

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

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

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

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

Indikation Epilepsie und mentale Retardierung

Auftrag Molekulargenetische Diagnostik: *SHANK3*, *NUS1*, *GRIN2B*, *ARX*, *GRIN1* und *DYNC1H1* (Einzelexom-Auswertung)

Ergebnis: Auffälliger Befund

- **Nachweis einer pathogenen Variante im Gen *SHANK3*, die ursächlich für ein Phelan-McDermid Syndrom 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>SHANK3</i>	c.3989_4001del; p.Arg1330Leufs*25 chr22:51160013-51160026 TGCCCAGCCCCGG>T (hg19)	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 Phelan-McDermid Syndrom (Phelan et al., aktualisiert 2018, PMID: 20301377, GeneReviews).

Um festzustellen, ob die Variante im Gen *SHANK3* *de novo* entstanden ist, empfehlen wir die Untersuchung der Eltern des Patienten hinsichtlich dieser Veränderung.

Humangenetische Relevanz

Der Patient ist heterozygoter Träger einer pathogenen Variante im Gen *SHANK3*. Wir weisen darauf hin, dass formalgenetisch jede Variante mit einer Wahrscheinlichkeit von jeweils 50 % weitervererbt werden kann.

Klinische Information und Varianten-Interpretation

SHANK3, NM_001372044.2

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
606232	Phelan-McDermid-Syndrom (PHMDS)	AD

SHANK3 kodiert für ein Protein, das zu einer Gruppe von Multidomänen-Gerüstproteinen der postsynaptischen Dichte gehört, die Neurotransmitter-Rezeptoren, Ionenkanäle und andere Membranproteine mit dem Aktin-Zytoskelett und intrazellulären Prozessen verbinden. SHANK-Gerüstproteine sind an der Ausbildung von Synapsen sowie der Reifung dendritischer Dornenfortsätze beteiligt (Sheng und Kim, 2000, PMID: 10806096). Das Phelan-McDermid-Syndrom (PHMDS) wird bei 78 % der Patienten durch eine 22q13.3-Deletion und in 22 % der Fälle durch eine Variante im *SHANK3*-Gen verursacht (Landlust et al., 2023, PMID: 37120079). Die Kernphänotypen von PHMDS sind fehlende oder verzögerte Sprache, geistige Behinderung, neonatale Hypotonie, globale Entwicklungsverzögerung, geringfügige morphologische Merkmale wie große und fleischige Hände. Weitere Beeinträchtigungen sind Epilepsie, Schlafstörungen, Magen-Darm-Anomalien, Lymphödeme, Nierenfehlbildungen und Ernährungsprobleme (Phelan und McDermid, 2012, PMID: 22670140; Schön et al., 2023, PMID: 37003575). Pathogene Varianten in *SHANK3* entstehen normalerweise *de novo* (Leblond et al., 2014, PMID: 25188300; Phelan et al., aktualisiert 2018, PMID: 20301377; Koza et al., 2023, PMID: 37120077). Mosaizismus bei den Eltern sollte ebenfalls in Betracht gezogen werden, da 4 % der Patienten mit einer *SHANK3*-Variante einen Elternteil hatten, welcher die Variante im Mosaik-Status trug (Landlust et al., 2023, PMID: 37120079; Durand et al., 2007, PMID: 17173049). Die Penetranz pathogener Varianten ist hoch, es ist aber noch nicht klar, ob sie immer vollständig ist (Phelan, Rogers und Boccutto, Genereview, 2018, PMID: 20301377; Tabet et al., 2017, PMID: 29263841).

SHANK3, c.3989_4001del; p.Arg1330Leufs*25 (het.), ClinVar ID: 279892

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
PVS1	+8	Die Veränderung führt wahrscheinlich zum Verlust (oder Trunkierung) des Proteins und entspricht somit dem bekannten Pathomechanismus für eine <i>SHANK3</i> -assoziierte Erkrankung.
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. Leblond et al., 2014, PMID: 25188300; De Rubeis et al., 2018, PMID: 29719671; Nevado et al., 2022, PMID: 35495150
PS4	+4	Die Prävalenz der Variante bei betroffenen Personen ist im Vergleich zur Prävalenz bei Kontrollpersonen deutlich erhöht. Leblond et al., 2014, PMID: 25188300; De Rubeis et al., 2018, PMID: 29719671; Nevado et al., 2022, PMID: 35495150
PM2	+2	Die Variante ist nicht in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.

ACMG/ACGS Klassifizierung:	Punkte	Klassifizierung
pathogen	+18	<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="background-color: #003366; color: white; padding: 2px 5px; border-radius: 3px;">B</div> <div style="background-color: #006699; color: white; padding: 2px 5px; border-radius: 3px;">LB</div> <div style="background-color: #99ccff; color: black; padding: 2px 5px; border-radius: 3px;">VUS (Ice Cold)</div> <div style="background-color: #66b3ff; color: black; padding: 2px 5px; border-radius: 3px;">VUS (Cold)</div> <div style="background-color: #3399ff; color: white; padding: 2px 5px; border-radius: 3px;">VUS (Cool)</div> <div style="background-color: #ffcc00; color: black; padding: 2px 5px; border-radius: 3px;">VUS (Tepid)</div> <div style="background-color: #ff6600; color: white; padding: 2px 5px; border-radius: 3px;">VUS (Warm)</div> <div style="background-color: #ff0000; color: white; padding: 2px 5px; border-radius: 3px;">VUS (Hot)</div> <div style="background-color: #ff6666; color: white; padding: 2px 5px; border-radius: 3px;">LP</div> <div style="background-color: #990000; color: white; padding: 2px 5px; border-radius: 3px;">P</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> ≤ -7 -6 - -1 0 1 2 3 4 5 6 - 9 ≥ 10 </div>

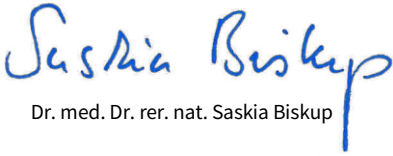
Nach § 10 GenDG soll jede diagnostische genetische Untersuchung mit dem Angebot einer genetischen Beratung einhergehen. Bei gesicherter Diagnose einer genetischen Erkrankung ist eine genetische Beratung anzubieten.

Befund erstellt von: XXX

Geprüft durch: XXX

Validiert durch: XXX

Mit freundlichen Grüßen


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

Fachärztin für Humangenetik

Ergänzende Informationen

Untersuchte Regionen	<p>Für den oben genannten Patienten wurde eine Exom-Sequenzierung durchgeführt.</p> <p>SHANK3 (NM_001372044.2), NUS1 (NM_138459.5), GRIN2B (NM_000834.5), ARX (NM_139058.3), GRIN1 (NM_007327.4), DYNC1H1 (NM_001376.5)</p> <p>Folgende (Differential-)Diagnosen wurden ebenfalls im Rahmen der Auswertung unserer Sequenzierdaten berücksichtigt: Intelligenzminderung: X-chromosomal, nicht syndromal; Intelligenzminderung, autosomal dominant; Intelligenzminderung, autosomal rezessiv; Intelligenzminderung: Syndrome; (Früh-)Kindliche neurodegenerative Erkrankungen, Enzephalopathien/Entwicklungsregression, Hypomyelinisierung/Leukodystrophie; Intelligenzminderung, metabolische Ursachen; X-chromosomale Intelligenzminderung mit Epilepsie</p>
Allgemeine Hinweise	<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>
Information zur Interpretation der Tabellen	<p>Erbgang: AD – autosomal dominant; AR – autosomal rezessiv; XL – X-chromosomal; mito – mitochondrial</p> <p>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).</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	<p>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.</p> <p>NGS basiertes CNV-Calling: CNVs (<i>copy number variations</i>) wurden auf Basis von Sequenzen, die eindeutig einer</p>

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 Mosaik 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) < 1,5 % 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.

Varianten, die im Rahmen einer Einzel-Exom-Auswertung beim Indexpatienten identifiziert wurden, wurden unter Berücksichtigung des angegebenen Phänotyps beurteilt. Im vorliegenden Fall wurde mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung eine Sequenziertiefe von min. 30X für 97,43 % 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.