

INSTYTUT MATKI I DZIECKA
ZAKŁAD GENETYKI MEDYCZNEJ

Anna Kucińska-Chahwan

**Zastosowanie metody sekwencjonowania całokosmowego w diagnostyce
prenatalnej wad rozwojowych**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. n. med. Jerzy Bal

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Beata Nowakowska

Warszawa, 2022

Słowa kluczowe : diagnostyka prenatalna, wrodzone wady rozwojowe,
sekwencjonowanie eksomowe, WES, patogenne warianty

Key words: prenatal diagnosis, congenital anomalies, exome sequencing, WES,
pathogenic variants

Spis treści

I.	Wykaz publikacji.....	5
II.	Wykaz stosowanych skrótów	6
III.	Opis pracy w języku polskim.....	7
	1. Wstęp.....	7
	2. Cele pracy.....	10
	3. Metodyka.....	11
	4. Omówienie publikacji.....	12
	5. Podsumowanie wyników.....	17
	6. Wnioski	19
IV.	Opis pracy w języku angielskim.....	20
	1. Introduction	20
	2. Aims	22
	3. Methods.....	23
	4. Overview of scientific articles.....	24
	5. Summary of the results.....	25
	6. Conclusions	26
	7. References/Piśmiennictwo	30
V.	Publikacje stanowiące rozprawę doktorską.....	34
VI.	Oświadczenia współautorów.....	84
VII.	Zgody komisji bioetycznych	99

I. Wykaz publikacji

Na rozprawę doktorską składają się następujące, powiązane tematycznie publikacje

1. Kucińska-Chahwan A, Roszkowski T, Geremek M, Paczkowska M, Ciebiera M, Bijok J, Massalska D, Panek G, Siemion K, Nowakowska B. **Prenatal diagnosis of glutaric acidemia type 2 with the use of exome sequencing - an up-to-date review and new case report.** Ginekol Pol. 2021; 92: 51-56. (IF: 1,232; MNiSW: 40)

Indywidualny wkład: stworzenie koncepcji pracy, zebranie danych, analiza i interpretacja wyników, napisanie finalnej wersji manuskryptu. Proporcjonalny udział w realizacji pracy – 70%.

2. Kucińska-Chahwan A, Roszkowski T, Nowakowska B, Geremek M, Paczkowska M, Bijok J, Massalska D. **Extended genetic testing in fetuses with sonographic skeletal system abnormalities.** Ultrasound Obstet Gynecol. 2022; 59: 660-667. (IF: 7,299; MNiSW: 140)

Indywidualny wkład: stworzenie koncepcji pracy, zebranie danych, analiza i interpretacja wyników, napisanie finalnej wersji manuskryptu. Proporcjonalny udział w realizacji pracy – 70%.

3. Kucińska-Chahwan A, Geremek M, Roszkowski T, Bijok J, Massalska D, Ciebiera M, Correia H, Pereira-Caetano I, Barreta A, Obersztyn E, Kutkowska-Każmierczak A, Własienko P, Krajewska-Walasek M, Węgrzyn P, Dudarewicz L, Krzeszowski W, Rybak-Krzyszowska M, Nowakowska B. **Implementation of exome sequencing in prenatal diagnosis and impact on genetic counseling: the Polish experience.** Genes 2022; 13: 724. (IF: 4,096; MNiSW: 100)

Indywidualny wkład: stworzenie koncepcji pracy, zebranie danych, analiza i interpretacja wyników, napisanie finalnej wersji manuskryptu. Proporcjonalny udział w realizacji pracy – 60%.

Sumaryczny współczynnik IF: 12,594

Sumaryczna punktacja MNiSW: 280

II. Wykaz stosowanych skrótów

aCGH - ang. array comparative genomic hybridization

CADD - ang. Combined Annotation Dependent Depletion

GA2 - ang. glutaric acidemia

HGMD - ang. Human Gene Mutation Database

HGP - ang. Human Genome Project

IEM - ang. inborn errors of metabolism

IMC - ang. Institute of Mother and Child

IMiD - Instytut Matki i Dziecka

ISDS - ang. International Skeletal Dysplasia Society

KG2 - kwasica glutarowa typu 2

LBWC - ang. limb body-wall complex

MPS - ang. massively parallel sequencing

NGS - ang. next generation sequencing

NT - ang. nuchal translucency

OMIM - ang. Online Mendelian Inheritance in Man

OR - ang. odds ratio

SIFT - ang. Sorting Intolerant From Tolerant

VUS - ang. variant of unknown clinical significance

WES - ang. Whole Exome Sequencing

WHO - ang. World Health Organization

WWM - wrodzone wady metabolizmu

III. Opis pracy w języku polskim

1. Wstęp

Wrodzoną wadą rozwojową, według definicji WHO, nazywamy każdą nieprawidłowość morfologiczną lub czynnościową powstającą w okresie życia wewnątrzmacicznego i obecną po urodzeniu. Wrodzone wady rozwojowe występują u ok. 2-3% żywo urodzonych noworodków i w ok. 20% przypadków samoistnie poronionych płodów stanowiąc istotny problem zdrowotny [1]. Różnorodne czynniki zewnętrzne (infekcje, używki, leki) oraz wewnętrzne (naczyniowe, genetyczne) mogą zaburzyć rozwój zarodka i prowadzić do powstania wady [2]. Wady wrodzone ze względu na mechanizm powstawania możemy podzielić na malformacje, przerwania, deformacje i dysplazje. Malformacje to wady wywołane przez pierwotne zaburzenie rozwoju zarodka, spowodowane między innymi nieprawidłową proliferacją, różnicowaniem, czy migracją komórek co powoduje defekt organogenezy (np. ubytek w przegrodzie międzykomorowej serca, przepuklina mózgowa). W wadach wynikających z przerwania na początkowo prawidłowo rozwijający się organizm musi zadziałać czynnik przerywający ten rozwój (np. infekcja wewnątrzmaciczna, zablokowanie światła naczynia krwionośnego). Deformacje występują wtedy, gdy na prawidłowo rozwijający się płód działają długotrwałe siły fizyczne zaburzające formowanie się poszczególnych organów czy narządów (np. stopy szpotawe w ułożeniu miednicowym płodu). Z kolei dysplazje to wady, w których nieprawidłowa organizacja lub czynność komórek dotyczy określonej tkanki i ma wpływ na cechy kliniczne organizmu (np. dysplazja kostna, dysplazja ektodermalna) [3].

Ultrasonografia jest podstawową metodą obrazową w prenatalnej diagnostyce wrodzonych wad rozwojowych. Badania ultrasonograficzne są bezpieczne dla rozwijającego się płodu, jednak wykonując je, należy kierować się zasadą minimalnej ekspozycji i czasu badania pozwalającego na kompletne wykonanie procedury [4]. Podstawowym celem badań ultrasonograficznych w ciąży jest zminimalizowanie wystąpienia niekorzystnych wyników położniczych, mogących nastąpić wskutek nierozpoznania wady wrodzonej u płodu lub innych zaburzeń wewnątrzmacicznych. Polskie Towarzystwo Ginekologów i Położników, w zgodzie z rekomendacjami międzynarodowymi, zaleca wykonanie w ciąży przynajmniej czterech badań ultrasonograficznych. [5]. Jak podaje Syngelaki i wsp. w analizie obejmującej ponad 100 000 badań I i II trymestru i ponad 71 000 badań III trymestru jedynie mniej niż

5% wad rozwojowych pozostało nierozpoznanych prenatalnie [6]. W uzasadnionych przypadkach uzupełnieniem badań ultrasonograficznych mogą być badania przy użyciu rezonansu magnetycznego [7,8].

Rozpoznanie wady rozwojowej u płodu jest wskazaniem do rozszerzenia diagnostyki o badania genetyczne [9]. Materiałem do badań jest płyn owodniowy, kosmki lub krew pępowinowa płodu pobierane podczas procedur inwazyjnych: amniopunkcji, biopsji kosmówki lub kordocentezy. Każda procedura inwazyjna obarczona jest ryzykiem powikłań w tym poronienia ciąży. Z tego powodu materiał do badań prenatalnych musi być traktowany ze szczególną rozważą, z zastosowaniem badań diagnostycznych najlepiej odpowiadających wskazaniom, aby uniknąć sytuacji konieczności ponownego pobrania materiału. Dlatego też największe zastosowanie mają techniki całogenomowe, na różnym poziomie rozdzielczości w zależności od wybranej metody [10]. Klasyczne badanie cytogenetyczne, w którym pod mikroskopem świetlnym analizowane są chromosomy z rozdzielczością rzędu kilku milionów par zasad, umożliwia ustalenie przyczyny wad rozwojowych w ok. 32% przypadków. Dalsze 6-7% przypadków wad rozwojowych można wyjaśnić przy użyciu genomowej hybrydyzacji do mikromacierzy (aCGH) o minimalnej średniej rozdzielczości zalecanej dla badań prenatalnych rzędu 300 - 400 tysięcy par zasad [11,12]. Jednakże, pomimo zastosowania tych metod, pozostaje grupa ponad 60% płodów z rozpoznaną prenatalnie wadą rozwojową, u których podłoże genetyczne anomalii nie zostało ustalone.

Ostatnie dziesięciolecie XX wieku to intensywne prace nad poznaniem kompletnej sekwencji genomu człowieka. W 2003 roku opublikowano dokument stwierdzający zakończenie prac nad projektem Human Genome Project (HGP) [13]. Sekwencja genomu ludzkiego licząca ponad 3 miliardy par nukleotydów stała się publicznie dostępna, co przyczyniło się do rozwoju metod diagnostycznych stosowanych w genetyce molekularnej. Złotym standardem sekwencjonowania, czyli poznania kolejności nukleotydów w cząsteczce DNA jest metoda Sanger [14]. Metoda ta ma jednak podstawowe ograniczenie - sekwencjonowany fragment może mieć długość maksymalnie kilkuset nukleotydów. Z tego względu analizowany może być określony, wybrany przez badacza fragment genu. Decyzja o wyborze analizowanej sekwencji jest podejmowana na podstawie objawów klinicznych sugerujących konkretne rozpoznanie lub w przypadku gdy wywiad rodzinny jest obciążony i rozpoznanie molekularne zostało już wcześniej postawione. Celowane

badania molekularne w diagnostyce prenatalnej są stosowane przede wszystkim w rodzinach z obciążonym wywiadem (np. badania w kierunku dystrofii mięśniowej Duchenne'a). Jedynie w nielicznych przypadkach obraz ultrasonograficzny sugeruje określoną jednostkę chorobową i możliwość zastosowania badania celowanego (np. sekwencjonowanie fragmentu genu *FGFR3* w przypadku ultrasonograficznych cech dysplazji tanatoforycznej u płodu). Postęp jaki dokonał się dzięki badaniom prowadzonym podczas projektu HGP umożliwił opracowanie nowej metody - sekwencjonowania wysokoprzepustowego (MPS) zwanego również sekwencjonowaniem następnej generacji (NGS). W tej metodzie podczas jednego badania sekwencjonuje się wielką liczbę krótkich fragmentów DNA. Metodę można zastosować np. do sekwencjonowania panelowego, czyli sekwencjonowania określonej liczby wybranych przez badacza genów lub sekwencjonowania eksomowego (WES), gdzie badane są wszystkie kodujące części genomu (eksom). Uzyskane z MPS dane wymagają obróbki bioinformatycznej, a następnie analizy wyników pod kątem korelacji wykrytych wariantów z obrazem klinicznym [15]. Takie podejście daje możliwość identyfikacji patogennych wariantów bez ścisłego wskazania klinicznego, czy obciążonego wywiadu. Metoda WES jest już wykorzystywana jako metoda diagnostyczna w badaniach postnatalnych i jak wiele innych metod molekularnych zaczyna być stosowana również w diagnostyce prenatalnej [16].

2. Cele pracy

1. Poszukiwanie wariantów genetycznych odpowiedzialnych za powstawanie wad rozwojowych u płodu przy użyciu metody WES.
2. Określenie zależności genotyp - fenotyp u płodów ze stwierdzonymi ultrasonograficznie wadami i wariantami genetycznymi zidentyfikowanymi przy użyciu metody WES.
3. Ocena przydatności metody WES w diagnostyce prenatalnej wrodzonych wad rozwojowych.

3. Metodyka

Do badania włączono 160 pacjentek z rozpoznanymi ultrasonograficznie wadami rozwojowymi u płodu. Materiał do badań genetycznych był pobierany podczas procedur inwazyjnych w trakcie trwania ciąży. Badanie metodą WES wykonano w 122 przypadkach. Diagnostyka genetyczna była prowadzona w Zespole Pracowni Cytogenetyki Zakładu Genetyki Medycznej IMiD, a badania ultrasonograficzne we współpracujących ośrodkach diagnostyki wad płodu. Do wychwycenia sekwencji kodujących podczas sekwencjonowania wysokoprzepustowego używany był zestaw SureSelect Human All Exon v.6 (Agilent). Uzyskane w wyniku sekwencjonowania warianty analizowano pod względem częstości występowania w populacji, efektu molekularnego oraz powiązania wariantu z określonymi jednostkami klinicznymi. Do analizy stosowano ogólnodostępne bazy danych (GnomAD, ClinVar, HGMD, OMiM) oraz programy predykcyjne do oceny patogenności wariantu (SIFT, Polyphen-2, MutationTaster, CADD). W każdym przypadku interpretacja wyników odbywała się w kilkusobowej grupie specjalistów z różnych dziedzin w celu rozstrzygnięcia patogenności zidentyfikowanego wariantu i oceny korelacji genotyp - fenotyp. Warianty patogene lub prawdopodobnie patogene były definiowane jako wyniki nieprawidłowe. W każdym przypadku wytypowane w ten sposób warianty były potwierdzane przy użyciu metody sekwencjonowania Sangera. Następnie w celu ustalenia pochodzenia zmiany weryfikowano jej obecność u obojga rodziców płodu.

4. Omówienie publikacji

1. Kucińska-Chahwan A, Roszkowski T, Geremek M, Paczkowska M, Ciebiera M, Bijok J, Massalska D, Panek G, Siemion K, Nowakowska B. **Prenatal diagnosis of glutaric acidemia type 2 with the use of exome sequencing - an up-to-date review and new case report.** Ginekol Pol. 2021;92:51-56.

Wrodzone wady metabolizmu (WWM) zwane również chorobami metabolicznymi stanowią dużą i niejednorodną grupę zaburzeń charakteryzujących się upośledzeniem podstawowych funkcji komórkowych. Prenatalnie WWM mogą przebiegać bezobjawowo lub objawy stwierdzenie u płodu mogą być niespecyficzne (np. obrzęk płodu, zahamowanie wzrastania wewnątrzmacicznego, wady mózgu, serca, nerek lub układu kostnego) co sprawia, że diagnostyka prenatalna chorób metabolicznych jest trudna. Kwasica glutarowa typu 2 (KG2) jest rzadką chorobą metaboliczną objawiającą się klinicznie na trzy sposoby nazywane trzema typami klinicznymi (typ I, II i III). W typie I zaburzenia metaboliczne rozpoczynają się wkrótce po urodzeniu, dodatkowo u dziecka występuje wielotorbielowatość i uszkodzenie funkcji nerek. Typ II również rozpoczyna się w wieku noworodkowym, ale u dziecka nie są obecne towarzyszące wady anatomiczne. W typie III zaburzenia metaboliczne rozpoczynają się w wieku późniejszym u osób bez wad towarzyszących. Obie formy noworodkowe są zwykle letalne. Prenatalnie, w badaniu ultrasonograficznym w typie I KG2 można uwidocznienie powiększone, hiperechogenne nerki czasem z drobnymi torbielami oraz małowodzie lub bezwodzie. Taki obraz nie jest jednak patognomiczny dla KG2, występuje bowiem również w innych chorobach przebiegających z wielotorbielowatością nerek. Przyczyną KG2 jest obecność patogennych wariantów w jednym z trzech genów (*ETFA*, *ETFB*, *ETFDH*) powodująca defekt kompleksu enzymatycznego biorącego udział w metabolizmie kwasów tłuszczowych. Choroba dziedziczona jest w sposób autosomalny recesywny.

W niniejszej pracy przedstawiamy kliniczny opis płodu z wielotorbielowatością nerek i zidentyfikowanymi w badaniu WES dwoma patogennymi wariantami w genie *ETFDH* odpowiedzialnymi za wystąpienie choroby. Ponadto prezentujemy przegląd piśmiennictwa dotyczący prenatalnej diagnostyki KG2. Do tej pory opublikowano dziesięć rozpoznanych prenatalnie przypadków KG2, a diagnoza opierała się głównie o metody biochemiczne. We wszystkich przypadkach

wywiad rodzinny był obciążony, w związku z tym stosowano badania celowane. W opisywanym przez nas przypadku wywiad rodzinny był negatywny, a rozpoznanie postawiono dzięki równoczesnemu zastosowaniu metody WES u płodu i jego obojga rodziców (tzw. sekwencjonowanie trójki lub trio). Dzięki porównaniu wyników sekwencjonowania w obrębie badanej trójki zidentyfikowaliśmy dwa nowe warianty w genie *ETFDH* odpowiedzialne za objawy występujące u płodu oraz określiliśmy rodzicielskie pochodzenie każdego z nich. W przypadku rozpoznania u płodu wielotorbielowatych nerek i bezwodzia, należy wziąć pod uwagę KG2, która dzięki zastosowaniu metody WES może być zdiagnozowana nawet bez wcześniejszej znajomości dokładnego podłoża molekularnego choroby.

2. Kucińska-Chahwan A, Roszkowski T, Nowakowska B, Geremek M, Paczkowska M, Bijok J, Massalska D. **Extended genetic testing in fetuses with sonographic skeletal system abnormalities**. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2022; 59: 660-667.

Nieprawidłowości układu kostnego to niejednorodna grupa wad wrodzonych, które mogą być wywołane między innymi przez czynniki genetyczne - aberracje chromosomowe czy patogenne warianty pojedynczych genów. Dane na temat dysplazji kostnych o podłożu jednogowym są cyklicznie uaktualniane i publikowane przez Międzynarodowe Towarzystwo Dysplazji Szkieletowych (ang. ISDS). Publikacja ISDS bazuje na fenotypach pacjentów urodzonych i w swoim założeniu nie dotyczy okresu prenatalnego.

Celem niniejszej pracy było ustalenie genetycznych przyczyn szerokiego spektrum wad układu kostnego rozpoznanych prenatalnie w badaniu ultrasonograficznym oraz ustalenie protokołu diagnostycznego z uwzględnieniem badania WES w tej grupie pacjentów. Było to badanie prospektywne, do którego włączono 55 płodów. Płody podzielono na cztery grupy w zależności od tego czy wada kośćca była pojedyncza czy mnoga i czy towarzyszyły jej dodatkowe wady anatomiczne. Aberracje chromosomowe stwierdzono u 24 (43,6%) płodów a u 18 (32,7%) zidentyfikowano skorelowane z fenotypem patogenne lub prawdopodobnie patogenne warianty w 14 genach. Siedem genów znajdowało się na liście przyczyn dysplazji kostnych w publikacji ISDS, a pozostałe siedem genów nie było w niej uwzględnione. Najwyższy odsetek nieprawidłowych wyników WES obserwowano wśród płodów z mnogimi wadami układu kostnego niezależnie od tego czy były obecne dodatkowe nieprawidłowości anatomiczne. Analizując korelacje genotyp - fenotyp stwierdzono, że w przypadku wad układu kostnego ograniczonych do jednego obszaru anatomicznego z towarzyszącymi wadami strukturalnymi innych narządów najczęstszym rozpoznaniem była aberracja chromosomowa 19/21 (90,5%). Zastosowanie metody WES zwiększało wykrywalność przyczyn genetycznych wad układu kostnego, zwłaszcza w przypadkach wad mnogich 17/27 (63%). W pracy zaprezentowano również schemat prenatalnej diagnostyki genetycznej u płodów z wadami układu kostnego z uwzględnieniem metod rutynowych oraz metody WES.

3. Kucińska-Chahwan A, Geremek M, Roszkowski T, Bijok J, Massalska D, Ciebiera M, Correia H, Pereira-Caetano I, Barreta A, Obersztyn E, Kutkowska-Kaźmierczak A, Własienko P, Krajewska-Walasek M, Węgrzyn P, Dudarewicz L, Krzeszowski W, Rybak-Krzyszowska M, Nowakowska B. **Implementation of exome sequencing in prenatal diagnosis and impact on genetic counseling: the Polish experience.** *Genes* 2022; 13: 724.

W przypadkach wad rozwojowych płodu, w których przy użyciu rutynowych metod diagnostycznych nie ustalono przyczyny wystąpienia wady, brak jest możliwości oszacowania ryzyka powtórzenia się wady oraz udzielenia szczegółowej porady genetycznej.

Celem pracy było przedstawienie wstępnych wyników wdrożenia metody WES jako rozszerzenia rutynowej diagnostyki prenatalnej oraz omówienie ich wpływu na poradnictwo genetyczne. Wskazaniem do badania metodą WES we wszystkich przypadkach była wrodzona wada rozwojowa rozpoznana prenatalnie lub obrzęk płodu. Płody podzielono na 9 grup w zależności od rodzaju wady (wada ośrodkowego układu nerwowego, twarzy, układu sercowo-naczyniowego, brzucha, układu moczowo-płciowego, układu mięśniowo-szkieletowego, cewy nerwowej, obrzęk płodu i wady mnogie). Wyniki nieprawidłowe, definiowane jako warianty patogenne lub prawdopodobnie patogenne stwierdzono w 33 genach u 52 (42,6%) płodów. U 31 (31/64; 48,4%) płodów z wadą pojedynczą i u 21 (58/122; 47,5%) płodów z wadami mnogimi. Różnica nie była istotna statystycznie. Natomiast stwierdzono, że obecność izolowanej wady układu mięśniowo-szkieletowego 2,5 - krotnie zwiększała szansę wystąpienia nieprawidłowego wyniku WES, a izolowana wada układu sercowo-naczyniowego zmniejszała szansę 0,34-krotnie. Wśród 57 zidentyfikowanych patogennych lub prawdopodobnie patogennych wariantów najczęstsze były warianty niesynonimiczne (28/57; 49,1%), w większości (34/57; 59,6%) warianty były nowe, nieraportowane w dostępnych bazach danych, u 31 (31/52; 59,6%) płodów odpowiadały za choroby o dziedziczeniu autosomalnym dominującym. W pracy przedstawiono również listę genów, w których stwierdzono warianty o nieznanym znaczeniu klinicznym oraz odpowiadające im fenotypy, między innymi trzy płody z letalną, złożoną wadą kończyn i powłok (ang. limb body-wall complex, LBWC). Interpretacja korelacji genotyp - fenotyp w tego typu przypadkach jest trudna, gdyż nie ma opisów żyjących osób z takimi wadami, a opisy prenatalne są

ograniczone do pojedynczych przypadków bez wykonanej poszerzonej diagnostyki genetycznej. U opisywanych przez nas płodów stwierdzono rzadkie warianty w genach *CEP120*, *FLNB* oraz *COL2A1*, ale z powodu braku podobnych opisów w dostępnych bazach oraz literaturze nie mogą być one zakwalifikowane inaczej niż jako warianty o nieznanym znaczeniu klinicznym. W pracy zaprezentowano także szczegółowy opis obrazów ultrasonograficznych u płodów, u których nie stwierdzono patogennych lub prawdopodobnie patogennych wariantów skorelowanych z fenotypem i wynik badania WES uznano jako prawidłowy. W 17 (17/122; 13,9%) przypadkach diagnoza molekularna miała rzeczywisty wpływ na postępowanie w kolejnych ciążach lub była klinicznie istotna dla innych członków rodziny.

5. Podsumowanie wyników

Pierwsze doniesienie naukowe dotyczące zastosowania badania WES w diagnostyce prenatalnej opublikowano w roku 2012 [17]. Do chwili obecnej pojawiło się wiele pojedynczych opisów oraz badań dotyczących określonych grup klinicznych, jednak dużych populacyjnych badań oraz baz danych katalogujących korelację genotyp - fenotyp dedykowanych diagnostyce prenatalnej nadal brakuje. Dwa największe prospektywne badania obejmowały grupę 610 i 234 płodów z prawidłowym wynikiem rutynowych badań genetycznych oraz wadami rozwojowymi lub poszerzoną przeziernością karku [18,19]. Dzięki zastosowaniu badania WES ustalono rozpoznanie genetyczne odpowiednio u 8,5% i 10% płodów. W innych publikacjach w zależności od tego jaka była charakterystyka badanej grupy pod względem prezentowanego fenotypu uzyskiwano nieprawidłowy wynik WES w zakresie od 6 do 80% płodów [20, 21]. Natomiast Pauta i wsp. [22] w metaanalizie obejmującej badania dotyczące zastosowania WES u płodów z wadami mnogimi i prawidłowym wynikiem aCGH podaje wskaźnik wykrywalności na poziomie 33% [22]. W prezentowanej przez nas publikacji nr 3 odsetek nieprawidłowych wyników WES wynosił 42,6%. Iloraz szans (OR) nieprawidłowego wyniku wśród badanych przez nas płodów był najwyższy w przypadku wad układu kostnego. Różnice w przydatności metod diagnostycznych u płodów z wadami układu kostnego zostały z kolei zaprezentowane w publikacji nr 2. W celu ustalenia przydatności metody WES w określonych zastosowaniach klinicznych potrzeba dalszych badań obejmujących homogenne pod względem fenotypu grupy.

Pomimo ciągłego rozwoju dostępnych baz danych interpretacja wyników prenatalnych WES jest trudna. W bazie danych OMIM, gromadzącej informacje na temat chorób o dziedziczeniu mendelowskim, znajdują się opisy fenotypów postnatalnych. Wiele cech zewnętrznych odpowiadających za charakterystyczny wygląd osoby chorej nie jest możliwych do oceny ultrasonograficznej. Wzrok, słuch, rozwój psychofizyczny również nie mogą być ocenione prenatalnie. U płodu nie można także wykonać wielu badań dodatkowych pomocnych w diagnostyce postnatalnej. Z kolei opisy ciężkich, letalnych wad nie są umieszczane w klinicznych bazach danych z uwagi na brak żyjących pacjentów z takimi wadami. Z tego powodu interpretacja wariantów wytypowanych podczas prenatalnego badania WES jest dokonywana na podstawie niepełnych informacji. Może to spowodować odrzucenie

wariantu odpowiedzialnego faktycznie za chorobę z powodu braku dostatecznych danych na poparcie korelacji genotyp - fenotyp. W większości analizowanych przez nas przypadków zidentyfikowane patogenne lub prawdopodobnie patogenne warianty były nowe, nieraportowane do tej pory w dostępnych bazach danych. W tym miejscu należy postawić pytanie czy przyczyną tego może być fakt, że warianty powodujące wady diagnozowane prenatalnie, szczególnie te sugerujące ciężki przebieg kliniczny są zlokalizowane w innych miejscach w obrębie genów niż te opisywane postnatalnie? Dlatego, w celu poprawienia możliwości interpretacji potrzeba więcej opracowań naukowych i publikacji dotyczących prenatalnych badań WES.

Każda postawiona diagnoza molekularna ma znaczenie dla dotkniętej pary lub dla spokrewnionych osób. W każdym przypadku, w którym postawiono rozpoznanie, ustalono wariant odpowiedzialny za stwierdzone u płodu wady i sposób dziedziczenia choroby wywołanej przez ten wariant można było udzielić właściwej porady genetycznej. Postawienie rozpoznania jeszcze w czasie trwania ciąży umożliwia zaplanowanie dalszego postępowania, miejsca i drogi porodu, opieki nad noworodkiem na oddziale neonatologicznym. Jeśli wynik badania WES jest dostępny już po zakończeniu ciąży może pomóc w dalszych decyzjach prokreacyjnych, co mogliśmy zaobserwować dzięki informacjom od pacjentek, które były włączone do badania. Należy tutaj zwrócić uwagę na opisywaną przez nas w publikacji nr 1 sytuację kliniczną, w której wywiad rodzinny był obciążony zgonem dziecka z powodu wielotorbielowatości nerek, a podjęta wówczas próba diagnostyki genetycznej nie przyniosła rozpoznania. Z powodu zgonu dziecka wkrótce po porodzie nie było możliwe wykonanie dalszych badań, dopiero dzięki zastosowaniu metody WES podczas kolejnej ciąży z takimi samymi wadami postawiono rozpoznanie molekularne. Dzięki zastosowaniu techniki zapłodnienia pozaustrojowego z diagnostyką przedimplantacyjną pacjentka w wyniku kolejnej ciąży urodziła zdrowe dziecko, o czym wzmiankuje publikacja nr 3. Dzięki postawieniu rozpoznania w badaniu WES pacjentki decydowały się na badania przedimplantacyjne podczas starań o kolejną ciążę, prenatalne badania inwazyjne w celu poznania statusu genetycznego płodu w kolejnej ciąży lub na antykoncepcję o wysokiej skuteczności w celu zapobiegania ciąży.

6. Wnioski

1. Zastosowanie metody WES w przypadku wrodzonych wad rozwojowych płodu zwiększyło wykrywalność nieprawidłowości genetycznych o 43%.
2. W wadach układu kostnego zastosowanie metody WES zwiększyło wykrywalność nieprawidłowości genetycznych o 33%.
3. W celu ustalenia przydatności metody WES w określonych wskazaniach klinicznych w diagnostyce prenatalnej, niezbędne jest wykonanie dużej liczby badań w grupach o homogennym fenotypie.
4. Identyfikacja w badaniu WES wariantu odpowiedzialnego za stwierdzone u płodu wady oraz sposób dziedziczenia choroby wywołanej przez ten wariant jest podstawą do udzielenia porady genetycznej.
5. Prenatalna diagnoza molekularna przy użyciu techniki WES ma rzeczywisty wpływ na postępowanie w kolejnych ciążach, jak również jest klinicznie istotna dla innych członków rodziny.

IV. Opis pracy w języku angielskim

1. Introduction

Congenital anomalies, as defined by the WHO, are structural or functional abnormalities that occur during the intrauterine life and are present after birth. They occur in approximately 2–3% of live births and 20% of spontaneously aborted fetuses posing a major health problem [1]. The underlying etiology of congenital anomalies includes various extrinsic (e.g. infectious agents, drugs, medications) or intrinsic (e.g. vascular, genetic) factors [2]. Congenital anomalies can be classified according to developmental mechanisms as malformation, disruption, deformation or dysplasia. Malformation arise during organogenesis due to abnormal proliferation, differentiation or migration of cells (e.g. ventricular septal defect, cephalocele). Disruption is the defect resulting from a breakdown of an originally normal development (e.g. intrauterine infection, vascular accident). Deformation is an abnormal shape of the organ caused by long-lasting mechanical forces (e.g. talipes caused by breech position). Dysplasia is an abnormality of the tissue formation (e.g. skeletal dysplasia, ectodermal dysplasia) [3].

Prenatal ultrasonography is the main, safe diagnostic tool for fetal anomalies. [4]. The first goal of prenatal scanning is to minimize unfavorable outcome caused by undiagnosed congenital malformation or other intrauterine pathology. The Polish Society of Obstetricians and Gynecologists recommends at least four sonographic evaluations during pregnancy which is in line with the international guidelines [5]. According to an analysis of over 100 000 first and second trimesters scans and over 71 000 of third trimester scans conducted by Syngelaki at al. only less than 5% of congenital malformations were undetectable by prenatal ultrasonography [6]. In selected cases magnetic resonance can be an additional tool for prenatal diagnosis [7,8].

The genetic testing is indicated in case of sonographic recognition of the fetal anomaly [9]. Amniotic fluid, chorionic villi or fetal blood can be used for testing. The fetal samples are obtained at invasive procedures which carries the risk of complication including miscarriage. For this reason fetal samples should be used prudently. To avoid repeated procedures genomic techniques analyzing all chromosomes, all genomic material with different resolution are widely used [10]. Prenatal karyotyping with the resolution of several millions of base pairs is diagnostic in about 32% of anomalous

fetuses. Next 6-7% can be diagnosed with the use of array comparative genomic hybridization (aCGH) having 300-400 thousands of base pairs resolution [11,12]. However, about 60% of cases remain without a genetic diagnosis.

Extensive scientific work to analyze whole human genome was proceeded during the last ten years of 20th century at the Human Genome Project (HGP). In 2003 the results have been published [13]. The human genome sequence of more than 3 billion base pairs has become publicly available, which has contributed to the development of diagnostic methods used in molecular genetics. The golden standard for sequencing, i.e. analyzing the order of nucleotides in a DNA molecule, is the Sanger method [14]. The main limitation of the Sanger method is that the length of sequenced DNA fragment can be up to several hundred nucleotides long. For this reason, the Sanger sequencing is targeted and the decision of the target is made by the clinician based on symptoms or family history. Targeted prenatal diagnosis is performed mainly in affected families (e.g. Duchenne muscular dystrophy). Exceptionally targeted examination can be used after sonographic indication (e.g. *FGFR3* sequencing in case of ultrasound imaging suggesting thanatophoric dysplasia). Thanks to HGP new method of sequencing called massively parallel sequencing (MPS) or next generation sequencing (NGS) was introduced. In MPS in one diagnostic experiment huge number of short DNA fragments is sequenced. It can be used for panel sequencing (only genes of interest indicated by clinician) or whole exome sequencing (WES) of all coding regions (exome). Raw data are subsequently post-processed by bioinformatician and then correlated with patient phenotype [15]. Sequencing of all coding regions allow to identify pathogenic variants without previous clinical indication or family history. WES is already used in postnatal patients and like many other molecular methods, is now also introduced into prenatal diagnostics [16].

2. Aims

1. Identification of sequence variants responsible for fetal congenital anomalies with the use of WES.
2. Indication of genotype-phenotype correlation in fetuses with congenital anomalies and variants detected by WES.
3. Assessment of clinical usefulness of the prenatal WES.

3. Methods

A total of 160 patients with fetal anomalies diagnosed in ultrasound scanning were enrolled in the study. The fetal samples for genetic testing were collected during prenatal invasive procedures. WES was performed in 122 cases. Genetic testing was carried out at the Department of Medical Genetics IMC, and ultrasound examinations were carried out in cooperating obstetrics centers. A diagnostic kit SureSelect Human All Exon v.6 (Agilent) was used for exome capture. Variants obtained at the massively parallel sequencing were analyzed based on allele frequency, molecular and clinical impact. The opensource databases were used for analysis (GnomAD, ClinVar, HGMD, OMiM). The software (SIFT, Polyphen-2, MutationTaster, CADD) were used for in silico evaluation of pathogenicity. In each case interpretation of the results was discussed in a panel group of specialists in order to classify identified variant and to assess the genotype-phenotype correlation. Pathogenic or likely pathogenic variants were defined as abnormal WES result. In each case abnormal results were verified by Sanger sequencing and parental origin was examined.

4. Overview of a collection of thematically related scientific articles

1. Kucińska-Chahwan A, Roszkowski T, Geremek M, Paczkowska M, Ciebiera M, Bijok J, Massalska D, Panek G, Siemion K, Nowakowska B. **Prenatal diagnosis of glutaric acidemia type 2 with the use of exome sequencing - an up-to-date review and new case report.** Ginekol Pol. 2021;92:51-56.

Inborn errors of metabolism (IEM) also called metabolic diseases constitute a large and heterogeneous group of disorders characterized by a failure of essential cellular functions. Antenatal manifestation of IEM is absent or nonspecific (e.g. fetal hydrops, intrauterine growth restriction, brain, heart, kidneys or skeletal anomalies) which makes prenatal diagnosis challenging. Glutaric acidemia type 2 (GA2) is a rare metabolic disease clinically manifested in three different ways called clinical type I, II or III. In type I clinical symptoms of metabolic disorder occur shortly after birth in a baby with cystic kidneys and renal failure. In type II metabolic symptoms occur shortly after birth but no additional anomalies are found. In type III metabolic symptoms occur in the later years of life. Both neonatal forms are usually lethal. In type I congenital anomalies may be visible on prenatal ultrasound as large, hyperechoic or cystic kidneys with reduced amniotic fluid volume. However, such an ultrasound image is not pathognomonic only for GA2, as it also occurs in other with cystic kidneys. GA2 is caused by pathogenic variants in one of the three genes (*ETFA*, *ETFB*, *ETFDH*) disrupting normal functioning of the enzyme complex involved in the metabolism of fatty acids. GA2 is inherited in an autosomal recessive manner.

In this publication we present a clinical report of fetus with cystic kidneys and two pathogenic variants in *ETFDH* gene identified in WES analysis causing GA2 in the fetus. We also performed a systematic literature review describing prenatal diagnosis of the disease. Ten prenatally diagnosed cases have been reported to date. In the majority of cases diagnosis was targeted, based on enzyme activity measurement because in all cases family history of GA2 was positive. In our study WES analysis in trio (mother, father and fetus) was performed. Consequently, we were able to identify two novel pathogenic variants of the *ETFDH* gene and to indicate their parental origin. Cystic kidneys and decreased amniotic fluid volume could be the clinical features of GA2. Exome sequencing approach allows to identify pathogenic variants in disease causing gene even without earlier knowledge of the precise genetic background.

2. Kucińska-Chahwan A, Roszkowski T, Nowakowska B, Geremek M, Paczkowska M, Bijok J, Massalska D. **Extended genetic testing in fetuses with sonographic skeletal system abnormalities**. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2022; 59: 660-667.

Skeletal system abnormalities are a heterogeneous group of disorders that could be caused by genetic factors - chromosomal abnormalities or monogenic disorders. Monogenic causes of the skeletal disorders are periodically revised by the International Skeletal Dysplasia Society (ISDS) and published. ISDS classification is based on postnatal phenotypes and is not intended to cover the prenatal period..

The aim of this study was to analyze genetic causes of the broad spectrum of skeletal system abnormalities diagnosed by prenatal sonography and to establish a diagnostic protocol with the use of prenatal WES. This was a prospective observational cohort study that included 55 fetuses. The fetuses were divided into four groups according to number of affected regions and the presence of additional abnormalities. Chromosomal abnormalities were observed in 24 (43,6%) fetuses. In 18 (32,7%) fetuses pathogenic or likely pathogenic sequence variants were identified in 14 genes. Seven genes have already been listed in the ISDS publication and the remaining seven genes were out of this list. The highest percentage of abnormal WES result was observed in fetuses with multiple skeletal defects. After analysis of genotype-phenotype correlation we concluded that in fetuses with localized abnormality of the skeletal system accompanied by additional structural anomalies chromosomal abnormality was the most common diagnosis 19/21 (90,5%). WES increases the diagnostic yield in fetuses with skeletal system abnormalities especially in case of multiple abnormalities 17/27 (63%). Analysis of the study group enabled us to propose a diagnostic protocol with the use of routine prenatal methods extended by WES.

3. Kucińska-Chahwan A, Geremek M, Roszkowski T, Bijok J, Massalska D, Ciebiera M, Correia H, Pereira-Caetano I, Barreta A, Obersztyn E, Kutkowska-Kaźmierczak A, Własienko P, Krajewska-Walasek M, Węgrzyn P, Dudarewicz L, Krzeszowski W, Rybak-Krzyszowska M, Nowakowska B. **Implementation of exome sequencing in prenatal diagnosis and impact on genetic counseling: the Polish experience.** *Genes* 2022; 13: 724.

In cases of fetal malformations where the cause of the defect has not been established using routine diagnostic methods, it is not possible to estimate the risk of recurrence and to provide appropriate genetic counsel.

The aim of our study was to present initial results of the implementation of WES to the prenatal diagnosis and to discuss its possible clinical impact on genetic counseling. All fetuses were referred due to structural anomalies or fetal hydrops. We arranged fetal phenotypes into 9 categories: as anomalies of the central nervous system, face, cardiovascular system, abdomen, genitourinary system, musculoskeletal system, neural tube defects, non-immune hydrops fetalis and multisystem anomalies. Overall, there were 52 (42.6%) abnormal WES results defined as pathogenic or likely pathogenic sequence variants detected in 33 genes. 31 (31/64; 48.4%) abnormal results were found in the group of fetuses with a single organ system anomaly and 21 (21/58; 36.2%) in the group of fetuses with multisystem anomalies. The difference between groups was not statistically significant. Musculoskeletal anomalies increased the odds of an abnormal WES result by 2.5 fold whereas isolated cardiovascular defects decreased the odds of an abnormal WES result by 0.34 fold. There were 57 different pathogenic or likely pathogenic variants, the most common were missense variants (28/57; 49.1%). In the majority of cases variants were novel (34/57; 59,6%). The mode of inheritance was autosomal dominant in 31 cases of abnormal results (31/52; 59.6%). We present also a list of genes with variants of unknown clinical significance (VUS) and corresponding phenotypes, including three fetuses with a lethal condition limb body-wall complex (LBWC). Interpretation of the genotype-phenotype correlation in this type of cases is difficult, as there are no descriptions of living people with such defects, and prenatal descriptions are limited to individual cases without extended genetic diagnosis. Rare variants detected in the *CEP120*, *FLNB* and *COL2A1* genes, due to the lack of similar records in the available databases and literature, cannot be classified otherwise than as VUS. Moreover, we included detailed descriptions of

ultrasound imaging in fetuses in which no pathogenic or likely pathogenic variants correlated with the phenotype were found and the WES result was considered normal. Molecular diagnosis obtained by prenatal WES had actual clinical impact in 17 (17/122; 13,9%) cases both for affected couple and for their relatives.

5. Summary of the results

The first scientific report on the use of WES in prenatal diagnosis was published in 2012 [17]. To date, many case reports and cohort studies have been published, however, large population-based studies or databases intended for prenatal patients are still lacking. The two largest prospective studies including 610 and 234 fetuses with structural anomalies or increased nuchal translucency (NT), indicated a diagnostic yield of WES of 8.5% and 10%, respectively [18,19]. Other studies, depending on the observed fetal phenotype, report the added value of WES ranging between 6 and 80% [20,21]. Pauta et al. in the metanalysis including studies on WES performed in fetuses with multiple anomalies and normal aCGH reported a diagnostic yield of 33% [22]. In our publication no. 3 the diagnostic yield of prenatal WES was 42,6%. The odds ratio (OR) of an abnormal WES among the fetuses we studied was the highest in case of skeletal malformations. Differences in the clinical usefulness of diagnostic methods in this group of fetuses were presented in the publication no. 2. The analysis of diagnostic yield in phenotypically homogenous cohorts is probably more valuable for clinical practice than the overall diagnostic yield of prenatal WES.

Despite continuous improvement of clinical databases, the interpretation of prenatal WES is challenging. The OMIM catalogue of mendelian disorders collects postnatal phenotypes. Dysmorphic features, vision, hearing, psychomotor development cannot be assessed in the prenatal setting. For these reasons prenatal data are incomplete. On the other hand, lethal conditions are not included in the datasets of living patients. Lack of evidence for genotype - phenotype correlation can cause erroneous discarding of causative variants. Most of identified causative variants in our cohort were novel and it is interesting question, if the genomic location is different in prenatal and postnatal cases? Therefore, a large amount of data available in public repositories and scientific reports is required to implement WES in the routine prenatal diagnosis.

Establishing a molecular diagnosis has clinical impact on affected couple, as well as other family members. By having information on a detected diagnostic variant and its inheritance trait, we were able to give a correct genetic counsel. Genetic diagnosis is important for better prenatal and neonatal care and has clinical impact even when it is established after the end of pregnancy. In the publication no. 1 we described a family with a history burdened with the perinatal death due to cystic

kidneys in a child without genetic diagnosis. The child died shortly after delivery and it was not possible to perform further tests. Thanks to application of WES during the next pregnancy with the same clinical course, molecular diagnosis of GA2 was made. In the subsequent pregnancy after in vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis and embryo selection the patient gave birth to a healthy child, as mentioned in the publication no. 3. Diagnosis established by prenatal WES altered reproductive management in the affected couple and was also important for their relatives.

6. Conclusions

1. Prenatal WES increases the diagnostic yield by 43% in fetuses with congenital anomalies.
2. In fetuses with skeletal system abnormalities prenatal WES increases the diagnostic yield by 33%.
3. Further research on large, phenotypically homogenous cohorts is needed to establish clinical usefulness of prenatal WES .
4. Identifying in prenatal WES of causative sequence variant and its inheritance trait in the anomalous fetus enables a correct genetic counsel.
5. Establishing a molecular diagnosis by prenatal WES has clinical impact on subsequent pregnancies, as well as other family members.

7. References / Piśmiennictwo

1. Centers for Disease Control and Prevention. Update on Overall Prevalence of Major Birth Defects—Atlanta, Georgia, 1978-2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008; 57: 1-5.
2. Shepard T, Fantel A, Fitzsimmons J. Congenital defect rates among spontaneous abortuses: twenty years of monitoring. *Teratology* 1989; 39: 325–331
3. Korniszewski L. Mechanizmy patogenetyczne. Dziecko z zespołem wad wrodzonych. Diagnostyka dysmorfologiczna. 2 wyd. Warszawa: PZWL; 2005.
4. Abramowicz J. Benefits and risks of ultrasound in pregnancy. *Semin Perinatol.* 2013; 37: 295–300.
5. Borowski D, Pietryga M, Basta P, Cnota W, Czuba B, Dubiel M, Fuchs T, Huras H, Iciek R, Jaczyńska R, Kaczmarek P, Kosinski P, Kwiatkowski S, Nocun A, Pomorski M, Ropcka-Lesiak M, Rybak-Krzyszowska M, Sieroszewski P, Wegrzyn P, Wiechec M, Wielgos M, Zimmer M. Practice guidelines of the Polish Society of Gynecologists and Obstetricians - Ultrasound Section for ultrasound screening in uncomplicated pregnancy - 2020. *Ginekol Pol.* 2020; 91: 490-501.
6. Syngelaki A, Hammami A, Bower S, Zidere V, Akolekar R, Nicolaides K. Diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities on routine ultrasound examination at 11-13 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019; 54: 468-476.
7. Prayer D, Malinger G, Brugger PC, Cassady C, De Catte L, De Keersmaecker B, Fernandes G, Glanc P, Gonçalves L, Gruber G, Laifer-Narin S, Lee W, Millischer A, Molho M, Neelavalli J, Platt L, Pugash D, Ramaekers P, Salomon L, Sanz M, Timor-Tritsch I, Tutschek B, Twickler D, Weber M, Ximenes R, Raine-Fenning N. ISUOG Practice Guidelines: performance of fetal magnetic resonance imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017; 49: 671-680.
8. Bekiesińska-Figatowska M, Herman-Sucharska I, Duczkowska A, Jaczyńska R, Romaniuk-Doroszewska A, Bragoszewska H, Zamłyński J. Prenatalne badanie MR jako metoda kontroli patologii płodu [Prenatal MRI as a method of controlling fetal pathology]. *Ginekol Pol.* 2013; 84: 436-43.
9. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące postępowania w zakresie diagnostyki prenatalnej. *Ginekol Pol.* 2009; 80: 390-393.

10. Bijok J, Kucińska-Chahwan A, Massalska D, Ilnicka A, Panek G, Roszkowski T. In-house genetic counseling increases the detection of abnormal karyotypes—a 26-year experience in prenatal diagnosis in a single tertiary referral hospital in Poland. *J Assist Reprod Genet.* 2020; 37: 1999-2006.
11. Wapner R, Martin C, Levy B, Ballif B, Eng C, Zachary J, Savage M, Platt L, Saltzman D, Grobman W, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal V, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb A, Thom E, Beaudet A, Ledbetter D, Shaffer L, Jackson L. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012; 367: 2175-2184.
12. South S, Lee C, Lamb A, Higgins A, Kearney H; Working Group for the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genet Med.* 2013; 15: 901-909.
13. Hood L, Galas D. The digital code of DNA. *Nature.* 2003; 421: 444-448
14. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977; 74: 5463-5467.
15. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody W, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm H; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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: 405-424.
16. Committee Opinion No. 682 Summary: Microarrays and Next-Generation Sequencing Technology: The Use of Advanced Genetic Diagnostic Tools in Obstetrics and Gynecology. *Obstet Gynecol.* 2016; 128: 1462-1463.
17. Talkowski M, Ordulu Z, Pillalamarri V, Benson C, Blumenthal I, Connolly S, Hanscom C, Hussain N, Pereira S, Picker J, Rosenfeld J, Shaffer L, Wilkins-Haug L, Gusella J, Morton C. Clinical diagnosis by whole-genome sequencing of a prenatal sample. *N Engl J Med.* 2012; 367: 2226-2232.
18. Lord J, McMullan D, Eberhardt R, Rinck G, Hamilton SJ, Quinlan-Jones E, Prigmore E, Keelagher R, Best S, Carey G, Mellis R, Robart S, Berry I, Chandler K, Cilliers D, Cresswell L, Edwards S, Gardiner C, Henderson A, Holden S, Homfray T, Lester T, Lewis R, Newbury-Ecob R, Prescott K, Quarrell O, Ramsden

- S, Roberts E, Tapon D, Tooley M, Vasudevan P, Weber A, Wellesley D, Westwood P, White H, Parker M, Williams D, Jenkins L, Scott R, Kilby M, Chitty L, Hurles M, Maher E; Prenatal Assessment of Genomes and Exomes Consortium. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet* 2019; 393: 747-757.
19. Petrovski S, Aggarwal V, Giordano J, Stosic M, Wou K, Bier L, Spiegel E, Brennan K, Stong N, Jobanputra V, Ren Z, Zhu X, Mebane C, Nahum O, Wang Q, Kamalakaran S, Malone C, Anyane-Yeboah K, Miller R, Levy B, Goldstein D, Wapner R. Whole exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies: a prospective cohort study. *Lancet* 2019; 393: 758-767
 20. Best S, Wou K, Vora N, Van der Veyver I, Wapner R, Chitty L: Promises, pitfalls and practicalities of prenatal whole exome sequencing. *Prenat Diagn* 2018, 38: 10–19.
 21. Mellis R, Oprych K, Scotchman E, Hill M, Chitty L. Diagnostic yield of exome sequencing for prenatal diagnosis of fetal structural anomalies: A systematic review and meta-analysis. *Prenat Diagn.* 2022; doi: 10.1002/pd.6115. Epub ahead of print.
 22. Pauta M, Martinez-Portilla R, Borrell A. Diagnostic yield of exome sequencing in fetuses with multisystem malformations: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2022; doi: 10.1002/uog.24862. Epub ahead of print.