

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

Herrn  
Dr. med. Otto Muster  
Musterfirma  
Musterstraße 1  
12345 Musterstadt

<b>Patient</b>	Mustermann, Erika
<b>ID #</b>	weiblich (*TT.MM.JJJJ)
<b>Probeneingang</b>	TT.MM.JJJJ
<b>Material</b>	EDTA-Blut
<b>Externe ID</b>	#
<b>Befunddatum</b>	TT.MM.JJJJ
<b>Befund-ID</b>	R#

## Molekulargenetischer Befund – Mustermann, Erika (\*TT.MM.JJJJ)

**Indikation** V. a. sideroblastische Anämie; Anämie (Z. n. x Transfusion), im Knochenmark hyperplastische Erythropoese, aber Retikulozyten und Hämoglobin reduziert, alle x Wochen Transfusionsbedarf

**Auftrag** Molekulargenetische Diagnostik: Erythrozytendefekte und Anämien (Exomanreicherung)

### Ergebnis: Auffälliger Befund

- **Nachweis von zwei pathogenen Varianten im Gen *HBB*, die ursächlich für eine autosomal-rezessive Beta-Thalassämie bei Ihrer Patientin sind. Unsere NGS-Daten zeigen, dass beide Varianten im compound-heterozygoten Zustand vorliegen.**
- 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
<i>HBB</i>	<b>c.93-21G&gt;A</b> chr11:5248050 C>T (hg19)	het.	AD, AR	0,03	pathogen
<i>HBB</i>	<b>c.135delC; p.Phe46Leufs*16</b> chr11:5247986-5247987 AG>A (hg19)	het.	AD, AR	< 0,01	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 Beta-Thalassämie (Langer, aktualisiert 2024, PMID: 20301599, GeneReviews).

Um die Wiederholungswahrscheinlichkeit für eine weitere Familienplanung abschätzen zu können, empfehlen wir die Testung auf Anlageträgerschaft der Eltern.

Eine Testung asymptomatischer Familienangehöriger hinsichtlich der nachgewiesenen Veränderungen c.93-21G>A und c.135delC; p.Phe46Leufs\*16 im Gen *HBB* kann erst nach humangenetischer Beratung erfolgen.

## Humangenetische Relevanz

Die Patientin ist compound-heterozygote Trägerin von zwei pathogenen Varianten im Gen *HBB*, die für die zukünftige Familienplanung und 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 *HBB* wird in jedem Fall jeweils ein verändertes Allel an jeden Nachkommen weitervererbt.

## Klinische Information und Varianten-Interpretation

### **HBB, NM\_000518.5**

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
141749	Delta-beta-Thalassämie	AD
140700	Heinz-Körper-Anämie	AD
603903	Sichelzellanämie	AR
603902	Beta-Thalassämie, "dominant inclusion-body"	AD
<b>613985</b>	<b>Beta-Thalassämie</b>	<b>AR</b>
141749	Hereditäre Persistenz des fetalen Hämoglobins	AD
617980	Erythrozytose 6	AD
617971	Methämoglobinämie Typ Beta	AD

**HBB** kodiert für Beta-Globin, eine Untereinheit des adulten Hämoglobins. Pathogene Varianten im *HBB*-Gen können ursächlich für verschiedene Formen von Anämien sein. Die Beta-Thalassämie wird in drei Formen eingeteilt, die sich in der Stärke ihrer Ausprägung unterscheiden: Thalassämie major (Patienten sind transfusionsbedürftig), Thalassämie intermedia (mittelschwere Form) und Thalassämie minor (asymptomatisch bei Mikrozytose und möglicher Anämie). Bei den leichteren Formen liegt meist nur auf einem Allel eine pathogene Variante vor (Heterozygotie), sie werden autosomal-dominant vererbt. Patienten mit Thalassämie major entwickeln schon in ihren ersten Lebensjahren eine schwere Anämie, während die Thalassämie intermedia klinisch sehr heterogen ist. Die Thalassämie intermedia kann durch pathogene *HBB*-Varianten verursacht werden, die zu einem hyperinstabilen Hämoglobinmolekül führen oder durch eine Kombination aus einer pathogenen *HBB*-Variante zusammen mit einer Duplikation des *HBA1*- oder *HBA2*-Gens zustande kommen (Langer, aktualisiert 2024, PMID: 20301599, GeneReviews). Bei der autosomal-rezessiven Sichelzellkrankheit führt ein verändertes Hämoglobin unter bestimmten Bedingungen wie Sauerstoffmangel, Exsikkose u. a. zur Bildung deformierter, sichelförmiger Erythrozyten. Eine chronische Hämolyse mit Anämie sowie eine Störung der Mikrozirkulation mit Kapillarinfarkten sind die Folge. Es kommt nach gewissen Triggern zu akuten Episoden mit Gefäßverschlüssen, Schmerzen und Organschäden (Bender und Carlberg, aktualisiert 2025, PMID: 20301551, GeneReviews).

### **HBB, c.93-21G>A (het.), ClinVar ID: 15454**

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
<b>PM2</b>	+2	Die Variante ist nur in sehr niedriger Frequenz in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.
<b>PM3</b> (very strong)	+8	Die Variante wurde <i>in trans</i> mit einer pathogenen Veränderung und/oder im homozygoten Zustand nachgewiesen. Das Auftreten der Variante zusammen mit einer wahrscheinlich pathogenen bzw. pathogenen Variante kann auch bei unbekannter allelischer Konfiguration als Evidenz miteinbezogen werden. Oner et al., 1990, PMID: 2200760; Fettah et al., 2013, PMID: 24106605
<b>PP4</b>	+1	Der Phänotyp bzw. die Familienanamnese bei Patienten mit dieser Variante ist spezifisch für eine Erkrankung mit begrenzter genetischer Ätiologie.

<b>ACMG/ACGS</b> <b>Klassifizierung:</b> pathogen	+11	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

**HBB, c.135delC; p.Phe46Leufs\*16 (het.), ClinVar ID: 15415**

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
<b>PVS1</b>	+8	Die Veränderung führt voraussichtlich zum Verlust des Proteins. Loss-of-Function ist ein bekannter Pathomechanismus für eine <i>HBB</i> -assoziierte Erkrankung.
<b>PM2</b>	+2	Die Variante ist nur in sehr niedriger Frequenz in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.
<b>PM3</b> (very strong)	+8	Die Variante wurde <i>in trans</i> mit einer pathogenen Veränderung und/oder im homozygoten Zustand nachgewiesen. Das Auftreten der Variante zusammen mit einer wahrscheinlich pathogenen bzw. pathogenen Variante kann auch bei unbekannter allelischer Konfiguration als Evidenz miteinbezogen werden. Fettah et al., 2013, PMID: 24106605; Langer, aktualisiert 2024, PMID: 20301599; Ozalp und Anlas, 2024, PMID: 38708170
<b>PP4</b>	+1	Der Phänotyp bzw. die Familienanamnese bei Patienten mit dieser Variante ist spezifisch für eine Erkrankung mit begrenzter genetischer Ätiologie.

  

<b>ACMG/ACGS</b> <b>Klassifizierung:</b> pathogen	+19	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. Dr. rer. nat. Saskia Biskup  
Fachärztin für Humangenetik

## Ergänzende Informationen

<b>Untersuchte Regionen</b>	<p>Für die oben genannte Patientin wurde eine Exom-Sequenzierung durchgeführt. Die Analyse wurde auf die folgenden Regionen fokussiert:</p> <p><b>ABCB7, ABCG5, ABCG8, AK1, ALAS2, ALDOA, ANK1, ATP11C, BPGM, CD59, CDAN1, CDIN1, COL4A1, CYB5R3, DHFR, DNASE2, EGLN1, EPAS1, EPB41, EPB42, EPO, EPOR, G6PD, GATA1, GCLC, GLRX5, GPI, GSR, GSS, HBA1, HBA2, HBB, HBG2, HK1, HSPA9, JAK2, KCNN4, KIF23, KLF1, LARS2, LCAT, LPIN2, MT-ATP6, MTHFD1, NDUFB11, NT5C3A, PFKM, PGK1, PIEZO1, PKLR, PUS1, RHAG, SEC23B, SH2B3, SLC11A2, SLC19A2, SLC25A38, SLC2A1, SLC30A10, SLC4A1, SPTA1, SPTB, TMPRSS6, TP11, TRNT1, UMPS, VHL, XK, YARS2</b> (Erythrozytendefekte und Anämien)</p>
<b>Allgemeine Hinweise</b>	<p>Varianten in nicht untersuchten Bereichen der analysierten kernkodierten 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. Varianten mit sehr niedrigem Heteroplasmiegrad, sowie Deletionen oder Duplikationen in der mtDNA können mit der von uns angewandten Methode nicht detektiert werden. Der Heteroplasmiegrad von Veränderungen in der mtDNA kann zwischen verschiedenen Geweben stark variieren (Wallace &amp; Chalkia 2013; PMID: 24186072). Aus diesem Grund können pathogene Varianten in der DNA aus Leukozyten nicht nachweisbar sein, während sie in anderen Geweben krankheitsursächlich sein können. 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 <i>minor allele frequency</i> 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 (Richards et al., 2015, PMID: 25741868; Durkie et al., 2024, Association for Clinical Genomic Science). 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 Kriteriumstärke 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 der kernkodierten Gene und weitere nicht kodierende, krankheitsrelevante Regionen sowie die vollständige mitochondriale DNA 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 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 <i>CNV-Calling</i> 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</p>

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 Mosaikungen 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 % in der mitochondrialen DNA und innerhalb der kodierenden Regionen sowie in flankierenden intronischen Regionen ( $\pm 8$  bp) der kernkodierten Gene. Bekannte krankheitsauslösende Varianten (laut HGMD und MITOMAP) werden in der gesamten mitochondrialen DNA sowie 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, MITOMAP) 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 95,94 % 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.**