

Klassifizierung von Spleißvarianten

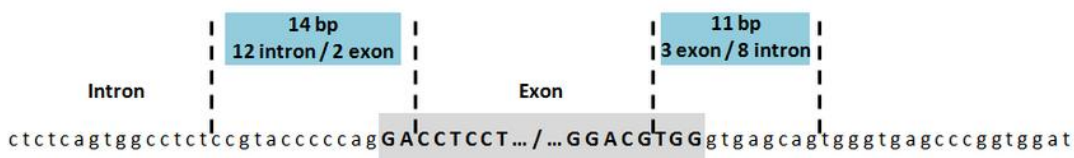
Grundsätzlich werden alle Varianten nach den Guidelines des „American College for Medical Genetics and Genomics“ (ACMG) klassifiziert ⁽⁴⁾. Varianten die hiermit nicht erfasst werden können (z.B. intronische Varianten mit möglichem Einfluss auf das korrekte Spleißen) werden mit einem Klassifizierungssystem auf Grundlage der von Houdayer et al. ⁽²⁾ veröffentlichten Richtlinien beurteilt, um Varianten für weiterführende Analysen (z.B. cDNA-Analyse) zu priorisieren.

1. Varianten der konservierten Spleißstellen (AG/gt oder ag/GT)

Varianten an der Position +/- 1 und 2 sind nach den **ACMG-Guidelines** ⁽⁴⁾ zu Klassifizieren (hier Kriterium PVS1, siehe ACMG-Klassifizierungssystem: <http://www.mgz-muenchen.de/mgz-klassifikationssystem.html>). In der Regel führen diese Varianten zu einer gestörten Funktion des Genprodukts, es sind jedoch Ausnahmen zu beachten:

1. Trunkierende Varianten („loss of function“ Varianten bzw. „null Varianten“) müssen als Pathomechanismus für die Erkrankung in dem entsprechenden Gen beschrieben sein (z.B. im *MYH7*-Gen sind nur missense Varianten mit der Erkrankung assoziiert)
2. Eine kryptische Spleißstelle (AG/GT) in der Nähe wird aktiviert und *das* (vorhergesagte) neue Exon wird *in-frame* gespleißt
3. Das (vorhergesagte) geskippte Exon (bzw. Exons) wird physiologisch alternativ gespleißt (siehe u.a. UCSC-Browser oder <http://www.eurasnet.info/tools/asdatabases>) z.B. *BRCA2* c.68-7T>A führt zwar zum skipping von Exon 3, dies wird jedoch auch physiologisch alternativ gespleißt
4. Das (vorhergesagte) geskippte Exon (bzw. Exons) wird *in frame* gespleißt und enthält keine bekannte funktionelle Domäne (siehe u.a. www.nextprot.org/)
5. Die (vorhergesagte) Spleißveränderung führt nur zu einer geringen Längenänderung des Proteins (*in frame* Deletionen oder Insertionen von wenigen Aminosäuren) ohne die Funktion des Proteins zu beeinflussen (z.B. Lokalisation außerhalb funktioneller Domänen)

2. Variante der Konsensus 5´ und 3´ Spleißstellen nach Cartegni ⁽²⁾



Varianten in den Cartegni Konsensus Spleißstellen (siehe Grafik) welche alle der folgenden Kriterien erfüllen und kein ACMG-Kriterium ⁽⁴⁾ erfüllen werden als Klasse 3 eingestuft:

- **Analyse mit MaxEntScan (MES):** Bei einem Unterschied zwischen Wildtyp zu Mutation von **mehr als 15%** (entspricht einer Sensitivität über 96%)
- **Analyse mit Splice Site Finder Like (SSF):** Bei einem Unterschied zwischen Wildtyp zu Mutation von **mehr als 5%** (entspricht einer Spezifität über 87%)

Weiterführende Analysen (z.B. Segregationsanalyse, cDNA Analyse oder Mini-Gene Assay) können in diesen Fällen in Erwägung gezogen werden.

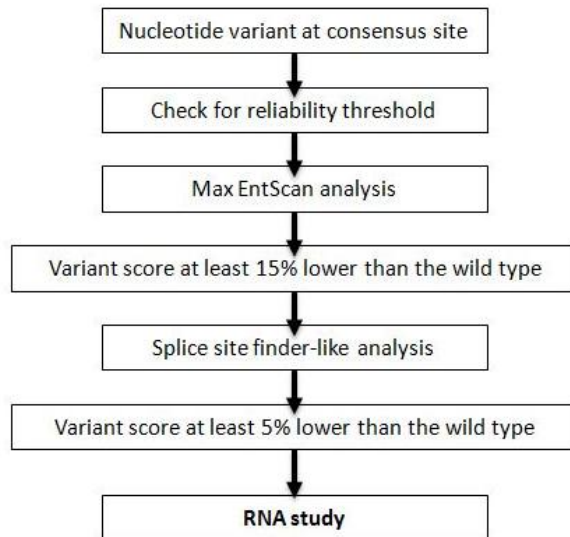
Zu beachten:

- Dies ist nur anwendbar wenn die physiologische Spleißstelle von der Prädiktion-Software ausreichend erkannt wird. Die Schwellenwerte für eine verlässliche Erkennung der WT-Spleißstellen sind: **MES > 3 und SSF > 60.**

- Varianten der Cartegni Konsensus Spleißstellen in sehr großen Exons (z.B. *BRCA1/BRCA2* Exon 11) und sehr kleinen Exons (z.B. *KCNQ3* Exon 9) können nicht verlässlich analysiert werden.
- Deutliche Hinweise auf mögliche Pathogenität wie z.B. eindeutige Klinik, immunhistochemische Daten, zweite Mutation bei rezessivem Erbgang, beschriebene pathogene Variante an selber Stelle, Nukleotidkonservierung sehr hoch, etc. können eine weiterführende Analyse begründen.

Varianten die diese Kriterien nicht erfüllen, werden als Klasse 2 klassifiziert.

Algorithmus:



3. Variante außerhalb der Cartegni Konsensus Spleißstellen ("tief" intronisch oder exonisch) die kein ACMG Kriterium ⁽⁴⁾ erfüllen.

- **Tief intronische Varianten** werden nur dann als **Klasse 3** eingestuft, wenn die o.g. Spleiß-Programme die Erzeugung einer *de novo* Spleißstelle oder die Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle nahe legen. Varianten die diese Kriterien nicht erfüllen werden als **Klasse 2** klassifiziert. ^(2,3)
- **Tief exonische Varianten** werden nur dann als **Klasse 3** eingestuft, wenn die Spleiß-Programme (in diesem Fall alle 5 Alamut Spleiß-Programme verwenden) die Erzeugung einer *de novo* Spleißstelle oder die Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle nahe legen. Varianten die diese Kriterien nicht erfüllen werden als **Klasse 2 (bei stillen Varianten)** oder **Klasse 3 (bei missense Varianten)** klassifiziert. ^(2,3)

ESE- und Branchpoint Prediction Programme werden für die Diagnostik **NICHT** empfohlen (Sensitivität und Spezifität für Diagnostik zu gering). ⁽²⁾

Literatur:

1 Cartegni et al., 2002. *Nat Rev Genet* 3

2 Houdayer et al., 2013. *Hum Mutat* 33

3 Jian et al., 2014. *Nucleic Acids Research* 1

4 Richards et al.; 2015. *Genetics in Medicine* 3.