

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

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

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

Indikation V.a. hereditäre spastische Paraplegie

Auftrag Panel-Diagnostik: Hereditäre spastische Spinalparalyse (HSP) (Exomanreicherung)

Ergebnis: Auffälliger Befund

- **Nachweis von zwei pathogenen Varianten im Gen *SPG7*, die unter der Voraussetzung einer Compound-Heterozygotie gemeinsam ursächlich für eine spastische Paraplegie Typ 7 bei Ihrem Patienten sind.**
- Es wurden keine genomischen Zugewinne oder Verluste gefunden, die nach derzeitigem Kenntnisstand für die Erkrankung Ihres Patienten ursächlich sind.

Gen	Variante	Zygotie	Erbgang	MAF (%)	Bewertung
<i>SPG7</i>	c.1529C>T; p.Ala510Val chr16:89613145 C>T (hg19)	het.	AD, AR, digenisch	0,54	pathogen
<i>SPG7</i>	c.1053dup; p.Gly352Argfs*44 chr16:89598370 G>GC (hg19)	het.	AD, AR, digenisch	0,05	pathogen

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

Empfehlung

Wir empfehlen eine Versorgung entsprechend dem aktuellen Protokoll für spastische Paraplegie Typ 7 (Casari und Marconi, aktualisiert 2018, PMID: 20301286, GeneReviews).

Um die Eltern des Patienten auf Anlageträgerschaft zu untersuchen und die mutmaßliche Compound-Heterozygotie der Varianten im Gen *SPG7* beim Patienten zu bestätigen sowie die Wiederholungswahrscheinlichkeit für eine weitere Familienplanung abschätzen zu können, empfehlen wir die Analyse der Eltern des Patienten hinsichtlich dieser Veränderungen.

Eine Testung adulter asymptomatischer Familienangehöriger hinsichtlich der nachgewiesenen Veränderungen c.1529C>T; p.Ala510Val und c.1053dup; p.Gly352Argfs*44 im Gen *SPG7* kann erst nach humangenetischer Beratung erfolgen.

Humangenetische Relevanz

Der Patient ist heterozygoter Träger von pathogenen Varianten im Gen *SPG7*, die für die Familienplanung und auch für Verwandte relevant sein können.

Wir weisen darauf hin, dass formalgenetisch jede Variante mit einer Wahrscheinlichkeit von jeweils 50 % weitervererbt werden kann.

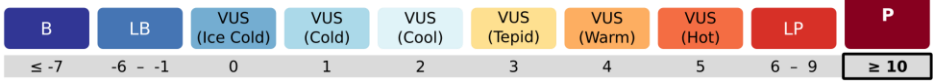
Klinische Information und Varianten-Interpretation

SPG7, NM_003119.4

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
607259	Spastische Paraplegie Typ 7 (SPG7)	AR, AD?
PMID: 23065789, PMID: 32548275	Isolierte Optikusatrophie	AD
PMID: 30252181	Syndromaler Parkinsonismus und Optikusatrophie	digenisch

Das Gen **SPG7** kodiert das Protein Paraplegin, welches Teil eines ATP-abhängigen proteolytischen Komplexes ist, der fehlgefaltete Proteine abbaut und die Ribosomenanordnung reguliert. Pathogene Veränderungen können eine spastische Paraplegie Typ 7 (SPG7) verursachen. Die Erkrankung beginnt typischerweise im mittleren Erwachsenenalter, kann sich in seltenen Fällen aber auch im Kindes- oder späten Erwachsenenalter manifestieren (Casari und Marconi, aktualisiert 2018, PMID: 20301286, GeneReviews). Sie ist durch eine progressive Schwäche und Spastik der unteren Extremitäten in Folge der Degeneration kortikospinaler Axone charakterisiert. Hinsichtlich der Symptomatik besteht auch innerhalb von Familien eine phänotypische Variabilität. Zusätzliche Manifestationen umfassen sowohl eine Skoliose und Hohlfüße als auch okuläre Symptome wie eine Optikusatrophie, Nystagmus und Strabismus. Charakteristischerweise folgt eine SPG7 einem autosomal rezessiven Erbgang. Es wird allerdings vermutet, dass manche SPG7-Varianten einen dominant-negativen Effekt zeigen und möglicherweise in einer milderer Ausprägung der Erkrankung mit späterem Krankheitsbeginn resultieren (Klebe et al., 2012, PMID: 23065789; Sánchez-Ferrero et al., 2013, PMID: 22571692, Yoon et al., 2013, PMID: 23733235, Pfeffer et al., 2014, PMID: 24727571). Ferner gibt es Hinweise darauf, dass ein syndromaler Parkinsonismus mit einer Optikusatrophie auch über einen digenischen Erbgang durch pathogene Varianten in den Genen *SPG7* und *AFG3L2* verursacht werden kann (Magri et al., 2018, PMID: 30252181).

SPG7, c.1529C>T; p.Ala510Val (het.), ClinVar ID: 42016

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
PS3 (supporting)	+1	Funktionelle Studien stützen die Pathogenität der Variante.
PM2	+2	Die Variante ist nur in sehr niedriger Frequenz in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.
PM3 (very strong)	+8	Die Variante wurde bereits <i>in trans</i> mit einer pathogenen Veränderung und/oder im homozygoten Zustand nachgewiesen.
PP1	+1	Kosegregation der Variante mit der Erkrankung bei mehreren betroffenen Familienmitgliedern.
ACMG/ACGS Klassifizierung: pathogen	+12	

SPG7, c.1053dup; p.Gly352Argfs*44 (het.), ClinVar ID: 411675

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
PVS1	+8	Die Veränderung führt wahrscheinlich zum Verlust (oder Trunkierung) des Proteins und entspricht somit dem bekannten Pathomechanismus für eine <i>SPG7</i> -assoziierte Erkrankung.
PM2	+2	Die Variante ist nur in sehr niedriger Frequenz in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.
PM3	+2	Die Variante wurde bereits <i>in trans</i> mit einer pathogenen Veränderung und/oder im homozygoten Zustand nachgewiesen.
ACMG/ACGS Klassifizierung: pathogen	+12	

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

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

Fachärztin für Humangenetik

Ergänzende Informationen

Untersuchte Regionen Für den oben genannten Patienten wurde eine Exom-Sequenzierung durchgeführt. Die Analyse wurde auf die folgenden Regionen beschränkt:

ABCD1, ABHD16A, AFG3L2, AIMP1, ALDH18A1, ALS2, AP4B1, AP4E1, AP4M1, AP4S1, AP5Z1, ARG1, ATL1, ATP13A2, B4GALNT1, BSCL2, CAPN1, CYP2U1, CYP7B1, DARS1, DDHD1, DDHD2, DSTYK, ENTPD1, ERLIN1, ERLIN2, FA2H, FARS2, GALC, GBA2, GCH1, HACE1, HPDL, HSPD1, KCNA2, KDM5C, KIDINS220, KIF1A, KIF1C, KIF5A, KLC2, L1CAM, MAG, MTRFR, NIPA1, NKX6-2, NT5C2, PCYT2, PLP1, PNPLA6, REEP1, RNF170, RTN2, SACS, SELENOI, SLC16A2, SLC33A1, SPART, SPAST, SPG11, SPG21, SPG7, TECPR2, TFG, TNR, TUBB4A, UBAP1, UCHL1, WASHC5, WDR45B, ZFYVE26 (Hereditäre spastische Spinalparalyse (HSP))

Allgemeine Hinweise Varianten in nicht untersuchten Bereichen der analysierten Gene (z.B. Introns, untranslatierte Regionen (UTRs), Promotor oder Enhancer), in Bereichen mit multiplen Kopien hoher Sequenzhomologie, Repeat-Expansionen sowie Kopienzahlveränderungen einzelner Exons oder eines 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.

Information zur Interpretation der Tabellen

Erbgang: AD – autosomal dominant; AR – autosomal rezessiv; XL – X-chromosomal; mito – mitochondrial

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).

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 *Very Strong* (+ 8), *Strong* (+/- 4), *Moderate* (+/- 2), sowie *Supporting* (+/- 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 *hot*, *warm*, *tepid*, *cool*, *cold* und *ice cold* 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.

Die chromosomalen Positionen der im Befund aufgeführten Varianten beziehen sich auf das humane Referenzgenom hg19.

Methoden

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.

NGS basiertes CNV-Calling: CNVs (*copy number variations*) 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 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. 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. Unsere Qualitätskriterien erfordern bei Nichterreichen einer informativen Sequenzieriefe mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung eine lokale Re-Sequenzierung mittels herkömmlicher Sanger-Technologie. Sämtliche für den gegebenen Fall relevanten und nach obigem Vorgehen identifizierten CNVs werden manuell evaluiert. Potenziell pathogene Ergebnisse werden ggf. mit einer zweiten diagnostischen Methode, wie beispielsweise MLPA, validiert.

Im vorliegenden Fall wurde mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung eine Sequenzieriefe von min. 30X für 97,76 % 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.