

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

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

<b>Patient</b>	XXX, XX
ID #	weiblich (*TT.MM.JJJJ)
<b>Mutter</b>	XXX, XX
ID #	(*TT.MM.JJJJ)
<b>Vater</b>	XXX, XX
ID #	(*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** Dilatative Kardiomyopathie, Kleinwüchsigkeit, Skoliose, Dysmorphiezeichen. Körpergröße der Eltern im Normbereich.

**Auftrag** Molekulargenetische Diagnostik: *CREBBP*, *JUP*, *SOS1*, *RAF1*, *RIT1*, *BRAF* und *KRAS* (klinische Trio-Exom-Analyse)

### Ergebnis: Auffälliger Befund

- **Nachweis einer höchstwahrscheinlich *de novo* entstandenen, bislang nicht beschriebenen pathogenen Variante im Gen *CREBBP*, die wir ursächlich für ein Menke-Hennekam-Syndrom bei Ihrer Patientin halten.**
- 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>CREBBP</i>	<b>c.5439C&gt;G; p.Asn1813Lys</b> chr16:3779609 G>C (hg19)	het.	-	-	AD	-	<b>pathogen</b>

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

### Empfehlung

Da die Ursache der Kardiomyopathie nicht klar gelöst ist, empfehlen wir die Exom-Daten zu einem späteren Zeitpunkt zu reevaluieren, da sich aufgrund neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse die Einschätzung der Pathogenität von Varianten verändern kann. Zusätzlich könnte eine signifikante Veränderung der Symptomatik Ihrer Patientin Grund für eine Reevaluierung der Daten sein.

## Humangenetische Relevanz

Die Patientin ist heterozygote Trägerin einer höchstwahrscheinlich *de novo* entstandenen pathogenen Variante im Gen *CREBBP*, die für die Familienplanung 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

### *CREBBP*, NM\_004380.3

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
180849	Rubinstein-Taybi-Syndrom 1 (RSTS1)	AD
618332	Menke-Hennekam-Syndrom 1 (MKHK1)	AD

Das Gen ***CREBBP*** (CBP) kodiert für einen Transkriptionsfaktor-Coaktivator, der eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung, Wachstumskontrolle und Homöostase spielt. Pathogene Veränderungen in diesem Gen treten üblicherweise *de novo* auf und führen einem autosomal dominanten Erbgang folgend zu einer syndromalen Erkrankung. Es scheint, dass die Position der Veränderung dabei ausschlaggebend für den Phänotyp ist; so sind Varianten im letzten Teil des Exons 30 und im ersten Teil des Exons 31 mit dem Menke-Hennekam-Syndrom 1 (MKHK1) assoziiert, wohingegen pathogene Varianten in den übrigen Bereichen des Gens zu dem schwereren Rubinstein-Taybi-Syndrom (RSTS1) führen (Menke et al., 2016, PMID: 27311832). Zu den typischen Symptomen des RSTS1 zählen unter anderem angeborene Fehlbildungen (Mikrozephalie, spezifische faziale Dysmorphien, breite Daumen und Großzehen und postnatale Wachstumsretardierung), Intelligenzminderung und Verhaltensauffälligkeiten. Das MKHK1 ist durch variable Intelligenzminderung und faziale Dysmorphien gekennzeichnet. Zudem können unter anderem Mikrozephalie, Krampfanfälle, autistische Verhaltensweisen, rezidivierende Infektionen der oberen Atemwege, Kleinwuchs und Hörstörungen auftreten (u. a. Hennekam, 2006, PMID: 16868563; Menke et al., 2018, PMID: 29460469; Banka et al., 2019, PMID: 30892814; Angius et al., 2019, PMID: 30737887). Eine variable Expressivität ist bekannt (Stevens, aktualisiert 2019, PMID: 20301699).

### *CREBBP*, c.5439C>G; p.Asn1813Lys (het.)

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
<b>PS2</b>	+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.
<b>PM1</b>	+2	Die Variante befindet sich innerhalb einer kritischen Region des Gens <i>CREBBP</i> .
<b>PM2</b>	+2	Die Variante ist nicht in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.
<b>PP2</b>	+1	Für das Gen <i>CREBBP</i> wurden bisher weniger Missense-Veränderungen in der allgemeinen Bevölkerung nachgewiesen als erwartet, was auf eine Intoleranz des Gens gegenüber Missense-Veränderungen hindeutet.
<b>PP3</b>	+1	Die Variante wird von den verwendeten <i>in silico</i> Vorhersageprogrammen als pathogen eingestuft.

ACMG/ACGS Klassifizierung:	Punkte	Skala
Pathogen	+10	<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="background-color: #003366; color: white; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">B</div> <div style="background-color: #006699; color: white; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">LB</div> <div style="background-color: #99ccff; color: black; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">VUS (Ice Cold)</div> <div style="background-color: #ccffcc; color: black; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">VUS (Cold)</div> <div style="background-color: #ffffcc; color: black; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">VUS (Cool)</div> <div style="background-color: #ffcc99; color: black; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">VUS (Tepid)</div> <div style="background-color: #ff9966; color: black; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">VUS (Warm)</div> <div style="background-color: #ff6633; color: black; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">VUS (Hot)</div> <div style="background-color: #ff3300; color: white; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">LP</div> <div style="background-color: #cc0000; color: white; padding: 2px 5px; border: 1px solid black;">P</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center; margin-top: 5px;"> <span>≤ -7</span> <span>-6 - -1</span> <span>0</span> <span>1</span> <span>2</span> <span>3</span> <span>4</span> <span>5</span> <span>6 - 9</span> <span>≥ 10</span> </div>

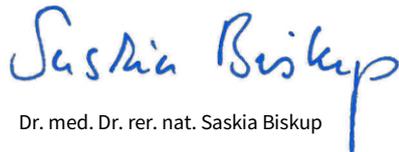
Nach § 10 GenDG soll jede diagnostische genetische Untersuchung mit dem Angebot einer genetischen Beratung einhergehen. Bei gesicherter Diagnose einer genetischen Erkrankung ist eine genetische Beratung anzubieten.

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

<b>Untersuchte Regionen</b>	<p><b>Klinische Trio-Exom-Analyse:</b> Varianten, die bei der Indexpatientin und den Eltern gefunden wurden, wurden verglichen und auf folgende Fälle gefiltert: <i>de novo</i>, compound-heterozygote oder homozygote Varianten der Indexpatientin bei heterozygoten Eltern. Die klinische Trio-Exom-Analyse beschränkt sich auf Gene mit etablierter/gesicherter Krankheitsassoziation zum Zeitpunkt der Auswertung.</p> <p><b>CREBBP</b> (NM_004380.3), <b>JUP</b> (NM_001352773.2, NM_001352774.2, NM_001352775.2, NM_001352776.2, NM_001352777.2, NM_002230.4, NM_021991.4), <b>SOS1</b> (NM_005633.4), <b>RAF1</b> (NM_002880.4), <b>RIT1</b> (NM_006912.6), <b>BRAF</b> (NM_004333.6), <b>KRAS</b> (NM_004985.5)</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 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.</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-2020v4.01 sowie der ClinGen SVI WG (Richards et al., 2015, PMID: 25741868; Ellard et al., 2020, Association for Clinical Genomic Science; <a href="https://clinicalgenome.org/working-groups/sequence-variant-interpretation/">https://clinicalgenome.org/working-groups/sequence-variant-interpretation/</a>). 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.,</p>

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. 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 ( $\pm 8$  bp). Bekannte krankheitsauslösende Varianten (laut HGMD) werden in flankierenden Regionen bis zu  $\pm 30$  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.

Varianten, die im Rahmen einer Einzelexom-Auswertung bei der Indexpatientin identifiziert wurden, wurden unter Berücksichtigung des angegebenen Phänotyps beurteilt. Im vorliegenden Fall sind die kodierenden Bereiche vollständig abgedeckt.

**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.**