

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

Frau
Dr. med. Dr. rer. nat. Lisa Muster
Musterfirma
Musterstraße 1
12345 Musterstadt

Patient	XXX, XX
ID #	weiblich (*TT.MM.JJJJ)
Probeneingang	xxx
Material	EDTA-Blut
Befunddatum	xxx
Befund-ID	R999999999

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

Auftrag Parkinson (prädictives Genset), Demenz (prädictives Genset) und *APOE* (Genotypisierung)

Ergebnis: Auffälliger Befund

- **Nachweis einer pathogenen Variante im Gen *NOTCH3*, die mit einer zerebralen Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie Typ 1 (CADASIL1) assoziiert ist. Die Variante c.1774C>T führt zu einem zusätzlichen Cystein und ist in der EGFr-Domäne 15 des Proteins lokalisiert. Pathogene Varianten in den EGFr-Domänen 7-34 sind mit einem milden Verlauf sowie einer reduzierten Penetranz assoziiert.**
- Nachweis des E3/E3-Genotyps im Gen *APOE*. Das neutrale E3-Allel wird als Normalallel bezeichnet und hat keinen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit an einer Alzheimer-Demenz (AD) zu erkranken (Genin et al., 2011, PMID: 21556001; Bird et al., aktualisiert 2018, PMID: 20301340, GeneReviews; Li et al., 2020, PMID: 33148290).
- Es wurden keine genomischen Zugewinne oder Verluste gefunden, die nach derzeitigem Kenntnisstand eine Prädisposition für eine Parkinson-Erkrankung oder Demenz darstellen.

Gen	Variante	Zygotie	Erbgang	MAF (%)	Bewertung
<i>NOTCH3</i>	c.1774C>T; p.Arg592Cys chr19:15297982 G>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 gegebenenfalls Versorgung entsprechend dem aktuellen Protokoll für CADASIL (Hack et al., aktualisiert 2019, PMID: 20301673, GeneReviews; Cramer et al., aktualisiert 2024, PMID: 29261860, StatPearls).

Eine Testung adulter asymptomatischer Familienangehöriger hinsichtlich der nachgewiesenen Veränderung c.1774C>T; p.Arg592Cys im Gen *NOTCH3* kann erst nach humangenetischer Beratung erfolgen.

Da es sich um eine prädictive Untersuchung handelt, besteht die Möglichkeit, das Ergebnis anhand einer zweiten unabhängigen Blutprobe zu bestätigen.



Humangenetische Relevanz

Die Ratsuchende ist heterozygote Trägerin einer pathogenen Variante im Gen *NOTCH3*, die auch für Verwandte 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

NOTCH3, NM_000435.3

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
125310	Zerebrale Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie Typ 1 (CADASIL1)	AD
130720	Syndrom der lateralen Meningozele (LMNS)	AD
615293	?Infantile Myofibromatose 2 (IMF2)	AD

Das Gen *NOTCH3* kodiert für ein Transmembranprotein, welches als Transkriptionsaktivator fungiert und so in Differenzierung, Proliferation und apoptotischen Vorgängen in der Zelle involviert ist. Heterozygote pathogene Varianten in *NOTCH3* führen zur Ausprägung verschiedener Erkrankungen. CADASIL1 wird zumeist durch pathogene Missense-Varianten in den Exons 2 bis 24 des *NOTCH3*-Gens verursacht, die zum Verlust oder Zugewinn eines Cysteins in einer der EGFr-Domänen führen. CADASIL ist gekennzeichnet durch rezidivierende ischämische Schlaganfälle im mittleren Erwachsenenalter, kognitiven Verfall bis hin zur Demenz, Migräne mit Aura in der Vorgeschichte, Stimmungsschwankungen, Apathie und diffuse Läsionen der weißen Substanz sowie subkortikale Infarkte in der Neurobildgebung. Ischämische Schübe sind rekurrent und führen zu schweren Beeinträchtigungen mit Gangstörungen, Harninkontinenz und Pseudobulbärparalyse. Es besteht eine hohe Penetranz, deren Ausprägung jedoch bezüglich Erkrankungsalter, Schwere der klinischen Symptome und des Krankheitsverlaufs variiert. Während für pathogene Varianten in den EGFr-Domänen 1–6 von einer vollständigen Penetranz bei typischerweise schwerem Verlauf ausgegangen wird, ist für pathogene Varianten in den EGFr-Domänen 7–34 eine reduzierte Penetranz beschrieben und es wird eine mildere Symptomatik angenommen (Rutten et al., 2016, PMID: 27844030; Rutten et al., 2019, PMID: 30032161; Hack et al., aktualisiert 2019, PMID: 20301673, GeneReviews).

NOTCH3, c.1774C>T; p.Arg592Cys (het.), ClinVar ID: 808495

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
PS4	+4	Die Prävalenz der Variante bei betroffenen Personen ist im Vergleich zur Prävalenz bei Kontrollpersonen deutlich erhöht. Ni et al., 2022, PMID: 35822697; Wang et al., 2022, PMID: 35401403; interne Datenbank
PM1 (strong)	+4	Die Variante befindet sich innerhalb einer kritischen Region des Gens <i>NOTCH3</i> .
PM2	+2	Die Variante ist nur in sehr niedriger Frequenz in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.
ACMG/ACGS Klassifizierung: pathogen	+10	

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



Befund erstellt von: XXX

Geprüft durch: XXX

Validiert durch: XXX

Mit freundlichen Grüßen



Dr. med. Friedmar Kreuz

Facharzt für Humangenetik

Ergänzende Informationen

CeGaT ExomeXtra®-basierte Diagnostik

Die genetische Analyse wurde mit der von der CeGaT entwickelten ExomeXtra®-Anreicherung (Version 6) durchgeführt. Diese enthält:

- alle Exons der etwa 20.000 proteinkodierenden Gene
- mehr als 46.000 intergenische und intronische Positionen, die mit genetischen Erkrankungen assoziiert sind
- das gesamte mitochondriale Genom mit hoher Abdeckung
- ausgewählte klinisch relevante RNA-Gene einschließlich aller snRNAs des Spleißosoms
- genomweites CNV-calling mit einer array-CGH-ähnlichen Auflösung von ca. 50 kb und höherer Auflösung von CNVs in kodierenden Regionen
- pharmakogenetische Varianten mit hoher Evidenz
- genomische Regionen, die mit Repeat-Erkrankungen assoziiert sind
- Screening auf Infektionen mit Humane Papillomaviren HPV, Epstein-Barr-Virus (EBV), Zytomegalievirus (CMV), Herpes-simplex-Viren (HSV) 1 and 2, Toxoplasma gondii (Toxoplasmosis), Varicella-Zoster-Virus (humanes Herpesvirus Typ 3), Parvovirus B19 (Fifth disease), und Treponema pallidum (Syphilis)

Bitte beachten Sie, dass die Datenauswertung auf dem angegebenen Phänotyp basiert. Daher sind nicht alle der oben genannten Merkmale für jeden Fall relevant und die Befundung ist auf phänotypisch relevante Varianten beschränkt. Weitere methodische Informationen zur spezifischen Diagnostik für diese Ratsuchende finden Sie nachfolgend.

Untersuchte Regionen

Für die oben genannte Ratsuchende wurde eine Exom-Sequenzierung durchgeführt. Die Analyse wurde auf die folgenden Regionen fokussiert:

APP, CSF1R, GRN, ITM2B, MAPT, NOTCH3, PRNP, PSEN1, PSEN2 (Demenz (prädiagnostisches Genset))

APOE (Genotypisierung, NM_000041.4)

ATP1A3, C19orf12, DNAJC6, FBXO7, GRN, LRRK2, MAPT, PANK2, PARK7, PINK1, PLA2G6, PRKN, SLC30A10, SLC39A14, SNCA, SPR, VPS35 (Parkinson (prädiagnostisches Genset))

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 Keimbahnmosaik 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-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 *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 (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.

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 Mosaikie 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. 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 % innerhalb der kodierenden Regionen sowie in flankierenden intronischen Regionen (±8 bp). Bekannte



krankheitsauslösende Varianten (laut HGMD und ClinVar) werden in flankierenden Regionen bis zu ± 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) sowie einer internen Datenbank ermittelt. Unsere Qualitätskriterien erfordern bei Nichterreichen einer informativen Sequenzierentiefe 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 Sequenzierentiefe von min. 30X für 97,67 % 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, 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.

