

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

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

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

Indikation Kleinwuchs (<0,4 Perzentile). Positive Familienanamnese

Auftrag Trio-Exom-Analyse

Ergebnis: Auffälliger Befund

- **Nachweis einer pathogenen Variante im Gen *FBN1*, die ursächlich für den Kleinwuchs Ihrer Patientin ist.**
- Es wurden keine genomischen Zugewinne oder Verluste gefunden, die nach derzeitigem Kenntnisstand für die Erkrankung Ihrer Patientin ursächlich sind.

Gen	Variante	Zygotie			Erbgang	MAF (%)	Bewertung
		Index	Mutter	Vater			
<i>FBN1</i>	c.5183C>T; p.Ala1728Val chr15:48755320 G>A (hg19)	het.	-	het.	AD	-	pathogen

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

Empfehlung

Wir empfehlen eine weiterführende klinische Diagnostik und Versorgung entsprechend dem aktuellen Protokoll für *FBN1*-assoziierte Erkrankungen (Marzin and Cormier-Daire, aktualisiert 2018, PMID: 20301776, GeneReviews; Marzin et al., 2021, PMID: 33082559).

Es besteht die Möglichkeit, weitere betroffene Familienangehörige hinsichtlich der Veränderung im Gen *FBN1* zu untersuchen.

Humangenetische Relevanz

Die Patientin ist heterozygote Trägerin einer pathogenen Variante im Gen *FBN1*, 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

FBN1, NM_000138.5

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
154700	Marfan-Syndrom (MFS)	AD
616914	Marfan-Lipodystrophie-Syndrom (MFLS)	AD
102370	Akromikrische Dysplasie (ACMICD)	AD
614185	Geleophysischer Kleinwuchs (GPHYSD2)	AD
608328	Weill-Marchesani-Syndrom 2 (WMS2)	AD
129600	Familiäre ectopia lentis (ECTOL1)	AD
184900	Stiff-skin-Syndrom (SSKS)	AD
604308	? MASS-Syndrom	AD
PMID: 20082464	? Familiäres thorakales Aortenaneurysma	AD

Das Gen **FBN1** kodiert das Protein Fibrillin, einen wesentlichen Bestandteil von extrazellulären Mikrofibrillen in elastischen und nicht-elastischen Bindegeweben im gesamten Körper (OMIM *134797). Ein Marfan-Syndrom kann sowohl durch Varianten mit einem dominant-negativen Effekt als auch durch eine Haploinsuffizienz verursacht werden (Dietz, aktualisiert 2022, PMID: 20301510, GeneReviews). Typische pathogene Missense-Varianten im **FBN1**-Gen sind Austausch, die die Aminosäure Cystein innerhalb einer der 47 "epidermal growth factor (EGF)-like"-Domänen betreffen und so die Ausbildung von Disulfidbrücken verhindern (Schrijver et al., 1999; PMID: 10486319). Für das Marfan-Syndrom ist von einer hohen Penetranz von pathogenen **FBN1**-Varianten, aber auch von einem (auch intrafamiliär) sehr variablen Krankheitsbild auszugehen (Dietz, aktualisiert 2022, PMID: 20301510, GeneReviews). Pathogene trunkierende Veränderungen überwiegend im vorletzten Exon von **FBN1** sind als ursächlich für ein Marfan-Lipodystrophie-Syndrom beschrieben. Dieses Syndrom ist durch unvollständige Symptome des Marfan-Syndroms sowie kongenitale Stoffwechselstörung-unabhängige Lipodystrophie und progeroides Erscheinungsbild mit typischen Gesichtszügen gekennzeichnet (u.a. Takenouchi et al., 2013, PMID: 24039054; Passarge et al., 2016, PMID: 26860060; Lin et al., 2020, PMID: 31774634; OMIM: #616914).

FBN1, c.5183C>T; p.Ala1728Val (het.), ClinVar ID: 1528902

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
PS1	+4	Die Variante führt zu einem Aminosäure-Austausch, der bereits als pathogen beschrieben wurde. Marzin et al., 2021, PMID: 33082559; Le Goff et al., 2011, PMID: 21683322
PS2	+4	Die Variante wurde bereits <i>de novo</i> bei einem Patienten mit der Erkrankung ohne positive Familienanamnese detektiert. Die Anzahl der <i>de novo</i> Fälle und weitere Faktoren wie bestätigte Elternschaft beeinflussen die Evidenzstärke. Le Goff et al., 2011, PMID: 21683322
PS4 (moderate)	+2	Die Prävalenz der Variante bei betroffenen Personen ist im Vergleich zur Prävalenz bei Kontrollpersonen deutlich erhöht.
PM2	+2	Die Variante ist nicht in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.
PP1	+1	Kosegregation der Variante mit der Erkrankung bei mehreren betroffenen Familienmitgliedern. de Bruin et al., 2016, PMID: 27245183
PP2	+1	Für das Gen FBN1 wurden bisher weniger Missense-Veränderungen in der allgemeinen Bevölkerung nachgewiesen als erwartet, was auf eine Intoleranz des Gens gegenüber Missense-Veränderungen hindeutet.
PP3	+1	Die Variante wird von den verwendeten <i>in silico</i> Vorhersageprogrammen als pathogen eingestuft.

PP4	+1	Die mit der nachgewiesenen Veränderung assoziierte Erkrankung ist mit spezifischen Symptomen des Patienten vereinbar.
-----	----	---

ACMG/ACGS Klassifizierung: pathogen	+16	B	LB	VUS (Ice Cold)	VUS (Cold)	VUS (Cool)	VUS (Tepid)	VUS (Warm)	VUS (Hot)	LP	P
		≤ -7	-6 - -1	0	1	2	3	4	5	6 - 9	≥ 10

Befund erstellt von: XXX

Geprüft durch: XXX

Validiert durch: XXX

Mit freundlichen Grüßen

Saskia Biskup

Saskia Biskup

Fachärztin für Humangenetik

Ergänzende Informationen

Untersuchte Regionen	Es wurde eine Exom-Sequenzierung bei allen drei aufgeführten Personen durchgeführt.
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 und Repeat-Expansionen 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	<p>Erbgang: AD – autosomal dominant; AR – autosomal rezessiv; XL – X-chromosomal; mito – mitochondrial</p> <p>MAF: Die <i>minor allele frequency</i> 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	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. Balancierte Translokationen, uniparentale Disomien, sowie niedrigprozentige Mosaiken können mit dieser Methode nicht erkannt werden. Regionen auf dem Y-Chromosom sowie die 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 Sequenzierungstiefe 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 Indexpatienten und den Eltern gefunden wurden, wurden verglichen und auf folgende Fälle gefiltert: *de novo*, compound-heterozygote oder homozygote Varianten des Indexpatienten bei heterozygoten Eltern, und hemizygoten Varianten des Patienten bei heterozygoter Mutter für Varianten auf dem X-Chromosom.

Varianten, die im Rahmen einer Einzelexom-Auswertung beim Indexpatienten 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 97,9 % (Index), 97,86 % (Mutter) und 97,98 % (Vater) der untersuchten Regionen wurde mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung eine Sequenzierungstiefe 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 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.