

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

Patient	Fötus von XX, XXX
ID #	
Mutter	XXX, XX
ID #	(*TT.MM.JJJJ)
Vater	XXX, XX
ID #	(*TT.MM.JJJJ)
Probeneingang	xxx
Material	Chorionzotten, nativ
Befunddatum	xxx
Befund-ID	R#

Molekulargenetischer Befund – Fötus von XX, XXX

Indikation Großes Lymphangiom vom linken Unterbauch bis linken Unterschenkel, linke Niere nach kranial verschoben; Differentialdiagnose Cloves-Syndrom

Auftrag Klinisches Exom (Trio-Exom-Analyse)

Ergebnis: Auffälliger Befund

- **Nachweis einer wahrscheinlich pathogenen Variante im Gen *AKT3* im untersuchten fötalen Gewebe, die vereinbar mit einer *AKT3*-assoziierten Erkrankung bei dem Fötus ist.**
- Es wurden keine genomischen Zugewinne oder Verluste gefunden, die nach derzeitigem Kenntnisstand für den Phänotyp des Fötus ursächlich sind.
- Die Sequenzierdaten ergaben keinen Hinweis auf eine maternale DNA Kontamination der fötalen Probe.

Gen	Variante	Zygotie			Erbgang	MAF (%)	Bewertung
		Index	Mutter	Vater			
<i>AKT3</i>	c.1397C>T; p.Pro466Leu chr1:243668594 G>A (hg19)	het.	-	-	AD	-	wahrscheinlich pathogen

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

Empfehlung

Wir empfehlen eine weiterführende klinische Diagnostik insbesondere hinsichtlich Hirnfehlbildungen und gegebenenfalls nachgeburtlich eine Versorgung entsprechend dem aktuellen Protokoll für *AKT3*-assoziierte Erkrankungen (Mirzaa, aktualisiert 2022, PMID: 27854409, GeneReviews).

Humangenetische Relevanz

Der Fötus ist heterozygot für eine höchstwahrscheinlich *de novo* entstandene wahrscheinlich pathogene Variante im Gen *AKT3*.

Klinische Information und Varianten-Interpretation

AKT3, NM_005465.7

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
615937	Megalenzephalie-Polymikrogyrie-Polydaktylie-Hydrozephalus-Syndrom 2 (MPPH2)	AD
PMID: 22729223	Hemimegalenzephalie	AD
PMID: 23794269	Makrozephalie	AD

Das **AKT3**-Gen kodiert für eine von drei verwandten Serin/Threonin-Kinasen (AKT1, AKT2, AKT3; Teil des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs), welche vielfältige zelluläre Prozesse regulieren. Diese schließen den Zellstoffwechsel, -proliferation, -überleben als auch das Zellwachstum ein. AKT3 spielt damit eine wichtige Rolle bei der Hirnentwicklung bzw. -größe (Easton et al., 2005, PMID: 15713641). Pathogene Varianten in **AKT3** gehen mit einem breiten Spektrum von Hirnbeteiligungen einher, das von fokalen oder segmentalen Hirnfehlbildungen (wie Hemimegalenzephalie und Polymikrogyrie) vorwiegend aufgrund von somatischen Mosaik-Varianten bis hin zu diffusen bilateralen kortikalen Fehlbildungen, Megalenzephalie und Heterotopie aufgrund von konstitutionellen **AKT3**-Varianten reicht.

AKT3, c.1397C>T; p.Pro466Leu (het.), ClinVar ID: 958474

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
PS2 (moderate)	+2	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.
PS4 (supporting)	+1	Die Prävalenz der Variante bei betroffenen Personen ist im Vergleich zur Prävalenz bei Kontrollpersonen deutlich erhöht.
PM2	+2	Die Variante ist nicht in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.
PP2	+1	Für das Gen AKT3 wurden bisher weniger Missense-Veränderungen in der allgemeinen Bevölkerung nachgewiesen als erwartet, was auf eine Intoleranz des Gens gegenüber Missense-Veränderungen hindeutet.
PP4	+1	Die mit der nachgewiesenen Veränderung assoziierte Erkrankung ist mit spezifischen Symptomen des Patienten vereinbar.
ACMG/ACGS Klassifizierung: Wahrscheinlich pathogen	+7	

Befunde einer Pränataldiagnostik müssen gemäß GenDG im Rahmen einer genetischen Beratung mitgeteilt werden. Für Rückfragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.

Befund erstellt von: XXX

Geprüft durch: XXX

Validiert durch: XXX

Mit freundlichen Grüßen

Saskia Biskup

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

Fachärztin für Humangenetik

Ergänzende Informationen

Untersuchte Regionen

Trio-Exom-Analyse: Varianten, die beim Fötus und den Eltern gefunden wurden, wurden verglichen und auf folgende Fälle gefiltert: *de novo*, compound-heterozygote oder homozygote Varianten des Fötus bei heterozygoten Eltern sowie ggf. hemizygoten Varianten des Fötus bei heterozygoter Mutter für Varianten auf dem X-Chromosom. Die klinische Trio-Exom-Analyse beschränkt sich auf Gene mit etablierter/gesicherter Krankheitsassoziation zum Zeitpunkt der Auswertung.

Befundet werden nur Varianten, die entsprechend der aktuellen Datenlage als pathogen oder wahrscheinlich pathogen eingestuft werden.

PIK3CA (NM_006218.4), **AKT1** (NM_005163.2), **AKT3** (NM_005465.7), **CDKN1C** (NM_000076.2), **AKT2** (NM_001626.6), **PTEN** (NM_000314.8), **PTPN11** (NM_002834.5), **FLT4** (NM_182925.5), **MDFIC** (NM_001166345.3), **PIEZO1** (NM_001142864.4)

Folgende (Differential-)Diagnosen wurden ebenfalls im Rahmen der Auswertung unserer Sequenzierdaten berücksichtigt: Mitochondriales Genom (mtDNA); HP:0001528 - Hemihypertrophy, HP:0100764 - Lymphangioma

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 können nicht sicher erfasst und somit nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren können Mosaiken 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.

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. 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 (± 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. 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 Sequenzierungstiefe 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 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, wahrscheinlich benigne oder Varianten unklarer Signifikanz 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.