Zentrum für Humangenetik Tübingen

Zentrum für Humangenetik Tübingen | Paul-Ehrlich-Str. 23 | D-72076 Tübingen

Frau
Dr. med. Jane Doe
Paul-Ehrlich-Str. 23
72076 Tübingen

Patient	Roe, Richard (*TT.MM.JJJJ)
Geschlecht	männlich
Patienten-ID	#
Probeneingang	TT.MM.JJJJ
Material	EDTA-Blut
Befunddatum	TT.MM.JJJJ

Befund molekulargenetische Diagnostik – Roe, Richard (*TT.MM.JJJJ)

Indikation V. a. hereditärer GIST, Patient selbst betroffen

Auftrag Molekulargenetische Diagnostik: *KIT*, *NF1*, *PDGFRA*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* und *SDHD* (Exomanreicherung)

Sehr geehrte Frau Dr. Doe,

vielen Dank für die Anforderung einer molekulargenetischen Diagnostik.

ERGEBNIS

- **Nachweis einer pathogenen Variante im Gen *SDHB*, die vereinbar mit dem vorliegenden GIST bei Ihrem Patienten ist.**
- Es wurden keine genomischen Zugewinne oder Verluste gefunden, die nach derzeitigem Kenntnisstand für einen hereditären GIST ursächlich sind.

Gen	Variante	Zygotie	Erbgang	MAF (%)	Bewertung
SDHB	c.689G>A; p.Arg230His	het.	AD, AR	< 0,01	pathogen

Informationen zur Interpretation der Tabelle:
AD: Einzelne (heterozygote) Varianten in einem Gen können nur dann allein ursächlich für einen Phänotyp sein, wenn die assoziierte Erkrankung dem **autosomal dominanten** Erbgang folgt.
AR: Einzelne (heterozygote) Varianten in einem Gen können nicht allein ursächlich für einen Phänotyp sein, wenn die assoziierte Erkrankung dem **autosomal rezessiven** Erbgang folgt. Um ursächlich für den Phänotyp zu sein, sind im selben Gen mindestens zwei Varianten auf unterschiedlichen Allelen notwendig.
XL: X-chromosomaler Erbgang
mitochondrial: Gen auf der mitochondrialen DNA kodiert, Angabe des Heteroplasmiegrades (heteropl. oder homopl.), der Frequenz sowie der Readanzahl (Reads der Variante/alle Reads).
MAF: Die ***minor allele frequency*** gibt Auskunft über die Seltenheit einer Variante in der Bevölkerung. Tendenziell gilt, je seltener eine Variante auftritt, desto wahrscheinlicher ist sie pathogen und umgekehrt. Hierbei müssen die Prävalenz und der Erbgang der jeweiligen Erkrankung berücksichtigt werden. Für Varianten, die auf der mitochondrialen DNA kodiert sind, wird in der MAF-Spalte die Frequenz homoplasmatischer Träger in einer Referenzpopulation angegeben (gnomAD).
Bewertung: Diese bezieht sich lediglich auf die mögliche Pathogenität einer Variante, sagt aber nicht notwendigerweise etwas über die Ursächlichkeit genau dieser Variante für den Phänotyp des Untersuchten aus. Die Einteilung erfolgt in die Kategorien pathogen, wahrscheinlich pathogen und unklare Signifikanz, je nach Bewertung aufgrund aktueller Datenlage und verschiedener Kriterien. **Mit unklarer Signifikanz werden alle Varianten klassifiziert, deren mögliche Pathogenität weder mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen noch ausgeschlossen werden kann.**

Zentrum für Humangenetik Tübingen | Paul-Ehrlich-Str. 23 | 72076 Tübingen
Dr. med. Dr. rer. nat. Saskia Biskup | Fachärztin für Humangenetik
Tel: 07071 565 44 00 | Fax: 07071 565 44 22 | info@humangenetik-tuebingen.de | www.humangenetik-tuebingen.de
VR Bank Tübingen eG | IBAN: DE22 6406 1854 0602 6410 04 | SWIFT / BIC: GENODES1STW

DAkkS Deutsche Akkreditierungsstelle D-ML-21320-01-00
Akkreditiert nach DIN EN ISO 15189:2014

BEURTEILUNG

***SDHB*, c.689G>A; p.Arg230His (het.), NM_003000.3, rs587782604**

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
606764	Gastrointestinale Stromatumoren (GIST)	AD
606864	Paragangliome und gastrointestinale Stromatumoren	AD
115310	Paragangliome Typ 4 (PGL4)	AD
171300	Phäochromozytom	AD
619224	Mitochondriale Komplex-II-Defizienz, nukleärer Typ 4 (MC2DN4)	AR

Das Gen ***SDHB*** kodiert für eine Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase, welche am Citrat-Zyklus beteiligt ist. SDHB agiert u.a. als Tumor-Suppressor und pathogene Keimbahnveränderungen im *SDHB*-Gen gehen mit einer Prädisposition für die Entwicklung von Phäochromozytomen, Paragangliomen, Leiomyosarkomen und Nierenzellkarzinomen einher (Pollard et al., 2005, PMID: 15987702; Else et al., aktualisiert 2018, PMID: 20301715, GeneReviews). Pathogene Keimbahnvarianten in *SDHB* wurden zudem in Familien mit stromalen Sarkomen des Magens identifiziert (Janeway et al., 2011, PMID: 21173220; McWhinney et al., 2007, PMID: 17804857). Außerdem wurden das Cowden-Syndrom und Cowden-ähnliche Syndrome mit Veränderungen in *SDHB* assoziiert. Hierbei wurde unter anderem eine erhöhte Frequenz von Mammakarzinomen beobachtet (Ni et al., 2008, PMID: 18678321). Pathogene Varianten in SDHB weisen eine altersabhängige Penetranz auf, bei der die Wahrscheinlichkeit einen Tumor zu entwickeln mit 60 Jahren bei 21,8%-26,4% liegt (PMID: 20301715). Zudem wurden biallelische Veränderungen in *SDHB* als ursächlich für MC2DN4, eine früh beginnende (oft stressinduzierte) progressive Neurodegeneration mit Leukenzephalopathie berichtet (OMIM #619224).

Die Variante **c.689G>A; p.Arg230His** im Gen *SDHB* wurde bei Ihrem Patienen im heterozygoten Zustand nachgewiesen. Diese Veränderung wurde vielfach in der Literatur als ursächlich für sporadische und familiäre Phäochromozytome und Paragangliome sowie Nierenzellkarzinome berichtet (u a. Amar et al., 2005, PMID: 16314641; s. HGMD Professional; ClinVar Variation ID: 142637). Grønborg und Kollegen identifizierten zudem die Veränderung compound-heterozygot mit einer weiteren pathogenen *SDHB*-Veränderung (p.Asp48Val) bei einem Patienten mit Leukenzephalopathie durch eine Komplex-II-Defizienz (2017, PMID: 27604842). Die Untersuchung der Variante in einem C. elegans Modell zeigte eine funktionelle Beeinträchtigung des veränderten Proteins (Saskői et al., 2020, PMID: 32859697).

Aufgrund der aktuellen Datenlage stufen wir die Variante als pathogen ein, die vereinbar mit dem vorliegenden GIST bei Ihrem Patienten ist.

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 Mosaike mit geringem Frequenzanteil nicht sicher erfasst und somit ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Die Sequenzierdaten ergaben keinen Hinweis auf größere Deletionen oder Duplikationen in den untersuchten Genen. Obwohl unwahrscheinlich, ist es außerdem möglich, dass sich aufgrund neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse die Einschätzung der Pathogenität von Varianten zu einem späteren Zeitpunkt verändern könnte.

Zentrum für Humangenetik Tübingen | Paul-Ehrlich-Str. 23 | 72076 Tübingen
Dr. med. Dr. rer. nat. Saskia Biskup | Fachärztin für Humangenetik
Tel: 07071 565 44 00 | Fax: 07071 565 44 22 | info@humangenetik-tuebingen.de | www.humangenetik-tuebingen.de
VR Bank Tübingen eG | IBAN: DE22 6406 1854 0602 6410 04 | SWIFT / BIC: GENODES1STW

DAkkS Deutsche Akkreditierungsstelle D-ML-21320-01-00
Akkreditiert nach DIN EN ISO 15189:2014

HUMANGENETISCHE RELEVANZ

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

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

EMPFEHLUNG

Wir empfehlen eine weiterführende klinische Diagnostik und Versorgung entsprechend dem aktuellen Protokoll für *SDHB*-assoziierte Erkrankungen (Else et al., zuletzt aktualisiert 10/2018, PMID: 20301715, GeneReviews).

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

Eine Testung adulter, asymptomatischer Familienangehöriger hinsichtlich der nachgewiesenen Veränderung c.689G>A; p.Arg230His im Gen *SDHB* kann erst nach humangenetischer Beratung erfolgen.

Nach § 10 GenDG soll jede diagnostische genetische Untersuchung mit dem Angebot einer genetischen Beratung einhergehen. Bei gesicherter Diagnose einer genetischen Erkrankung ist eine genetische Beratung anzubieten.

Befund erstellt von: xxx

Geprüft durch: xxx

Mit freundlichen Grüßen

Dr. med. Dr. rer. nat. Saskia Biskup Dr. med. Friedmar Kreuz,	xxx
Fachärztin/Facharzt für Humangenetik	Diagnostik

ERGÄNZENDE INFORMATIONEN

Untersuchte Regionen

Für den oben genannten Patienten wurde eine Exom-Sequenzierung durchgeführt.

KIT (NM_000222.3), ***NF1*** (NM_000267.3), ***PDGFRA*** (NM_006206.6), ***SDHA*** (NM_004168.4), ***SDHB*** (NM_003000.3), ***SDHC*** (NM_003001.5), ***SDHD*** (NM_003002.4)

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 NovaSeq6000 System analysiert. Mindestens eine seltene Variante wurde mittels herkömmlicher Sanger-Sequenzierung nachsequenziert und auf diese Weise in einem unabhängigen Ansatz durch eine zweite Methode bestätigt.

NGS basiertes CNV-Calling: (nicht anwendbar auf das mitochondriale Genom) 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. 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 Mosaike 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) < 1,5 % 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 99,14 % 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).

Abrechnungs-informationen

Das Laborbudget des Überweisers wird durch Abrechnung humangenetischer Leistungen im Kapitel 11 nicht belastet.

x

Die tatsächliche Erstattung hängt von der jeweils aktuellen Quotierung ab.

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

Zentrum für Humangenetik Tübingen | Paul-Ehrlich-Str. 23 | 72076 Tübingen
Dr. med. Dr. rer. nat. Saskia Biskup | Fachärztin für Humangenetik
Tel: 07071 565 44 00 | Fax: 07071 565 44 22 | info@humangenetik-tuebingen.de | www.humangenetik-tuebingen.de
VR Bank Tübingen eG | IBAN: DE22 6406 1854 0602 6410 04 | SWIFT / BIC: GENODES1STW

DAkkS Deutsche Akkreditierungsstelle D-ML-21320-01-00
Akkreditiert nach DIN EN ISO 15189:2014