Классификация вариантов нуклеотидной последовательности по степени патогенности

Резник Александр Олегович,

врач-генетик, биомедицинский холдинг «Атлас»

Генетические школы
genschool.ru

Лекция прочитана в рамках проекта Genschool.ru

Структура презентации

1. Мутации/полиморфизмы – варианты
2. Руководства по интерпретации вариантов нуклеотидной последовательности (ВНП)
3. Правила интерпретации вариантов нуклеотидной последовательности по степени патогенности
4. Использование правил на практике

Мутации/полиморфизмы
➡ варианты

Классификация изменений в ДНК

Karki *et al. BMC Medical Genomics* (2015) 8:37
DOI 10.1186/s12920-015-0115-z

BMC Medical Genomics

DEBATE Open Access

Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics

Roshan Karki[1], Deep Pandya[1], Robert C. Elston[2] and Cristiano Ferlini[1*]

"Mutation" and "polymorphism": earlier definitions

The uniform and unequivocal description of sequence variants in human DNA and protein sequences (mutations, polymorphisms) were initiated by two papers published in 1993 [20, 21]. In this context, any rare change in the nucleotide sequence, usually but not always with a disease causing attribute, is termed a "mutation" [22]. This change

Классификация изменений в ДНК

Karki *et al. BMC Medical Genomics* (2015) 8:37
DOI 10.1186/s12920-015-0115-z

BMC Medical Genomics

DEBATE Open Access

Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics

Roshan Karki[1], Deep Pandya[1], Robert C. Elston[2] and Cristiano Ferlini[1*]

"Mutation" and "polymorphism": earlier definitions

The uniform and unequivocal description of sequence variants in human DNA and protein sequences (mutations, polymorphisms) were initiated by two papers published in 1993 [20, 21]. In this context, any rare change in the nucleotide sequence, usually but not always with a disease causing attribute, is termed a "mutation" [22]. This change

The anatomy of the problem

In the era of advanced DNA sequencing tools and personal genomics, these earlier definitions of mutation and polymorphism are antiquated. Before multiple parallel sequencing was developed, it was impossible to sequence multiple times the genome of the same patient. For these reasons at that time it was required to use a reference sequence coming from the assembly of multiple genomes. In the preparation of the consensus sequence, an arbitrary threshold of 1 % was established to distinguish common (polymorphism) from rare (mutation) variants [26].

Руководства по интерпретации вариантов нуклеотидной последовательности (ВНП)

Основы классификации вариантов нуклеотидной последовательности

SPECIAL ARTICLE

Human Mutation

OFFICIAL JOURNAL
HGVS
HUMAN GENOME VARIATION SOCIETY
www.hgvs.org

HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update

Johan T. den Dunnen,[1]* Raymond Dalgleish,[2] Donna R. Maglott,[3] Reece K. Hart,[4] Marc S. Greenblatt,[5] Jean McGowan-Jordan,[6] Anne-Francoise Roux,[7] Timothy Smith,[8] Stylianos E. Antonarakis,[9] and Peter E.M. Taschner[10] on behalf of the Human Genome Variation Society (HGVS), the Human Variome Project (HVP), and the Human Genome Organisation (HUGO)

[1]Human Genetics & Clinical Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden, Nederland; [2]Department of Genetics, University of Leicester, Leicester, United Kingdom; [3]National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland; [4]Invitae, Inc., San Francisco, California; [5]University of Vermont College of Medicine, Burlington, Vermont; [6]Children's Hospital of Eastern Ontario and University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada; [7]Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHRU Montpellier, Montpellier, France; [8]Human Variome Project International Coordinating Office, Melbourne, Australia; [9]Department of Genetic Medicine, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland; [10]Generade Centre of Expertise Genomics and University of Applied Sciences Leiden, Leiden, The Netherlands

For the 25th Anniversary Commemorative Issue

Received 7 December 2015; accepted revised manuscript 18 February 2016.
Published online 2 March 2016 in Wiley Online Library (www.wiley.com/humanmutation). DOI: 10.1002/humu.22981

http://varnomen.hgvs.org/recommendations/general/

Классификация изменений в ДНК сегодня

acgs
Association for Clinical Genetic Science
Part of the British Society for Genetic Medicine

ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification 2017

Sian Ellard[1,2], Emma L Baple[2,3], Martina Owens[1], Diana M Eccles[4], Stephen Abbs[5], Zandra C Deans[6], William G Newman[7] and Dominic J McMullan[8]

1. Department of Molecular Genetics, Royal Devon & Exeter NHS Foundation Trust, Exeter, EX2 5DW, UK.
2. University of Exeter Medical School, Exeter, EX2 5DW, UK.
3. Department of Clinical Genetics, Royal Devon & Exeter NHS Foundation Trust, Exeter, EX2 5DW, UK.
4. Wessex Clinical Genetics Service, University Hospital Southampton, Southampton SO16 5YA, UK.
5. East Anglian Medical Genetics Service, Addenbrooke's Hospital, Cambridge CB2 0QQ, UK.
6. UK NEQAS for Molecular Genetics, Department of Laboratory Medicine, Royal infirmary of Edinburgh, Edinburgh EH16 4SA, UK.
7. Manchester Centre for Genomic Medicine, Central Manchester University Hospitals NHS Foundation Trust, Manchester M13 9WL, UK.
8. West Midlands Regional Genetics Laboratory, Birmingham Women's NHS Foundation Trust, Birmingham, B15 2TG, UK.

Recommendations ratified by ACGS Quality Subcommittee on XXX 2017).

Variants are classified as "pathogenic", "likely pathogenic", uncertain significance", "likely benign" or "benign" with respect to a disease and inheritance pattern. The variant classification must be included within the main body of the clinical diagnostic report together with the gene-disease association and the mode of inheritance. The evidence supporting the variant classification may be included in an appendix (see example in Figure 3) or made available by the laboratory upon request.

European Journal of Human Genetics (2016) 24, 2–5
© 2016 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 1018-4813/16
www.nature.com/ejhg

EJHG Open

POLICY

Guidelines for diagnostic next-generation sequencing

Gert Matthijs*[,1,8], Erika Souche[1,8], Mariëlle Alders[2], Anniek Corveleyn[1], Sebastian Eck[3], Ilse Feenstra[4], Valérie Race[1], Erik Sistermans[5], Marc Sturm[6], Marjan Weiss[5], Helger Yntema[4], Egbert Bakker[7], Hans Scheffer[4] and Peter Bauer[6]

2016

College of American Pathologists' Laboratory Standards for Next-Generation Sequencing Clinical Tests

Nazneen Aziz, PhD; Qin Zhao, PhD; Lynn Bry, MD, PhD; Denise K. Driscoll, MS, MT(ASCP)SBB; Birgit Funke, PhD; Jane S. Gibson, PhD; Wayne W. Grody, MD; Madhuri R. Hegde, PhD; Gerald A. Hoeltge, MD; Debra G. B. Leonard, MD, PhD; Jason D. Merker, MD, PhD; Rakesh Nagarajan, MD, PhD; Linda A. Palicki, MT(ASCP); Ryan S. Robetorye, MD; Iris Schrijver, MD; Karen E. Weck, MD; Karl V. Voelkerding, MD

2015

© American College of Medical Genetics and Genomics
ACMG STANDARDS AND GUIDELINES | Genetics inMedicine

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

Sue Richards, PhD[1], Nazneen Aziz, PhD[2,16], Sherri Bale, PhD[3], David Bick, MD[4], Soma Das, PhD[5], Julie Gastier-Foster, PhD[6,7,8], Wayne W. Grody, MD, PhD[9,10,11], Madhuri Hegde, PhD[12], Elaine Lyon, PhD[13], Elaine Spector, PhD[14], Karl Voelkerding, MD[13] and Heidi L. Rehm, PhD[15]; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

2015

© American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG STANDARDS AND GUIDELINES | Genetics inMedicine

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

2015

Sue Richards, PhD[1], Nazneen Aziz, PhD[2,16], Sherri Bale, PhD[3], David Bick, MD[4], Soma Das, PhD[5], Julie Gastier-Foster, PhD[6,7,8], Wayne W. Grody, MD, PhD[9,10,11], Madhuri Hegde, PhD[12], Elaine Lyon, PhD[13], Elaine Spector, PhD[14], Karl Voelkerding, MD[13] and Heidi L. Rehm, PhD[15]; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

© American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG STANDARDS AND GUIDELINES | Genetics inMedicine

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

Sue Richards, PhD[1], Nazneen Aziz, PhD[2,16], Sherri Bale, PhD[3], David Bick, MD[4], Soma Das, PhD[5], Julie Gastier-Foster, PhD[6,7,8], Wayne W. Grody, MD, PhD[9,10,11], Madhuri Hegde, PhD[12], Elaine Lyon, PhD[13], Elaine Spector, PhD[14], Karl Voelkerding, MD[13] and Heidi L. Rehm, PhD[15]; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

2015

ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS)

Рыжкова О.П.[1], Кардымон О.Л.[2], Прохорчук Е.Б.[3], Коновалов Ф.А.[4], Масленников А.Б.[5], Степанов В.А.[6], Афанасьев А.А.[7], Заклязьминская Е.В.[8], Костарева А.А.[9], Павлов А.Е.[10], Голубенко М.В.[6], Поляков А.В.[1], Куцев С.И.[1]

2017

Варианты нуклеотидной последовательности

- Патогенный (pathogenic) – изменения с достаточной доказательной базой для того, чтобы рассматривать их как причину проявления фенотипа, соответствующего заболеванию
- Вероятно патогенный вариант (likely pathogenic) – ранее не описанное изменение, приводящее к проявлению фенотипа, соответствующего заболеванию
- Неопределенного значения (variant of uncertain significance, VUS) – ранее не описанный вариант, который может быть ассоциирован с заболеванием, равно как может и не приводить к развитию болезни
- Вероятно доброкачественный (likely benign) – ранее не описанный вариант, скорее всего не связанный с развитием заболевания
- Доброкачественный (benign) – ранее описанный как не связанный с заболеванием вариант нуклеотидной последовательности

Правила интерпретации вариантов нуклеотидной последовательности по степени патогенности

Варианты: классификация 1

название	обозначение	Описание
Замена (substitution)	g.1318G>T	замена одного нуклеотидного основания на другое в отдельно взятой нуклеотидной последовательности (и ее сравнение с референсной нуклеотидной последовательностью).
Делеции (deletion)	g.3661_3706del	Изменение в последовательности, при котором из нее удаляется один и более нуклеотид
Инверсии (inversion)	g.495_499inv	Изменение в последовательности, при котором происходит замена более чем одного нуклеотида оригинальной последовательности на обратно-комплементарный фрагмент
Дупликации (duplication)	g.3661_3706dup	Изменение в последовательности, при котором копия одного и более нуклеотидов вставляется непосредственно с 3’ конца оригинальной последовательности
Инсерции (insertion)	g.7339_7340insTAGG	Изменение в последовательности, при котором один и более нуклеотидов вставляются в последовательность и эта вставка не является непосредственной копией последовательности с 5’ конца
Конверсия (conversion)	g.333_590con1844_2101	Разновидность инверсии-делеции, при которой набор нуклеотидов, замещающий оригинальную последовательность, является копией нуклеотидной последовательности другого участка генома
Делеция-инсерция (delins/indel)	g.112_117delinsTG	Изменения, при которых один и более нуклеотидов заменяется одним и более нуклеотидами, при этом изменение не относится к замене, инверсии или конверсии

Референсные последовательности (транскрипты)

Что используется в качестве референса	префикс	Откуда ведется нумерация позиции
Геномная ДНК	g.	Первый нуклеотид референсной геномной последовательности
Кодирующая ДНК	c.	Первый нуклеотид старт-кодона
Некодирующая ДНК	n.	Первый нуклеотид некодирующей ДНК-последовательности
Митохондриальная ДНК	m.	Первый нуклеотид референсной митохондриальной ДНК
РНК	r.	Первый нуклеотид старт-кодона РНК или первый нуклеотид некодирующей последовательности РНК
Белок	p.	Первая аминокислота белковой последовательности

Референсные последовательности (транскрипты)

Что используется в качестве референса	префикс	Откуда ведется нумерация позиции
Геномная ДНК	g.	Первый нуклеотид референсной геномной последовательности
Кодирующая ДНК	c.	Первый нуклеотид старт-кодона
Некодирующая ДНК	n.	Первый нуклеотид некодирующей ДНК-последовательности
Митохондриальная ДНК	m.	Первый нуклеотид референсной митохондриальной ДНК
РНК	r.	Первый нуклеотид старт-кодона РНК или первый нуклеотид некодирующей последовательности РНК
Белок	p.	Первая аминокислота белковой последовательности

Референсная последовательность должна быть наиболее клинически значимой и/или наиболее длинной из всех известных

Рекомендованные референсные транскрипты могут быть обнаружены в следующих базах данных:

1. Locus Reference Genomic - https://www.lrg-sequence.org
2. Consensus CDS Database - https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcdsBrowse.cgi
3. Human Gene Mutation Database - http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
4. ClinVar - https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
5. Локус-специфичные базы данных - https://grenada.lumc.nl/LSDB_list/lsdbs

Рекомендуемые базы данных нуклеотидной последовательности человека. Популяционные базы данных.

Название базы данных + ссылка	Описание
Exome Aggregation Consortium http://exac.broadinstitute.org/	База данных вариантов, найденных при проведении экзомного секвенирования образцов ДНК от 61,486 участников различных популяционных генетических исследований. В выборку не входят лица с наследственными заболеваниями, проявляющимися в детстве.
Genome Aggregation Database http://gnomad.broadinstitute.org/	Расширенная база данных геномных вариантов, построенная на основе ExAC, включает данные о 123 136 экзомах и 15 496 геномах
Exome Variant Server http://evs.gs.washington.edu/EVS	База данных вариантов, найденных при экзомном секвенировании нескольких крупных когорт лиц европейского и афроамериканского происхождения. Включает данные о покрытии.
1000 Genomes Project http://browser.1000genomes.org	База данных, обнаруженных во время геномного и таргетного секвенирования с низким и высоким покрытием в 26 популяциях. Включает данные низкого качества
dbSNP http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp	База данных коротких генетических вариантов (менее 50 п.н.), собранных из различных источников. Содержит доброкачественные, вероятно доброкачественные и патогенные варианты
dbVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar	База данных структурных вариантов (более 50 п.н.)

Рекомендуемые базы данных нуклеотидной последовательности человека. Фенотипы.

Название базы данных + ссылка	Описание
OMIM http://www.omim.org/	База данных генов человека и генетических состояний, которая содержит репрезентативную выборку вариантов нуклеотидной последовательности, ассоциированных с заболеваниями
Human Gene Mutation Database http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php	База данных аннотированных вариантов нуклеотидной последовательности, опубликованных в литературе. Доступ к большей части информации платный. В базу включены доброкачественные и вероятно доброкачественные варианты.
ClinVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clin-var	База данных утверждений о клинической значимости и фенотипической взаимосвязи вариантов. Включает данные низкого качества, поэтому ее использование при формировании заключений не рекомендуется. Может использоваться для поиска литературных источников.

Рекомендуемые базы данных нуклеотидной последовательности человека. Специфичные базы данных (локус/болезнь/этническая принадлежность).

Название базы данных + ссылка	Описание
Human Genome Variation Society http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html Leiden Open Variation Database http://www.lovd.nl	Сайт общества по изучению вариаций генома человека. Создан список тысяч баз данных, которые предоставляют варианты аннотации конкретных вариантов нуклеотидной последовательности человека. Многие базы данных представлены в системе Leiden Open Variation Database system
DECIPHER http://decipher.sanger.ac.uk	Молекулярно-цитогенетическая база данных для врачей и исследователей, связывающая геномные данные, полученные при генотипировании, с фенотипами, используя геномный браузер Ensembl

Рекомендуемые базы данных нуклеотидной последовательности человека. Базы данных о кодирующей последовательности.

Название базы данных + ссылка	Описание
NCBI Genome http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome	Ресурс полногеномных референсных последовательностей
RefSeqGene http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg	Ресурс референсных последовательностей клинически значимых генов
MitoMap http://www.mitomap.org/MITOMAP	Исправленная кембриджская референсная последовательность митохондриальной ДНК человека

Рекомендации по работе с базами данных

При работе с базами данных необходимо:

1. Проверять частоту обновлений, курирование базы данных – следует использовать новейшую версию и/или базу данных, которую курирует институт с хорошей репутацией

2. Убедиться, что используется номенклатура HGVS, указаны референсные последовательности для сборки генома и транскриптов, используемых при наименовании вариантов

3. Проверить показатели качества, приводящиеся для оценки точности данных (может требовать анализа литературы)

4. Оценить источник и независимость исследований, содержащих информацию о варианте нуклеотидной последовательности

Рекомендации по работе с литературными источниками

На что следует обращать внимание:

1. С осторожностью использовать источники, в которых применяется старая номенклатура и классификация вариантов нуклеотидной последовательности

2. Всего один литературный источник с упоминанием варианта должен настораживать

3. Важно убедиться, что один и тот же случай не используется в нескольких публикациях

Алгоритмы предсказания эффекта вариантов нуклеотидной последовательности (*in silico* методы)

Можно использовать в случаях, когда вариант нуклеотидной последовательности:

- не был описан в литературных источниках ранее
- не представлен ни в одной из существующих баз данных
- имеющихся сведений о нем недостаточно для оценки клинической значимости

Автоматические алгоритмы предсказания эффекта миссенс-варианта

- ConSurf http://consurftest.tau.ac.il
- FATHMM http://fathmm.biocompute.org.uk
- MutationAssessor http://mutationassessor.org
- PANTHER http://www.pantherdb.org/tools/csnpScoreForm.jsp
- PhD-SNP http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html
- SIFT http://sift.jcvi.org
- SNPs&GO http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go
- Align GVGD http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php
- MAPP http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/MAPP/index.html
- MutationTaster http://www.mutationtaster.org
- MutPred http://mutpred.mutdb.org
- PolyPhen-2 http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
- PROVEAN http://provean.jcvi.org/index.php
- nsSNPAnalyzer http://snpanalyzer.uthsc.edu
- Condel http://bg.upf.edu/fannsdb/
- CADD http://cadd.gs.washington.edu

Автоматические алгоритмы предсказания эффекта вариантов в сайтах сплайсинга

- GeneSplicer http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml
- Human Splicing Finder http://www.umd.be/HSF/
- MaxEntScan http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
- NetGene2 http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2
- NNSplice http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
- FSPLICE http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fsplice&group=programs&subgroup=gfind

Критерии классификации вариантов нуклеотидной последовательности

- ВНП, ранее описанный в нескольких источниках (кроме ClinVar) и являющийся причиной развития интересующего фенотипа с соответствующим типом наследования, классифицируется как патогенный

- Для остальных вариантов – 2 набора критериев:
  1. Для классификации патогенных вариантов
  2. Для классификации доброкачественных вариантов

Критерии классификации вариантов нуклеотидной последовательности

1. Критерии патогенности: очень сильный (PVS1), сильный (PS1-4), средний (PM1-5), вспомогательный (PP1-5)

2. Критерии доброкачественности: очень сильный (независимый) (BA1), сильный (BS1-4), вспомогательный (BP1-6)

NB! *Соответствие анализируемого варианта нумерации признаков, характеризующих каждый критерий, не дает оснований для изменения его клинической значимости. Важно отнесение варианта к какому-либо критерию, нумерация признаков нужна для упрощения использования критериев.*

Критерии классификации вариантов нуклеотидной последовательности

В случае, если ВНП не отвечает критериям любого набора или доказательства патогенности/доброкачественности противоречивы, то такой вариант классифицируется как вариант неопределенного значения

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

1. Патогенный вариант

Критерий «очень сильный» (very strong, PVS):

PVS1: LOF-варианты – варианты, приводящие к прекращению синтеза белка (нонсенс-мутации; мутации со сдвигом рамки считывания; изменения канонических (+-1 или +-2) нуклеотидов сайта сплайсинга; варианты, приводящие к изменениям в стартовом кодоне; делеции/дупликации одного или нескольких экзонов), если данный тип ВНП гена является известной причиной заболевания.

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

Важно!

Есть гены, ВНП которых, приводящие к прекращению синтеза белка, не являются патогенными (GFAP, MYH7)

ВНП в непосредственной близости к 3’ концу гена следует интерпретировать с осторожностью

С осторожностью следует интерпретировать сплайс-варианты, которые ожидаемо приводят к пропуску экзонов, но оставляют часть белка нетронутой и не меняют рамку считывания

Необходима осторожность при наличии нескольких транскриптов

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

1. Патогенный вариант

Критерий «сильный» (strong, PS):

PS1: вариант, приводящий к замене на АК, которая ранее была описана как патогенная для этого заболевания, в том же положении.

e.g. Описана G>C, приводящая к Val>Leu, поэтому замена G>T, приводящая к такой же АК последовательности, будет соответствовать критерию PS1.

NB! Варианты, патогенность которых обусловлена изменением сайта сплайсинга, а не АК, относятся к PVS1

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

1. Патогенный вариант

Критерий «сильный» (strong, PS):

PS2: *de novo* вариант, отсутствующий у обоих родителей пациента.

Для отнесения к этому критерию необходимо подтверждение отцовства и материнства.

Донорство яйцеклеток, суррогатное материнство, ошибки при подсадке эмбриона в программах ЭКО и т.д. – причины «ложного» материнства

PS3: подтверждение патогенности эффекта ВНП функциональными исследованиями (*in vitro* и *in vivo*) гена или продукта гена.

Функциональные исследования должны быть: валидируемыми, воспроизводимыми. Их должны выполнять лаборатории с хорошей репутацией.

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

1. Патогенный вариант

Критерий «сильный» (strong, PS):

PS4: Распространенность варианта у больных индивидуумов значительно выше, чем в контрольной группе. Отношение шансов (OR), полученное при исследовании «случай-контроль» >5,0.

Если результаты исследования «случай-контроль» статистически не достоверны, очень редкий ВНП у нескольких не связанных родством пациентов с одинаковым фенотипом при его отсутствии в контрольной группе следует отнести к критерию средний (PM, moderate)

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

1. Патогенный вариант

Критерий «средний» (moderate, PM):

PM1: вариант расположен в «горячей» точке и/или важных и хорошо исследованных функциональных доменах белка (активный сайт фермента), в которых не описаны доброкачественные изменения.

PM2: вариант отсутствует в контрольной выборке (или встречается с крайне низкой частотой): для **АД** болезней частота аллеля не должна превышать **0,01%**, для **АР** болезней – **0,5%**, для доминантных Х-сцепленных – **0,03%**, для рециссивных Х-сцепленных – **0,5%**

Следует помнить о том, что данные о частоте в популяциях инсерций/делеций могут быть плохо аннотированы в БД, содержащих информацию о результатах NGS

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

1. **Патогенный вариант**

Критерий «средний» (moderate, PM):

PM3: вариант, находящийся в транс-положении с описанным патогенным вариантом при рецессивных заболеваниях. Для подтверждения требуется анализ родителей (или потомков).

PM4: вариант, приводящий к синтезу белка измененной длины (инсерции/делеции в рамках считывания в неповторяющихся регионах или потеря стоп-кодона/замена на аминокислоту).

PM5: новые миссенс-варианты, приводящие к замене АК в положении, в котором другие миссенс-варианты, выявленные ранее, были описаны как патогенные.

Следует с осторожностью относиться к интерпретации изменений нуклеотидной последовательности, которые влияют на сплайсинг.

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

1. Патогенный вариант

Критерий «вспомогательный» (supporting, PP):

PP1: вариант в гене, для которого точно установлена связь с болезнью вследствие косегрегации у нескольких пораженных членов семьи.

По мере накопления данных о сегрегации может быть отнесен к критерию «сильный» (PS).

PP2: миссенс-вариант в гене, в котором редки доброкачественные миссенс-варианты, но они являются обычной причиной возникновения заболевания.

PP3: результаты трех и более программ предсказания патогенности in silico подтверждают патогенное воздействие варианта на ген или генный продукт.

Важно помнить, что программы предсказания эффекта ВНП часто используют одинаковые или очень схожие алгоритмы – поэтому результаты использования нескольких программ не могут считаться независимыми и должны оцениваться только в сочетании. Критерий PP3 используется один раз и представляет собой комбинацию результатов всех программ предсказания патогенности

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

1. Патогенный вариант

Критерий «вспомогательный» (supporting, PP):

PP4: фенотип пациента и/или семейная история высоко специфичны для заболевания с данной наследственной этиологией

PP5: источники с хорошей репутацией указывают на патогенность вариантов, но независимая оценка не проводилась.

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

2. Доброкачественный вариант

Критерий «очень сильный (независимый)» (stand alone, BA):

BA1: частота аллеля >3% в базах данных ESP, 1KP или ExAc

Критерий «сильный» (strong, BS):

BS1: частота аллеля больше, чем ожидаемая для заболевания: для **АД** болезней не выше **0,01%**, для **АР** болезней – **0,5%**, для **доминантного Х**-сцепленного – **0,03%**, для **рецессивного Х**-сцепленного – **0,5%**.

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

2. Доброкачественный вариант

Критерий «сильный» (strong, BS):

BS2: если ВНП в гене, изменения которого приводят к заболеванию с полной пенетрантностью с манифестацией в детстве, встретился у здорового человека:

1. в гомозиготном состоянии при заболеваниях с рецессивным типом наследования;
2. в гетерозиготном состоянии при заболеваниях с доминантным типом наследования или
3. в гемизиготном состоянии при Х-сцепленных заболеваниях.

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

2. Доброкачественный вариант

Критерий «сильный» (strong, BS):

BS3: функциональные исследования (*in vitro* или *in vivo*) подтверждают отсутствие патогенного эффекта варианта на ген или генный продукт.

Функциональные исследования должны быть: валидируемыми, воспроизводимыми. Их должны выполнять лаборатории с хорошей репутацией.

BS4: ВНП, для которого точно установлено отсутствие косегрегации с болезнью в семье.

При этом следует принимать во внимание, что наличие фенокопий может имитировать отсутствие сегрегации у пораженных лиц, а наличие в семье более чем одного патогенного варианта может также привести к ложному заключению об отсутствии косегрегации варианта и заболевания

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

2. Доброкачественный вариант

Критерий «вспомогательный» (support, BP):

BP1: миссенс-вариант в гене, о котором известно, что только ВНП, приводящие к изменению длины белка, являются причиной заболевания.

BP2: если выявлен один патогенный вариант, соответствующий фенотипу заболевания с полной пенетрантностью, а неописанный вариант находится с ним в транс-положении при доминантном типе наследования или в цис-положении при любом другом типе наследования.

BP3: делеции/инсерции с сохранением рамки считывания, если не проводилось функциональное исследование.

Характеристики критериев патогенности и доброкачественности вариантов

2. Доброкачественный вариант

Критерий «вспомогательный» (support, BP):

BP4: результаты 3 и более программ предсказания патогенности in silico подтверждают отсутствие воздействия варианта на ген или генный продукт.

Важно помнить, что программы предсказания эффекта ВНП часто используют одинаковые или очень схожие алгоритмы – поэтому результаты использования нескольких программ не могут считаться независимыми и должны оцениваться только в сочетании. Как и критерий PP3, критерий BP4 используется один раз и представляет собой комбинацию результатов всех программ предсказания патогенности

BP5: источники с хорошей репутацией сообщили об отсутствии патогенности варианта, но независимая оценка не проводилась.

BP6: синонимичный (silent) вариант с отсутствием влияния на консенсную последовательность сплайс-сайтов по данным алгоритмов предсказания сплайсинга и нуклеотид не является эволюционно высоко консервативным.

Правила комбинирования критериев для классификации вариантов

Патогенный вариант	1. 1 очень сильный критерий (PVS1) и a. 1 сильный (PS1-PS4) или b. 2 и более средних (PM1-PM5) или c. 1 средний (PM1-PM5) и 1 вспомогательный (PP1-PP5) d. 2 и более вспомогательных (PP1-PP5) 2. 2 и более сильных (PS1-PS4) критериев 3. 1 сильный критерий (PS1-PS4) и a. 3 и более средних (PM1-PM5) или b. 2 средних (PM1-PM5) и 2 и более вспомогательных (PP1-PP5) или c. 1 средний (PM1-PM5) и 4 и более вспомогательных (PP1-PP5)
Вероятно патогенный вариант	1. 1 очень сильный (PVS1) и 1 средний (PM1-PM5) 2. 1 сильный (PS1-PS4) и 1-2 средних (PM1-PM5) 3. 1 сильный (PS1-PS4) и 2 и более вспомогательных (PP1-PP5) 4. 3 и более средних (PM1-PM5) 5. 2 средних (PM1-PM5) и 2 и более вспомогательных (PP1-PP5) 6. 1 средний (PM1-PM5) и 4 и более вспомогательных (PP1-PP5)
Вариант неопределенного значения	1. Вариант не описывается ни одним критерием 2. Критерии доброкачественности и патогенности противоречат друг другу
Вероятно доброкачественный вариант	1. 1 сильный (BS1-BS4) и 1 вспомогательный (BP1-BP6) 2. 2 и более вспомогательных (BP1-BP6)
Доброкачественный вариант	1. 1 очень сильный (BA1) или 2. 2 сильных (BS1-BS4)

Заключение о проведенном исследовании: состав

1. Отражаются **патогенные, вероятно патогенные варианты и варианты неопределенного значения.**
2. Остальные варианты отражать **не** следует.
3. При обнаружении вариантов, соответствующих фенотипу пациента и не противоречащих типу наследования, в заключении следует отражать только эти варианты, другие выявленные варианты отражать не следует.
4. При обнаружении одного патогенного и одного и более вероятно патогенного ВНП в одном гене, соответствующих фенотипу пациента, при заболевании с АР и Х-сцепленным рецессивным наследованием, в заключении отражаются только они.
5. В остальных случаях отражаются варианты из п.1.
6. Также следует указывать выявленные патогенные варианты, которые не связаны с диагнозом направления, но обусловливают развитие заболеваний, для которых существует лечение.

Заключение и отчет о проведенном исследовании: общие требования

Краткость и емкость очень важны!

Информация о пациенте: ФИО, дата рождения, пол, клинический диагноз, родственные отношения (при наличии данных)

Информация о выявленных вариантах:

1. список вариантов по номенклатуре HGVS, включая название гена, положение, зиготность, номер экзона, номенклатура на уровне нуклеотида и ДНК, номенклатура на уровне белка;
2. номер используемой референсной последовательности (NM);
3. название заболевания;
4. тип наследования;
5. частоты варианта в базах данных (в описании используемых БД должна быть указана их версия);
6. результаты программ предсказания с указанием Score (в описании программ следует указывать версию). Должны быть указаны результаты всех использованных программ.

Заключение и отчет о проведенном исследовании: общие требования

Краткость и емкость очень важны!

Данные о покрытии (качество данных):

1. Среднее покрытие исследуемой области при секвенировании полного (WES)/«клинического» экзома и панелей генов должно быть не менее x70, полного генома (WGS) не менее x15
2. При исследовании WES/WGS/«клинического» экзома, больших панелей генов (>100 т.п.н.) необходимо указывать долю (%) областей с покрытием менее x10
3. При исследовании небольших панелей генов (<100 т.п.н.) необходимо указывать все регионы с покрытием менее x10
4. При обнаружении только одного варианта в гетерозиготном состоянии в гене с рецессивным типом наследования при любом типе исследования необходимо указывать все области гена с покрытием менее x10
5. Информация о подтверждении найденных вариантов секвенированием по Сенгеру.

Заключение и отчет о проведенном исследовании: дополнительная информация

1) Семейное происхождение варианта, если известно

2) При анализе конкретных вариантов перечисление списка искомых вариантов в рамках исследования

Заключение и отчет о проведенном исследовании: интерпретация

При интерпретации должна приводится доказательная база, на основе которой классифицированы варианты в отчете!

Следует указывать:

1. Предсказанный эффект на синтезируемый белок;
2. Описан ли данный вариант ранее в литературе или в БД заболеваний или контрольной группы, если да, то сколько раз, № замены и частоту выявленного аллеля с указанием БД, из которой получена информация;
3. Литературные источники указываются в двух местах: рядом с описанием варианта и в конце отчета;
4. Рекомендации врачу для дополнительного лабораторного и/или функционального тестирования;
5. Данные о неполной пенетрантности, фенотипической и генетической гетерогенности;
6. Обобщенный вывод по результатам использования программ предсказания;
7. Обязательно информацию о подтверждении находок референсным методом (секвенирование по Сенгеру) для всех вариантов, внесенных в заключение.

Заключение и отчет о проведенном исследовании: варианты неопределенного значения

Ген неопределенного значения - это ген без доказанной ассоциации с фенотипом пациента или ассоциированный с другим фенотипом, отличным от фенотипа исследуемого пациента.

Предлагаемая классификация в данном случае применяться не может по 2 причинам:

1. de novo вариант не имеет сильной доказательной базы
2. У здорового человека встречаются от 2 до 4 LOF-вариантов на геном

Указывать в отчете с пометкой о варианте неопределенного значения

Заключение и отчет о проведенном исследовании: методология

- Тип образца (кровь, слюна, биоптат и т.д.)
- Метод выделения нуклеиновых кислот
- Тип подготовки библиотек (ПЦР, гибридный захват, амплификация полного генома)
- Коммерческое название прибора, на котором проводилось исследование, и методы анализа нуклеиновых кислот
- Официальное наименование гена, заявленное в Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee.
- Номер транскрипта согласно RefSeq
- Геномный референс с указанием версии
- Недоступность некоторых вариантов для анализа (при недостаточном покрытии регионов при севенировании)
- Клинические рекомендации по ведению пациентов в отчете указываться **НЕ** должны

Повторное исследование и подтверждение результатов

- Может потребоваться в виду постоянно растущего объема информации

- Рекомендуется запрашивать актуальную информацию у лабораторий 1-2 раза в год

Особые положения

- Особенности интерпретации ВНП у здоровых людей или людей без симптомов
- Распространенные многофакторные заболевания
- Особенности интерпретации и анализа вариантов митохондриальной ДНК
- Особенности анализа соматических вариантов
- Особенности фармакогеномного анализа и интерпретации

Official journal of the American College of Medical Genetics and Genomics ORIGINAL RESEARCH ARTICLE | Genetics inMedicine

Open

Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG–AMP variant classification criteria

Keith Nykamp, PhD[1], Michael Anderson, PhD[1], Martin Powers, MD[1], John Garcia, PhD[1], Blanca Herrera, PhD[1], Yuan-Yuan Ho, PhD[1], Yuya Kobayashi, PhD[1], Nila Patil, PhD[1], Janita Thusberg, PhD[1], Marjorie Westbrook, PhD[1], The Invitae Clinical Genomics Group[2] and Scott Topper, PhD, FACMG[1]

Purpose: The 2015 American College of Medical Genetics and Genomics–Association for Molecular Pathology (ACMG–AMP) guidelines were a major step toward establishing a common framework for variant classification. In practice, however, several aspects of the guidelines lack specificity, are subject to varied interpretations, or fail to capture relevant aspects of clinical molecular genetics. A simple implementation of the guidelines in their current form is insufficient for consistent and comprehensive variant classification.

Methods: We undertook an iterative process of refining the ACMG–AMP guidelines. We used the guidelines to classify more than 40,000 clinically observed variants, assessed the outcome, and refined the classification criteria to capture exceptions and edge cases. During this process, the criteria evolved through eight major and minor revisions.

Results: Our implementation: (i) separated ambiguous ACMG–AMP criteria into a set of discrete but related rules with refined weights; (ii) grouped certain criteria to protect against the overcounting of conceptually related evidence; and (iii) replaced the "clinical criteria" style of the guidelines with additive, semiquantitative criteria.

Conclusion: Sherloc builds on the strong framework of 33 rules established by the ACMG–AMP guidelines and introduces 108 detailed refinements, which support a more consistent and transparent approach to variant classification.

Genet Med advance online publication 11 May 2017

Key Words: ACMG laboratory guideline; clinical genetic testing; clinical interpretation; variant classification; variant interpretation

Использование правил на практике

Основной результат, который ждет врач, — ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приложение

Примеры заключений

Пример 1: Выявлен патогенный вариант нуклеотидной последовательности при заболевании с АР типом наследования

ЗАКЛЮЧЕНИЕ
по результатам секвенирования ДНК (панель «Эпилепсии»)
Пациент:
Фамилия
Имя
Отчество
Пол: М/Ж
Дата рождения: дд.мм.гг
Вид материала: Кровь (венозная)
Дата забора: дд.мм.гг
Диагноз: Симптоматическая эпилепсия.

Патогенные варианты нуклеотидной последовательности, являющиеся вероятной причиной заболевания

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Замена АК	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения
TPP1	chr11:6638271G>A	A/A	6	c.622C>T	p.Arg208*	0,0173159%	NM_000391.3	176x
** Частоты аллелей приведены по базе Exome Aggregation Consortium (выборка до 60702 человек). н/д = нет данных (не описан)*								

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

У ФИО был проведен поиск патогенных мутаций, ассоциированных с наследственными эпилепсиями, а также с другими наследственными заболеваниями со сходными фенотипическими проявлениями.

Выявлен ранее описанный вариант нуклеотидной последовательности в 6 экзоне гена *TPP1* (chr11:6638271G>A, rs119455955) в гомозиготном состоянии, приводящий к появлению сайта преждевременной терминации трансляции в кодоне 208 (p.Arg208Ter, NM_000391.3). Вариант описан как мутация, которая в гомозиготной или в компаунд-гетерозиготной форме с другими мутациями приводит к развитию нейронального цероидного липофусциноза, тип 2 (OMIM: 204500), основными симптомами которого являются атаксия, миоклонические приступы, постепенный регресс интеллектуального развития [ссылки на источники: или 2 статьи или база данных, в которой указано сколько раз встретился вариант (обязательно больше 2)]. Частота варианта в контрольной выборке ExAC составляет 0.0173%.

Других значимых изменений, соответствующих критериям поиска, не обнаружено.

Все варианты, указанные в заключении, подтверждены методом прямого секвенирования по Сенгеру.

Оценка клинической значимости (патогенности) выявленных вариантов проводилась на основании российских рекомендаций для интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS).

Клиническое заключение по результатам данного исследования может быть дано только врачом-генетиком.

ОПИСАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
(стандартное, не зависит от типа выявленных вариантов)

Анализ ДНК пациента проведен на секвенаторе нового поколения (название) методом (например: парно-концевое чтение (2x151 п.н.)) со средним покрытием (например: не менее 70-100x). Для пробоподготовки была использована методика (например: селективный захват участков ДНК, относящихся к кодирующим областям (количество генов) генов с известным клиническим значением). Список исследованных генов: (при секвенировании клинического или полного экзома можно ограничиться ссылкой на ресурс, в котором представлены эти данные).

Для названия выявленных вариантов использовалась номенклатура (например: представленная на сайте http://www.hgvs.org/mutnomen версия 2.1511)

Обработка данных секвенирования проведена с использованием автоматизированного алгоритма (название используемой программы для биоинформатического анализа и/или ее описание, например: алгоритм включает выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (GRCh37/hg19), постпроцессинг выравнивания, выявление вариантов и фильтрацию вариантов по качеству, а также аннотацию выявленных вариантов по всем известным транскриптам каждого гена из базы RefSeq с применением ряда методов предсказания патогенности замен (SIFT, PolyPhen2-HDIV, PolyPhen2-HVAR, MutationTaster), а также методов расчета эволюционной консервативности позиций (PhyloP, PhastCons)).

Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы выборки проектов «1000 геномов», ESP6500 и Exome Aggregation Consortium. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы база данных OMIM, специализированные базы данных по отдельным заболеваниям (при наличии) и литературные данные. В заключение включены только варианты, имеющие возможное отношение к клиническим проявлениям у пациента.

Ограничения методики, например, метод не позволяет выявлять инсерции и делеции длиной более 10 п.н., мутации в интронных областях (за исключением канонических сайтов сплайсинга), вариации длины повторов (в том числе экспансии триплетов), а также мутации в генах, у которых в геноме существует близкий по последовательности паралог (псевдоген). Метод не предназначен для определения цис-, транс-положения пар гетерозиготных мутаций, а также для оценки уровня метилирования, выявления хромосомных перестроек, полиплоидии, выявления мутаций в состоянии мозаицизма.

СВЕДЕНИЯ О КАЧЕСТВЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего прочтений	16051259	Всего выявлено вариантов	42310
Длина прочтений	2x151 п.н.	Вариантов после фильтрации по базовым критериям патогенности и оценки по клиническим критериям	1
Прочитано нуклеотидов	4.42 млрд		
Среднее покрытие	147.8x	Количество фрагментов (%) с покрытием менее X10 (для WES/WGS/ "клинический экзом"	8

Данные по покрытию генов Указать, какие участки нуклеотидной последовательности генов не были проанализированы или были проанализированы частично. Список должен включать название гена, № экзона и название референсной последовательности (NM). При секвенировании клинического или полного экзома можно ограничиться информацией о покрытии в графическом виде с указанием (в %) количества фрагментов нуклеотидной последовательности с покрытием менее X10 и информацией о том, как получить сведения о покрытии конкретной области.

ССЫЛКИ НА ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ БАЗЫ ДАННЫХ И ЛИТЕРАТУРУ

1. Ссылка на статью
2. Ссылка на статью
3. http://www.omim.org/
4. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
5. http://evs.gs.washington.edu/EVS/
6. http://exac.broadinstitute.org/

Дата

Подпись врача лабораторного генетика

Основной результат, который ждет врач, — ЗАКЛЮЧЕНИЕ

-------- Пересылаемое сообщение --------
От:
Кому:
Дата:
Тема: Результаты генетической диагностики

Здравствуйте, уважаемая Л

В прикрепленном табличном файле список всех значимых мутаций, которые мы обнаружили при секвенировании экзома Вашего сына.

Сам по себе файл не несет клинически значимой информации. Опираться только на результаты генетического теста нельзя. Мы проводим работу по изучению вклада каждой (!) обнаруженной мутации в клиническую картину, наблюдаемую у Вашего сына.

На текущий момент мы считаем наиболее вероятной причиной развития болезни мутацию в гене BBS1 (Bardet-Biedl syndrome 1) с координатой на хромосоме: chr8 10467581
Подробнее о гене Вы можете узнать здесь: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/582

Этот файл может понадобиться Вам в дальнейшем. Сохраните его у себя там, где Вы храните медицинскую документацию.

Мы ждем Вас с супругом на консультацию.

Основной результат, который ждет врач, — ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хромосома	хромосомная координата	ген	референс	найденная мутация	тип мутации
chrX	135960146	AC=5;AF=0.313;AN=16;BaseQRank	G	GAA	frame shift
chr17	39340795	AC=16;AF=1.00;AN=16;DP=351;FS	ACGGCAGCAGCTGGACAT	A	frame shift
chr3	195508454	AC=4,2;AF=0.250,0.125;AN=16;Ba	T	TC,TGGTGACATGAAGAGGGGTGG	frame shift
chr3	195511329	AC=7;AF=0.438;AN=16;BaseQRank	A	AGGGCTGGT	frame shift
chr7	100385561	AC=10;AF=0.625;AN=16;BaseQRa	GGCTTCAGCTACCGCTTGC	G	frame shift
chr17	48227403	AC=8;AF=1.00;AN=8;DP=5;FS=0.0	G	GGC	frame shift
chrX	122336600	AC=16;AF=1.00;AN=16;DP=995;FS	T	TG	frame shift
chr2	242035491	AC=1;AF=0.063;AN=16;BaseQRank	ATT	A	frame shift
chr11	1093567	AC=8;AF=0.500;AN=16;BaseQRank	A	AC	frame shift
chr4	103822482	AC=7;AF=0.438;AN=16;BaseQRank	AAC	A	frame shift
chr7	75914934	AC=16;AF=1.00;AN=16;DP=99;FS=	G	GC	frame shift
chr12	974355	AC=9;AF=0.563;AN=16;BaseQRank	T	TC	frame shift
chr3	14561627	AC=15;AF=0.938;AN=16;BaseQRa	A	AG	frame shift
chr3	75790783	AC=8;AF=0.500;AN=16;BaseQRank	G	GGTCTCCAGCATCATGTCCCTGTA	frame shift
chr22	23653975	AC=5;AF=0.313;AN=16;BaseQRank	T	TCCGG	frame shift
chr1	26671538	AC=8;AF=0.500;AN=16;BaseQRank	AGCAC	A	frame shift
chr9	33794797	AC=7;AF=0.438;AN=16;BaseQRank	TGA	T	frame shift
chr12	51740416	AC=6;AF=0.375;AN=16;BaseQRank	C	CG	frame shift
chr10	116931101	AC=16;AF=1.00;AN=16;DP=266;FS	C	CTT	frame shift
chr1	17085995	AC=6;AF=0.375;AN=16;BaseQRank	G	GC	frame shift
chr5	139931629	AC=6;AF=0.375;AN=16;BaseQRank	C	CG	frame shift
chr2	231193470	AC=1;AF=0.063;AN=16;BaseQRank	A	C	frame shift
chr12	86268183	AC=1;AF=0.063;AN=16;BaseQRank	T	C	frame shift
chr1	26671522	AC=7;AF=0.438;AN=16;BaseQRank	GAAATGAGGCATCA	G	frame shift
chr2	158958551	AC=1;AF=0.063;AN=16;BaseQRank	G	GA	frame shift
chr12	50745861	AC=9;AF=0.563;AN=16;BaseQRank	T	TGA	frame shift

•

•

•

Список из 316 вариантов

- Грамотно составленное заключение — основа для взаимодействия между врачом-генетиком и лабораторией, а также залог правильного диагноза для пациента.

Применение критериев ACMG 1

- Пробанд, мальчик 4,5 лет, имеет грубое отставание психомоторного развития, дебютировавшее с судорог в 0,5 года.
- Сестра пробанда — 6 лет, не разговаривает.
- Родители здоровы.

- В связи с наблюдающимся состоянием пробанду проведено высокопроизводительное секвенирование экзома.

Применение критериев ACMG 1

Таблица 1. Нуклеотидные замены, являющиеся наиболее вероятной причиной заболевания, другие выявленные нуклеотидные замены, описанные в международных базах данных, а также нуклеотидные замены, которые могут оказывать влияние на клиническую картину болезни.

Ген	Референсная последовательность	Экзон/ интрон	Геномная координата (GRCh37)	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Оценка, согласно рекомендациям ACMG
SCN1A	NM_001165963.1	19	166872146	*c.3521C>G (гетерозигота)*	*p.T1174S*	Патогенная
ATM	NM_000051.3	12	108123551	*c.1810C>T (гетерозигота)*	*p.P604S*	Вероятно патогенная
ATM	NM_000051.3	29	108160480T	*c.4388T>G (гетерозигота)*	*p.F1463C*	Вероятно патогенная

Применение критериев ACMG 1

SCN1A:c.3521C>G

- AD
- Семейные фибрильные судороги
- GEFS+
- Синдром Драве (EIEE6)
- Описана в публикации Lal (2016) *PLoS One* **11:** e0150426

ATM:c.[1810C>T(;)4388T>G]

- AR
- Ataxia-telangiectasia
- Мутации ранее не описаны

Применение критериев ACMG 1

- *SCN1A*:c.3521C>G
- Описан в HGMD несколько раз как ассоциированный с гемиплегической мигренью, миоклонической эпилепсией, синдромом Драве.
- 1. Gargus (2007) Pediatr Neurol 37: 407 PubMed: 18021921
- 2. Cestèle (2013) Epilepsia 54: 927 PubMed: 23398611
- 3. Escayg (2001) Am J Hum Genet 68: 866 PubMed: 11254445
- 4. Frosk (2013) J Child Neurol 28: 389 PubMed: 22550089
- 5. Lal (2016) PLoS One 11: e0150426 PubMed: 26990884
- 6. Rilstone (2012) Epilepsia 53: 1421 PubMed: 22780858
- 7. Yordanova (2011) Neurosci Lett 494: 180 PubMed: 21396429

- **В работах с относительно большими выборками (165 пациентов, 2001 год) встречался также в контрольных образцах.**

Применение критериев ACMG 1

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of Presumably Disease Causing *SCN1A* Variants in a Cohort of Common Epilepsy Syndromes

Dennis Lal[1,2,3,4]*, Eva M. Reinthaler[5], Borislav Dejanovic[6], Patrick May[7],

В данной работе замена была охарактеризована как фактор риска развития эпилепсии с небольшим вкладом, исходя из **несколько** более высокой частоты в группе больных (OR=0.32).

Применение критериев ACMG 1

SCN1A:c.3521C>G

- по данным базы gnomAD вариант rs121918799 в гене *SCN1A* встретился на 479 из 276812 хромосом с общей частотой 0,173%, в том числе в **трех** случаях в **гомозиготном** состоянии.

ATM:c.[1810C>T(;)4388T>G]

- по данным базы gnomAD вариант rs2227922 встретился на 887 из 275954 хромосом, в том числе **15 раз** в **гомозиготном** состоянии с общей частотой 0,3214%. Вариант rs138327406 встретился на 405 из 276966 хромосом, в том числе **7 раз** в **гомозиготном** состояние с общей частотой 0,1462%.

Применение критериев ACMG 1

- Таким образом, в данном случае ни один из попавших в заключение лаборатории вариантов нуклеотидной последовательности не имеет отношения к клинической картине пациента.

- Лаборатории нет необходимости сообщать SNV просто для того, чтобы сообщить что-то.

Применение критериев ACMG 2

- Пробанд, мальчик 6 лет, обратился в к врачу-генетику по поводу периодического повышения уровня КФК.
- Родители не имеют лабораторных данных о повышении уровня КФК.
- Объективно легкая миопатия

Применение критериев ACMG 2

Заключение по секвенированию экзома

Анализ проведен методами секвенирования следующего поколения с использованием наборов для обогащения экзома Genotek Clinical Exome (Illumina Inc., США) и секвенирования ДНК производства Illumina (Illumina Inc., США). Биоинформатическая обработка данных произведена в соответствии с регуляциями ACMG (США). Референсная последовательность Human genome 19 (hg19) build 37.

Обнаруженные вероятно патогенные нарушения:

Ассоциированные заболевания	Хромосома	Позиция в геноме	Ген	Экзон	Нуклеотидная замена	Амино-кислотная замена
#118200 CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE, DEMYELINATING, TYPE 1B;	1	Chr1:10425470	KIF1B	41	c.4378G>A в гетерозиготном состоянии	p.Glu1460Lys (несинонимичная замена)
#117000 CENTRAL CORE DISEASE OF MUSCLE	19	Chr19:38965975	RYR1	29	c.4178A>G в гетерозиготном состоянии	p.Lys1393Arg (несинонимичная замена)

Применение критериев ACMG 2

- NM_000540.2(*RYR1*_v001):c.4178A>G (p.Lys1393Arg) (rs137933390, hg19::chr19:38965975A> G) в гене *RYR1*, гетерозиготные, гомозиготные и компаунд-гетерозиготные мутации в котором описаны у больных с аутосомно-рецессивной и аутосомно-доминантной болезнью центрального стержня (OMIM 117000), аутосомно-доминантной злокачественной гипертермией (OMIM 145600), с аутосомно-рецессивной миопатией малых волокон с офтальмоплегией (OMIM 255320).
- Несмотря на то, что аминокислотная замена затрагивает относительно консервативную у позвоночных позицию, она локализована вне описанных критических регионов белка RYR1, в которых описаны мутации, приводящие к злокачественной гипертермии и болезни центрального стрежня.
- Вариант встретился на 688 из 251434 хромосом по данным базы gnomAD (с общей частотой 0,2736%), включая трех человек в гомозиготном состоянии.

Применение критериев ACMG 2

- Аминокислотная замена Lys1393Arg описана в гетерозиготном состоянии как вариант с неизвестным клиническим значением или доброкачественный вариант в нескольких публикациях (doi:10.1093/bja/aep061, 10.1186/1750-1172-9-8, 10.1213/ANE.0b013e3181cbd815) у пациентов со злокачественной гипертермией, в основном, до 2013 года.

Применение критериев ACMG 2

- По совокупности данных вариант следует рассматривать как вероятно доброкачественный.
- Последующий анализ варианта в семье показал его наличие у здоровой матери пробанда, у которой не отмечалось повышение уровня КФК.

Применение критериев ACMG 2

1. Патогенные мутации, являющиеся вероятной причиной заболевания

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
Не выявлено								

2. Вероятно патогенные мутации, являющиеся возможной причиной заболевания

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
Не выявлено								

3. Мутации с неизвестным клиническим значением, имеющие возможное отношение к фенотипу. Для уточнения статуса патогенности таких мутаций и их отношения к заболеванию у пациента могут потребоваться дополнительные исследования.

Положение (hg19)	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля*	Глубина прочтения
Не выявлено								