CeGaT GmbH | Paul-Ehrlich-Str. 23 | D-72076 Tübingen | Germany

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

Patient	Fötus von XX, XXX
ID #	
Mutter	XXX, XX
ID #	(*TT.MM.JJJJ)
Vater	XXX, XX
ID #	(*TT.MM.JJJJ)
Patienten-ID	#
Probeneingang	xxx
Material	EDTA-Blut
Befunddatum	xxx
Befund-ID	R#

Molekulargenetischer Befund – Fötus von XX, XXX

Indikation Zystische Hygroma colli

Auftrag Trio-Exom-Analyse

Ergebnis: Auffälliger Befund

- **Nachweis einer wahrscheinlich pathogenen Variante im Gen *KRAS* im untersuchten fötalen Gewebe, die vereinbar mit einem Noonan-Syndrom 3 bei dem Fötus ist.**
- Es wurden keine genomischen Zugewinne oder Verluste gefunden, die nach derzeitigem Kenntnisstand für den Phänotyp des Fötus ursächlich sind.
- Die Sequenzierdaten ergaben keinen Hinweis auf eine maternale DNA Kontamination der fötalen Probe.

Gen	Variante	Zygotie			Erbgang	MAF (%)	Bewertung
		Index	Mutter	Vater			
KRAS	**c.149C>T; p.Thr50Ile** **chr12:25380309 G>A (hg19)**	**het.**	**-**	**-**	**AD**	**0,05**	**wahrscheinlich pathogen**

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

Empfehlung

Wir empfehlen eine weiterführende klinische Diagnostik und gegebenenfalls nachgeburtlich eine Versorgung entsprechend dem aktuellen Protokoll für das *KRAS*-assoziierte Noonan-Syndrom (Roberts, aktualisiert 2022, PMID: 20301303, GeneReviews).

Humangenetische Relevanz

Der Fötus ist heterozygot für eine höchstwahrscheinlich *de novo* entstandene wahrscheinlich pathogene Variante im Gen *KRAS*.

Die Veränderung im Gen *KRAS* ist beim Index höchstwahrscheinlich *de novo* entstanden. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass bei einem Elternteil ein Keimbahnmosaik vorliegt, das anhand von DNA aus Leukozyten nicht nachgewiesen werden kann. Bei Vorliegen eines Keimbahnmosaiks besteht statistisch gesehen eine geringe Wiederholungswahrscheinlichkeit ein weiteres Kind mit dieser wahrscheinlich pathogenen Variante zu bekommen. Die Abschätzung der Wiederholungswahrscheinlichkeit ist aufgrund der wenigen zur Verfügung stehenden wissenschaftlichen Daten jedoch schwer vorzunehmen (Basiswissen Humangenetik - Schaaf, Zschocke 2018).

Klinische Information und Varianten-Interpretation

***KRAS*, NM_004985.5**

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
615278	Kardio-fazio-kutanes Syndrom 2 (CFC2)	AD
609942	Noonan-Syndrom 3 (NS3)	AD
607785	Juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) verursacht durch somatische oder Keimbahnmutationen in *KRAS*	AD
614470	RAS-assoziierte autoimmun-lymphoproliferative Erkrankung (RALD)	AD
600268	Okulo-ektodermales Syndrom, somatisch	AD
163200	Schimmelpenning-Feuerstein-Mims-Syndrom, somatisch	AD

Das Gen ***KRAS*** kodiert für ein GDP/GTP-Bindeprotein, das als intrazelluläres Signalprotein eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Signaltransduktionskaskaden spielt. Während das unveränderte Protein in seiner Funktion essenziell für normale zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung und Alterung ist, agiert verändertes KRAS als Onkogen bei vielen humanen proliferativen Prozessen (Kranenburg, 2005, PMID: 16269215).

***KRAS*, c.149C>T; p.Thr50Ile (het.), ClinVar ID:**

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
PS2	+4	Die Variante wurde bereits *de novo* bei einem Patienten mit der Erkrankung ohne positive Familienanamnese detektiert. Die Anzahl der *de novo* Fälle und weitere Faktoren wie bestätigte Elternschaft beeinflussen die Evidenzstärke.
PM2	+2	Die Variante ist nur in sehr niedriger Frequenz in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.
PP2	+1	Für das Gen *KRAS* wurden bisher weniger Missense-Veränderungen in der allgemeinen Bevölkerung nachgewiesen als erwartet, was auf eine Intoleranz des Gens gegenüber Missense-Veränderungen hindeutet.
ACMG/ACGS Klassifizierung: wahrscheinlich pathogen	+7	B (≤ -7) | LB (-6 – -1) | VUS (Ice Cold) (0) | VUS (Cold) (1) | VUS (Cool) (2) | VUS (Tepid) (3) | VUS (Warm) (4) | VUS (Hot) (5) | **LP (6 – 9)** | P (≥ 10)

Befunde einer Pränataldiagnostik müssen gemäß GenDG im Rahmen einer genetischen Beratung mitgeteilt werden. Für Rückfragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.

Befund erstellt von: XXX

Geprüft durch: XXX

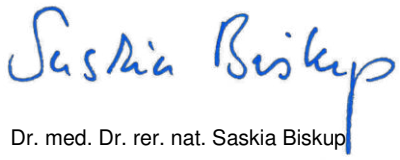
CeGaT GmbH | Paul-Ehrlich-Str. 23 | 72076 Tübingen
Tel: 07071 565 44 55 | Fax: 07071 565 44 56 | info@cegat.de | www.cegat.de
Amtsgericht Stuttgart - HRB 729958 | Ust-IdNr: DE265504070
Volksbank in der Region eG | IBAN: DE73 6039 1310 0543 4480 02 | SWIFT / BIC: GENODES1VBH
Geschäftsführer: Dr. Dr. Saskia Biskup, Dr. Dirk Biskup, Dr. Detlef Schumann

CAP ACCREDITED COLLEGE of AMERICAN PATHOLOGISTS
CLIA CERTIFIED ID: 99D2130225
Akkreditiert durch das College of American Pathologists

DAkkS Deutsche Akkreditierungsstelle D-ML-13206-01-00
Akkreditiert nach DIN EN ISO 15189:2014

Validiert durch: XXX

Mit freundlichen Grüßen



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

Fachärztin für Humangenetik

Ergänzende Informationen

Untersuchte Regionen

Es wurde eine Exom-Sequenzierung beim Fötus und den Eltern durchgeführt.

Befundet werden nur Varianten, die entsprechend der aktuellen Datenlage als pathogen oder wahrscheinlich pathogen eingestuft werden. Folgende (Differential-)Diagnosen wurden ebenfalls im Rahmen der Auswertung unserer Sequenzierdaten berücksichtigt: Erhöhte pränatale Nackentransparenz; Erhöhte pränatale Nackentransparenz; Mitochondriales Genom (mtDNA)

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 können nicht sicher erfasst und somit nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren können Mosaike 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. Uniparentale Disomien

werden aus dem familiären Trio-Datensatz errechnet. Die Bezeichnung der nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen erfolgt nach den Richtlinien der aktuellen ISCN. Kopienzahlneutrale strukturelle Veränderungen wie z.B. balancierte Translokationen, Inversionen sowie niedrigprozentige Mosaike 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, https://www.acgs.uk.com/quality/best-practice-guidelines/).

Bewertet werden nur Varianten (SNVs/Small Indels) mit einer Populationsfrequenz (MAF) < 1 % 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. X-chromosomale Varianten, die in öffentlichen Datenbanken mindestens 50 Mal hemizygot gelistet sind und laut HGMD-Datenbank nicht als krankheitsverursachend gelten, werden von der Analyse ausgeschlossen. 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.

Trio-Analyse: Varianten, die beim Fötus und den Eltern gefunden wurden, wurden verglichen und auf folgende Fälle gefiltert: *de novo*, compound-heterozygote oder homozygote Varianten beim Fötus bei heterozygoten Eltern und ggf. hemizygote Varianten beim Fötus bei heterozygoter Mutter für Varianten auf dem X-Chromosom.

Varianten, die im Rahmen einer Einzelexom-Auswertung beim Fötus identifiziert wurden, wurden unter Berücksichtigung des angegebenen Phänotyps beurteilt. Daher wurden einzelne heterozygote Varianten in Genen, die mit einem autosomal rezessiven Erbgang assoziiert sind, gegebenenfalls nicht berichtet.

Für 95,96 % (Index), 97,6 % (Mutter) und 97,53 % (Vater) der untersuchten Regionen wurde mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung eine Sequenziertiefe von min. 30X 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, wahrscheinlich benigne oder Varianten unklarer Signifikanz 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.

CeGaT GmbH | Paul-Ehrlich-Str. 23 | 72076 Tübingen
Tel: 07071 565 44 55 | Fax: 07071 565 44 56 | info@cegat.de | www.cegat.de
Amtsgericht Stuttgart - HRB 729958 | Ust-IdNr: DE265504070
Volksbank in der Region eG | IBAN: DE73 6039 1310 0543 4480 02 | SWIFT / BIC: GENODES1VBH
Geschäftsführer: Dr. Dr. Saskia Biskup, Dr. Dirk Biskup, Dr. Detlef Schumann

CAP ACCREDITED
COLLEGE of AMERICAN PATHOLOGISTS
CLIA CERTIFIED ID: 99D2130225
Akkreditiert durch das College of American Pathologists

DAkkS Deutsche Akkreditierungsstelle D-ML-13206-01-00
Akkreditiert nach DIN EN ISO 15189:2014