

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 Periodisches Fieber

Auftrag Panel-Diagnostik: Periodisches Fiebersyndrom mit/ohne Urtikaria (Exomanreicherung)

Ergebnis: Auffälliger Befund

- **Nachweis einer pathogenen Variante im Gen *MEFV*, die ursächlich für ein familiäres Mittelmeerfieber bei Ihrem Patienten ist.**
- 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>MEFV</i>	c.2080A>G; p.Met694Val chr16:3293407 T>C (hg19)	het.	AD, AR	0,1	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 familiäres Mittelmeerfieber. Eine Colchicin-Behandlung wird bei akuten Fieberepisoden sowie zur Vorbeugung einer Amyloidose als mögliche schwerwiegende langfristige Komplikation des FMF eingesetzt (u. a. Shohat, aktualisiert 2016, PMID: 20301405, GeneReviews).

Es besteht die Möglichkeit, weitere betroffene Familienangehörige hinsichtlich der Veränderung im Gen *MEFV* zu untersuchen.

Humangenetische Relevanz

Der Patient ist heterozygoter Träger einer pathogenen Variante im Gen *MEFV*, die für die Familienplanung und auch für Verwandte relevant sein kann.

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

Klinische Information und Varianten-Interpretation

MEFV, NM_000243.3

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
249100	Klassisches, autosomal rezessives familiäres Mittelmeerfieber	AR
134610	Autosomal dominantes familiäres Mittelmeerfieber	AD
608068	Dermatose, akute febrile neutrophile	AD

Das Gen **MEFV** kodiert für Pyrin, das als wichtiger Mediator bei inflammatorischen Prozessen fungiert. Pathogene Varianten im **MEFV**-Gen können das familiäre Mittelmeerfieber (FMF) verursachen, eine in einigen Populationen häufige autoinflammatorische Erkrankung, die durch rezidivierende Episoden von Fieber und Serositis mit Schmerzen im Abdomen, im Thorax, in den Gelenken und Muskeln gekennzeichnet ist (ORPHA:342). Für das FMF wird ein autosomal rezessiver Erbgang angenommen, jedoch kann bei ca. 20-25 % der FMF-Patienten nur eine einzelne pathogene Veränderung im **MEFV**-Gen festgestellt werden. Ein autosomal dominanter Erbgang ist allerdings nur für wenige pathogene Veränderungen in **MEFV** gesichert (p.Thr577Asn, p.Tyr688*, p.Met694del und p.Met694Val), wobei für die meisten dieser Varianten aufgrund ihrer hohen Allelfrequenz in Hinsicht auf einen dominanten Erbgang eine reduzierte Penetranz bzw. variable Expressivität angenommen werden muss (u. a. Shohat, aktualisiert 2016, PMID: 20301405, GeneReviews). Diese epidemiologischen Beobachtungen deuten darauf hin, dass weitere Faktoren wie eine zusätzliche genetische Prädisposition und ein Dosage-Effekt, epigenetische Mechanismen oder Umwelteinflüsse an der Pathogenese des FMF beteiligt sind (u. a. Gao et al., 2016, PMID: 27482109; Gangemi et al., 2018, PMID: 29393966; Jamilloux et al., 2018, PMID: 29040788; Magnotti et al., 2019, PMID: 31589380; Boursier et al., 2019, PMID: 30928144).

MEFV, c.2080A>G; p.Met694Val (het.), ClinVar ID: 2538

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
PS3 (moderate)	+2	Funktionelle Studien stützen die Pathogenität der Variante. Chae et al., 2006, PMID: 16785446; Sugiyama et al., 2014, PMID: 24318677
PS4	+4	Die Prävalenz der Variante bei betroffenen Personen ist im Vergleich zur Prävalenz bei Kontrollpersonen deutlich erhöht. Yilmaz et al., 2001, PMID: 11464248; Talaat et al., 2012, PMID: 23206577; Neocleous et al., 2015, PMID: 25393764
PM1	+2	Die Variante befindet sich innerhalb einer kritischen Region des Gens MEFV .
PM5	+2	Die Variante führt zum Austausch einer Aminosäure, für die bereits andere Austausche (p.Met694Ile, p.Met694Lys) als pathogen beschrieben wurden. Bernot et al., 1998, PMID: 9668175; Mansour et al., 2001, PMID: 11175300; Yesilada et al., 2012, PMID: 23031807
PP4	+1	Die mit der nachgewiesenen Veränderung assoziierte Erkrankung ist mit spezifischen Symptomen des Patienten vereinbar.
BP1	-1	Die Variante wird von den verwendeten <i>in silico</i> Vorhersageprogrammen als benigne eingestuft.

ACMG/ACGS Klassifizierung:	Punkte	Klassifizierung
pathogen	+10	P

ACMG/ACGS Klassifizierung:	Punkte	Klassifizierung
pathogen	+10	P

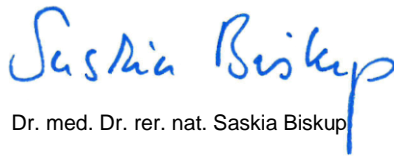
Für jede genetische Diagnostik wird eine genetische Beratung empfohlen, insbesondere wenn eine genetische Erkrankung diagnostiziert wurde.

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:

F12, HTR1A, MEFV, MVK, NLRC4, NLRP12, NLRP3, NTRK1, OTULIN, PLOG2, RIPK1, SLC29A3, TNFRSF1A, WDR1 (Periodisches Fiebersyndrom mit/ohne Urtikaria)

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 Mosaikie 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 Sequenziertiefe 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 Sequenziertiefe von min. 30X für 98,01 % 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.