

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

СВЕДЕНИЯ ОБ ОБСЛЕДУЕМОМ		СВЕДЕНИЯ ОБ ОБРАЗЦЕ	
Обследуемый	-	Дата поступления образца	-
Дата рождения	-	Материал для анализа	Кровь
Пол	Женский	Внутренний номер	-

КЛИНИЧЕСКАЯ ИНФОРМАЦИЯ	
Направляющий врач	
Предположительный диагноз	Прекоцепционный генетический скрининг
Клинические характеристики	-

РЕЗУЛЬТАТ ИССЛЕДОВАНИЯ

НОСИТЕЛЬСТВО ВАРИАНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РЕЦЕССИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Ген	Ассоциированное заболевание (Номер ОМIM; тип наследования*)	Изменение ДНК (hg19) Изменение транскрипта Изменение белка	Зиготность	Частота	Компьютерное предсказание	Эволюционная консервативность	Классификация патогенности
<i>CNGB1</i>	Пигментный ретинит, тип 45 (613767; AR)	chr16:g.57996515C>T ENST00000251102.8: c.413-1G>A	Гетерозигота	0,007%	-	-	Патогенный

Обнаружен ранее описанный в литературе вариант (rs189234741) в гетерозиготном состоянии в 6 интроне (из 32) гена *CNGB1*, приводящий к нарушению канонического сайта сплайсинга: c.413-1G>A.

Патогенные биаллельные варианты в данном гене могут приводить к развитию пигментного ретинита. Обнаруженный вариант был описан в гомозиготном состоянии у пациентов с этим заболеванием:

1. van Huet RA, et al. The efficacy of microarray screening for autosomal recessive retinitis pigmentosa in routine clinical practice. Mol Vis. 2015 Apr 28;21:461-76. PMID: 25999674
2. Saqib MA, et al. Homozygosity mapping reveals novel and known mutations in Pakistani families with inherited retinal dystrophies. Sci Rep. 2015 May 6;5:9965. PMID: 25943428

Вариант присутствует в базе данных популяционных частот gnomAD с частотой 0,007% (21 гетерозиготный носитель, гомозигот не зарегистрировано).

В базе данных ClinVar вариант описан как патогенный, вероятно патогенный (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/437976>).

Вариант присутствует в курируемой базе данных Global Variome shared LOVD, классифицирован как патогенный, вероятно патогенный (<https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000817944#00005382>).

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 ОМIM; тип наследования*)	Изменение ДНК (hg19) Изменение транскрипта Изменение белка	Зиготность	Частота	Компьютерное предсказание	Эволюционная консервативность	Классификация патогенности
<i>GBA</i>	Перинатальная летальная болезнь Гоше (608013; AR) Болезнь Гоше I типа (230800; AR) Болезнь Гоше II типа (230900; AR) Болезнь Гоше III типа (231000; AR) Болезнь Гоше типа IIIC (231005; AR)	chr1:g.155205043A>G ENST00000327247.5: c.1448T>C ENSP00000314508.5: p.Leu483Pro	Гетерозигота	0,1%	Патогенный (MetaSVM, SIFT, MutationTaster)	Умеренно консервативный	Патогенный

Обнаружен ранее описанный в литературе вариант в гетерозиготном состоянии в 11 экзоне (из 12) гена *GBA*, приводящий к замене аминокислоты лейцин на пролин в положении 483 (p.Leu483Pro, мутация типа миссенс).

Патогенные биаллельные варианты в данном гене могут приводить к развитию болезни Гоше различных типов. Обнаруженный вариант был описан в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии у пациентов с болезнью Гоше типов I и II (также в литературе упоминается как p.Leu444Pro):

1. Grabowski GA, et al. Gaucher disease types 1 and 3: Phenotypic characterization of large populations from the ICGG Gaucher Registry. Am J Hematol. 2015 Jul;90 Suppl 1:S12-8. PMID: 26096741
2. Tammachote R, et al. A common and two novel GBA mutations in Thai patients with Gaucher disease. J Hum Genet. 2013 Sep;58(9):594-9. PMID: 23719189

Вариант присутствует в базе данных популяционных частот gnomAD с частотой 0,1% (345 гетерозиготных носителей, гомозигот не зарегистрировано).

Результаты *in silico* алгоритмов предсказания эффекта вариантов свидетельствуют о патогенном (MetaSVM, SIFT, MutationTaster) влиянии данной замены на структуру белка. Вариант затрагивает умеренно консервативную аминокислоту.

В базе данных ClinVar вариант описан как патогенный, вероятно патогенный (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/4288>).

Вариант описан в базе данных OMIM в ассоциации с болезнью Гоше типов I и II (<https://omim.org/entry/606463#0001>, <https://omim.org/entry/606463#0009>).

Вариант присутствует в курируемой базе данных Global Variome shared LOVD, классифицирован как патогенный, вариант неопределенной клинической значимости (<https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000321026#00000025>).

Вариант расценивается как патогенный.

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

Данный вариант также обнаружен у супруга.

Ген	Ассоциированное заболевание (Номер OMIM; тип наследования*)	Изменение ДНК (hg19) Изменение транскрипта Изменение белка	Зиготность	Частота	Компьютерное предсказание	Эволюционная консервативность	Классификация патогенности
<i>NRHP3</i>	Синдром Меккеля, тип 7 (267010; AR) Нефронофтизис, тип 3 (604387; AR) Дисплазия почек, печени и поджелудочной железы, тип 1 (208540; AR)	chr3:g.132408108_132408109del ENST00000337331.5: c.2694-2_2694-1del -	Гетерозигота	0,03%	-	-	Патогенный

Обнаружен ранее описанный в литературе вариант (rs751527253) в гетерозиготном состоянии в 19 интроне (из 26) гена *NRHP3*, приводящий к нарушению канонического сайта сплайсинга: c.2694-2_2694-1del, активации криптического сайта сплайсинга в интроне 19, вставке дополнительных 19 нуклеотидных остатков в последовательность экзона и возникновению преждевременного стоп-кодона.

Патогенные биаллельные варианты в данном гене могут приводить к развитию синдрома Меккеля типа 7, нефронофтиза типа 3 и дисплазии почек, печени и поджелудочной железы типа 1. Обнаруженный вариант был описан в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии у пациентов с этим заболеванием:

1. Bergmann C, et al. Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. Am J Hum Genet. 2008 Apr;82(4):959-70. PMID: 18371931
2. Fiskerstrand T, et al. Identification of a gene for renal-hepatic-pancreatic dysplasia by microarray-based homozygosity mapping. J Mol Diagn. 2010 Jan;12(1):125-31. PMID: 20007846
3. Halbritter J, et al. Identification of 99 novel mutations in a worldwide cohort of 1,056 patients with a nephronophthisis-related ciliopathy. Hum Genet. 2013 Aug;132(8):865-84. PMID: 23559409

Вариант присутствует в базе данных популяционных частот gnomAD с частотой 0,03% (78 гетерозиготных носителей, гомозигот не зарегистрировано).

В базе данных ClinVar вариант описан как патогенный, вероятно патогенный (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/220868>).

Вариант описан в базе данных OMIM в ассоциации с синдромом Меккеля типа 7 и дисплазией почек, печени и поджелудочной железы типа 1 (<https://omim.org/entry/608002#0004>).

Вариант присутствует в курируемой базе данных Global Variome shared LOVD, классифицирован как патогенный (<https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000517962#00025697>).

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

Для интерпретации результатов исследования необходима консультация врача-генетика.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

Дата выдачи заключения:

Биоинформатик

Заведующая лабораторией NGS

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 известных генах, ассоциированных с развитием моногенных рецессивных заболеваний, 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» и «Вероятно патогенные варианты» и «Варианты неопределенного значения» включены в заключение в формате, соответствующем рекомендациям HGVS. В особых случаях лаборатория оставляет за собой право включить в заключение генетические варианты из категории «Варианты неопределенного значения».

Скрининг носительства рецессивных заболеваний может позволить уточнить генетические риски, но не позволяет полностью исключить их.

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 экзона 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 экзона 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 экзона 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 экзона 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 экзона 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 экзона 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 (*ACTA2, ACTC1, APC, APOB, ATP7B, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, CACNA1S, COL3A1, DSC2, DSG2, 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, TGFB1, TGFB2, 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
9. Sequence Variant Nomenclature <https://varnomen.hgvs.org/>