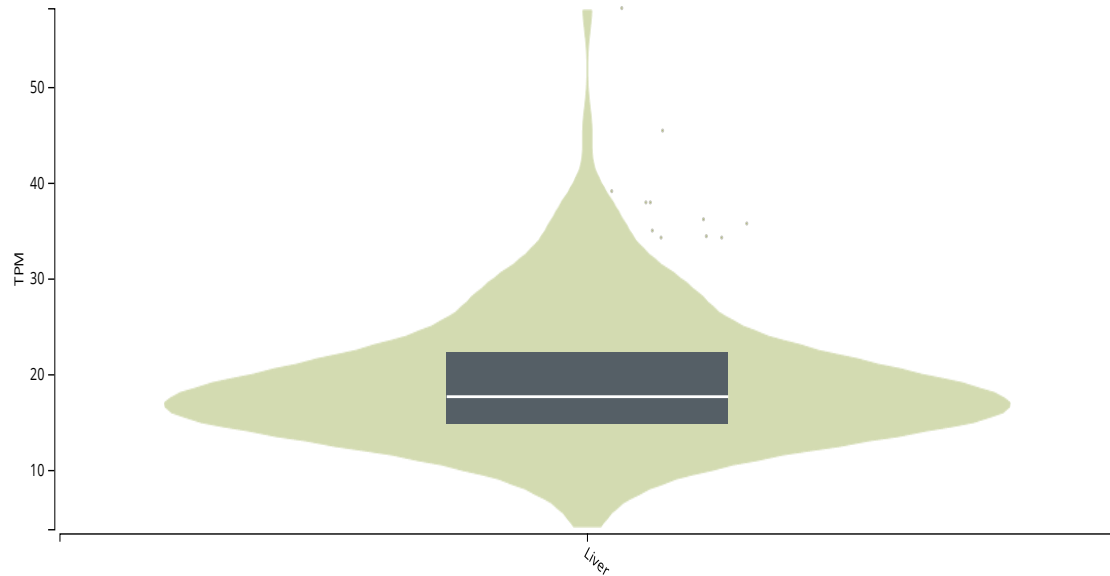


Abbildung 11: Genexpression von DGUOK im Lebergewebe von Personen in der GTEx Datenbank.

Datenquelle: GTEx Analysis Release V8 (dbGaP Accession phs000424.v8.p2), die Daten wurden am 28.02.23 vom GTEx-Portal (<https://gtexportal.org>) entnommen.

Für die intronische Variante des Gens DGUOK wird bioinformatisch ein möglicher Verlust einer Akzeptor-Splice-Site vorhergesagt, welches möglicherweise zu einem Fehl-Spleißen oder einem Überspringen eines Exons (Exon-Skipping) führen könnte. Um dies zu überprüfen wurden die Transkriptom-Ergebnisse für das Gen DGUOK mittels Sashimi Plot in Abbildung 12 visualisiert und mit dem eines Kontrollpatienten verglichen. Anhand dieser Ergebnisse liegen keine Hinweise für die Auswirkung dieser Variante auf das Spleißen vor. Spleiß-Veränderungen lassen sich jedoch nicht sicher ausschließen, da die Mutation nicht voll durchschlagen muss und der Effekt der Variante auf dem anderen Allel sich nicht ermitteln lässt.

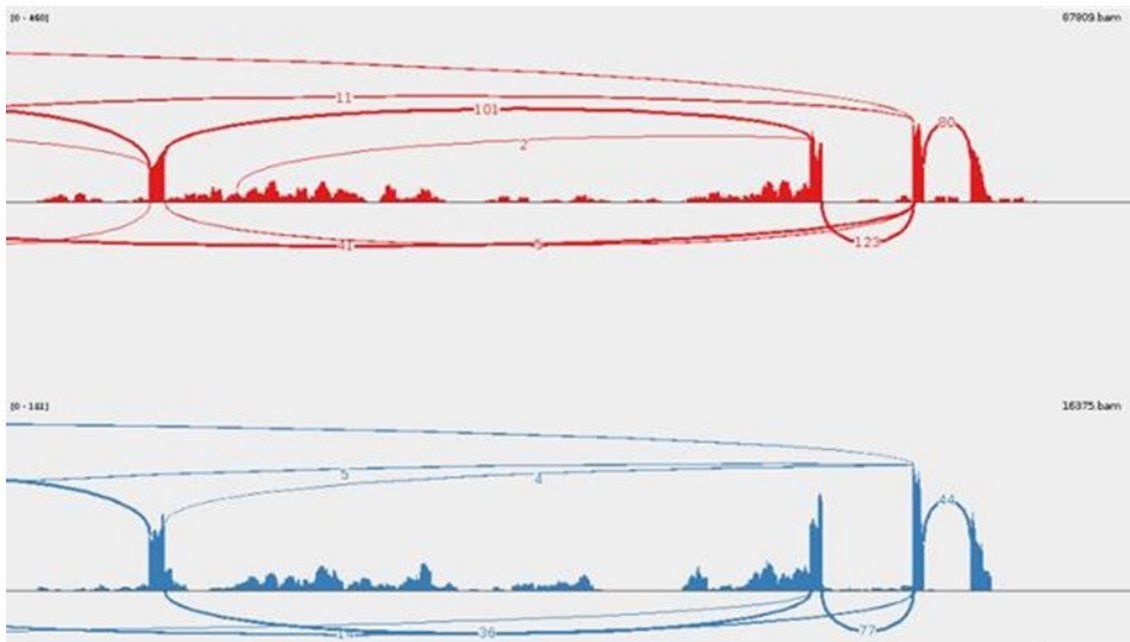


Abbildung 12: Darstellung der Sequenzierung des Gens DGUOK mittels Sashimi-Plot. Horizontal wird die Lokalisation im Gen und vertikal die Lesedichte dargestellt. In blau wird der Indexpatient T1 und in rot ein Vergleichspatient dargestellt. Es liegen zwar, wie zu erwarten, unterschiedliche Expressionsstärken vor, jedoch kein Hinweis auf Veränderungen des Splicings.

4. DISKUSSION

Seltene Lebererkrankungen bei Kindern stellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Ätiologien und sich überschneidenden klinischen Merkmalen eine große diagnostische Herausforderung dar. Spezifische laborchemische Veränderungen sind nur mit einem Teil der Erkrankungen assoziiert, so beispielsweise bei dem α_1 -Antitrypsinmangel oder spezifische Antikörper bei Autoimmunhepatitis. Die Leberbiopsie ist invasiv, mit potentiellen Risiken verbunden und zeigt häufig auch keine spezifischen Veränderungen, die eindeutig einer Erkrankung zuzuordnen sind. Viele der Lebererkrankungen im Kindesalter sind genetisch determiniert. Bei diesen häufig autosomal rezessiv vererbten Erkrankungen, ist die Expression von Genen gestört, die für die Differenzierung essentieller Organstrukturen der Leber, für die Funktion an wichtigen Domänen des Hepatozyten oder der Cholangiozyten kodieren.

Moderne Sequenzierungstechniken (Next Generation Sequencing, NGS) haben sich als leistungsfähiges Instrument zur Entschlüsselung der genetischen Grundlagen dieser Erkrankungen erwiesen und ermöglichen eine genaue und rechtzeitige Diagnose. Diese Arbeit untersuchte bei leberkranken Kindern und Jugendlichen die Effektivität der Panel-Analyse in der Diagnosestellung der zugrundeliegenden Erkrankung. In dieser Arbeit wurden 56 Patienten mit unterschiedlichen Symptomen und Zeichen einer Leberfunktionsstörung im Kindes-, Schul-, und Jugendalter untersucht. Zur Differenzierung der klinischen Daten wurde u.a. bei Säuglingen mit cholestatischen Leberfunktionsstörungen ein Diagnostikalgorithmus verwendet (nach Nicastro et al. [11] und Sturm et al. [12]) und dementsprechend eine Panel-Sequenzierung eingesetzt. Bei 53,6% konnte durch die Panel-Analyse, mit vorausgehender ausgiebiger Phänotypisierung mittels konventioneller Diagnostik, erfolgreich eine Diagnose gestellt werden.

Häufig existiert zwischen der genetisch gesicherten und der Diagnose im klinischen Kontext eine Divergenz. Aufgrund von unklarer Signifikanz oder fehlenden Literaturnachweisen werden nachgewiesene Varianten aus genetischer Sicht nur als „vermutlich ursächlich“ eingestuft. Aus Sicht des klinisch tätigen Arztes reichen diese Ergebnisse jedoch aus, um ein Therapiekonzept erstellen zu können,

weshalb diese Patienten in unserer Arbeit zu den gesicherten Ergebnissen zählen. Ein Beispiel hierfür sind Patienten mit transienter neonataler Cholestase, bei welchen häufig heterozygot vorliegende Varianten in den Genen ABCB4 und ABCB11 gefunden werden [106]. Die heterozygot vorliegende Mutation kann in Kombination mit anderen Risikofaktoren, wie beispielsweise Frühgeburtlichkeit oder Hypoxie, zu dem Krankheitsbild der transienten neonatalen Cholestase führen [107, 108]. Aus genetischer Sicht kann eine heterozygot vorliegende Mutation zumindest nicht allein ursächlich für eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit sein, Kliniker können den Patienten aufgrund dieses Befundes jedoch ein Konzept der Weiterbehandlung anbieten. Diese Patienten haben im Kindesalter meist einen benignen Verlauf.

Effektivität der Panel-Diagnostik

Bei der Studie von Nicastro et al. [11] konnte 2019 bei 60% (29/48) durch Einzelgen-, Panel- oder Trio-Exom-Analyse eine Diagnose gestellt werden. Hierbei wurden 125 Patienten prospektiv analysiert. Frühgeborene sowie Patienten mit Sepsis, parenteraler Ernährung über mindestens zwei Wochen oder endokrinen Störungen wurden von vornerein ausgeschlossen. Von den 125 Patienten wurden zudem alle Patienten mit Gallengangsatresie ausgeschlossen, so dass insgesamt 48 Patienten mit einem Durchschnittsalter von zwei Monaten, cholestatischem Phänotyp und dem Verdacht auf monogenetische Lebererkrankungen genetisch analysiert wurden. Davon wurde bei 36 Patienten eine Genpanel-Analyse, bei 6 eine Trio-Exom-Analyse und bei weiteren 6 Einzelgen-Analysen durchgeführt. Betrachtet man nur die Genpanel-Analysen, sinkt die Erfolgsquote auf 50%. Die häufigsten Diagnosen waren, wie auch in unserer Arbeit, die progressiven familiären Cholestasen und das Alagille-Syndrom.

Ein wichtiger Unterschied zu unserer Arbeit besteht in der Selektion der Patienten. Nachdem Ausschluss nicht-genetischer Erkrankungen wie der Gallengangsatresie wurden von Nicastro et al. ausschließlich cholestatische Patienten analysiert, während in unserer Studie zusätzlich Patienten mit hepatitisähnlicher Symptomatik oder Hepatomegalie und phänotypischem Verdacht auf eine monogene Lebererkrankung mit eingeschlossen wurden. Auch ist das Patientenalter

in unserer Studie mit einem durchschnittlichen Alter von etwa 4 Jahren bei Analyse auch deutlich älter. Insgesamt liegt unsere Erfolgsquote mit 53,6 % in einem ähnlichen Bereich wie die Erfolgsquote der Genpanel-Analyse von Nicastro et al., trotz des heterogenen Patientenkollektivs.

Verbesserung der Effektivität durch Phänotypisierung

Auch Togawa et al. [109] untersuchten Patienten mit neonataler bzw. infantiler intrahepatischer Cholestase. Insgesamt wurden 109 Patienten mit Hilfe eines Gen-Panels, bestehend aus 18 Genen, analysiert. Aufgrund des Einschlusses von Patienten mit Risikofaktoren für eine nicht-genetisch bedingte Cholestase, wie beispielsweise Frühgeburtlichkeit, Infektionen, Auffälligkeiten des Hormonsystems oder des Stoffwechsels, lag die Erfolgsrate bei lediglich 28%. In der Untergruppe mit klinisch unbekannter, möglicherweise nicht-genetischer Ätiologie liegt die Erfolgsrate sogar nur bei 4%. Die Untergruppe mit vorbekannter klinischer Diagnose weist mit 71% hingegen ein deutlich besseres Ergebnis auf. Dies ist ebenfalls ein Hinweis dafür, dass eine Vorauswahl zu einer höheren Diagnoserate führt.

Auch Karpen et al. [110] untersuchten cholestatische Patienten, allerdings wurden bei ihnen ebenfalls Patienten mit unbekannter chronischer Lebererkrankung mit eingeschlossen. Außerdem ordneten sie die Gendiagnostik früher im Diagnoseprozess ein und verzichteten somit auf eine, der Genanalyse vorausgehende, ausgiebige Phänotypisierung, um potentiell überflüssige Leberbiopsien zu vermeiden. Durch die unspezifisch angewandte Gendiagnostik fällt die Erfolgsrate deutlich geringer aus als in dieser Arbeit. Von 2171 Patienten erhielten 8% eine sichere und weitere 4% eine wahrscheinliche genetische Diagnose durch die Panel-Analyse. Die häufigsten gestellten Diagnosen waren das Alagille-Syndrom, α_1 -Antitrypsinmangel und PFIC 2.

Um schnell und in einem frühen Krankheitsstadium eine Diagnose stellen zu können, veranlassten auch Chen et al. [111] eine Panel-Analyse ohne genaue vorherige Phänotypisierung. Retrospektiv lag die Effektivität bei Patienten mit spezifischem Phänotyp auch hier deutlich über dem der Patienten ohne spezifischere Merkmale (67,6% vs. 12,3%).

Abbildung 13 zeigt das Ergebnis dieser Arbeit im Vergleich mit den zuvor diskutierten Arbeiten.

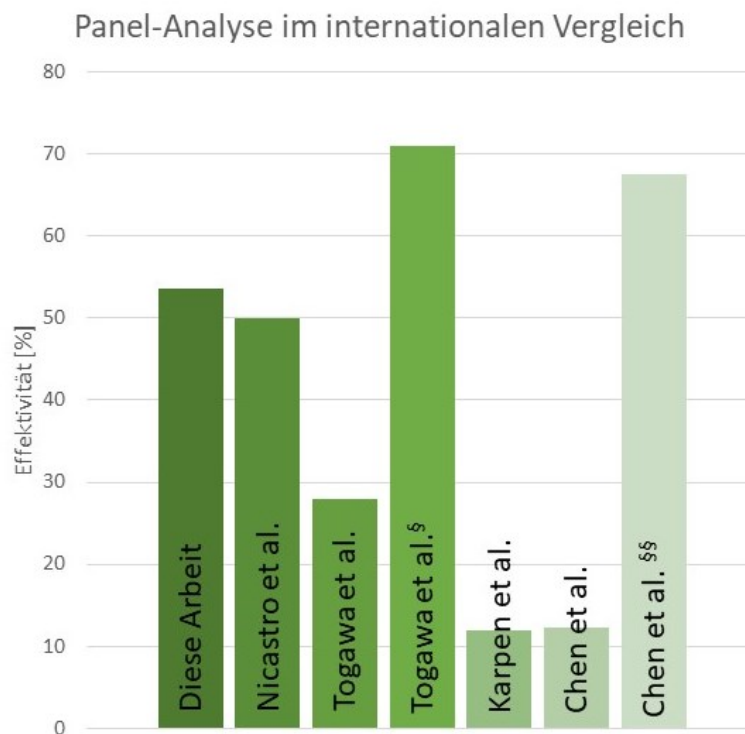


Abbildung 13: Darstellung der Effektivität dieser Arbeit im internationalen Vergleich mit Nicastro et al. [11]; Togawa et al. [109], §: Patienten mit bereits bestehender klinischer Diagnose; Karpen et al. [110]; Chen et al. [111], §§: Patienten mit spezifischem Phänotyp.

Die genannten Arbeiten unterstützen die These, dass eine genaue Phänotypisierung die Treffsicherheit der Panel-Diagnostik erhöht. Diese Hypothese wurde auch in dieser Arbeit, anhand der Kategorisierung der Patienten basierend auf ihrem Phänotyp, untersucht. Allerdings lag die Erfolgsrate bei Patienten mit spezifischem Phänotyp, welche der Kategorie 1 zugeordnet wurden, nur 10,7% (64,3% vs. 53,6%) über dem Gesamtkollektiv. Dieser Unterschied ist somit deutlich geringer als bei Chen et al. und Togawa et al. Diese Differenz kann durch unterschiedliche Gen- bzw. Panel-Auswahl, unterschiedliche Zeitpunkte der Panel-Analyse im Ablauf der Diagnostik oder den verschiedenen Einschlusskriterien der einzelnen Studien zustande kommen.

Um zu untersuchen, ob die Erfolgsrate mit weniger spezifischem Phänotyp abnimmt, wurden noch zwei weitere Kategorien analysiert. In Kategorie 2 (Phänotyp ermöglicht nur Zuteilung zu einer Erkrankungsgruppe) lag die Erfolgsrate bei 42,1% und somit unter der Gesamterfolgsrate. Diese Patienten haben alle die Verdachtsdiagnose einer progressiven familiären Cholestase. Als Auslöser für diese Gruppe an Erkrankungen konnten bereits viele Varianten in unterschiedlichen Genen benannt werden. In den Genen ATP8B1, ABCB11 und ABCB4, welche ursächlich sind für die drei häufigsten Subtypen (PFIC 1-3), sind jeweils bis zu 150 verschiedene Varianten bekannt [42]. Häufig kommen einzelne Varianten nur in wenigen Familien vor. Bei ca. 10% der Patienten, welche an PFIC1 erkrankt sind, ist nur ein mutiertes Allel (was bei einer rezessiv-vererbten Erkrankung nicht ausreicht, um krankheitsursächlich zu sein) oder gar keine Mutation nachweisbar. In solchen Fällen werden Mutationen in regulatorischen oder anders in die Transkription von PFIC-Genen involvierten Sequenzen vermutet [65, 112, 113]. Hinzu kommt, dass diese Vielzahl an Varianten zu einer Vielzahl an unterschiedlichen Symptomen führen kann. Selbst bei Geschwistern mit gleichem Genotyp kann sich die Erkrankung in unterschiedlichen Phänotypen präsentieren [42, 60]. In den letzten Jahren wurden neue Gene, welche das Krankheitsbild einer PFIC auslösen, beschrieben und vermutlich können in Zukunft noch weitere Gene identifiziert werden [42]. Somit könnte dieses, im Vergleich zu den anderen beiden Kategorien, schlechtere Ergebnis möglicherweise bei einer Panel-Analyse in ein paar Jahren deutlich besser ausfallen.

Der Zusammenhang zwischen Phänotypisierung und Erfolgsrate zeigt sich auch in den unterschiedlichen Ergebnissen der einzelnen Altersgruppen. Gerade bei sehr jungen Patienten ist die klinische Diagnostik erschwert, die Symptome sind unspezifisch und Leberfunktionsstörung häufiger mit nicht-genetischen Erkrankungen, wie beispielsweise Harnwegsinfektionen assoziiert. Demnach konnten auch bei Patienten der Altersgruppen 1 und 2 (ein bis sechs Monate) die wenigsten Diagnosen gestellt werden. Hervorzuheben ist, dass auch in dieser Altersgruppe der Bedarf an therapeutischen Maßnahmen bzw. das Vorhandensein von Beschwerden ein Jahr nach Analyse mit 60% am geringsten ist. Dies könnte auf

die, in dieser Altersgruppe häufiger auftretenden, transitorischen Verläufe zurückzuführen sein. Die transiente neonatale Cholestase wird beispielsweise in Zusammenhang mit perinataler Asphyxie, Frühgeburtlichkeit, parenteraler Ernährung oder Sepsis gebracht [114]. Die genaue Ätiologie ist meist unklar [115], diese Patienten sind jedoch häufig Träger relevanter Varianten.

Effektivität der Segregations- und Trio-Exom-Analyse

Eine Möglichkeit die Diagnoserate weiter zu erhöhen, besteht in der Einbeziehung der elterlichen DNA mittels Segregations-Analyse. Dies ist vor allem für Patienten, bei welchen eine möglicherweise ursächliche Variante gefunden wurde, aus genetischer Sicht jedoch aufgrund von unklarer Signifikanz oder fehlenden Literaturnachweisen nicht eindeutig eine Diagnose gestellt werden kann, relevant. Hierdurch können Varianten beim Patienten als Neumutationen erkannt oder compound heterozygot vorliegende Varianten identifiziert werden. Dies ermöglicht eine genauere Aussage darüber, ob eine gefundene Variante tatsächlich krankheitsverursachend ist. Die Segregationsanalyse der Eltern hat in dieser Studie aus klinischer Sicht keinen diagnostischen Vorteil gebracht. Von den fünf Patienten, von welchen uns Daten zur weiterführenden Analyse vorliegen, war bei allen bereits das Ergebnis der Panel-Analyse ausreichend, um ein klinisches Behandlungskonzept zu erstellen. Aus genetischer Sicht konnten mit Hilfe der Segregationsanalyse jedoch die vermuteten Diagnosen der Patienten 2, 24 und 26 zusätzlich gesichert werden. Die Daten der Segregationsanalyse ermöglichen erstens eine solidere Interpretation der genetischen Befunde beim Indexpatienten und zweitens eine genauere Aussage über Vererbungsrisiken bei weiterem Kinderwunsch.

Wenn durch die Panel-Analyse keine krankheitsverursachende Variante gefunden werden konnte, stellt die Trio-Exom-Analyse als weiterführendes genanalytisches Verfahren eine zusätzliche Möglichkeit dar. So konnten beispielsweise Retterer et al. [116] einen deutlichen Vorteil der Einbeziehung weiterer Familienmitglieder in die genetische Untersuchung belegen. Untersucht wurden hier die Daten von 3040 Patienten mit neurologischer Symptomatik. Die Erfolgsquote erhöhte sich von 23,6% nach Exom-Sequenzierung des Indexpatienten auf 31%

nach Trio-Exom-Analyse. Die in unsere Studie insgesamt geringe Datenmenge bezüglich weiterführender Analysen, enthielt bis auf einen Patienten, bei welchem keine Diagnose gestellt werden konnte, keine Daten der Trio-Exom-Analysen. Somit lässt sich keine Antwort auf die Frage ableiten, ob unsere Ergebnisse dadurch verbessert wurden.

Hervorzuheben ist, dass die meisten Empfehlungen für eine Trio-Exom-Analyse bei Patienten der Kategorie 3 ausgesprochen wurden. Weiterführende Analysen wurden demnach häufiger bei Patienten mit unspezifischem Phänotyp empfohlen. Nicastro et al. [11] untersuchten sechs Patienten, bei welchen durch die Panel-Analyse keine Diagnose gestellt werden konnte, anschließend mittels Trio-Exom-Analyse. Die Patienten wurden gezielt ausgewählt und hatten einen starken Verdacht auf eine genetische Erkrankung. Jedoch konnte bei keinem dieser Patienten mittels Trio-Exom-Analyse eine Diagnose gestellt werden. Auch hier ist die geringe Datenmenge als Faktor zu beachten.

Eine mögliche Ursache für die geringe Datenmenge der weiterführenden Analysen in dieser Studie kann die erforderliche Zustimmung beider Eltern für eine Teilnahme an wissenschaftlichen Arbeiten sein. Hinzu kommt, dass nicht alle empfohlenen weiterführenden Analysen durchgeführt werden, beispielsweise aufgrund fehlender Motivation nach erfolgloser Panel-Analyse. Eine Analyse gesunder Familienangehöriger kann aus familiären oder religiösen Gründen abgelehnt werden. Auch finanzielle Gründe können, bei zeitlich etwas zurück liegenden Empfehlungen, ursächlich sein, da die Analysen mit den Krankenkassen früher nicht abgerechnet werden konnten.

Deep Phenotyping

Ein weiterer Punkt, welcher möglicherweise das Ergebnis der Panel-Analyse verbessern kann, liegt in der Optimierung der Panel-Auswahl. Hier können computer-basierte Methoden verwendet werden, um basierend auf dem Phänotyp eine priorisierte Reihenfolge der möglicherweise krankheitsverursachenden Gene zu erzeugen. Der zeitliche und diagnostische Nutzen solcher Methoden konnte in vorherigen Studien bereits gezeigt werden [117]. In unserer Arbeit wurde bei-

spielhaft die Software *Phenolyzer* [87] zur retrospektiven Genpriorisierung angewendet. Diese nutzt Beschreibungen des Phänotyps in Form von *Human Phenotype Ontology (HPO)* Schlagworten und erstellt daraus eine Rangliste von möglicherweise assoziierten Genen.

Bei den sechs Patienten, bei denen der *Phenolyzer* beispielhaft durchgeführt wurde, konnte retrospektiv zu dem Zeitpunkt der Untersuchung bei keinem ein zusätzlicher Nutzen daraus gezogen werden. Bei den drei Patienten (5, 16, 46), bei welchen durch die Panel-Analyse keine Diagnose gestellt wurde, wurden die im Panel untersuchten Gene mit denen vom *Phenolyzer* vorgeschlagenen Genen verglichen. Die vorgeschlagenen Gene wurden entweder bereits im Panel untersucht oder haben aus klinischer Sicht keine ausreichende Relevanz, um die Symptomatik der Patienten zu erklären. Bei den anderen drei Patienten wurden durch die Panel-Analyse möglicherweise krankheitsverursachende Varianten detektiert. Hier wurde lediglich bei einem Patienten die entsprechenden Gene vom *Phenolyzer* priorisiert.

Eine Schwierigkeit bei der Anwendung des *Phenolyzers* war, dass viele Schlagworte nicht berücksichtigt wurden, da diese in der Datenbank nicht hinterlegt waren. So wurden Symptome, welche für das Krankheitsbild des Patienten relevant sind, für die Gen-Priorisierung nicht verwendet. Die vom *Phenolyzer* verwendete *HPO* Datenbank wird kontinuierlich erweitert [118], so dass in Zukunft hier eine bessere Erkennung denkbar ist. Auch der *Phenolyzer* selbst, wurde seit der Anwendung in dieser Arbeit weiterentwickelt, um Phänotyp-spezifische Schlagworte noch gezielter und schneller mit den korrespondierenden Genen in Verbindung zu bringen (*Phen2Gene*) [119].

Durch technische Weiterentwicklungen ist der Einsatz von Whole-Exome-Sequencing (WES) und Whole-Genome-Sequencing (WGS) mittlerweile kostengünstig möglich und wird in Zentren durchgeführt. Im Gegensatz zum Panel werden hier alle Exone bzw. das gesamte Genom auf krankheitsverursachende Varianten überprüft. Trotzdem liegt die Erfolgsrate der Diagnostik bei diesen Varianten lediglich bei 35-60% [120]. Dies bedeutet, dass die alleinige Identifikation von Varianten in bestimmten Genen nicht in jedem Fall ausreichend ist, um die

klinische Relevanz zu beurteilen. Die Schwierigkeit liegt nunmehr darin, die Varianten entsprechend ihrer möglichen Pathogenität zu beurteilen und priorisieren. Dies kann beispielsweise mittels einer Transkriptom-Analyse erreicht werden, welche die Interpretation von Varianten in nicht-kodierenden Sequenzen ermöglicht. So konnte gezeigt werden, dass die Anwendung der Transkriptom-Analyse zusätzlich zu WES und WGS, eine Steigerung der Diagnostik-Rate um 16% ermöglicht [93]. Eine weitere Möglichkeit zur Diagnostik in Kombination mit DNA- und RNA-Analysen bietet die Proteom-Analyse, welche eine direkte Quantifizierung der Proteine erlaubt. Aufgrund der geringen Korrelation von mRNA und Proteinkonzentration wäre dies mit einer Transkriptom-Analyse nicht möglich [121]. Eine Kombination von WES, WGS, Transkriptom- und Proteom-Analyse könnte zukünftig ein umfassenderes Verständnis der Krankheitsmechanismen ermöglichen.

Der Einsatz von Deep-Learning-Methoden ermöglicht eine neue Bandbreite an potentiellen Anwendungen in der Gendiagnostik [122, 123]. Hierzu gehören beispielsweise die Vorhersage über Auswirkungen verschiedener nicht-kodierender Varianten [124] oder Veränderungen des Spleißens [125]. Zukünftig sind weitere Deep-Learning-Modelle zu erwarten, welche sowohl für Genom-, Transkriptom-, als auch Proteom-Daten neue Anwendungen finden. Diese werden dabei unterstützen, die Menge und Komplexität dieser Daten zu interpretieren und für die klinische Routine nutzbar zu machen [122].

Neben den diagnostischen Möglichkeiten, bietet NGS auch die Möglichkeit für zukünftige therapeutische Konzepte. Beispiele hierfür sind Gen-Therapien, welche für Krankheitsbilder wie M. Wilson, PFIC oder α_1 -Antitrypsin-Mangel potentiell angewendet werden können [126]. Eine Voraussetzung dieser gezielten therapeutischen Interventionen ist jedoch weiterhin eine gesicherte, korrekte Diagnose.

Die Panel-Diagnostik war bei der Beurteilung seltener Lebererkrankungen im Kindes- und Jugendalter eine effektive diagnostische Maßnahme. Zukünftig kann die Diagnostik mit dem Einsatz der oben diskutierten Methoden erweitert (siehe

Abbildung 14) und noch effektiver werden. Ein Beispiel für diese aufeinander aufbauende Diagnostik findet sich bei Chen et al. [127], wo bei 31,6% der Patienten eine Variante bei der Whole-Exome-Analyse gefunden wurde, welche durch die vorausgehende Panel-Analyse nicht detektiert werden konnte.

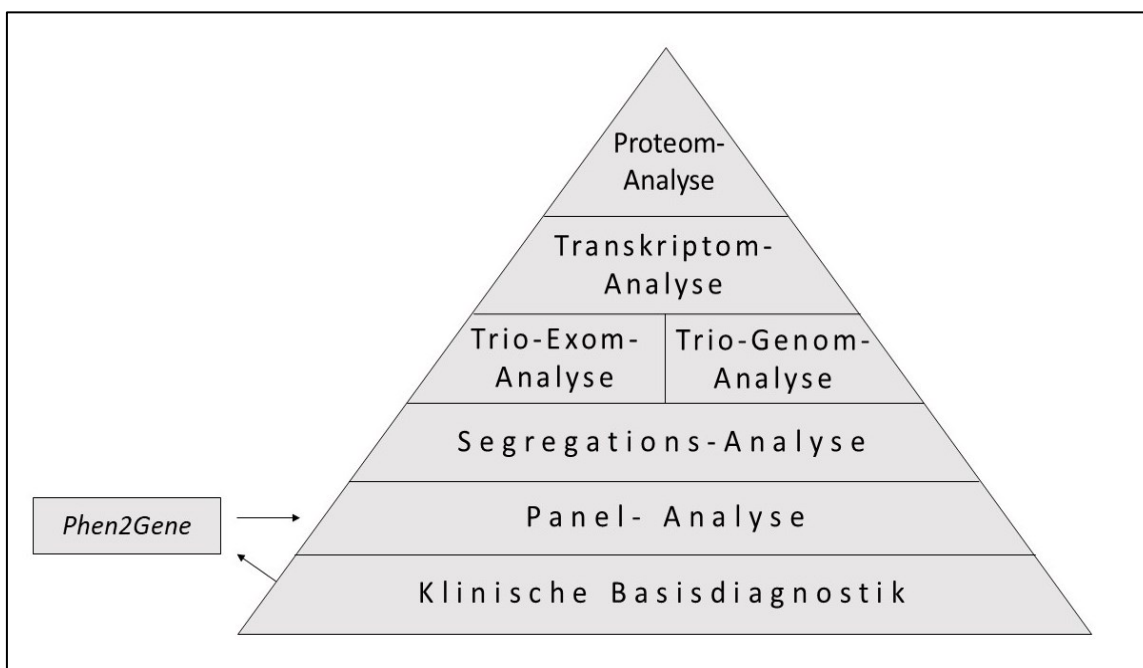


Abbildung 14: möglicher Ablauf zukünftiger, aufeinander aufbauender, diagnostischer Verfahren, zur weiteren Optimierung der Effektivität und möglicher Verwendung von Phen2Gene [119].

4.1 Schlussfolgerung

Die Panel-Analyse ist bei der Diagnostik seltener Lebererkrankungen im Kindes- und Jugendalter eine effektive Methode und ermöglicht eine schnelle und genaue Identifizierung genetischer Varianten. Die Effektivität kann durch eine genaue Phänotypisierung mittels klinischer Basisdiagnostik erhöht werden. Zukünftig sind hier auch unterstützende Deep-Learning-basierte Verfahren zu erwarten. Eine genaue genetische Diagnose ermöglicht den Einsatz gezielter therapeutischer Maßnahmen. Durch die kontinuierliche Weiterentwicklung genanalytischer Verfahren, wird die Panel-Analyse durch breitere Analysen (Whole-Exome- oder Whole-Genome-Sequencing) ersetzt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Seltene Lebererkrankungen bei Kindern stellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Ätiologien und sich überschneidenden klinischen Merkmalen eine große diagnostische Herausforderung dar. Spezifische laborchemische Veränderungen sind nur mit einem Teil der Erkrankungen assoziiert, eine Leberbiopsie ist invasiv, mit potentiellen Risiken verbunden und die Ergebnisse häufig unspezifisch. Viele der Lebererkrankungen im Kindesalter sind genetischen Ursprungs. Moderne Sequenzierungstechniken (Next Generation Sequencing, NGS) haben sich als leistungsfähiges Instrument zur Entschlüsselung der genetischen Grundlagen dieser Erkrankungen erwiesen und ermöglichen eine genaue und rechtzeitige Diagnose. Hierzu zählt auch die Panel-Analyse. Dabei werden gezielt, nach Symptomen gruppierte, krankheitsverursachende Gene untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, die Effektivität der Panel-Analyse, auch in Abhängigkeit der vorliegenden Phänotypisierung sowie darauf aufbauender, anschließender Analyseverfahren, zu untersuchen. Um dem heterogenen Patientenkollektiv diagnostisch gerecht zu werden, wurden in dieser Arbeit Patienten mit unterschiedlichen Phänotypen, wie beispielsweise mit dem klinischen Bild einer Cholestase, einer Speichererkrankung sowie hepatitisähnlicher Symptomatik, untersucht. Eine vorausgehende risikoadaptierte, schrittweise durchgeführte klinische Diagnostik ist wichtig, um einen möglichst spezifischen Phänotypen beschreiben zu können. Eine genaue Phänotypisierung erleichtert die Auswahl eines geeigneten Gen-Panels. Bei Säuglingen mit cholestatischen Leberfunktionsstörungen wurde zur Differenzierung der klinischen Daten ein Diagnostikalgorithmus verwendet (nach Nicastro et al. [11] und Sturm et al. [12]). Der Algorithmus wurde in dieser Arbeit durch ein Konzept ergänzt, welches bei Bedarf aufbauend auf der Panel-Analyse eine Trio-Exom-Analyse bzw. Segregationsanalyse der Eltern vorsieht. Beispielhaft wurde der Nutzen einer anschließenden Transkriptom-Analyse untersucht. Auch ein möglicher Nutzen von Deep Phenotyping mittels *Phenolyzer*[87] wurde an einigen Beispielen untersucht.

In dieser Arbeit wurden 56 Patienten (24 w, Durchschnittsalter: $47,5 \pm 69,3$ Monate) analysiert, welche sich im Zeitraum von 2014-2020 an der Universitäts-Kinderklinik Tübingen bzw. in einer externen Praxis oder einem Krankenhaus mit

unterschiedlichen Symptomen und Zeichen einer Leberfunktionsstörung vorstellten. Zur Überprüfung der Effektivität wurden die Patienten anhand ihres Phänotyps in Kategorien eingeteilt, sowie ihre Ergebnisse in unterschiedlichen Altersklassen verglichen.

Durch die Panel-Analyse konnte bei 53,6% erfolgreich eine Diagnose gestellt werden. Einen Zusammenhang zwischen Phänotypisierung und Erfolgsrate konnte durch das bessere Ergebnis der Patienten mit spezifischem Phänotyp, im Vergleich zum Gesamtkollektiv, gezeigt werden (64,3% vs. 53,6%). Ergänzend zur Panel-Analyse konnten einige Diagnosen mittels Segregationsanalyse der Eltern gesichert werden. Insgesamt handelt es sich um ein im internationalen Vergleich erfolgreiches Diagnosekonzept, durch welches Patienten mit unterschiedlichen Phänotypen schnell eine Diagnose erhalten.

Durch technische Weiterentwicklungen ist der Einsatz von Whole-Exome-Sequencing (WES) und Whole-Genome-Sequencing (WGS) mittlerweile kostengünstig möglich. Im Gegensatz zur Panel-Analyse werden hier alle Exone bzw. das gesamte Genom auf krankheitsverursachende Varianten überprüft. Zukünftig wird die Panel-Analyse durch solch breitere, effektivere Tools abgelöst werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Schäfer, J.R. and C.F. Vogelmeier, *Orphan Drugs*. Der Internist, 2019. **60**(4): p. 396-398.
2. European Organisation for Rare Diseases, *Rare Diseases: Understanding this Public Health Priority*. 2005.
3. Wright, C.F., D.R. FitzPatrick, and H.V. Firth, *Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children*. Nat Rev Genet, 2018. **19**(5): p. 253-268.
4. Iorio, R., et al., *Hypertransaminasemia in childhood as a marker of genetic liver disorders*. Journal of Gastroenterology, 2005. **40**(8): p. 820-826.
5. Matsui, A., *Hypertransaminasemia: the end of a thread*. Journal of Gastroenterology, 2005. **40**(8): p. 859-860.
6. Grüters-Kieslich, A., P. Burgard, R. Berner, and G. Hoffmann, *Zentren für seltene Erkrankungen*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2017. **165**(3): p. 211-215.
7. Jones, D.E.J., E. Sturm, and A.W. Lohse, *Access to care in rare liver diseases: New challenges and new opportunities*. Journal of Hepatology, 2018. **68**(3): p. 577-585.
8. Beck, M., *Orphan Drugs*. Der Internist, 2016. **57**(11): p. 1132-1138.
9. Bandmann, O., K.H. Weiss, and S.G. Kaler, *Wilson's disease and other neurological copper disorders*. The Lancet Neurology, 2015. **14**(1): p. 103-113.
10. Sturm, E., *Lebererkrankungen des Säuglings*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2010. **158**(11): p. 1086-1094.
11. Nicastro, E., et al., *Diagnostic Yield of an Algorithm for Neonatal and Infantile Cholestasis Integrating Next-Generation Sequencing*. J Pediatr, 2019. **211**: p. 54-62 e4.
12. Sturm, E. and S. Hartleif, *Practical Approach to the Jaundiced Infant*, in *Pediatric Hepatology and Liver Transplantation*, L. D'Antiga, Editor. 2019, Springer International Publishing: Cham. p. 99-127.
13. Wildhaber, B.E., *Screening for biliary atresia: Swiss stool color card*. Hepatology, 2011. **54**(1): p. 368-368.
14. Wirth, S., *Cholestase bei Neugeborenen und Säuglingen*. Falk Gastro-Kolleg, 2021.
15. Seeler, R.A. and K. Hahn, *Jaundice in urinary tract infection in infancy*. Am J Dis Child, 1969. **118**(4): p. 553-8.
16. Vanier, M.T., *Niemann-Pick disease type C*. Orphanet journal of rare diseases, 2010. **5**: p. 16-16.
17. Patterson, M.C., et al., *Recommendations for the diagnosis and management of Niemann–Pick disease type C: An update*. Molecular Genetics and Metabolism, 2012. **106**(3): p. 330-344.
18. Sitarska, D. and A. Ługowska, *Laboratory diagnosis of the Niemann-Pick type C disease: an inherited neurodegenerative disorder of cholesterol metabolism*. Metabolic Brain Disease, 2019. **34**(5): p. 1253-1260.
19. Vanier, M.T., et al., *Diagnostic tests for Niemann-Pick disease type C (NP-C): A critical review*. Molecular Genetics and Metabolism, 2016. **118**(4): p. 244-254.
20. Strebing, G., E. Müller, A. Feldman, and E. Aigner, *Lysosomal acid lipase deficiency - early diagnosis is the key*. Hepatic medicine : evidence and research, 2019. **11**: p. 79-88.
21. Hamilton, J., I. Jones, R. Srivastava, and P. Galloway, *A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalstat 2*. Clinica Chimica Acta, 2012. **413**(15): p. 1207-1210.

22. Synoracki, S., et al., *Mangel an lysosomaler saurer Lipase (LAL-D)*. Der Pathologe, 2018. **39**(3): p. 249-254.
23. Reiner, Z., et al., *Lysosomal acid lipase deficiency--an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction*. Atherosclerosis, 2014. **235**(1): p. 21-30.
24. Bernstein, D.L., H. Hülkova, M.G. Bialer, and R.J. Desnick, *Cholesteryl ester storage disease: review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease*. J Hepatol, 2013. **58**(6): p. 1230-43.
25. Weiskirchen, R., *Fast progression of liver damage in lysosomal acid lipase deficiency*. Current Medical Research and Opinion, 2017. **33**(11): p. 2081-2083.
26. Chora, J.R., et al., *Lysosomal acid lipase deficiency: A hidden disease among cohorts of familial hypercholesterolemia?* J Clin Lipidol, 2017. **11**(2): p. 477-484.e2.
27. Jones, S.A., et al., *Survival in infants treated with sebelipase Alfa for lysosomal acid lipase deficiency: an open-label, multicenter, dose-escalation study*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2017. **12**(1): p. 25.
28. Dani, C., et al., *Italian guidelines for the management and treatment of neonatal cholestasis*. Italian Journal of Pediatrics, 2015. **41**(1): p. 69.
29. Feldman, A.G. and R.J. Sokol, *Neonatal Cholestasis*. Neoreviews, 2013. **14**(2).
30. Metreweli, C., N.M. So, W.C. Chu, and W.W. Lam, *Magnetic resonance cholangiography in children*. Br J Radiol, 2004. **77**(924): p. 1059-64.
31. Rossi, G., et al., *Diagnosis of sclerosing cholangitis in children: Blinded, comparative study of magnetic resonance versus endoscopic cholangiography*. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, 2013. **37**(6): p. 596-601.
32. Shanmugam, N.P., et al., *Selective use of endoscopic retrograde cholangiopancreatography in the diagnosis of biliary atresia in infants younger than 100 days*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009. **49**(4): p. 435-41.
33. Felux, J., et al., *ERCP in infants, children and adolescents is feasible and safe: results from a tertiary care center*. United European gastroenterology journal, 2017. **5**(7): p. 1024-1029.
34. Goetz, M., et al., *ERCP in babies: Low risk of post-ERCP pancreatitis – results from a multicentre survey*. United European Gastroenterology Journal, 2020. **8**(1): p. 77-80.
35. Negm, A.A., et al., *The Role of Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography in the Diagnosis of Biliary Atresia: 14 Years' Experience*. Eur J Pediatr Surg, 2018. **28**(3): p. 261-267.
36. Dezsöfi, A., et al., *Liver biopsy in children: position paper of the ESPGHAN Hepatology Committee*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2015. **60**(3): p. 408-20.
37. Lackner, C. and A.S. Knisely, *Hereditäre Lebererkrankungen*, in *Pathologie: Leber, Gallenwege und Pankreas*, A. Tannapfel and G. Klöppel, Editors. 2020, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 63-116.
38. Habdank, K., et al., *Combined sonographic and fluoroscopic guidance during transjugular hepatic biopsies performed in children: a retrospective study of 74 biopsies*. AJR Am J Roentgenol, 2003. **180**(5): p. 1393-8.
39. Neuberger, J., et al., *Guidelines on the use of liver biopsy in clinical practice from the British Society of Gastroenterology, the Royal College of Radiologists and the Royal College of Pathology*. Gut, 2020. **69**(8): p. 1382-1403.
40. Morotti, R.A. and D. Jain, *Pediatric Cholestatic Disorders: Approach to Pathologic Diagnosis*. Surg Pathol Clin, 2013. **6**(2): p. 205-25.
41. Russo, P., et al., *Design and validation of the biliary atresia research consortium histologic assessment system for cholestasis in infancy*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011. **9**(4): p. 357-362.e2.

42. Keitel, V., C. Dröge, and D. Häussinger, *Genetische Ursachen cholestatischer Lebererkrankungen*. Falk Gastro Review journal / Falk Gastro-Kolleg 2019.
43. El-Guindi, M.A., et al., *Hepatic immunohistochemistry of bile transporters in progressive familial intrahepatic cholestasis*. *Annals of Hepatology*, 2016. **15**(2): p. 222-229.
44. Hoerning, A., et al., *Diversity of Disorders Causing Neonatal Cholestasis – The Experience of a Tertiary Pediatric Center in Germany*. *Frontiers in Pediatrics*, 2014. **2**(65).
45. Pimpin, L., et al., *Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies*. *Journal of Hepatology*, 2018. **69**(3): p. 718-735.
46. Fawaz, R., et al., *Guideline for the Evaluation of Cholestatic Jaundice in Infants: Joint Recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2017. **64**(1): p. 154-168.
47. Lakshminarayanan, B. and M. Davenport, *Biliary atresia: A comprehensive review*. *Journal of Autoimmunity*, 2016. **73**: p. 1-9.
48. Kelly, D.A. and A. Stanton, *Jaundice in babies: implications for community screening for biliary atresia*. *BMJ*, 1995. **310**(6988): p. 1172-1173.
49. De Bruyne, R., S. Van Biervliet, S. Vande Velde, and M. Van Winckel, *Clinical practice*. *European Journal of Pediatrics*, 2011. **170**(3): p. 279-284.
50. Sokol, R.J., et al., *Screening and outcomes in biliary atresia: summary of a National Institutes of Health workshop*. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2007. **46**(2): p. 566-581.
51. Haber, B.A. and P. Russo, *Biliary atresia*. *Gastroenterology Clinics of North America*, 2003. **32**(3): p. 891-911.
52. Kröner, C. and B. Koletzko, *Basiswissen Pädiatrie*. 2010: Springer-Verlag.
53. Schilsky, M.L., *Diagnosis and treatment of Wilson's disease*. *Pediatric Transplantation*, 2002. **6**(1): p. 15-19.
54. Bandmann, O., K.H. Weiss, and P. Hedera, *Liver transplant for neurologic Wilson disease. Hope or fallacy?*, 2020: p. 10.1212/WNL.00000000000009476.
55. Ala, A., et al., *Wilson's disease*. *The Lancet*, 2007. **369**(9559): p. 397-408.
56. Walshe, J.M., *Cause of death in Wilson disease*. *Movement Disorders*, 2007. **22**(15): p. 2216-2220.
57. Vandriel, S.M., et al., *Natural history of liver disease in a large international cohort of children with Alagille syndrome: Results from the GALA study*. *Hepatology*, 2023. **77**(2): p. 512-529.
58. de Vree, J.M., et al., *Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(1): p. 282-287.
59. Gonzales, E., et al., *Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate*. *Hepatology*, 2015. **62**(2): p. 558-66.
60. Davit-Spraul, A., et al., *ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history*. *Hepatology*, 2010. **51**(5): p. 1645-55.
61. Jansen, P.L.M., et al., *Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis*. *Gastroenterology*, 1999. **117**(6): p. 1370-1379.
62. Trauner, M., P.J. Meier, and J.L. Boyer, *Molecular Pathogenesis of Cholestasis*. *New England Journal of Medicine*, 1998. **339**(17): p. 1217-1227.

63. Davit-Spraul, A., E. Gonzales, C. Baussan, and E. Jacquemin, *Progressive familial intrahepatic cholestasis*. Orphanet journal of rare diseases, 2009. **4**: p. 1-1.
64. Bähner, V. and S. Gehring, *Neonatale Cholestase*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2016. **164**(6): p. 436-447.
65. Srivastava, A., *Progressive familial intrahepatic cholestasis*. Journal of clinical and experimental hepatology, 2014. **4**(1): p. 25-36.
66. Rust, C., H. Bikker, and U. Beuers, *Familiäres „Low Phospholipid Associated Cholelithiasis“ (LPAC)-Syndrom bei bislang unbeschriebenen heterozygoten MDR 3-Mutationen im ABCB4-Gen*. Z Gastroenterol, 2008. **46**(09): p. K01.
67. Nicastro, E. and L. D'Antiga, *Next generation sequencing in pediatric hepatology and liver transplantation*. Liver Transpl, 2018. **24**(2): p. 282-293.
68. Sturm, E. and K. Hörtnagel, *Genetische Diagnostik bei Lebererkrankungen im Kindesalter*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2016. **164**(6): p. 448-454.
69. Dohrn, M.F., et al., *Frequent genes in rare diseases: panel-based next generation sequencing to disclose causal mutations in hereditary neuropathies*. Journal of Neurochemistry, 2017. **143**(5): p. 507-522.
70. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.
71. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
72. Mardis, E.R., *Next-generation sequencing platforms*. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif), 2013. **6**: p. 287-303.
73. Verma, M., S. Kulshrestha, and A. Puri, *Genome Sequencing*. Methods Mol Biol, 2017. **1525**: p. 3-33.
74. Antonarakis, S.E. and J.S. Beckmann, *Mendelian disorders deserve more attention*. Nature Reviews Genetics, 2006. **7**(4): p. 277-282.
75. Majewski, J., et al., *What can exome sequencing do for you?* J Med Genet, 2011. **48**(9): p. 580-9.
76. CeGaT GmbH. *CeGaT Homepage*. 2020; Available from: <https://www.cegat.de/>.
77. Mahler, E.A., et al., *Exom-Sequenzierung bei Kindern*. Dtsch Arztebl International, 2019. **116**(12): p. 197-204.
78. Farwell, K.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*. Genetics in Medicine, 2015. **17**(7): p. 578-586.
79. Glöckle, N., et al., *Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies*. European Journal of Human Genetics, 2014. **22**(1): p. 99-104.
80. Rehm, H.L., et al., *ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing*. Genet Med, 2013. **15**(9): p. 733-47.
81. Rudnik-Schöneborn, S., et al., *Diagnostic algorithms in Charcot–Marie–Tooth neuropathies: experiences from a German genetic laboratory on the basis of 1206 index patients*. Clinical Genetics, 2016. **89**(1): p. 34-43.
82. Ibrahim, S.H., B.M. Kamath, K.M. Loomes, and S.J. Karpen, *Cholestatic liver diseases of genetic etiology: Advances and controversies*. Hepatology, 2022. **75**(6): p. 1627-1646.
83. CeGaT GmbH. 2021 [cited 2021 06.12.2021]; Available from: <https://www.cegat.com/services/transcriptome-sequencing/>.

84. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. Nature reviews. Genetics, 2009. **10**(1): p. 57-63.
85. Smirnov, D., et al., *Guidelines for clinical interpretation of variant pathogenicity using RNA phenotypes*. Hum Mutat, 2022. **43**(8): p. 1056-1070.
86. Kremer, L.S., et al., *Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 15824.
87. Yang, H., P.N. Robinson, and K. Wang, *Phenolyzer: phenotype-based prioritization of candidate genes for human diseases*. Nature methods, 2015. **12**(9): p. 841-843.
88. Wang Genomics Lab. *Phenolyzer*. 2021 [04.07.2021]; Available from: <https://phenolyzer.wglab.org/>.
89. Son, J.H., et al., *Deep Phenotyping on Electronic Health Records Facilitates Genetic Diagnosis by Clinical Exomes*. Am J Hum Genet, 2018. **103**(1): p. 58-73.
90. Matthijs, G., et al., *Guidelines for diagnostic next-generation sequencing*. European Journal of Human Genetics, 2016. **24**(1): p. 2-5.
91. Bentley, D.R., et al., *Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry*. Nature, 2008. **456**(7218): p. 53-59.
92. Slatko, B.E., A.F. Gardner, and F.M. Ausubel, *Overview of Next-Generation Sequencing Technologies*. Current protocols in molecular biology, 2018. **122**(1): p. e59-e59.
93. Smirnov, D., N. Konstantinovskiy, and H. Prokisch, *Integrative omics approaches to advance rare disease diagnostics*. J Inherit Metab Dis, 2023. **46**(5): p. 824-838.
94. Jaganathan, K., et al., *Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning*. Cell, 2019. **176**(3): p. 535-548.e24.
95. Mortazavi, A., et al., *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. Nature Methods, 2008. **5**(7): p. 621-628.
96. Lonsdale, J., et al., *The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project*. Nature Genetics, 2013. **45**(6): p. 580-585.
97. Herz, M., S. Hartleif, S. Biskup, and E. Sturm, *Exome panel diagnostics in rare childhood liver disease—good but not good enough?* Zeitschrift für Gastroenterologie, 2024. **62**(01): p. P2. 05.
98. Tennessen, J.A., et al., *Evolution and Functional Impact of Rare Coding Variation from Deep Sequencing of Human Exomes*. Science, 2012. **337**(6090): p. 64-69.
99. MacArthur, D.G., et al., *A Systematic Survey of Loss-of-Function Variants in Human Protein-Coding Genes*. Science, 2012. **335**(6070): p. 823-828.
100. Narasimhan, V.M., et al., *Health and population effects of rare gene knockouts in adult humans with related parents*. Science, 2016. **352**(6284): p. 474-477.
101. Montgomery, S.B., T. Lappalainen, M. Gutierrez-Arcelus, and E.T. Dermitzakis, *Rare and Common Regulatory Variation in Population-Scale Sequenced Human Genomes*. PLOS Genetics, 2011. **7**(7): p. e1002144.
102. Zhao, J., et al., *A burden of rare variants associated with extremes of gene expression in human peripheral blood*. The American Journal of Human Genetics, 2016. **98**(2): p. 299-309.
103. Zeng, Y., et al., *Aberrant Gene Expression in Humans*. PLOS Genetics, 2015. **11**(1): p. e1004942.
104. Li, X., et al., *Transcriptome sequencing of a large human family identifies the impact of rare noncoding variants*. The American Journal of Human Genetics, 2014. **95**(3): p. 245-256.
105. Li, X., et al., *The impact of rare variation on gene expression across tissues*. Nature, 2017. **550**(7675): p. 239-243.

106. Li, L.-T., et al., *ABCB11 deficiency presenting as transient neonatal cholestasis: Correlation with genotypes and BSEP expression*. *Liver International*, 2020. **40**(11): p. 2788-2796.
107. Hermeziu, B., et al., *Heterozygous Bile Salt Export Pump Deficiency: A Possible Genetic Predisposition to Transient Neonatal Cholestasis*. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2006. **42**(1).
108. Jacquemin, E., *Role of Multidrug Resistance 3 Deficiency in Pediatric and Adult Liver Disease: One Gene for Three Diseases*. *Semin Liver Dis*, 2001. **21**(04): p. 551-562.
109. Togawa, T., et al., *Molecular Genetic Dissection and Neonatal/Infantile Intrahepatic Cholestasis Using Targeted Next-Generation Sequencing*. *The Journal of Pediatrics*, 2016. **171**: p. 171-177.e4.
110. Karpen, S.J., et al., *Use of a Comprehensive 66-Gene Cholestasis Sequencing Panel in 2171 Cholestatic Infants, Children, and Young Adults*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2021. **72**(5): p. 654-660.
111. Chen, H.-L., et al., *Panel-Based Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of Cholestatic Genetic Liver Diseases: Clinical Utility and Challenges*. *The Journal of Pediatrics*, 2019. **205**: p. 153-159.e6.
112. Paulusma, C.C., et al., *ATP8B1 requires an accessory protein for endoplasmic reticulum exit and plasma membrane lipid flippase activity*. *Hepatology*, 2008. **47**(1): p. 268-78.
113. Vinayagamoorthy, V., A. Srivastava, and M.S. Sarma, *Newer variants of progressive familial intrahepatic cholestasis*. *World J Hepatol*, 2021. **13**(12): p. 2024-2038.
114. Baptista-González, H., F. Gutiérrez-Landeros, F. Rosenfeld-Mann, and R. Trueba-Gómez, *Changes of coagulation inhibitors and fibrinolysis system in newborn infants with transitory neonatal cholestasis*. *Annals of Hepatology*, 2004. **3**(1): p. 26-29.
115. Liu, L.-Y., et al., *Association of variants of ABCB11 with transient neonatal cholestasis*. *Pediatrics International*, 2013. **55**(2): p. 138-144.
116. Retterer, K., et al., *Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications*. *Genet Med*, 2016. **18**(7): p. 696-704.
117. Aerts, S., et al., *Gene prioritization through genomic data fusion*. *Nature Biotechnology*, 2006. **24**(5): p. 537-544.
118. Köhler, S., et al., *Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources*. *Nucleic Acids Research*, 2018. **47**(D1): p. D1018-D1027.
119. Zhao, M., et al., *Phen2Gene: rapid phenotype-driven gene prioritization for rare diseases*. *NAR Genom Bioinform*, 2020. **2**(2): p. lqaa032.
120. Robinson, P.N., et al., *The Human Phenotype Ontology: a tool for annotating and analyzing human hereditary disease*. *Am J Hum Genet*, 2008. **83**(5): p. 610-5.
121. Liu, Y., A. Beyer, and R. Aebersold, *On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance*. *Cell*, 2016. **165**(3): p. 535-550.
122. Eraslan, G., Ž. Avsec, J. Gagneur, and F.J. Theis, *Deep learning: new computational modelling techniques for genomics*. *Nature Reviews Genetics*, 2019. **20**(7): p. 389-403.
123. Zou, J., et al., *A primer on deep learning in genomics*. *Nature Genetics*, 2019. **51**(1): p. 12-18.
124. Zhou, J. and O.G. Troyanskaya, *Predicting effects of noncoding variants with deep learning-based sequence model*. *Nature Methods*, 2015. **12**(10): p. 931-934.

125. Cheng, J., et al., *MMSplice: modular modeling improves the predictions of genetic variant effects on splicing*. *Genome Biology*, 2019. **20**(1): p. 48.
126. Aravalli, R.N., J.D. Belcher, and C.J. Steer, *Liver-targeted gene therapy: Approaches and challenges*. *Liver Transplantation*, 2015. **21**(6): p. 718-737.
127. Chen, C.-B., et al., *Combining Panel-Based Next-Generation Sequencing and Exome Sequencing for Genetic Liver Diseases*. *The Journal of Pediatrics*, 2023. **258**.

7. ANHANG

Tabelle A1: genaue Angaben der durchgeführten Phenolyzer-Analyse.

Pat.-ID	Datum Suche	Aus Arztbriefen verwendete Schlagworte	Durch den <i>Phenolyzer</i> erkannte und in die Analyse einbezogene Schlagworte
5	04.07.21 17:30Uhr	Hepatomegalie, Ikterus, acholischer Stuhl, intrahepatische Cholestase, Gallengangsatresie, Riesenzellhepatitis, Hyperbilirubinämie, erhöhte Transaminasen, erniedrigter Quick	Hepatomegaly, icterus, acholic stools, intrahepatic cholestasis, biliary atresia, giant cell hepatitis, hyperbilirubinemia, elevated transaminases
16	04.07.21 17:00Uhr	Obstipation, Fibrose, Steatose, erhöhter Kupfergehalt, erniedrigter Coeruloplasminspiegel, erhöhte AP, erhöhte Transaminasen, erhöhte γ GT	Obstipation, fibrosis, steatosis, elevated copper levels, elevated alkaline phosphatase, elevated transaminases
46	11.05.21 11:20Uhr	Acholischer Stuhl, Fußödeme, Lidödeme, erhöhte Transaminasen, Hyperbilirubinämie, Hyperinsulinämie Hypertrichose, erhöhte AP, erniedrigtes Vitamin A+E	Acholic stools, edema of the dorsum of feet, edema of the eyelids, elevated transaminases, hyperbilirubinemia, hyperinsulinemia
8	11.05.21 12:15 Uhr	Erhöhte Transaminasen, Emesis, Ikterus, Bewusstseinsverlust, Migräne, Splenomegalie	elevated transaminases, emesis, jaundice, loss of consciousness, migraine, splenomegaly
12	11.05.21 15:00 Uhr	Erhöhte Transaminasen, erhöhte γ GT, erhöhte LDH, Hyperbilirubinämie, Ikterus, Juckreiz	elevated transaminases, hyperbilirubinemia, jaundice, itch
14	04.07.21 16:30Uhr	Hyperbilirubinämie, Hyperammonämie, Cholestase, Ikterus	Hyperbilirubinemia, hyperammonemia, cholestasis, jaundice

AP (Alkalische Phosphatase); γ GT (Gamma-Glutamyltransferase); LDH (Lactatdehydrogenase).

Tabelle A2: Verdachtsdiagnosen sowie Panel-Ergebnis aller Patienten.

Pat.-ID	Kategorie	Klinische Verdachtsdiagnosen	krankheitsverursachende Variante in Panel-Analyse	Bestätigung einer Verdachtsdiagnose	Kommentar
1	2	PFIC 2	Ja	Ja	
2	2	Familiäre Cholestase	(Ja)	Ja	
3	2	PFIC, transiente Kontrazeptiva-induzierte Cholestase	(Ja)	Ja	
4	1	Glykogenose Typ IX	Vermutlich, bisher nicht beschriebene Varianten	Ja	
5	2	Familiäre Cholestaseerkrankung	Nein		Z.n. Kasai-OP
6	1	M. Wilson	Ja	Ja	
7	3	Neonatale Cholestase	(Ja)	Ja	Mögliche Diagnose: Transiente neonatale Cholestase
8	3	Unklare Hepatopathie	(Ja)	Nein	Mögliche Diagnose: PFIC
9	2	Familiäres Cholestasesyndrom	Nein		
10	3	Unklare direkte Hyperbilirubinämie	Nein		
11	3	Neonatale Cholestase	Nein		
12	3	Neonatale Cholestase, intrahepatische Duktopenie	Ja	Nein	Diagnose: Alagille-Syndrom
13	2	Familiäre Cholestase	Nein		
14	3	Neonatale Cholestase	Ja	Nein	Diagnose: Rotor Syndrom
15	2	Progressive familiäre Cholestase	(Ja)	Ja	Evtl. ursächlich, wenn transient
16	1	M. Wilson	Nein		Erwarteter Genotyp nicht vorhanden, Diagnose durch klinische Tests trotzdem gesichert.
17	3	Unklare familiäre Hepatopathie	Nein		
18	2	PFIC 1	Ja	Ja	
19	2	Familiäre Lebererkrankungen (ATP8B1-Mangel, ABC B11-Mangel, PFIC, EHGA), PFIC, Gallengangsatresie	Nein		
20	2	Familiäre Cholestase	Nein		
21	3	-	Ja	-	Diagnose: Mikrodeletionssyndrom
22	1	M. Wilson, Autoimmunhepatitis	Nein		
23	3	Neonatale Cholestase und Hepatopathie, multifaktoriell bedingt durch: CMV-Hepatitis, Frühgeburtlichkeit, Sepsis, Nekrotisierende Enterokolitis, parenterale Ernährung und Herzinsuffizienz	Nein		
24	3	Small-duct primär sklerosierende Cholangitis, MDR3-Mangeldefekt	(Ja)	Nein	Mögliche Diagnose: Caroli Syndrom, nach Analyse Eltern + Bruder

25	3	Unklare neonatale Cholestase	(Ja)	Nein	Mögliche Diagnose: primäre Gallensäure- malabsorption
26	1	Phosphorylase-Kinase-Mangel, Glykogenose Typ IX	(Ja)	Ja	Bestätigung nach Seg- regationsanalyse des Bruders
27	2	PFIC	Nein		
28	2	PFIC	Nein		
29	3	Bürstensaumenzymmangel, Memb- rantransporter Defekte	Nein		
30	1	M. Wilson, Lebersynthesestörung	Ja	Ja	
31	1	M. Wilson	Nein		
32	3	neonatale Cholestase	Vermutlich, bisher nicht beschriebene Varianten	Nein	bisher nicht beschrie- bene Varianten
33	2	PFIC 3	Nein		
34	3		Nein		
35	2	Familiäre Cholestase	Ja	Nein	Diagnose: Alagille-Syndrom
36	2	Familiäre Cholestase	Nein		
37	1	Isovalerianazidämie, Hepatopathie	Ja	Ja	
38	3	Unklare neonatale Cholestase	Nein		
39	3	Unklare Hepatopathie	Ja	Nein	Diagnose: PFIC4
40	1	M. Wilson, Gallensäuretransportstö- rung, Hepatopathie	Nein		
41	3	Gallensäuretransportstörung	Nein		
42	3	Gallensäuresynthesedefekt	Nein		
43	2	PFIC I-III, Gallensäuresynthesede- fekt	Nein		
44	2	PFIC	Nein		
45	2	PFIC	Ja	Ja	
46	3	Neonatale Cholestase, Hyperinsuli- nismus	Nein		neonatale Cholestase, Hyperinsulinismus
47	1	Alagille-Syndrom, PFIC	Vermutlich, bisher nicht beschriebene Varianten	Nein	
48	3	Unklare Lebererkrankung	(Ja)	Nein	Mögliche Diagnose: PFIC 3
49	1	M. Wilson	Nein		
50	2	Primäre familiäre intrahepatische Cholestase	(Ja)	Ja	
51	1	Glykogenose	(Ja)	Ja	
52	1	Alagille-Syndrom	Ja	Ja	
53	1	Alagille-Syndrom	Ja	Ja	Alagille-Syndrom
54	3	Hereditäre Pankreatitis	(Ja)	Nein	Mögliche Diagnose: zystische Fibrose
55	3	Lysosomale Speicherkrankheit	Ja	Nein	Diagnose: neonatale sklerosierende Cho- langitis
56	3	Lysosomale Speicherkrankheit	Ja	Nein	Diagnose: Prolidase- Mangel

PFIC (Progressive familiäre intrahepatische Cholestase); γ GT (Gamma-Glutamyltrans-
ferase), CMV (Zytomegalievirus).

(Ja): Vermutlich wurde krankheitsverursachende Variante gefunden, unklare Signifi-
kanz.

8. EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter Betreuung von PD Dr. Dr. Ekkehard Sturm durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Breisach, den 14.09.2024

Mareike Herz

9. VERÖFFENTLICHUNGEN

Herz, M., Hartleif, S., Biskup, S., & Sturm, E., *Exome panel diagnostics in rare childhood liver disease—good but not good enough?* Zeitschrift für Gastroenterologie, 2024. **62**(01), P2-05.