

Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»
Министерства здравоохранения Республики Беларусь

Лаборатория молекулярно-генетических исследований

**Анализ таргетных регионов по данным от высокопроизводительного
секвенирования
Панель «Наследственная предрасположенность к онкологии»**

Пациент: Иванов Иван Иванович

Внутренний номер: 1234/56

Пол: мужской

Дата рождения: 12.12.2012

Вид биоматериала: кровь венозная

Биологический материал за дату: 14.02.2025

Направительный диагноз: Ретинобластома. Наследственная онкология?

Клинические характеристики: Ретинобластома билатеральная. Лейкокория, ухудшение зрения.

Адрес регистрации: Минская область, г. Минск,

Результаты исследования:

В генах

ATM, RB1, RET

выявлено 3 генетических варианта.

**Полученные данные не являются основанием для исключения клинического диагноза,
требуют тщательного сопоставления с клиническими признаками и могут быть
правильно интерпретированы только врачом-генетиком.**

**При выявлении врачом-генетиком варианта или вариантов, вероятно связанных с
заболеванием пациента, их наличие рекомендовано подтвердить референсным методом.**

См. разделы «Приложение 1» и «Приложение 2»

Приложение 1

Включает в себя выявленные генетические варианты с патогенным или вероятно патогенным эффектом, а также варианты неопределённого клинического значения с частотой встречаемости <1% (gnomAD), общей глубиной прочтения (Total Read Depth) >10 и частотой альтернативного аллеля (Variant Read Frequency) >30%:

Таблица 1. Дополнительные данные:

Ген*	Транскрипт	CDC	Белок	Тип наследования	Зиготность	Глубина прочтения	ID dbSNP**	Классификация варианта***
ATM	ENST00000675843	c.1819G>A	p.V607I	AD/AR/SMu	het	127/270	rs878853489	Uncertain significance
RB1	ENST00000267163	c.401T>A	p.L134X	AD	het	147/284	-	Likely pathogenic
RET	ENST00000355710	c.3127T>G	p.C1043G	AD	het	153/313	rs1367574614	Uncertain significance

* названия генов даны по HUGO Gene Nomenclature Committee;

** при наличии, приведён идентификатор варианта в базе данных dbSNP;

*** классификация вариантов представлена на основании обработки данных с использованием Germline Classification (VarSome), CliSeq Interpreter (Genes2Me), а также, при наличии, информации из базы ClinVar.

1) Аллельные варианты в гене *ATM* упоминаются у пациентов с заболеванием Breast cancer, susceptibility to (аутосомно-доминантный тип наследования), OMIM #114480. Аллельные варианты в гене *ATM* упоминаются у пациентов с заболеванием Ataxia-telangiectasia (аутосомно-рецессивный тип наследования), OMIM #208900. Аллельные варианты в гене *ATM* упоминаются у пациентов с заболеванием Lymphoma, B-cell non-Hodgkin, somatic. Аллельные варианты в гене *ATM* упоминаются у пациентов с заболеванием Lymphoma, mantle cell, somatic. Аллельные варианты в гене *ATM* упоминаются у пациентов с заболеванием T-cell prolymphocytic leukemia, somatic.

• В гене *ATM* обнаружена замена нуклеотида в гетерозиготном состоянии c.1819G>A, приводящая к замене аминокислоты p.V607I. Для данного варианта в базах данных аллельных вариантов человека (gnomAD) информация о частоте альтернативного аллеля отсутствует.

Данная замена не описана в литературе.

Данные от in silico предикторов патогенности соотносятся следующим образом: количество благоприятных прогнозов - 12 (MutationAssessor, MetaSVM, MetaLR, M-CAP, MutPred, PrimateAI, DEOGEN2, BayesDel_addAF, BayesDel_noAF, ClinPred, CADD, fathmm_XF_coding); количество неблагоприятных прогнозов - 0 ().

По данным ClinVar вариант имеет статус Uncertain significance.

2) Аллельные варианты в гене *RB1* упоминаются у пациентов с заболеванием Bladder cancer, somatic, OMIM #109800. Аллельные варианты в гене *RB1* упоминаются у пациентов с заболеванием Osteosarcoma, somatic, OMIM #259500. Аллельные варианты в гене *RB1* упоминаются у пациентов с заболеванием Retinoblastoma (аутосомно-доминантный тип

наследования), OMIM #180200. Аллельные варианты в гене *RB1* упоминаются у пациентов с заболеванием Small cell cancer of the lung, somatic, OMIM #182280.

- В гене *RB1* обнаружена замена нуклеотида в гетерозиготном состоянии с.401T>A, приводящая к замене аминокислоты p.L134X. Для данного варианта в базах данных аллельных вариантов человека (gnomAD) информация о частоте альтернативного аллеля отсутствует.

Данная замена не описана в литературе.

Данные от *in silico* предикторов патогенности соотносятся следующим образом: количество благоприятных прогнозов - 1 (fathmm_XF_coding); количество неблагоприятных прогнозов - 4 (VEST4, BayesDel_addAF, BayesDel_noAF, CADD).

Рассматриваемый нуклеотидный вариант не представлен в базе данных ClinVar.

3) Аллельные варианты в гене *RET* упоминаются у пациентов с заболеванием Hirschsprung disease, susceptibility to, 1 (аутосомно-доминантный тип наследования), OMIM #142623. Аллельные варианты в гене *RET* упоминаются у пациентов с заболеванием Medullary thyroid carcinoma (аутосомно-доминантный тип наследования), OMIM #155240. Аллельные варианты в гене *RET* упоминаются у пациентов с заболеванием Multiple endocrine neoplasia IIA (аутосомно-доминантный тип наследования), OMIM #171400. Аллельные варианты в гене *RET* упоминаются у пациентов с заболеванием Multiple endocrine neoplasia IIB (аутосомно-доминантный тип наследования), OMIM #162300. Аллельные варианты в гене *RET* упоминаются у пациентов с заболеванием Pheochromocytoma (аутосомно-доминантный тип наследования), OMIM #171300.

- В гене *RET* обнаружена замена нуклеотида в гетерозиготном состоянии с.3127T>G, приводящая к замене аминокислоты p.C1043G. Для данного варианта в базах данных аллельных вариантов человека (gnomAD) частота альтернативного аллеля достигает 4.33704e-06.

Данная замена не описана в литературе.

Данные от *in silico* предикторов патогенности соотносятся следующим образом: количество благоприятных прогнозов - 5 (MutationAssessor, MetaSVM, MetaLR, PrimateAI, ClinPred); количество неблагоприятных прогнозов - 15 (SIFT, SIFT4G, PROVEAN, VEST4, MetaRNN, M-CAP, REVEL, MutPred, MVP, DEOGEN2, BayesDel_addAF, BayesDel_noAF, LIST-S2, CADD, fathmm-XF_coding).

По данным ClinVar вариант имеет статус Uncertain significance.

В случае предполагаемых компаунд-гетерозиготных замен, для определения, находятся ли варианты в цис- или транс- положении, необходимо провести дополнительное исследование носительства выявленных вариантов у родителей.

Описание исследования

Анализ ДНК пациента выполнен методом таргетного секвенирования с использованием технологии секвенирования нового поколения (NGS) и парноконцевого чтения на генетическом анализаторе MiSeq производства компании Illumina (США), со средней глубиной прочтения 302.12x и покрытием целевого региона 87.34% при глубине прочтения не менее 30x. Генетическое исследование проводилось с использованием панели Common Hereditary Cancer NGS Panel производства Genes2Me (Индия).

Предобработка данных NGS-секвенирования (оценка качества, тримминг и фильтрация) проводилась с использованием программных решений FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) и Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>). Референсная последовательность (сборка генома – hg19) и все необходимые для анализа файлы взяты с платформы/ресурса UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>). Процедура выравнивания библиотеки на подготовленную референсную последовательность проводилась с использованием программы minimap2 (<https://github.com/lh3/minimap2>). Последующая обработка результатов (фильтрация, дедупликация, рекалибровка) проводилась с помощью программ Samtools (<http://samtools.sourceforge.net>) и Picard (<https://broadinstitute.github.io/picard/>). Для поиска и аннотации полученных вариантов использованы модули GATK (<https://gatk.broadinstitute.org>) и Annovar (<https://annovar.openbioinformatics.org>) соответственно. Фильтрация и форматирование результатов аннотации проводились с использованием разработанного модуля. Информация о типах наследования для рассматриваемых генов взята из баз данных Online Mendelian Inheritance in Man (<https://www.omim.org/>) и Gene Curation Coalition (GenCC) Database (DB) (<https://thegencc.org/>).

Анализ патогенности выявленных нарушений осуществлялся для несинонимичных однонуклеотидных вариантов с частотой встречаемости в популяции <1% (по gnomAD). Результаты NGS анализировались с использованием базы данных dbNSFP v5.1 (<https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP>), содержащей информацию, полученную от различных программ предсказания патогенности: PolyPhen-2, SIFT, SIFT4G, MutationTaster, MutationAssessor, PROVEAN, VEST4, MetaSVM, MetaLR, MetaRNN, M-CAP, REVEL, MutPred, MVP, PrimateAI, DEOGEN2, BayesDel, ClinPred, LIST-S2, CADD, fathmm-XF, AlphaMissense.

Варианты в генах, включённых в панель Common Hereditary Cancer NGS Panel, проанализированы на предмет влияния на структуру и функцию белка, клинический статус, частоту встречаемости и классифицированы согласно ClinVar в одну из пяти категорий (патогенные варианты, вероятно патогенные варианты, варианты неопределённой клинической значимости, вероятно доброкачественные варианты, доброкачественные варианты). Варианты из категории «Патогенные варианты», «Вероятно патогенные варианты» и «Варианты неопределённой клинической значимости» включены в заключение. Генетический вариант – это изменение в последовательности ДНК, которое может оказывать влияние на экспрессию гена, структуру или функцию кодируемого белка и, как следствие, на развитие или предрасположенность к заболеванию.

1. Патогенный вариант. Вариант ответственен за возникновение заболевания и имеет достаточно научных доказательств о связи с патологией. Такие варианты часто называют мутациями.

2. Вероятно патогенный вариант. Вариант с большой вероятностью может способствовать развитию заболевания, имеется недостаточное количество научных доказательств для подтверждения эффекта. Ожидается, что дополнительные испытания подтвердят утверждение о патогенности.

3. Вариант неопределенной значимости. Вариант, влияние которого трудно классифицировать на основании имеющихся научных данных.

Заключение о клинической значимости найденных вариантов дано с учетом рекомендаций American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), Human Gene Mutation Database (HGMD), Российского руководства по интерпретации данных NGS, а также анализа клинических литературных данных (PubMed).

Пересмотр результатов высокопроизводительного секвенирования через год и более может привести к выявлению клинически значимого варианта, который ранее не был идентифицирован.

Информируем Вас о том, что для пересмотра результатов высокопроизводительного секвенирования необходимы первичные данные в формате FASTQ – стандартном формате, содержащем данные о последовательностях ДНК или РНК, полученные в ходе секвенирования. Однако их анализ требует дополнительной обработки, которая проводится исключительно профильными специалистами. По запросу пациента или лечащего врача первичные данные секвенирования в формате FASTQ могут быть выданы путем записи на предоставленный Вами флэш-накопитель или путем скачивания по ссылке, но не позднее, чем в течение 6 месяцев с даты выдачи заключения.

Варианты, не имеющие признаков патогенности, либо имеющие некоторые признаки патогенности, но несоответствующие фенотипу, описанному в сопроводительных документах, могут быть не включены в заключение.

Генетическое исследование проводилось с использованием панели Common Hereditary Cancer NGS Panel производства Genes2Me (Индия), включающей 83 клинически значимых гена.

В состав панели входят следующие гены: *APC**, *ATM**, *ATRX*, *AXIN2*, *BAP1*, *BARD1*, *BLM*, *BMPR1A*, *BRAF*, *BRCA1**, *BRCA2**, *BRIP1*, *CDH1**, *CDK4*, *CDKN1C*, *CDKN2A**, *CHEK2*, *CTR9*, *EGLN1*, *EGLN2*, *EPAS1*, *EPCAM**, *EXT1*, *EXT2*, *FGFR1*, *FH*, *FLCN*, *GREM1*, *H3-3A (H3F3A)*, *HRAS*, *IDH2*, *KIF1B*, *KIT*, *KMT2D*, *MAX*, *MDH2*, *MEN1*, *MERTK*, *MET*, *MLH1**, *MRE11*, *MSH2**, *MSH3*, *MSH6**, *MTAP*, *MUTYH*, *NBN*, *NF1*, *NF2*, *NTHL1*, *PALB2**, *PDGFRA*, *PMS2**, *POLD1*, *POLE*, *PRSS1*, *PTEN**, *RAD50*, *RAD51C**, *RAD51D*, *RB1*, *RECQL4*, *REST*, *RET*, *RNF43*, *SDHA*, *SDHAF2*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SLX4*, *SMAD4*, *SPINK1*, *SQSTM1*, *STK11**, *TMEM127*, *TP53**, *TRIM28*, *TSC1*, *TSC2**, *VHL*, *WT1*, *XRCC2*.

Для генов, отмеченных звездочкой (*), в панели дополнительно предусмотрен анализ вариаций числа копий (Copy Number Variations, CNV).

Ограничения методики

- Технические ограничения метода не позволяют выявлять инсерции и делеции длиной более 10 п.о., аллельные варианты в интронных областях (за исключением регионов сайтов-сплайсинга), протяженные участки триплетных и других повторов, аллельные варианты в генах, у которых в геноме существует близкий по последовательности паралог (псевдоген), варианты в GC-богатых участках, а также эпигенетические нарушения.
- Чувствительность и специфичность обнаружения вариантов, находящихся в областях сегментарных дупликаций, могут быть низкими.
- Частота ошибочно обнаруженных вариантов в среднем составляет не более 1%, но в отдельных участках может достигать 5%, поэтому выявленные клинически-значимые варианты требуют подтверждения референсным методом (например методом секвенирования по Сэнгеру).
- Метод не предназначен для определения цис-/транс- положения варианта гетерозиготного компаунда, а также для оценки уровня метилирования или выявления варианта в состоянии мозаицизма.
- В некоторых случаях биоинформационный анализ данных позволяет заподозрить наличие микроделекций и микродупликаций. Обнаруженные перестройки подлежат обязательному подтверждению референсным методом (например методом мультиплексной проба-зависимой реакции).
- Метод не предназначен для анализа вариаций числа копий генов, не отмеченных звездочкой (*), и мозаичных вариантов числа копий генов.
- Метод не предназначен для выявления однородительских дисомий, полиплоидий, анеуплоидий.
- Невыявление вариантов при секвенировании не исключает их наличия у пациента. Метод позволяет определить последовательность в 85-95% целевых участков, согласно предоставленной производителем информации.
- Результативность обследования сильно зависит от наличия информации о варианте во внешних базах данных клинической информации, а также от изученности заболевания пациента.
- Редкие доброкачественные по предикторам патогенности варианты могут быть классифицированы неверно.
- В заключение включены только варианты, выявленные в перечне генов. Возможно, из-за недостаточной информации о связи гена с фенотипом, вариант присутствует в данных, но не выбран для анализа и интерпретации и не включён в заключение.

Данные секвенирования и обнаруженные варианты не являются окончательным диагнозом и должны использоваться с другими лабораторными и клиническими данными. Корректная интерпретация результатов секвенирования может быть выполнена только врачом-генетиком.

Медицинские процедуры, такие как пересадка костного мозга или переливание крови, могут привести к неверным результатам. Также результаты могут быть интерпретированы неверно, если предоставленная пациентом и/или врачом информация является недостоверной либо неполной.

Ссылки

1. Номенклатура генов и генетических вариантов:

HUGO Gene Nomenclature Committee (NGNC): <http://www.genenames.org/>

Human Genome Variation Society: <http://www.HGVS.org/varnomen/>

2. Руководство Американской коллегии по Медицинской Генетике и Геномике (ACMG) для оценки клинической значимости найденных генетических вариантов:

http://acmg.net/docs/Standards_Guidelines_for_the_Interpretation_of_Sequence_Variants.pdf

3. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). («Медицинская генетика», 2017, Том 16, № 7):

<https://www.medgen-journal.ru/jour/article/view/308/224>

4. Базы данных транскриптов:

RefSeq Gene: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>

Ensembl: http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index

5. База данных известных генетических вариантов:

dbSNP: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

6. База по наследственным моногенным заболеваниям человека

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): <http://www.omim.org/>

Gene Curation Coalition (GenCC) Database (DB): <https://thegencc.org/>

7. База по частотам известных генетических вариантов:

gnomAD Exomes, gnomAD Genomes: <http://gnomad.broadinstitute.org/>

8. Базы данных клинических значений некоторых генетических вариантов:

ClinVar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC): <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

Varsome: <https://varsome.com>

9. Поиск публикаций в реферируемых международных научных журналах:

PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

10. Программы компьютерного предсказания патогенности:

Varsome: <https://varsome.com>

Интерпретация результатов исследования,
создание заключения:

_____ Петров П.П.

Дата заключения: 23.05.2025