Zentrum für Humangenetik Tübingen

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
Befunddatum	xxx
Befund-ID	R#

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

Indikation V. a. megalenzephale Leukenzephalopathie

Auftrag Molekulargenetische Diagnostik: *AARS2*, *ABCD1*, *AIMP1*, *ARSA*, *ASPA*, *CLCN2*, *DARS1*, *DARS2*, *EIF2AK2*, *GALC*, *GFAP*, *GJC2*, *HEPACAM*, *MLC1*, *NAXD*, *NAXE*, *PLEKHG2*, *PLP1*, *POLR1C*, *POLR3A*, *POLR3B*, *PSAP*, *RNASET2* und *TUBB4A* (Exomanreicherung)

Ergebnis: Auffälliger Befund

- **Nachweis einer wahrscheinlich pathogenen Variante sowie einer pathogenen Variante im Gen *MLC1* im compound heterozygoten Zustand, die ursächlich für eine megalenzephale Leukenzephalopathie bei Ihrem Patienten sind.**
- 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
MLC1	**c.274C>T; p.Pro92Ser** **chr22:50518820 G>A (hg19)**	**het.**	**AR**	**0,01**	**pathogen**
MLC1	**c.268-2A>G; p.?** **chr22:50518828 T>C (hg19)**	**het.**	**AR**	**-**	**wahrscheinlich 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 eine *MLC1*-assoziierte megalenzephale Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (Min et al., aktualisiert 2023, PMID: 20301707, GeneReviews).

Eine Testung adulter asymptomatischer Familienangehöriger hinsichtlich der nachgewiesenen Veränderungen c.268-2A>G; p.? und c.274C>T; p.Pro92Ser im Gen *MLC1* kann erst nach humangenetischer Beratung erfolgen.

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
Volksbank in der Region eG | IBAN: DE91 6039 1310 0566 7300 06 | SWIFT / BIC: GENODES1VBH

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

Humangenetische Relevanz

Der Patient ist compound-heterozygoter Träger von einer wahrscheinlich pathogenen Variante sowie einer pathogenen Variante im Gen *MLC1*, die auch für Verwandte relevant sein können.

Wir weisen darauf hin, dass formalgenetisch jede Variante mit einer Wahrscheinlichkeit von jeweils 50 % weitervererbt werden kann. Aufgrund der Compound-Heterozygotie der Veränderungen im Gen *MLC1* wird in jedem Fall jeweils ein verändertes Allel an jeden Nachkommen weitervererbt.

Klinische Information und Varianten-Interpretation

***MLC1*, NM_015166.4**

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
604004	Megalenzephale Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC1)	AR

Das Gen ***MLC1*** kodiert für ein Transmembranprotein, das unter anderem in Astrozyten des Gehirns an subzellulären Kontaktstellen zur Blut-Hirn-Schranke exprimiert wird. Es wird vermutet, dass das Protein eine Rolle für die Ionen- und Wasser-Homöostase spielt (Brignone et al., 2015, PMID: 25883547). Einem autosomal rezessiven Erbgang folgend können pathogene Veränderungen in diesem Gen zu einer MLC1 führen, die sich bereits im Säuglingsalter manifestiert. Es wurde ein breites Spektrum an pathogenen Variantentypen in *MLC1* beschrieben (u. a. Ilja Boor et al., 2006, PMID: 16652334). Allerdings konnte keine Korrelation zwischen Variantenlokus und Schwere der klinischen Symptomatik hergestellt werden (Montagna et al., 2006; PMID: 16470554).

***MLC1*, c.274C>T; p.Pro92Ser (het.), ClinVar ID: 4719**

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
PS3 (supporting)	+1	Funktionelle Studien stützen die Pathogenität der Variante. Duarri et al., 2008, PMID: 18757878
PM2	+2	Die Variante ist nur in sehr niedriger Frequenz in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.
PM3 (strong)	+4	Die Variante wurde bereits *in trans* mit einer pathogenen Veränderung und/oder im homozygoten Zustand nachgewiesen. Ben-Zeev et al., 2002, PMID: 12189496; Leegwater et a., 2002, PMID: 11935341
PM5	+2	Die Variante führt zum Austausch einer Aminosäure, für die bereits ein anderer Austausch (p.Pro92Leu) als pathogen beschrieben wurde. ClinVar Variation ID: 1524959
PP4	+1	Die mit der nachgewiesenen Veränderung assoziierte Erkrankung ist mit spezifischen Symptomen des Patienten vereinbar.
ACMG/ACGS Klassifizierung: pathogen	+10	B (≤ -7) | LB (-6 – -1) | VUS (Ice Cold) (0) | VUS (Cold) (1) | VUS (Cool) (2) | VUS (Tepid) (3) | VUS (Warm) (4) | VUS (Hot) (5) | LP (6 – 9) | **P (≥ 10)**

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
Volksbank in der Region eG | IBAN: DE91 6039 1310 0566 7300 06 | SWIFT / BIC: GENODES1VBH

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

***MLC1*, c.268-2A>G; p.? (het.)**

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
PVS1 (strong)	+4	Die Veränderung führt wahrscheinlich zum Verlust (oder Trunkierung) des Proteins und entspricht somit dem bekannten Pathomechanismus für eine *MLC1*-assoziierte Erkrankung.
PM2	+2	Die Variante ist nicht in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.
PP4	+1	Die mit der nachgewiesenen Veränderung assoziierte Erkrankung ist mit spezifischen Symptomen des Patienten vereinbar.
ACMG/ACGS Klassifizierung: wahrscheinlich pathogen	+7	B (≤ -7) | LB (-6 – -1) | VUS (Ice Cold) (0) | VUS (Cold) (1) | VUS (Cool) (2) | VUS (Tepid) (3) | VUS (Warm) (4) | VUS (Hot) (5) | **LP (6 – 9)** | P (≥ 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. Dr. rer. nat. Saskia Biskup

Fachärztin für Humangenetik

Ergänzende Informationen

Untersuchte Regionen

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

AARS2 (NM_020745.4), ***ABCD1*** (NM_000033.4), ***AIMP1*** (NM_004757.3), ***ARSA*** (NM_000487.6), ***ASPA*** (NM_000049.4), ***CLCN2*** (NM_004366.6), ***DARS1*** (NM_001349.4), ***DARS2*** (NM_018122.5), ***EIF2AK2*** (NM_001135651.3), ***GALC*** (NM_000153.4), ***GFAP*** (NM_002055.5), ***GJC2*** (NM_020435.4), ***HEPACAM*** (NM_152722.5), ***MLC1*** (NM_015166.4), ***NAXD*** (NM_001242882.2), ***NAXE*** (NM_144772.3), ***PLEKHG2*** (NM_022835.3), ***PLP1*** (NM_000533.5), ***POLR1C*** (NM_203290.4), ***POLR3A*** (NM_007055.4), ***POLR3B*** (NM_018082.6), ***PSAP*** (NM_002778.4), ***RNASET2*** (NM_003730.6), ***TUBB4A*** (NM_006087.4)

Folgende (Differential-)Diagnosen wurden ebenfalls im Rahmen der Auswertung unserer Sequenzierdaten berücksichtigt: Leukodystrophie / Leukenzephalopathie

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, 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. Aufgrund neuer Erkenntnisse oder verbessertem wissenschaftlichen Verständnis kann sich die Einschätzung von Varianten zu einem späteren Zeitpunkt verändern.

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
Volksbank in der Region eG | IBAN: DE91 6039 1310 0566 7300 06 | SWIFT / BIC: GENODES1VBH

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

Information zur Interpretation der Tabellen

Erbgang: AD – autosomal dominant; AR – autosomal rezessiv; XL – X-chromosomal; mito – mitochondrial

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).

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 *Very Strong* (+ 8), *Strong* (+/- 4), *Moderate* (+/- 2), sowie *Supporting* (+/- 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 *hot*, *warm*, *tepid*, *cool*, *cold* und *ice cold* 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.

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. Kopienzahlneutrale strukturelle Veränderungen wie z.B. balancierte Translokationen, Inversionen, uniparentale Heterodisomien sowie niedrigprozentige Mosaike 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.

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
Volksbank in der Region eG | IBAN: DE91 6039 1310 0566 7300 06 | SWIFT / BIC: GENODES1VBH

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

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 97,85 % 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.

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
Volksbank in der Region eG | IBAN: DE91 6039 1310 0566 7300 06 | SWIFT / BIC: GENODES1VBH

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