

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

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

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

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

- Indikation** V. a. Brugada Syndrom, DD Ionenkanalerkrankung; auffälliger Endstreckenverlauf im EKG, diskrete T-Negativierungen, Hustenreiz
- Auftrag** Molekulargenetische Diagnostik: *CACNA1C*, *CACNB2*, *HCN4*, *KCND3*, *KCNH2*, *SCN1B*, *SCN5A* und *TRPM4* (Exomanreicherung)

### Ergebnis: Auffälliger Befund

- Nachweis einer pathogenen Variante im Gen *KCNH2*, die mit einem Long-QT-Syndrom 2 assoziiert und mit der Symptomatik Ihres Patienten vereinbar 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>KCNH2</i>	<b>c.2780G&gt;A; p.Trp927*</b> chr7:150644879 C>T (hg19)	het.	AD	-	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 ein Long-QT-Syndrom (Groffen et al., aktualisiert 2024, PMID: 20301308, GeneReviews).

Um festzustellen, ob die Variante im Gen *KCNH2* *de novo* entstanden ist, empfehlen wir die Untersuchung der Eltern des Patienten hinsichtlich dieser Veränderung.

Eine Testung asymptomatischer Familienangehöriger hinsichtlich der nachgewiesenen Veränderung c.2780G>A; p.Trp927\* im Gen *KCNH2* kann erst nach humangenetischer Beratung erfolgen.

## Humangenetische Relevanz

Der Patient ist heterozygoter Träger einer pathogenen Variante im Gen *KCNH2*, 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

### *KCNH2*, NM\_000238.4

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
<b>613688</b>	<b>Long-QT-Syndrom 2 (LQT2)</b>	<b>AD</b>
609620	Short-QT-Syndrom 1 (SQT1)	AD

Das Gen *KCNH2* (auch als HERG bekannt) kodiert die porenbildende Alpha-Untereinheit (Kv11.1) eines spannungsabhängigen Kaliumkanals. Pathogene Missens und Loss-of-Function Varianten in *KCNH2* können ein Long-QT-Syndrom 2 verursachen (LQT2, Romano-Ward-Syndrom). Es wird davon ausgegangen, dass sowohl ein dominant-negativer Effekt, als auch eine Haploinsuffizienz zu einer Ausprägung eines LQT2 führen kann (Aizawa et al., 2023, PMID: 36861347). Ein LQT2 ist durch synkopale Episoden und EKG-Veränderungen (QT-Verlängerung, abnorme T-Wellen, Torsade-de-Pointes-Tachykardie) gekennzeichnet (Groffen et al., aktualisiert 2024, PMID: 20301308, GeneReviews). Durch die Torsade-de-Pointes-Tachykardie kann es zu Kammerflimmern und in Folge zu einem Herzstillstand oder plötzlichem Herztod kommen (ORPHA:101016). Die Penetranz des LQT2 ist reduziert. Etwa 19 % der Träger pathogener *KCNH2*-Varianten weisen ein normales QTc-Intervall auf (Groffen et al., aktualisiert 2024, PMID: 20301308, GeneReviews). Darüber hinaus gibt es einzelne Berichte von Patienten mit pathogenen gain-of-function *KCNH2*-Varianten, die an einem Short-QT-Syndrom leiden (Schimpf et al., 2005, PMID: 15890322; Sun et al., 2011, PMID: 21130771).

### *KCNH2*, c.2780G>A; p.Trp927\* (het.), ClinVar ID: 200499

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
<b>PVS1</b>	+8	Die Veränderung führt wahrscheinlich zum Verlust (oder Trunkierung) des Proteins und entspricht somit dem bekannten Pathomechanismus für eine <i>KCNH2</i> -assoziierte Erkrankung.
<b>PS4 (moderate)</b>	+2	Die Variante wurde bei einem weiteren bzw. mehreren anderen betroffenen Patienten mit vereinbar assoziierter Symptomatik nachgewiesen. Kapplinger et al., 2009, PMID: 19716085; Crotti et al., 2012, PMID: 23158531
<b>PM2</b>	+2	Die Variante ist nicht in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.

  

ACMG/ACGS Klassifizierung:	Punkte	Skala																				
pathogen	+12	<table border="1"><tr><td>B</td><td>LB</td><td>VUS (Ice Cold)</td><td>VUS (Cold)</td><td>VUS (Cool)</td><td>VUS (Tepid)</td><td>VUS (Warm)</td><td>VUS (Hot)</td><td>LP</td><td>P</td></tr><tr><td>≤ -7</td><td>-6 - -1</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6 - 9</td><td>≥ 10</td></tr></table>	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
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													

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

Validiert durch: XXX

Mit freundlichen Grüßen



Dr. med. Lisa Dudler

Fachärztin für Humangenetik

## Ergänzende Informationen

<b>Untersuchte Regionen</b>	<p>Für den oben genannten Patienten wurde eine Exom-Sequenzierung durchgeführt.</p> <p><b>CACNA1C</b> (NM_000719.7), <b>CACNB2</b> (NM_201590.3), <b>HCN4</b> (NM_005477.3), <b>KCND3</b> (NM_004980.5), <b>KCNH2</b> (NM_000238.4), <b>SCN1B</b> (NM_001037.5), <b>SCN5A</b> (NM_198056.3), <b>TRPM4</b> (NM_017636.4)</p> <p>Folgende (Differential-)Diagnosen wurden ebenfalls im Rahmen der Auswertung unserer Sequenzierdaten berücksichtigt: Brugada-Syndrom</p>
<b>Allgemeine Hinweise</b>	<p>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.</p>
<b>Information zur Interpretation der Tabellen</b>	<p><b>Erbgang:</b> AD – autosomal dominant; AR – autosomal rezessiv; XL – X-chromosomal; mito – mitochondrial</p> <p><b>MAF:</b> Die <b>minor allele frequency</b> 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><b>Bewertung:</b> Die Klassifizierung von Varianten basiert auf den Richtlinien der ACMG, der ACGS-2024v1.2 sowie der ClinGen SVI WG (Richards et al., 2015, PMID: 25741868; Durkie et al., 2024, Association for Clinical Genomic Science; <a href="https://clinicalgenome.org/working-groups/sequence-variant-interpretation/">https://clinicalgenome.org/working-groups/sequence-variant-interpretation/</a>). Sofern anwendbar, wird das im Folgenden beschriebene Vorgehen genutzt. 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 (Durkie et al., 2024, 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>
<b>Methoden</b>	<p><b>Sequenzierung:</b> 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.</p> <p><b>NGS basiertes CNV-Calling:</b> CNVs (<i>copy number variations</i>) wurden auf Basis von Sequenzen, die eindeutig einer genomischen Position zugeordnet werden konnten, unter Verwendung einer intern entwickelten Methode</p>

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-2024v1.2 Richtlinien (Richards et al., 2015, PMID: 25741868, Durkie et al., 2024, Association for Clinical Genomic Science).

Bewertet werden nur Varianten (Single Nucleotide Variants (SNVs)/Small Indels) mit einer Populationsfrequenz (MAF) < 1,5 % innerhalb der kodierenden Regionen sowie in flankierenden intronischen Regionen ( $\pm 8$  bp). Bekannte krankheitsauslösende Varianten (laut HGMD) werden in flankierenden Regionen bis zu  $\pm 30$  bp und bis zu einer MAF < 5 % bewertet. Ausnahmen sind möglich, z.B. für Risikofaktor-Varianten und hypomorphe Allele. Populationsfrequenzen werden anhand öffentlicher Datenbanken (z.B. gnomAD) sowie einer internen Datenbank ermittelt. Unsere Qualitätskriterien erfordern bei Nichterreichen einer informativen Sequenzierertiefe 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 Sequenzierertiefe von min. 30X für 97,89 % 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.**