



Практическая работа по применению правил интерпретации NGS данных

Пётр Спарбер
лаборатория функциональной геномики
Медико-генетический научный центр

Руководства для интерпретации вариантов

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, Захлязьминская Е.В.⁸, Костарева А.А.⁹, Павлов А.Е.¹⁰, Голубенко М.В.⁶, Поляков А.В.¹, Куцев С.И.¹

- ¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва
- ² ООО ЦГРМ «Генетико», Москва
- ³ ФГУ «Геномед», Москва
- ⁴ ООО «Геномед», Москва
- ⁵ ГБУЗ НСО «ГКБ №1», Ново-Сибирск
- ⁶ Федеральное государственное научное учреждение «Федеральный научный центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», Москва
- ⁷ ООО «Бином», Москва
- ⁸ ФГБНУ «Российский научный центр «Материальная медицина» им. В. А. Алеева», Санкт-Петербург
- ⁹ ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алеева», Санкт-Петербург
- ¹⁰ ООО «Парсек Лаб», Санкт-Петербург

Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists

Marilyn M. Li,^{*,†} Michael Datto,^{*,†} Eric J. Duncavage,^{*,§} Shashikant Kulkarni,^{*,¶} Neal I. Lindeman,^{*,||} Somak Roy,^{*,***} Apostolia M. Tsimberidou,^{*,††} Cindy L. Vnencak-Jones,^{*,††} Daynna J. Wolff,^{*,§§} Anas Younes,^{*,¶¶} and Marina N. Nikiforova^{*,**}

ACMG Standards and Guidelines | Published: 05 March 2015

Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists



David Bick MD, Soma Das PhD, Julie
PhD, Elaine Lyon PhD, Elaine Spector
e ACMG Laboratory Quality Assurance

Критерии патогенности и

Да пошло оно всё!



Шучу конечно.
Мне еще экзомы
анализировать



генности.

Критерий «очень сильный»

PVS1: LOF-варианты — к прекращению синтеза белки со сдвигом рамки считывания (±1 или ±2) нуклеотидов (делеции/дупликации экзонов), если данный тип в следовательности гена является болезнью.

Критерий «вспомогательный»

BP1: миссенс-варианты, которые приводят к изменению функции белка.

BP2: если выявлен мутационный фенотип, а не описан мутационный фенотип.

С в транс-положении мутации гена заболевания или в сплайс-сайте наследования.

PS2: *de novo* вариант, от родителей пациента.

PP4: фенотип пациента и/или семьи специфичны для заболевания с известной этиологией.

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

Патогенный вариант

Вероятно патогенный вариант

Вариант неопределенной патогенности

Вероятно доброкачественный вариант

Доброкачественный вариант

«горячей» точке и/или в функциональных доменах (сайт фермента), в известные изменения.

в контрольной выборке (с той же частотой): для ауто-доминантных заболеваний.

P3: делеции/инсерции с сохранением рамки считывания, если не проводилось функциональное исследование.

P4: результаты не менее трех программ предсказания патогенности *in silico* подтверждают отсутствие воздействия варианта на ген или генный продукт. При этом не учитывают, что многие программы используют те же или очень схожие алгоритмы, поэтому результаты использования нескольких программ не могут рассматриваться как независимые и должны оцениваться в совокупности. Как и PP3, критерий BP4 используется для оценки варианта один раз, представляя собой комбинацию результатов всех программ предсказания патогенности.

P5: источники с хорошей репутацией сообщили об отсутствии патогенности варианта, но независимая оценка не проводилась.

P6: синонимичный (silent) вариант с отсутствием изменений на консенсусную последовательность (ис-сайтов по данным алгоритмов предсказания сплайсинга (отсутствуют новые сайты сплайсинга) и который не является эволюционно высоко консервативным.

Калькулятор патогенности вариантов нуклеотидной последовательности

- <http://calc.generesearch.ru>



Калькулятор патогенности
вариантов нуклеотидной последовательности

Данный инструмент создан с целью облегчения использования критериев, описанных в российском [Руководстве по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования \(MPS\)](#), и автоматической оценки патогенности/доброкачественности вариантов нуклеотидной последовательности в зависимости от выбранных критериев.

1. Вариант в гене APC

• c.1312+1G>A	DM	Adenomatous polyposis coli	Gavert (2002) Hum Mutat 19, 664 Xiong (2015) Science 347: 1254806 [Additional report] Zhang (2016) Gene 577: 187 [Functional characterisation]	КИ APC:
• c.1312+1G>C	DM	Adenomatous polyposis coli	Kerr (2013) J Mol Diagn 15, 31	
• c.1312+2T>C	DM	Adenomatous polyposis coli	Friedl (2005) Hered Cancer Clin Pract 3, 95 Xiong (2015) Science 347: 1254806 [Additional report]	Ы У
c.1312+2T>G	DM?	Adenomatous polyposis coli	Gundesen (2005) Hum Genet 117 300 Xiong (2015) Science 347: 1254806 [Additional report]	ЗОМ
c.1312+3A>C	DM	Adenomatous polyposis coli, attenuated	Nielsen (2007) Clin Genet 71, 427	
• c.1312+3A>G	DM	Adenomatous polyposis coli	Olschwang (1993) Am J Hum Genet 52, 273 Aretz (2004) Hum Mutat 24: 370 [Functional characterisation] Kerr (2013) J Mol Diagn 15: 31 [Additional report] 1 more reference(s)...	
• c.1312+5G>A	DM	Adenomatous polyposis coli	Aretz (2004) Hum Mutat 24, 370 Schwarzová (2013) Fam Cancer 12: 35 [Functional characterisation]	
• c.1312+5G>C	DM?	Adenomatous polyposis coli	Kerr (2013) J Mol Diagn 15, 31	ите с
c.1312+5G>T	DM	Adenomatous polyposis coli	Varesco (1994) Hum Genet 93, 281 Grandval (2014) Hum Mutat 35: 532 [Functional characterisation]	

1. Вариант в гене *APC*

- Пробанд – женщина 15 лет. Диагноз: полипы, рак толстой кишки
- Выявлен неописанный вариант в гене *APC*: NM_000038:c.1312+1G>T
- Гетерозиготные патогенные варианты в этом гене описаны у пациентов с доминантным семейным аденоматозным полипозом (OMIM #175100)
- Анализ сегрегации не проводился
- Данный вариант отсутствует в контрольных выборках
- Ген не толерантен к вариантам с потерей функции
- В HGMD описано множество патогенных вариантов в этом сайте с функциональным анализом
- Программы предсказания сплайсинга – поломка донорного сайта сплайсинга
- Ваша оценка?
- **Ответ: 1)Патогенный вариант (PM2, PVS1,PP3)**
2) Патогенный вариант (PM2,PVS1, PS3,PP3)

2. Вариант в гене *TP53*

- Пробанд – женщина, возраст? Диагноз: первично-множественные злокачественные заболевания
- Секвенированием по Сенгеру выявлен гетерозиготный вариант в гене *TP53*: NM_001126114: c.322_327del6 (p.Gly108_Phe109del)
- Гетерозиготные патогенные варианты в гене *TP53* описаны у больных с синдромом Ли-Фраумени
- Вариант неописанный, отсутствует в контрольных выборках
- Делеция 2-х аминокислот в ДНК-связывающем домене
- Ваша оценка?
- **Ответ: Вероятно патогенный вариант (PM1, PM2, PM4)**

2. Вариант в гене *TP53*

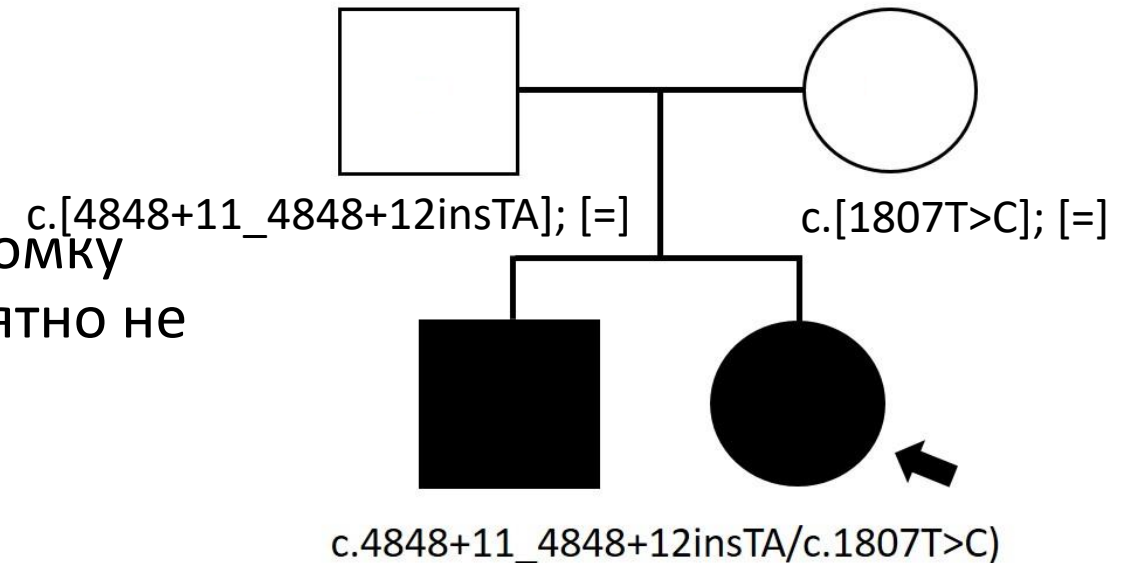
- Что нужно делать дальше?
 - Функциональный анализ!
 - Дополнительные клинические обследования
 - Анализ сегрегации
 - Полногеномное секвенирование

3. Вариант в гене *ABCA4*

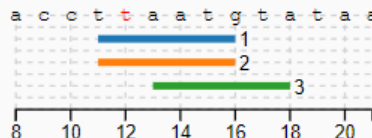
- Пробанд женщина возраст (?). Диагноз: прогрессирующая макулодистрофия сетчатки
- При секвенировании панели генов выявлено 2 варианта в гене *ABCA4*: c.1807T>C (p.Tyr603His) и c.4848+11_4848+12insTA
- Гомозиготные или компаунд гетерозиготные варианты в гене *ABCA4* описаны у пациентов с болезнью Штаргардта
- Первый вариант – описан множество раз как патогенный.
- Второй неописанный, отсутствует в контрольных выборках

3. Вариант в гене *ABCA4*. Сегрегационный анализ

- Варианты находятся в транс-положении
- Human splicing finder предсказывает поломку интронного энхансера сплайсинга. Вероятно не влияет на сплайсинг
- Ваша оценка?

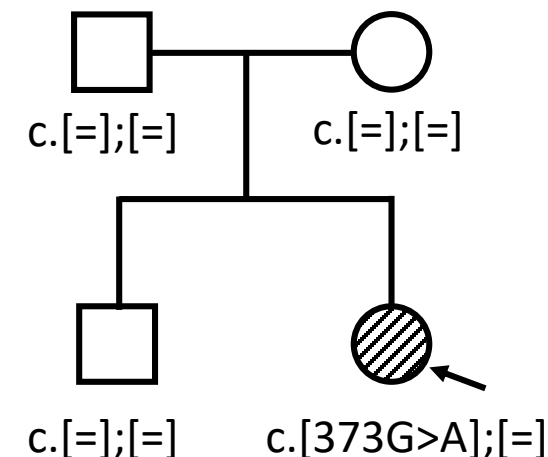


Ответ: **Вариант неопределенного значения (PM2,PM3)**

▼ Interpreted Data			
This table shows only relevant results related to the mutation position and context. The mutation occurs in the deep intronic positions, the following table show results of splicing and auxiliary sites that could be created by the mutation			
Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
ESS Site broken	1 - HSF Matrices - hnRNP A1		Alteration of an intronic ESS site. Probably no impact on splicing.
	2 - ESR Sequences from Goren et al.		
	3 - IIEs from Zhang et al.		

4. Вариант в гене *GABRB2*

- Пробанд – девочка 4 года. Диагноз: криптогенная фокальная эпилепсия. Задержка моторного развития.
- WGS квадро – выявлен de novo вариант NM_021911.2(*GABRB2_v001*):c.373G>A p.(Asp125Asn) в гене *GABRB2*.
- Гетерозиготные патогенные варианты в этом гене описаны у пациентов с ранней эпилептической энцефалопатией 2 (OMIM #617829)
- В базе данных HGMD описан как патогенный
- Данный вариант отсутствует в контрольных выборках
- Ваша оценка?
- **Ответ: Вероятно патогенный вариант (PM2, PS2, PP5)**



Asp125Asn

c.373G>A

p.D125N



Developmental and epileptic encephalopathy

[Hamdan \(2017\) Am J Hum Genet 101, 664](#)

Данные из статьи

- 197 больных с эпилепсией
- Всем провели WGS или WES
- Имеется только клиническое описание

ARTICLE

High Rate of Recurrent *De Novo* Mutations in Developmental and Epileptic Encephalopathies

Fadi F. Hamdan,¹ Candace T. Myers,² Patrick Cossette,^{3,4} Philippe Lemay,¹ Dan Spiegelman,⁵ Alexandre Dionne Laporte,⁵ Christina Nassif,¹ Ousmane Diallo,⁵ Jean Monlong,^{6,7} Maxime Cadieux-Dion,^{3,8,9} Sylvia Dobrzeniecka,³ Caroline Meloche,³ Kyle Retterer,¹⁰ Megan T. Cho,¹⁰ Jill A. Rosenfeld,¹¹ Weimin Bi,^{11,12} Christine Massicotte,¹ Marguerite Miguët,¹ Ledia Brunga,¹³ Brigid M. Regan,¹⁴ Kelly Mo,¹⁴ Cory Tam,¹⁴ Amy Schneider,¹⁵ Georgie Hollingsworth,¹⁵ Deciphering Developmental Disorders Study,¹⁶ David R. FitzPatrick,¹⁷ Alan Donaldson,¹⁸ Natalie Canham,¹⁹ Edward Blair,²⁰ Bronwyn Kerr,²¹ Andrew E. Fry,²² Rhys H. Thomas,²³ Joss Shelagh,²⁴

(Author list continued on next page)

K.02591	female	10 years	c.373G>A (p.Asp125Asn) (WES ^b)	GDD, moderate ID DEE	6 years	febrile, GTC	<u>VPA</u>	ND	normal	acquired microcephaly, no seizures (responded to VPA; off medication)
---------	--------	----------	--	----------------------	---------	--------------	------------	----	--------	---

5. Вариант в гене *SCN1A*


- Клинические данные: Пробанд, мальчик 4,5 лет, имеет грубое отставание психомоторного развития, дебютировавшее с судорог в 6 мес. Сестра пробанда — 6 лет, не разговаривает. Родители здоровы.
- WES:

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

5. Вариант в гене *SCN1A*

- Анализ сегрегации не проводился
- Гетерозиготные патогенные варианты в гене *SCN1A* описаны у пациентов с семейными фибрильными судорогами, GEFS+, синдромом Драве (РЭЭ 6 типа)
- 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
- Ваша оценка?

Thr1174Ser	c.3521C>G	p.T1174S		Hemiplegic migraine	Gargus (2007) <i>Pediatr Neurol</i> 37, 407 Escayg (2001) <i>Am J Hum Genet</i> 68: 866 [Additional phenotype] Yordanova (2011) <i>Neurosci Lett</i> 494: 180 [Additional phenotype] 4 more reference(s)...
------------	-----------	----------	---	---------------------	--

5. Вариант в гене *SCN1A*



RESEARCH ARTICLE

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

Dennis Lal^{1,2,3,4*}, Eva M. Reinthaler⁵, Borislav Dejanovic⁶, Patrick May⁷,

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

5. Вариант в гене *SCN1A*

- Что мы забыли?

Ваша оценка?

Population Frequencies

Population	Allele Count	Allele Number	Number of Homozygotes	Allele Frequency
▶ European (Finnish)	87	25122	2	0.003463
▶ European (non-Finnish)	362	128886	1	0.002809
▶ Ashkenazi Jewish	8	10362	0	0.0007721
▶ Other	5	7220	0	0.0006925
▶ African	9	24968	0	0.0003605
▶ South Asian	7	30606	0	0.0002287
▶ Latino	4	35426	0	0.0001129
▶ East Asian	0	19942	0	0.000
Total	482	282532	3	0.001706

Ответ: Доброкачественный вариант (BS1, BS2)

6. Вариант в гене *CFTR*

- Пробанд мальчик с респираторными симптомами, вязкой мокротой и «барабанные»鼓膜
- Проведен поиск в базе данных автоматически
- Выявлен вариант
- Вариант затрагивает функциональный домен
- Описан как патологический

Population Frequencies ⓘ				
Population	Allele Count	Allele Number	Number of Homozygotes	Allele Frequency
▶ European (non-Finnish)	1598	129034	1	0.01238
▶ Other	49	7214	0	0.006792
▶ Ashkenazi Jewish	58	10368	0	0.005594
▶ Latino	135	35426	0	0.003811
▶ African	65	24958	0	0.002604
▶ European (Finnish)	61	25074	0	0.002433
▶ South Asian	61	30608	0	0.001993
▶ East Asian	0	19948	0	0.000
Female	939	129374	0	0.007258
Male	1088	153256	1	0.007099
Total	2027	282630	1	0.007172

носители, с наличием густой, вязкой мокроты

и других симптомов

в тяжелой форме заболевания

Ваша оценка?

Ответ: **Патогенный вариант**

8. Вариант в гене SCN1A

- Пробанд мальчик 4 лет с ранней эпилептической энцефалопатией
- Проведен WES и выявлен вариант NM_001165963.2:c.4285-4A>G в гене *SCN1A*.
- Отсутствует в контрольных выборках
- Вариант описан как патогенный в базе данных HGMD
- Анализ сегрегации невозможен – отец недоступен

c.4285-4A>G

DM

Dravet syndrome

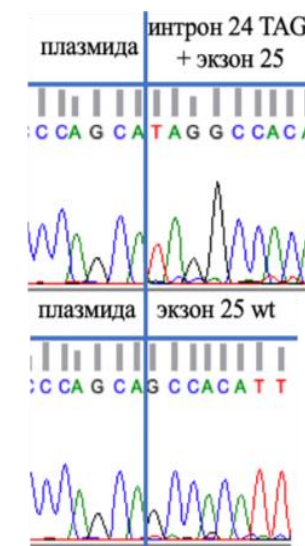
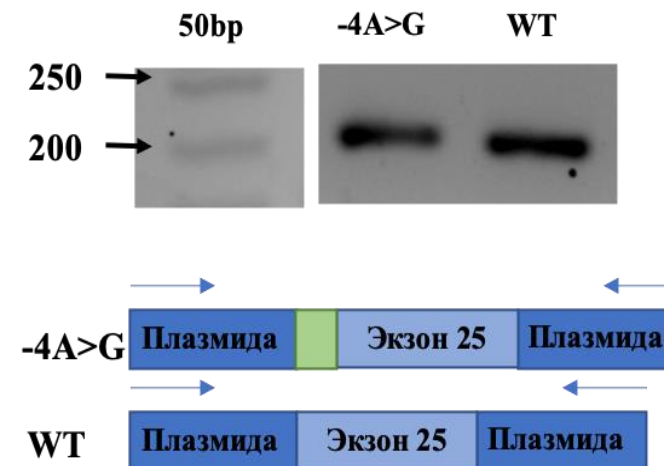
Mahdieh (2018) Clin Neurol Neurosurg 166, 80

8. Вариант в гене SCN1A

- В лаборатории функциональной геномики проведен функциональный анализ
- Наблюдается удлинение экзона на 3 буквы – TAG!
- Ваша оценка?
- **Ответ: Вероятно патогенный вариант (PM2,PP5,PS3)**

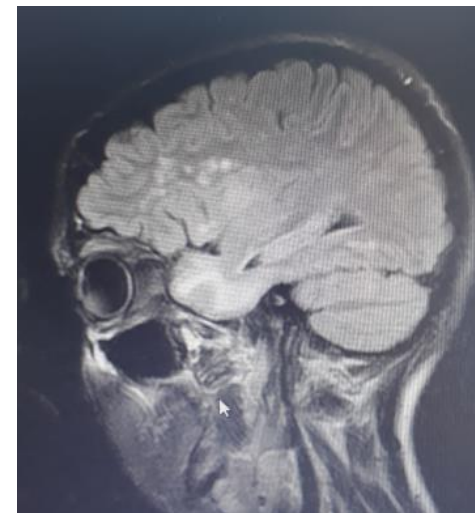
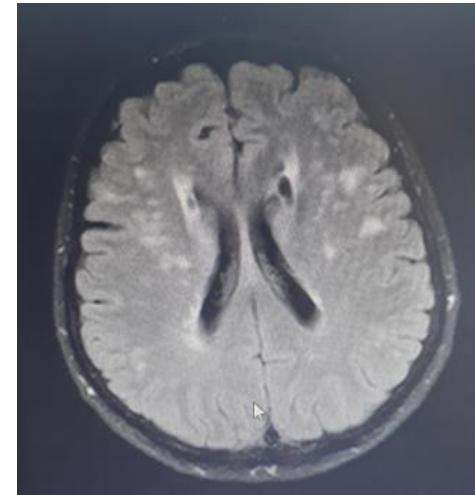
A		G	
TAT	} Tyr	TGT	} Cys
TAC		TGC	
TAA	Stop	TGA	Stop
TAG	Stop	TGG	Trp

T C A G



8. Вариант в гене *NOTCH3*

- Пробанд – женщина 39 лет. Диагноз: Демиелинизирующее заболевание нервной системы неуточненное. Лейкоэнцефалопатия. Возможный рассеянный склероз, инсультоподобный дебют с преходящей пирамидной недостаточностью справа, гемипарезом справа, дизартрией? Синдром, имитирующий рассеянный склероз? Системный васкулит? Синдром CADASIL? MELAS? Рефлекторный тетрапарез. Чувствительные нарушения в анамнезе.
- Проведено секвенирование гена *NOTCH3*



8. Вариант в гене *NOTCH3*

- Родители недоступны для анализа сегрегации
- У отца микроинсульты в 50. умер в 59

Заключение:

Методом прямого автоматического секвенирования проведен частичный анализ гена *NOTCH3* (CADASIL синдром, MN_000435). Исследованы 2, 3, 4, 5, 6 экзоны данного гена и прилежащие интронные области. В интроне 3 гена обнаружена не описанная ранее замена с.341-1G>C в гетерозиготном состоянии. Анализ биоинформатическими методами (Human Splicing Finder) показал высокую вероятность патогенности данной замены (нарушение сайта сплайсинга). Рекомендуется консультация лечащего врача.

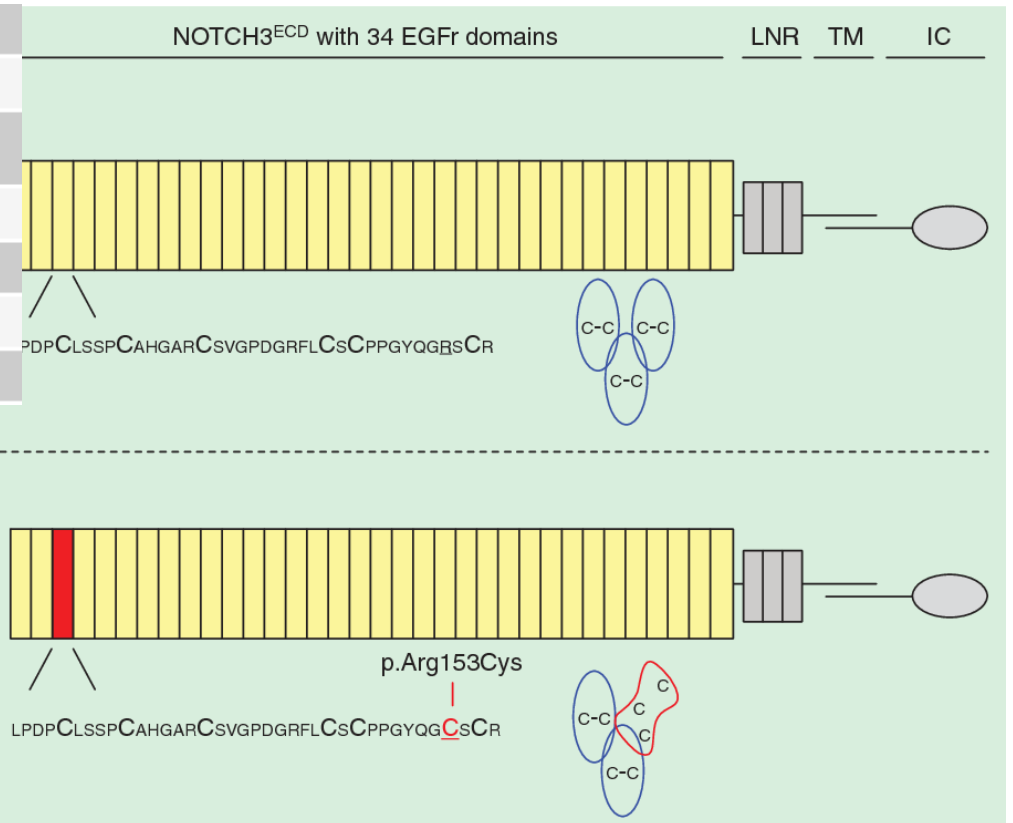
Популяционные данные

- Ген относительно толерантен к вариантам с потерей функции
- 22 варианта с потерей функции описано у здоровых людей 50-60-70 лет

Variant ID	Source	Consequence	Annotation	Flags	Allele Count	Allele Number
19-15276597-C-T	E	c.5667+1G>A	splice donor		1	247348
19-15276713-CG-C	E	p.Arg1851ValfsTer60	frameshift		1	251166
19-15276816-ATG-A	E	p.Thr1816llefsTer3	frameshift		1	251428
19-15278168-G-A	E	p.Gln1752Ter	stop gained		1	249776
19-15278221-ACC-A	E	c.5200-1_5200delGG	splice acceptor		1	244354
19-15278224-T-A	E	c.5200-2A>T	splice acceptor		1	243908
19-15280950-C-A	E	p.Glu1716Ter	stop gained		1	234766
19-15281235-A-AG	E	p.Leu1674ProfsTer5	frameshift		1	249550
19-15281495-C-CAGTGGGTAC...	E	p.Arg1627ProfsTer68	frameshift		1	196594
19-15285132-AGCCGCAC-A	E	p.Glu1492AspfsTer84	frameshift		4	158142
19-15288380-G-C	E	p.Tyr1453Ter	stop gained		1	235552
19-15288406-C-CG	E	p.Ala1445ArgfsTer118	frameshift		1	220096
19-15288465-CA-C	E	p.Trp1425GlyfsTer153	frameshift		1	160712
19-15290000-AG-A	E	p.Leu1185TrpfsTer87	frameshift		1	250252
19-15290039-G-C	E	p.Ser1172Ter	stop gained		1	249862
19-15290262-C-A	E	p.Glu1125Ter	stop gained		1	251264
19-15290305-A-T	E	p.Cys1110Ter	stop gained		1	251040
19-15291784-GC-G	E	p.Gly994AlafsTer278	frameshift		1	209140
19-15291974-C-T	E	c.2793-1G>A	splice acceptor		1	238108
19-15291975-T-C	G	c.2793-2A>G	splice acceptor		1	31390

Патогенез CADASIL

Cys43Gly	c.127T>G	p.C43G	DM	Cys65Gly	c.193T>G	p.C65G	DM	CADASIL
Cys43Phe	c.128G>T	p.C43F	DM	Cys65Ser	c.194G>C	p.C65S	DM	CADASIL
Cys43Ser	c.128G>C	p.C43S	DM	Cys65Tyr	c.194G>A	p.C65Y	DM	CADASIL
Cys43Tyr	c.128G>A	p.C43Y	DM	Cys67Ser	c.199T>A	p.C67S	DM	CADASIL
Cys49Arg	c.145T>C	p.C49R	DM	Cys67Tyr	c.200G>A	p.C67Y	DM	CADASIL
Cys49Gly	c.145T>G	Cys76Arg	c.226T>C	p.C76R	DM	CADASIL	DM	CADASIL
Cys49Phe	c.146G>T	Cys76Trp	c.228T>G	p.C76W	DM	CADASIL	DM	CADASIL
Cys49Tyr	c.146G>A	Cys76Tyr	c.227G>A	p.C76Y	DM	CADASIL	DM	CADASIL
Gly53Cys	c.157G>T	Asp80Gly	c.239A>G	p.D80G	DM	CADASIL		
Arg54Cys	c.160C>T	Cys82Arg	c.244T>C	p.C82R	DM	CADASIL		
Cys55Gly	c.163T>G	Cys87Arg	c.259T>C	p.C87R	DM	CADASIL		
Ser60Cys	c.179C>G	Cys87Phe	c.260G>T	p.C87F	DM	CADASIL		
		Cys87Tyr	c.260G>A	p.C87Y	DM	CADASIL		
		Gly89Cys	c.265G>T	p.G89C	DM	CADASIL		



- Ваша оценка?

Вариант c.341-2A>G

- RT-PCR показал, что замена приводит к делеции 21 нуклеотидов
- На белковом уровне делеция 7 аминокислот включая 6 остаток цистеина во втором EGF домене
- Ваша оценка?
- **Ответ : Патогенный вариант (PM2, PM4, PS3, PM1)**

Neurology®

Splice site mutation causing a seven amino acid *Notch3* in-frame deletion in CADASIL

A. Joutel, H. Chabriat, K. Vahedi, et al.

Neurology 2000;54;1874

DOI 10.1212/WNL.54.9.1874

c.341-2A>G

DM

CADASIL

[Joutel \(2000\) Neurology 54, 1874](#)

Take home messages

1. Даже если вариант описан как патогенный в HGMD, всегда необходимо читать статьи!
2. Анализ сегрегации очень важен и может перевести статус VUS как в вероятно патогенный, так и в доброкачественный.
3. Анализ сегрегации необходимо делать всегда
4. Для грамотной интерпретации необходимо знать этиопатогенез заболевания
5. Часто лишь функциональный анализ может поставить окончательную точку в вопросе значимости выявленного варианта
6. Нельзя делать дородовую диагностику на VUS