

Frau
 Dr. med. Erika Muster
 Paul-Ehrlich-Straße 23
 72076 Tübingen

Patient ID #	XXX, XX männlich (*TT.MM.JJJJ)
Probeneingang	xxx
Material	Blutkarte
Befunddatum	xxx
Befund-ID	R#

Molekulargenetischer Befund – XXX, XX (*TT.MM.JJJJ)

Indikation Kleinwuchs der Gliedmaßen, Skelettdysplasie, vorgeburtlicher Kleinwuchs, kurze Nase, tiefsitzende Ohren, Proptosis, Brachydaktylie, Leistenbruch

Auftrag ExomeFocus

Ergebnis: Auffälliger Befund

- **Nachweis einer homozygoten wahrscheinlich pathogenen Variante im Gen *CHST3*, die vereinbar mit einer spondyloepiphysären Dysplasie mit kongenitalen Gelenkdislokationen (SEDCJD) bei Ihrem Patienten ist.**
- Es wurden keine genomischen Zugewinne oder Verluste ≥ 50 kb gefunden, die nach derzeitigem Kenntnisstand für die Erkrankung Ihres Patienten ursächlich sind.

Gen	Variante	Zygotie	Erbgang	MAF (%)	Bewertung
<i>CHST3</i>	c.460C>T; p.Gln154* chr10:73767249 C>T (hg19)	homo.	AR	< 0,01	wahrscheinlich pathogen

Informationen zur Interpretation dieser Tabelle können im Abschnitt *Ergänzende Informationen* eingesehen werden.

Empfehlung

Wir empfehlen eine weiterführende klinische Diagnostik und Versorgung entsprechend dem aktuellen Protokoll für *CHST3*-assoziierte Skelettdysplasie (Superti-Furga & Unger, aktualisiert 2019, PMID: 21882400, GeneReviews).

Um die Eltern des Patienten auf Anlageträgerschaft zu untersuchen und die Wiederholungswahrscheinlichkeit für eine weitere Familienplanung abschätzen zu können, empfehlen wir die Analyse der Eltern des Patienten hinsichtlich dieser Veränderung.

Humangenetische Relevanz

Der Patient ist homozygoter Träger einer wahrscheinlich pathogenen Variante im Gen *CHST3*, die für die zukünftige Familienplanung und auch für Verwandte relevant sein kann.

Aufgrund der Homozygotie der Veränderung im Gen *CHST3* wird in jedem Fall jeweils ein verändertes Allel an jeden Nachkommen weitervererbt.

Die von uns erhobenen Sequenzierdaten ergaben keinen Hinweis auf größere Deletionen innerhalb oder inklusive des Gens *CHST3*, weshalb wir einen Allelverlust der eine Homozygotie vortäuschen würde für unwahrscheinlich halten.

Klinische Information und Varianten-Interpretation

CHST3, NM_004273.5

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
143095	Spondyloepiphysäre Dysplasie mit kongenitalen Gelenkdislokationen, Typ AR <i>CHST3</i> (SEDCJD)	

Das Gen ***CHST3*** kodiert für eine Carbohydrat-Sulfotransferase, die zur Bildung von extrazellulären Proteoglykanen im Knorpel essenziell ist und damit eine wesentliche Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Skelettstruktur spielt (GeneCards). Biallelisch pathogene Varianten in diesem Gen führen zu einer spondyloepiphysären Dysplasie mit kongenitalen Gelenkdislokationen (SEDCJD). Die Merkmale dieser Skelettdysplasie sind pränatal beginnender Kleinwuchs, multiple Gelenkdislokationen, Klumpfüße, sowie progressive Kyphosen und gelegentlich Skoliosen. Es können Herzanomalien und Hörstörungen vorliegen, wobei das Sehvermögen und die intellektuelle Entwicklung nicht betroffen sind (Superti-Furga & Unger, aktualisiert 2019, PMID: 21882400, GeneReviews).

CHST3, c.460C>T; p.Gln154* (homo.)

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
PVS1 (moderate)	+2	Die Veränderung führt wahrscheinlich zum Verlust (oder Trunkierung) des Proteins und entspricht somit dem bekannten Pathomechanismus für eine <i>CHST3</i> -assoziierte Erkrankung.
PM2	+2	Die Variante ist nur in sehr niedriger Frequenz in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.
PM3 (supporting)	+1	Die Variante wurde bereits <i>in trans</i> mit einer pathogenen Veränderung und/oder im homozygoten Zustand nachgewiesen.
PP4	+1	Die mit der nachgewiesenen Veränderung assoziierte Erkrankung ist mit spezifischen Symptomen des Patienten vereinbar.
ACMG/ACGS Klassifizierung: wahrscheinlich pathogen	+6	

Für jede genetische Diagnostik wird eine genetische Beratung empfohlen, insbesondere wenn eine genetische Erkrankung diagnostiziert wurde.

Befund erstellt von: XXX

Geprüft durch: XXX

Validiert durch: XXX

Mit freundlichen Grüßen

Saskia Biskup

Dr. med. Dr. rer. nat. Saskia Biskup

Fachärztin für Humangenetik

Ergänzende Informationen

Definition der Zielregionen	<p>Es wurde eine Exomsequenzierung (WES) durchgeführt. Alle Kopienzahlveränderungen ab einer Größe von ≥ 50 kb wurden in diesem Datensatz evaluiert. Ein automatisch selektiertes Set von potentiell krankheitsrelevanten Veränderungen wurde bioinformatisch definiert und zur Evaluierung ausgelistet. Kopienzahlveränderungen in Genen dieses Sets wurden auch < 50 kb berücksichtigt.</p> <p>Reported variants are limited to pathogenic, likely pathogenic, and variants of uncertain significance (ACGS temperature scale = hot)) associated with the clinical phenotype of the patient, according to current scientific understanding.</p>
Allgemeine Hinweise	<p>Varianten in nicht untersuchten Bereichen des analysierten Gens (z.B. Introns, untranslatierte Regionen (UTRs), Promotor oder Enhancer), in Bereichen mit multiplen Kopien hoher Sequenzhomologie, Repeat-Expansionen sowie Kopienzahlveränderungen einzelner Exons oder des gesamten Gens können nicht sicher erfasst und somit nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren können Mosaik mit geringem Frequenzanteil nicht sicher erfasst und somit ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund neuer Erkenntnisse oder verbessertem wissenschaftlichen Verständnis kann sich die Einschätzung von Varianten zu einem späteren Zeitpunkt verändern.</p>
Information zur Interpretation der Tabellen	<p>Erbgang: AD – autosomal dominant; AR – autosomal rezessiv; XL – X-chromosomal; mito – mitochondrial</p> <p>MAF: Die minor allele frequency gibt Auskunft über die Seltenheit einer Variante in der Bevölkerung. Für Varianten, die auf der mitochondrialen DNA kodiert sind, wird die Frequenz homoplasmatischer Träger in einer Referenzpopulation angegeben (gnomAD).</p> <p>Bewertung: Die Klassifizierung von Varianten basiert auf den Richtlinien der ACMG, der ACGS-2020v4.01 sowie der ClinGen SVI WG (Richards et al., 2015, PMID: 25741868; Ellard et al., 2020, Association for Clinical Genomic Science; https://clinicalgenome.org/working-groups/sequence-variant-interpretation/). Die Gewichtung der Kriterien bzw. deren Modifikation erfolgt nach den aktuellen Empfehlungen der ACGS in den Stärken <i>Very Strong</i> (+ 8), <i>Strong</i> (+/- 4), <i>Moderate</i> (+/- 2), sowie <i>Supporting</i> (+/- 1). Entsprechend der jeweiligen Kategorie (pathogen, benigne) und Kriteriumsstärke werden oben genannte positive oder negative Punkte vergeben (Tavtigian et al., 2020, PMID: 32720330). Varianten unklarer Signifikanz (VUS) werden nach ihrer Wahrscheinlichkeit zukünftig eine pathogene Klassifikation zu erreichen einem Temperaturgradienten folgend in <i>hot</i>, <i>warm</i>, <i>tepid</i>, <i>cool</i>, <i>cold</i> und <i>ice cold</i> VUS subkategorisiert. Die A-posteriori-Wahrscheinlichkeit nimmt in dieser Reihenfolge von 90 % bis 10 % ab (Ellard et al., 2020, Association for Clinical Genomic Science). Erreicht eine Variante die Klasse pathogen werden, nach Prüfung aller benignen Kriterien, nicht zwingend alle weiteren anwendbaren Kriterien aufgeführt.</p> <p>Die chromosomalen Positionen der im Befund aufgeführten Varianten beziehen sich auf das humane Referenzgenom hg19.</p>
Methoden	<p>Sequenzierung: Die kodierenden Bereiche sowie die angrenzenden Intronbereiche und weitere nicht kodierende, krankheitsrelevante Regionen wurden mittels in-solution-hybridization Technologie angereichert und anschließend mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung auf dem Illumina NovaSeq 6000/NovaSeq X Plus System analysiert.</p> <p>NGS basiertes CNV-Calling: CNVs (<i>copy number variations</i>) wurden auf Basis von Sequenzen, die eindeutig einer genomischen Position zugeordnet werden konnten, unter Verwendung einer intern entwickelten Methode basierend auf der Sequenzierungstiefe berechnet (nicht anwendbar auf das</p>

mitochondriale Genom). Es wurden Referenzproben verwendet, um ein Modell der erwarteten Abdeckung zu erstellen, das sowohl mögliche Abweichungen im Laborprozess als auch Variation zwischen Proben generell widerspiegelt. Das *CNV-Calling* wurde durchgeführt, indem die normalisierte Abdeckung jeder Probe und deren Abweichung von der erwarteten Abdeckung berechnet wurden. Genomische Regionen werden als Variante bezeichnet, wenn sie signifikant von der erwarteten Abdeckung abweichen. Die Bezeichnung der nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen erfolgt nach den Richtlinien der aktuellen ISCN. Kopienzahlneutrale strukturelle Veränderungen wie z.B. balancierte Translokationen, Inversionen, uniparentale Heterodisomien sowie niedrigprozentige Mosaik können mit dieser Methode nicht erkannt werden. Kopienzahlveränderungen innerhalb der pseudoautosomalen Regionen können nicht mit hoher Genauigkeit erfasst werden. Das NGS-basierte CNV-Calling erlaubt keine Aussage über den Integrationsort von Duplikationen.

Bitte beachten Sie, dass die auf *Next-Generation Sequencing* basierende Detektion von Kopienanzahlveränderungen eine geringere Sensitivität/Spezifität aufweist als beispielsweise eine MLPA. Kopienzahlneutrale strukturelle Aberrationen können mit der durchgeführten Methode nicht detektiert werden (z.B. balancierte Translokationen und balancierte Inversionen). Sämtliche befundeten CNVs wurden, wenn möglich, mit Hilfe einer zweiten Methode validiert. Kopienzahlveränderungen unterhalb einer Größe von 50 kb wurden nur für ein Set automatisch priorisierter Gene mit potentiell krankheitsrelevanten Varianten evaluiert. Im Rahmen des Befundes nicht berichtete CNVs garantieren letztlich nicht das generelle Fehlen von CNVs.

Bioinformatik: Die Sequenzierdaten wurden mit Illumina bcl2fastq2 aufbereitet. Mitsequenzierte Adaptersequenzen wurden mit Skewer entfernt und die so erhaltenen Sequenzen durch den Burrows Wheeler Aligner gegen das humane Referenzgenom (hg19) aligniert. Sequenzen, die nicht eindeutig einer genomischen Position zugeordnet werden konnten, wurden entfernt, ebenso Sequenzduplikate, die wahrscheinlich auf die Amplifikation zurückzuführen sind. Anhand der verbleibenden Sequenzen hoher Qualität wurden Sequenzvarianten (Einzelnukleotidaustausche und kurze Insertionen/Deletionen) bestimmt. Diese wurden mit verschiedenen internen und externen Datenbanken annotiert.

Genetische Datenauswertung: Die Klassifizierung von Varianten basiert auf den ACMG/ACGS-2020v4.01 Richtlinien (Richards et al., 2015, PMID: 25741868, Ellard et al., 2020, Association for Clinical Genomic Science).

Bewertet werden nur Varianten (SNVs/Small Indels) mit einer Populationsfrequenz (MAF) < 1,5 % innerhalb der kodierenden Regionen sowie in flankierenden intronischen Regionen (± 8 bp). Bekannte krankheitsauslösende Varianten (laut HGMD) werden in flankierenden Regionen bis zu ± 30 bp und bis zu einer MAF < 5 % bewertet. Populationsfrequenzen werden anhand öffentlicher Datenbanken (z.B. gnomAD) sowie einer internen Datenbank ermittelt. Sämtliche für den gegebenen Fall relevanten und nach obigem Vorgehen identifizierten CNVs werden manuell evaluiert.

Varianten aus dem Exomdatensatz wurden automatisch priorisiert und ein vordefiniertes Set anhand der phänotypischen Angaben zum Patienten ausgewertet. Daher wurden einzelne heterozygote Veränderungen in Genen die mit autosomal rezessiv vererbten Erkrankungen assoziiert sind ggf. nicht berichtet.

Im vorliegenden Fall wurde mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung eine Sequenzierentiefe von min. 30X für 97,75 % der kodierenden Bereiche erreicht. **Für die Beurteilung der Varianten wurden die klinischen Informationen herangezogen, die uns zum Zeitpunkt der Auswertung vorlagen.** Befundet werden nur Varianten, die entsprechend der aktuellen Datenlage nicht als benigne oder wahrscheinlich benigne eingestuft wurden. Synonyme Varianten in mitochondrial kodierten Genen werden als benigne bewertet. Zur *in silico*-Vorhersage wurden die Programme MetaLR (Dong et al., 2015, PMID: 25552646), PrimateAI (Sundaram et al., 2018, PMID: 30038395) sowie SpliceAI (Jaganathan et al., 2019, PMID: 30661751) verwendet. In Einzelfällen kann diese Prädiktion durch zusätzliche *in silico*-Vorhersagen ergänzt werden.

Die Nomenklatur gefundener Varianten erfolgt nach den Richtlinien der HGVS, jedoch ohne Berücksichtigung der allelischen Zuordnung einzelner Varianten, da diese meist nicht bekannt ist.

Die Probe hat die bei uns geltenden Qualitätskriterien nach Probeneingang und den jeweiligen analytischen Bearbeitungsschritten im Labor eingehalten.

Bei dem oben beschriebenen Verfahren handelt es sich um einen inhouse entwickelten und validierten Test (Laboratory developed test; LDT).

Bezüglich Mitteilung, Weitergabe und wissenschaftlicher Verwendung dieses Befundes gelten die Bestimmungen des GenDG.