

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

Dr. med. Richard Roe  
Paul-Ehrlich-Straße 23  
72076 Tübingen

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

## Molekulargenetischer Befund – Doe, Jane (\*TT.MM.JJJJ)

- Indikation** Neonatales Exanthem, anhaltende Entzündungszeichen, sterile Meningitis, einseitige Armlähmung, generalisierte Lymphknotenschwellungen, Anämie, entzündliche Veränderungen der Gelenke; externe Exom-Diagnostik vorab negativ
- Auftrag** Molekulargenetische Diagnostik: *NLRP3*, *NLRC4*, *TNFRSF1A*, *STING1*, *NOD2*, *UBA1*, *TLR8*, *JAK1* und *IL6ST* (DIG: Deep ImmunoGenetics Anreicherung)

### Ergebnis: Auffälliger Befund

- **Nachweis einer wahrscheinlich pathogenen Variante im Gen *NLRP3* im Mosaikstatus, die mit einem CINCA-Syndrom bzw. einer NOMID bei Ihrer Patientin vereinbar ist.**

Gen	Variante	Zygotie	Erbgang	MAF (%)	Bewertung
<i>NLRP3</i>	<b>c.925G&gt;C; p.Gly309Arg</b> chr1:247587670 G>C (hg19)	<b>Mosaik</b> (80 von 1341 reads; ~6 %)	<b>AD, somatisch</b>	-	<b>wahrscheinlich pathogen</b>

Informationen zur Interpretation dieser Tabelle können im Abschnitt *Ergänzende Informationen* eingesehen werden.

### Empfehlung

Wir empfehlen eine weiterführende klinische Diagnostik und Versorgung entsprechend dem aktuellen Protokoll für Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrome (Hansmann et al., 2020, PMID: 32066461; Romano et al., 2021, PMID: 35623638).

### Humangenetische Relevanz

Bei der nachgewiesenen Variante im Mosaikstatus ist von einer *de novo* Entstehung auszugehen.

Bei Mosaikvarianten im *NLRP3*-Gen und Krankheitsbeginn im Kindesalter wird eine Entstehung in hämatopoetischen Stammzellen oder aber in früheren Stadien der Embryonalentwicklung angenommen (Horebeek et al., 2019, PMID: 31668909). Es ist also möglich, dass die Variante auch in anderen Geweben sowie auch in den Keimzellen vorliegt. Bei Keimbahnmosaikern hängt das Weitervererbungsrisiko vom Anteil der von der Veränderung betroffenen Keimzellen ab und ist daher schwer abzuschätzen (Basiswissen Humangenetik - Schaaf, Zschocke 2018).

## Klinische Information und Varianten-Interpretation

### NLRP3, NM\_004895.5

OMIM / Referenz	Phänotyp	Erbgang
191900	Muckle-Wells-Syndrom (MWS)	AD
120100	Familiäres kälteinduziertes autoinflammatorisches Syndrom 1 (FCAS1) / familiäre Kälte-Urtikaria (FCU)	AD
<b>607115</b>	<b>Chronisch-infantiles-neurologisch-kutanes-artikuläres Syndrom (CINCA-Syndrom)/ Neonatal beginnende inflammatorische Multisystemerkrankung (NOMID)</b>	<b>AD, somatisch</b>
617772	Autosomal dominante Schwerhörigkeit 34, mit oder ohne Inflammation (DFNA34)	AD
148200	Keratoendotheliitis fugax hereditaria (KEFH)	AD

Das Gen NLRP3 kodiert für das Protein Cryopyrin, das an Entzündungs- und Zelltodvorgängen beteiligt ist. Pathogene gain-of-function-Varianten in NLRP3 verursachen autosomal dominante Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrome (CAPS), darunter das familiäre kälteinduzierte autoinflammatorische Syndrom 1 (FCAS1), das Muckle-Wells-Syndrom (MWS) und das CINCA-Syndrom (CINCA, auch bekannt als NOMID; Welzel und Kuemmerle-Deschner, 2021, PMID: 33401496). FCAS ist die mildeste Form des CAPS und zeichnet sich durch wiederkehrende Episoden eines durch Kälteexposition ausgelösten Urtikaria-ähnlichen Hautausschlags, sowie durch leichtes Fieber, allgemeines Unwohlsein, Augenrötung und Arthralgie/Myalgie aus (ORPHA: 47045). Das Muckle-Wells-Syndrom stellt eine intermediäre Form von CAPS dar und weist, zusätzlich zu den genannten Symptomen, schwerwiegendere chronische Beschwerden, eine potenziell lebensbedrohliche sekundäre Amyloidose und Hörverlust auf (ORPHA: 575). Das CINCA/NOMID-Syndrom kennzeichnet sich durch neonatale systemische Entzündungen, urtikarielle Hautausschläge und Arthritis/Arthralgie, die zu schwerer Arthropathie und Beteiligung des zentralen Nervensystems führen (einschließlich chronischer aseptischer Meningitis, welche unbehandelt zu einer Hirnatrophie, intellektueller Beeinträchtigung und sensorineuralem Hörverlust führen kann) (ORPHA: 1451). Des Weiteren wurden heterozygote Mutationen in NLRP3 im Zusammenhang mit autosomal dominanter Taubheit mit oder ohne Entzündung (DNFA34) und Keratitis fugax hereditaria (KEFH) in Verbindung gebracht. Für pathogene Varianten im Gen NLRP3 ist eine reduzierte Penetranz und variable Expressivität bekannt. Daher wird angenommen, dass ein Zusammenhang mit weiteren genetischen Faktoren und/oder Umweltfaktoren besteht (Schuh et al., 2015, PMID: 26020059; ORPHA:47045).

### NLRP3, c.925G>C; p.Gly309Arg (Mosaik), ClinVar ID: 393082

ACMG/ACGS Kriterium	Punkte	Erklärung
<b>PS2</b> (moderate)	+2	Die Variante ist <i>de novo</i> bei einem Patienten mit der Erkrankung ohne positive Familienanamnese detektiert worden. Die Evidenzstärke ist abhängig von der Phänotypspezifität, Anzahl der <i>de novo</i> Fälle mit dieser Variante und bestätigter Elternschaft.
<b>PM1</b>	+2	Die Variante befindet sich innerhalb einer kritischen Region des Gens <i>NLRP3</i> .
<b>PM2</b>	+2	Die Variante ist nicht in der Populationsdatenbank gnomAD gelistet.
<b>PM5</b>	+2	Die Variante führt zum Austausch einer Aminosäure, für die bereits ein anderer Austausch p.Gly309Ser als pathogen beschrieben wurde. Saito et al., 2008, PMID: 18063752
<b>ACMG/ACGS Klassifizierung:</b> wahrscheinlich pathogen	+8	

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

Befund erstellt von: XXX

Geprüft durch: XXX

Validiert durch: XXX

Mit freundlichen Grüßen

Dr. med. Lisa Dudler

Fachärztin für Humangenetik

## Ergänzende Informationen

---

**Untersuchte Regionen** **NLRP3** (NM\_004895.5), **NLRC4** (NM\_021209.4), **TNFRSF1A** (NM\_001065.4), **STING1** (NM\_198282.4), **NOD2** (NM\_022162.3), **UBA1** (NM\_003334.4), **TLR8** (NM\_138636.5), **JAK1** (NM\_002227.4), **IL6ST** (NM\_002184.4)

Folgende (Differential-)Diagnosen wurden ebenfalls im Rahmen der Auswertung unserer Sequenzierdaten berücksichtigt: Lymphoproliferation und Autoimmunität; Autoinflammation

**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 sowie Repeat-Expansionen können nicht sicher erfasst und somit nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren können niederfrequente Sequenzvarianten mit sehr geringem Frequenzanteil (insbes. < 1 %) 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-2020v4.01 sowie der ClinGen SVI WG (Richards et al., 2015, PMID: 25741868; Ellard et al., 2020, Association for Clinical Genomic Science; <https://clinicalgenome.org/working-groups/sequence-variant-interpretation/>). 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 (Ellard et al., 2020, 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.

**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-2020v4.01 Richtlinien (Richards et al., 2015, PMID: 25741868, Ellard et al., 2020, Association for Clinical Genomic Science).

Bewertet werden alle Sequenzvarianten (SNVs/Small Indels) mit einer Populationsfrequenz (MAF)  $< 1,5\%$  innerhalb der kodierenden Regionen sowie in deren flankierenden intronischen Regionen ( $\pm 8$  Basenpaare) mit einer Novel Allelfrequenz (NAF) von  $\geq 5\%$  in der untersuchten Probe. Bekannte Hotspotvarianten können darüber hinaus bis zu einer NAF von  $\geq 1\%$  berichtet werden. Bekannte krankheitsauslösende Varianten (laut HGMD) werden in flankierenden Regionen bis zu  $\pm 30$  bp und bis zu einer MAF  $< 5\%$  bewertet. Ausnahmen sind möglich, z.B. für Risikofaktor-Varianten und hypomorphe Allele. Populationsfrequenzen werden anhand öffentlicher Datenbanken (z.B. gnomAD) sowie einer internen Datenbank ermittelt.

Im vorliegenden Fall wurde mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung eine durchschnittliche Sequenziertiefe von 1055 Reads und eine Sequenziertiefe von min. 300X für 99,41 % der kodierenden Bereiche erreicht. **Für die Beurteilung der Varianten wurden die klinischen Informationen herangezogen, die uns zum Zeitpunkt der Auswertung vorlagen.** Befundet werden nur Varianten, die entsprechend der aktuellen Datenlage nicht als benigne oder wahrscheinlich benigne eingestuft wurden. Synonyme Varianten in mitochondrial kodierten Genen werden als benigne bewertet. Zur *in silico*-Vorhersage wurden die Programme MetaLR (Dong et al., 2015, PMID: 25552646), PrimateAI (Sundaram et al., 2018, PMID: 30038395) sowie SpliceAI (Jaganathan et al., 2019, PMID: 30661751) verwendet. In Einzelfällen kann diese Prädiktion durch zusätzliche *in silico*-Vorhersagen ergänzt werden.

Die Nomenklatur gefundener Varianten erfolgt nach den Richtlinien der HGVS, jedoch ohne Berücksichtigung der allelischen Zuordnung einzelner Varianten, da diese meist nicht bekannt ist.

Die Probe hat die bei uns geltenden Qualitätskriterien nach Probeneingang und den jeweiligen analytischen Bearbeitungsschritten im Labor eingehalten.

Bei dem oben beschriebenen Verfahren handelt es sich um einen inhouse entwickelten und validierten Test (Laboratory developed test; LDT).

**Bezüglich Mitteilung, Weitergabe und wissenschaftlicher Verwendung dieses Befundes gelten die Bestimmungen des GenDG.**