

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

по результатам биоинформатического анализа
данных секвенирования ДНК
(полное секвенирование экзона с целью скрининга на носительство вариантов,
ассоциированных с рецессивными заболеваниями)

СВЕДЕНИЯ О ПАЦИЕНТЕ		СВЕДЕНИЯ ОБ ОБРАЗЦЕ	
Пациент		Дата поступления образца	
Дата рождения		Материал для анализа	
Пол		Внутренний номер	

КЛИНИЧЕСКАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Направляющий врач	-
Предположительный диагноз	Прекоцепционный генетический скрининг
Клинические характеристики	-

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

НОСИТЕЛЬСТВО ВАРИАНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РЕЦЕССИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Ген	Ассоциированное заболевание (Номер OMIM; Тип наследования*)	Изменение ДНК (hg19) Изменение транскрипта Изменение белка	Зиготность	Частота	Компьютерное предсказание	Эволюционная консервативность	Классификация патогенности
<i>HPGD</i>	Изолированное врожденное утолщение пальцев (119900; AR) Первичная гипертрофическая остеоартропатия, тип 1 (259100; AR)	chr4:g.175443138_175443139del ENST00000296522.6: c.175_176del ENSP00000296522.6: p.Leu59ValfsTer8	Гетерозигота	0.02%	Патогенный	-	Патогенный

Обнаружен ранее описанный в литературе вариант (rs548208942) в гетерозиготном состоянии во 2 экзоне (из 7) в гене *HPGD*, приводящий к сдвигу рамки считывания и преждевременной терминации трансляции белка (p.Leu59ValfsTer8, мутация типа фреймшифт).

Патогенные биаллельные варианты в данном гене могут приводить к развитию гипертрофической остеоартропатии, а также к врожденному утолщению пальцев. Обнаруженный вариант был описан в гомозиготном состоянии у пациентов с этими состояниями:

1. Bergmann C, Wobser M, Morbach H, et al. Primary hypertrophic osteoarthropathy with digital clubbing and palmoplantar hyperhidrosis caused by 15-PGHD/HPGD loss-of-function mutations. *Exp Dermatol.* 2011 Jun;20(6):531-3. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01248.x. Epub 2011 Mar 23. PMID: 21426412.
2. Uppal S, Diggle CP, Carr IM, et al. Mutations in 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase cause primary hypertrophic osteoarthropathy. *Nat Genet.* 2008 Jun;40(6):789-93. doi: 10.1038/ng.153. Epub 2008 May 25. Erratum in: *Nat Genet.* 2008 Jul;40(7):927. PMID: 18500342.

Вариант присутствует в базе данных популяционных частот gnomAD с частотой 0.02% (44 носителя, гомозиготных носителей не зарегистрировано).

В базе данных ClinVar вариант описан как патогенный (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/7919>).

Вариант описан в базе данных OMIM в ассоциации с гипертрофической остеоартропатией (<https://omim.org/entry/601688#0003>).

Вариант расценивается как патогенный.

Данный вариант обнаружен в гетерозиготном состоянии и не может вызывать описанный фенотип при отсутствии патогенных вариантов во второй копии гена.

Ген	Ассоциированное заболевание (Номер OMIM; Тип наследования*)	Изменение ДНК (hg19) Изменение транскрипта Изменение белка	Зиготность	Частота	Компьютерное предсказание	Эволюционная консервативность	Классификация патогенности
<i>CNGBI</i>	Пигментный ретинит, тип 45 (613767; AR)	chr16:g.57953008del ENST00000251102.8: c.1952del ENSP00000251102.8: p.Leu651ArgfsTer4	Гетерозигота	0	Патогенный	-	Вероятно патогенный

Обнаружен ранее не описанный в литературе вариант в гетерозиготном состоянии в 20 экзоне (из 33) в гене *CNGBI*, приводящий к сдвигу рамки считывания и преждевременной терминации трансляции белка (p.Leu651ArgfsTer4, мутация типа фреймшифт).

Патогенные биаллельные варианты в данном гене могут приводить к развитию пигментного ретинита:

1. Nassisi M, Smirnov VM, Solis Hernandez C, et al. CNGBI-related rod-cone dystrophy: A mutation review and update. *Hum Mutat.* 2021 Jun;42(6):641-666. doi: 10.1002/humu.24205. Epub 2021 May 16. PMID: 33847019; PMCID: PMC8218941.

Вариант отсутствует в базе данных популяционных частот gnomAD.

Вариант расценивается как вероятно патогенный.

Данный вариант обнаружен в гетерозиготном состоянии и не может вызывать описанный фенотип при отсутствии патогенных вариантов во второй копии гена.

Ген	Ассоциированное заболевание (Номер ОМИМ; Тип наследования*)	Изменение ДНК (hg19) Изменение транскрипта Изменение белка	Зиготность	Частота	Компьютерное предсказание	Эволюционная консервативность	Классификация патогенности
<i>USH2A</i>	Синдром Ашера, тип 2А (276901; AR) Пигментный ретинит, тип 39 (613809; AR)	chr1:g.216040521T>C ENST00000307340.3: c.8682-9A>G	Гетерозигота	0.006%	Патогенный (SpliceAI)	-	Патогенный

Обнаружен ранее описанный в литературе вариант (rs372347027) в гетерозиготном состоянии в 43 интроне (из 71) в гене *USH2A* (с.8682-9A>G).

Патогенные биаллельные варианты в данном гене могут приводить к развитию синдрома Ашера, а также к пигментному ретиниту. Обнаруженный вариант был описан в компаунд-гетерозиготном состоянии у пациентов с синдромом Ашера:

1. Sengillo JD, Cabral T, Schuerch K, et al. Electroretinography Reveals Difference in Cone Function between Syndromic and Nonsyndromic USH2A Patients. *Sci Rep.* 2017 Sep 11;7(1):11170. doi: 10.1038/s41598-017-11679-y. PMID: 28894305; PMCID: PMC5593892.
2. Glöckle N, Kohl S, Mohr J, et al. Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies. *Eur J Hum Genet.* 2014 Jan;22(1):99-104. doi: 10.1038/ejhg.2013.72. Epub 2013 Apr 17. PMID: 23591405; PMCID: PMC3865404.

Вариант присутствует в базе данных популяционных частот gnomAD с частотой 0.006% (18 носителей, гомозиготных носителей не зарегистрировано).

Результат *in silico* алгоритма предсказания эффекта вариантов (SpliceAI) свидетельствует о патогенном влиянии данной замены на сплайсинг, приводя к нарушению акцепторного сайта сплайсинга.

В базе данных ClinVar вариант описан как патогенный и вероятно патогенный (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/197510>).

Вариант присутствует в курируемой базе данных Global Variome shared LOVD, классифицирован как патогенный, вероятно патогенный, а также как вариант с неизвестной клинической значимостью (<https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000647552#00000008>).

Вариант расценивается как патогенный.

Данный вариант обнаружен в гетерозиготном состоянии и не может вызывать описанный фенотип при отсутствии патогенных вариантов во второй копии гена.

Ген	Ассоциированное заболевание (Номер ОМИМ; Тип наследования*)	Изменение ДНК (hg19) Изменение транскрипта Изменение белка	Зиготность	Частота	Компьютерное предсказание	Эволюционная консервативность	Классификация патогенности
<i>NPHS2</i>	Нефротический синдром, тип 2 (600995; AR)	chr1:g.179530462C>T ENST00000367615.4: c.413G>A ENSP00000356587.4: p.Arg138Gln	Гетерозигота	0.06%	Патогенный (FATHMM-XF, REVEL, PROVEAN)	Консервативный	Патогенный

Обнаружен ранее описанный в литературе вариант (rs74315342) в гетерозиготном состоянии в 3 экзоне (из 8) в гене *NPHS2*, приводящий к замене аминокислоты аргинин на глутамин в положении 138 (p.Arg138Gln, мутация типа миссенс).

Патогенные биаллельные варианты в данном гене могут приводить к развитию нефротического синдрома. Обнаруженный вариант был описан в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии у пациентов с этим заболеванием:

1. Baylarov R, Senol O, Atan M, Berdeli A. NPHS2 gene mutations in azerbaijani children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2020 Jan-Feb;31(1):144-149. doi: 10.4103/1319-2442.279934. PMID: 32129207.
2. Bouchireb K, Boyer O, Gribouval O, et al. NPHS2 mutations in steroid-resistant nephrotic syndrome: a mutation update and the associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat.* 2014 Feb;35(2):178-86. doi: 10.1002/humu.22485. Epub 2013 Dec 9. PMID: 24227627.

Вариант присутствует в базе данных популяционных частот gnomAD с частотой 0.06% (163 носителя, гомозиготных носителей не зарегистрировано).

Результаты *in silico* алгоритмов предсказания эффекта вариантов свидетельствуют о патогенном (FATHMM-XF, REVEL, PROVEAN) влиянии данной замены на структуру белка. Вариант затрагивает консервативную аминокислоту.

В базе данных ClinVar вариант описан как патогенный (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/5360>).

Вариант описан в базе данных ОМИМ в ассоциации с нефротическим синдромом (<https://omim.org/entry/604766#0001>).

Вариант присутствует в курируемой базе данных Global Variome shared LOVD, классифицирован как патогенный (<https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000021700#00014736>).

Вариант расценивается как патогенный.

Данный вариант обнаружен в гетерозиготном состоянии и не может вызывать описанный фенотип при отсутствии патогенных вариантов во второй копии гена.

ПОБОЧНО ВЫЯВЛЕННЫЕ ВАРИАНТЫ В ГЕНАХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ К ПРОВЕРКЕ

Не обнаружено

* AR, Autosomal recessive, аутосомно-рецессивный тип наследования
AD, Autosomal dominant, аутосомно-доминантный тип наследования

Для интерпретации результатов исследования необходима консультация врача-генетика.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Прибор	Illumina NovaSeq 6000	Среднее покрытие	X
Система целевого обогащения	Sure Select all Exon V7	Процент целевых нуклеотидов с покрытием >10X	%

Дата выдачи заключения:

Биоинформатик

Врач-лабораторный генетик

Врач-генетик

ТЕХНИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

Секвенирование белок кодирующих генов человека методом парно-концевых прочтений, было проведено с использованием целевого обогащения геномной ДНК.

Исходные данные секвенирования в формате fastq могут быть предоставлены по запросу.

Данные секвенирования были проанализированы с помощью автоматизированного алгоритма, заключающего в себя оценку параметров качества секвенирования (модуль FASTQC); удаление адаптеров и последовательностей с низким качеством (модуль SEQPURGE); выравнивание прочтений на версию hg19 генома человека (модуль BWA MEM); фильтрацию оптических и ПЦР дубликатов (модуль SAMBLASTER); локальную оптимизацию выравниваний (модуль ABRA2); обнаружение вариантов и их фильтрация согласно качеству (пакет FREEBAYES) и аннотацию вариантов относительно баз данных с клинической информацией (модуль ENSEMBL-VEP).

Алгоритм был протестирован на экзомных данных, для которых существует расшифровка генома «золотого стандарта» (данные Genome in a Bottle). Чувствительность алгоритма составила 98,6% и средняя специфичность 99,1%.

При поиске клинически значимых генетических вариантов были отфильтрованы варианты, не влияющие на структуру белка и при этом не отмеченные как патогенные в базе данных ClinVar, а также все варианты, не отмеченные как патогенные в базе данных ClinVar, с максимальной частотой встречаемости в популяциях более 2%. Во всех генах, потенциально имеющих отношение к заболеванию пациента, каждый из вариантов был проанализирован на предмет влияния на структуру и функцию белка, эволюционную консервативность позиции, клинический статус, частоту встречаемости и тип наследования соответствующего гена и классифицирован в одну из пяти категорий (патогенные варианты, вероятно патогенные варианты, варианты неопределенного значения, вероятно безвредные варианты, безвредные) в соответствии с рекомендациями ACMG (7). Варианты из категорий «Патогенные варианты», «Вероятно патогенные варианты» и «Варианты неопределенного значения» включены в заключение в формате, соответствующем рекомендациям HGVS.

Повторный биоинформатический анализ исходных данных по запросу может быть проведен через год либо в случае уточнения фенотипа.

ИНФОРМАЦИОННОЕ ПРИЛОЖЕНИЕ

МЕТОДИКА ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Полноэкзомное секвенирование – это секвенирование всех белок-кодирующих генов человека (приблизительно 20 000), а секвенирование экзома с клинической целью – это секвенирование порядка 5000 генов, про которые на настоящий момент известна ассоциация с генетическими болезнями или признаками. Экзом составляет всего ~1% от полного генома человека, но приблизительно 85% всех болезнетворных вариантов находятся именно в белок-кодирующих областях. С помощью технологии секвенирования экзома можно определить последовательность 90-95% целевых участков человека, и некоторые участки поддаются секвенированию с помощью этой методики несколько хуже. Способность метода выявить болезнетворный вариант зависит от того, в каком участке он находится.

Метод предназначен для поиска однонуклеотидных замен в кодирующих участках генов человека. Некоторые другие типы генетических вариантов могут быть выявлены, но поддаются обнаружению с меньшей вероятностью, чем однонуклеотидные замены: это относится, в частности, к коротким делециям или вставкам (инделам) и изменениям числа коротких tandemных повторов.

Результативность обследования сильно зависит от наличия информации о варианте во внешних базах данных клинической информации, а также от изученности генетического заболевания пациента. В настоящий момент изучение генетических заболеваний является приоритетным направлением исследований во всем мире, и базы данных с клинической информацией постоянно пополняются. В практике клинического секвенирования экзома процент диагностированных случаев растет с каждым годом, поэтому в некоторых случаях переанализ данных секвенирования через некоторое время может привести к установлению диагноза, даже если изначально он не был поставлен.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Ввиду некоторых технических ограничений, секвенирование экзома не может покрыть 100% целевых участков. Мы обеспечиваем необходимое для достоверного обнаружения гетерозиготных вариантов покрытие: не менее 10x для 90% целевых участков. Частота ошибочно обнаруженных вариантов при секвенировании экзома в среднем составляет не больше 1%, но в отдельных участках может достигать 5%, поэтому релевантные варианты рекомендуется подтверждать независимым секвенированием по Сэнгеру или другими референсными методами, если такая возможность существует.

Некоторые типы вариантов поддаются выявлению методом экзомного секвенирования плохо, в том числе структурные изменения хромосом (инверсии, транслокации, делеции), полиплоидия, анеуплоидия, протяженные участки триплетных и других повторов, варианты в генах с наличием в геноме близкого по последовательности псевдогена или паралога, варианты в GC-богатых участках, варианты в интронах за пределами стандартных сайтов сплайсинга, а также эпигенетические варианты. Метод имеет ограниченную чувствительность в отношении вариантов в состоянии мозаицизма. Чувствительность и специфичность обнаружения вариантов, находящихся в областях сегментарных дупликаций, могут быть низкими.

Результаты клинического секвенирования всегда интерпретируются в контексте клинической картины, семейной истории и других лабораторных данных. Изучаются только варианты, которые потенциально могут иметь отношение к заболеванию пациента. Результаты секвенирования экзома могут быть интерпретированы неверно, если предоставленная информация ошибочна или неполна. Некоторые медицинские процедуры, такие как пересадка костного мозга или переливание крови могут привести к неверным результатам. Редкие безвредные варианты могут быть классифицированы неверно. Выявленные варианты не всегда объясняют все клинические проявления у пациента. Предоставление большего количества клинически значимой информации может помочь более точной оценке значимости выявленных вариантов.

ПОБОЧНО ВЫЯВЛЕННЫЕ ВАРИАНТЫ

ACMG разработал рекомендации (8) по предоставлению информации пациенту о патогенных и вероятно патогенных вариантах, присутствующих в некоторых генах (ACT2, ACTC1, APC, APOB, ATP7B, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, CACNA1S, COL3A1, DSC2, DSP, FBN1, GLA, KCNH2, KCNQ1, LDLR, LMNA, MEN1, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, MYBPC3, MYH11, MYH7, MYL2, MYL3, NF2, OTC, PCSK9, PKP2, PMS2, PRKAG2, PTEN, RB1, RET, RYR1, RYR2, SCN5A, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD3, SMAD4, STK11, TGFBR1, TGFBR2, TMEM43, TNNI3, TNNT2, TP53, TPM1, TSC1, TSC2, VHL, WT1). Эти гены связаны с определенными генетическими заболеваниями, нуждающимися в медицинском контроле. В случае обнаружения вариантов в этих генах необходима консультация врача-генетика.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА И РЕСУРСЫ

1. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
2. Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
3. Genome Aggregation Database (gnomAD). <http://gnomad.broadinstitute.org/>
4. ClinVar. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
5. Clinical Genome Resource, ClinGene. <https://www.clinicalgenome.org/>
6. Ensembl. <http://www.ensembl.org/index.html>
7. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015
8. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. Genet Med. 2017