

Využití automatických a semiautomatických kalkulátorů pro klasifikaci variant v počtu opakování (CNVs) detekovaných pomocí metody array-CGH

Eliška Novotná¹, Miroslav Štolfa², Eva Hladílková^{1,2}, Hana Dynková Filková², Dominik Režný^{1,2}, Vladimíra Vallová^{1,2}, Petr Kuglík^{1,2}

¹ Oddělení genetiky a molekulární biologie, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity

² Sekce cytogenomiky, Centrum molekulární biologie a genetiky, Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity



MUNI
SCI

Úvod:

V současné době čelí klinická cytogenomika výzvám při analýze a interpretaci variant v počtu opakování (CNVs, „Copy Number Variations“), které mohou být spojeny s mnoha genetickými poruchami anebo jsou naopak běžnými populačními variantami. V posledních letech je snaha klasifikaci CNVs usnadnit použitím různých počítačových nástrojů – automatických a semiautomatických kalkulátorů. Ty jsou dostupné jako webové stránky nebo samostatné programy a liší se používáním vlastních vyhodnocovacích algoritmů. Zásadní roli při jejich užití hrají také databáze, které využívají, a kvalita dostupných informací v nich uvedených.

Cíl studie:

Zjistit, jak se vybrané kalkulátory liší v klasifikaci CNVs u pacientů s vrozenými změnami a porovnat je s původně stanovenou klasifikací. Porovnání bylo provedeno zvláště v 5 skupinách podle ACMG klasifikace z roku 2019¹.

Srovnání kalkulátorů:

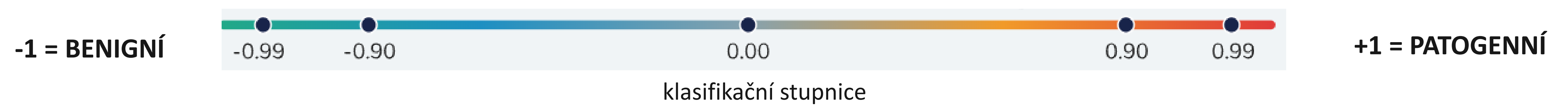
	CNV Clinviewer ²	MarCNV+ISV ³	AnnotSV ⁴	Franklin ⁵
princip fungování	• semiautomatický, pracuje s doporučeními ACMG	• ISV - automatický (strojové učení) • MarCNV - semiautomatický, pracuje s doporučeními ACMG => hybridní skóre	• semiautomatický, pracuje s doporučeními ACMG	• komplexní program na hodnocení genetických změn (CNVs, SNVs*, ROHs**)
výhody	+ vizualizace dat + možnost vygenerovat report + nahrání BED souborů a hodnocení více variant najednou + snadné přepnutí genomů hg19/hg38	+ možnost úpravy hybridního skóre (conservative, balanced, progressive) ve prospěch ISV nebo MarCNV	+ nahrání BED souborů a hodnocení více variant najednou + hodnocení SNVs a indels + úprava více kritérií pro hodnocení varianty (fenotyp, transkripty apod.) + Exomiser skóre*** + překryv s regulačními elementy	+ vizuálně i uživatelsky přívětivý + zadání více informací o pacientovi i variantě (dědičnost, zygotita, fenotyp) + uložení varianty v rámci laboratoře -> hodnocení vícero pracovníky + možnost vygenerovat report + přehled publikací
nevýhody	- web velmi často padá - při hodnocení sekce 4 a 5 ACMG klasifikace nutné skóre spočítat dopředu a uvést v BED souboru	- nutné vše zadávat v hg38 - v manuálně hodnocených sekcích nejde zvolit více kritérií, ani upravit body	- význam příkladán i malému překryvu s patogenními CNVs -> falešně pozitivní výsledky - složitá úprava sekcí 4 a 5 ACMG klasifikace	- velký význam příkladán pHaplo/pTriplo skóre**** -> riziko falešně pozitivních výsledků
možnost využití	• vizualizace dat	• pomocí strojového učení v kombinaci s doporučeními ACMG umožňuje dvojitý pohled na hodnocení patogenity CNVs	• ukázka specifity fenotypu vzhledem k dané variantě • ukázka překryvu s regulačními elementy	• komplexní nástroj pro hodnocení CNVs

* SNVs – jednonukleotidové varianty („Single Nucleotide Variants“); ** ROHs – regiony homozygoty („Regions of Homozygoty“); ***specifita fenotypu vzhledem k zadané variantě; **** pravděpodobnost přítomnosti haploinsuficience/triplosensitivity daného genu či oblasti

Materiál a metody:

- retrospektivní analýza dat vybraných pacientů Sekce klinické cytogenomiky CMBG IHOK FN Brno (2023-2025)
- 67 CNVs detekovaných metodou array-CGH (Agilent Technologies – 8x60K CGH, 4x180K CGH+SNP) rozdělených do 5 skupin na základě ACMG klasifikace z roku 2019¹ se zaměřením především na varianty nejasné klinické signifikance (VOUS)
- 4 kalkulátory – CNV Clinviewer², MarCNV+ISV³, Annot SV⁴ a Franklin⁵.

Sekce doporučení ACMG/ClinGen¹:



sekce 1 – genový obsah; body: -0,60 až 1

sekce 2 – překryv se stanovenou/předpokládanou oblastí citlivou na dávku; body: -1 až 1

sekce 3 – vyhodnocení počtu genů; body: 0 až 0,90

sekce 4 – důkazy z veřejných a interních databází; body: -1 až 0,90

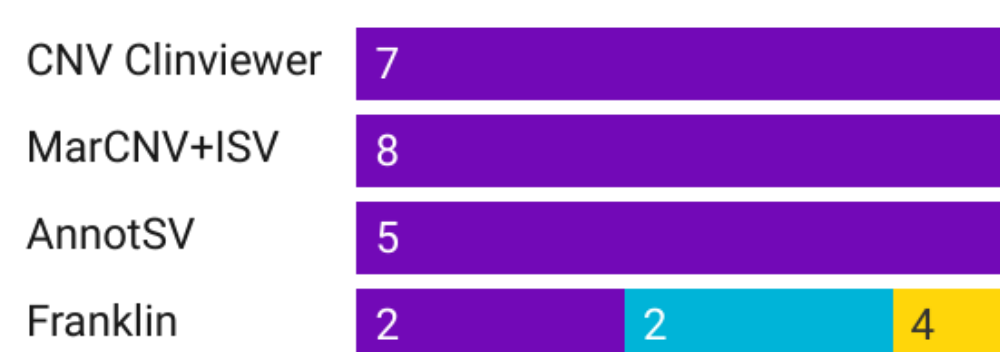
sekce 5 – vzor dědičnosti u pacienta nebo rodinná anamnéza; body: -0,45 až 0,45

Výsledky:

A) Porovnání s původně stanovenou klasifikací

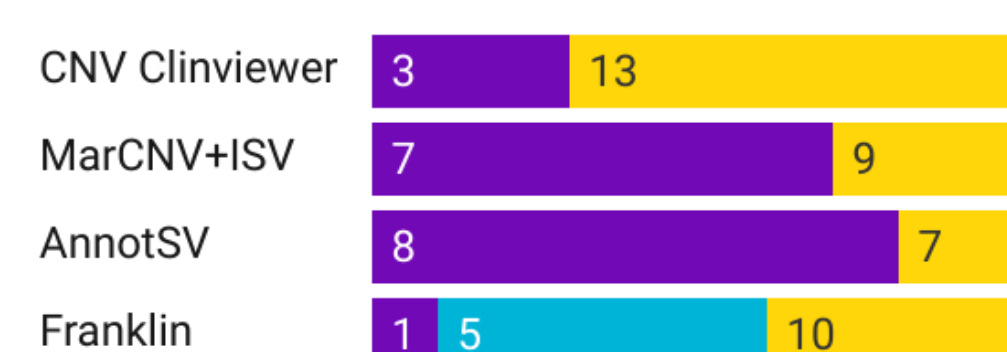
Třída 1 - benigní CNVs

■ BEN ■ P_BEN ■ VOUS ■ P_PAT ■ PAT



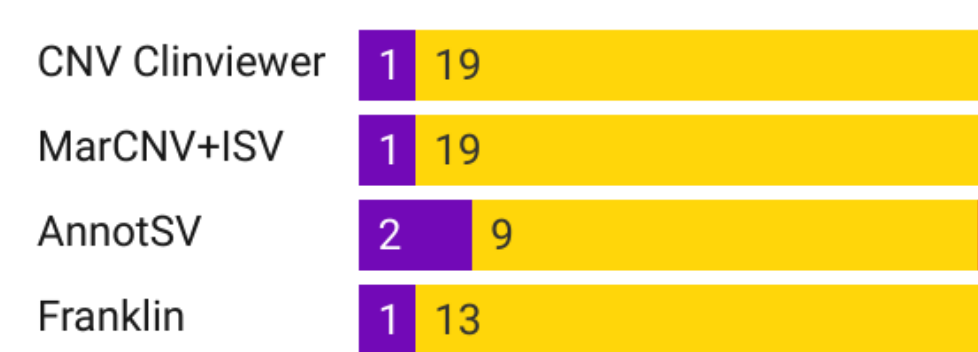
Třída 2 - pravděpodobně benigní CNVs

■ BEN ■ P_BEN ■ VOUS ■ P_PAT ■ PAT



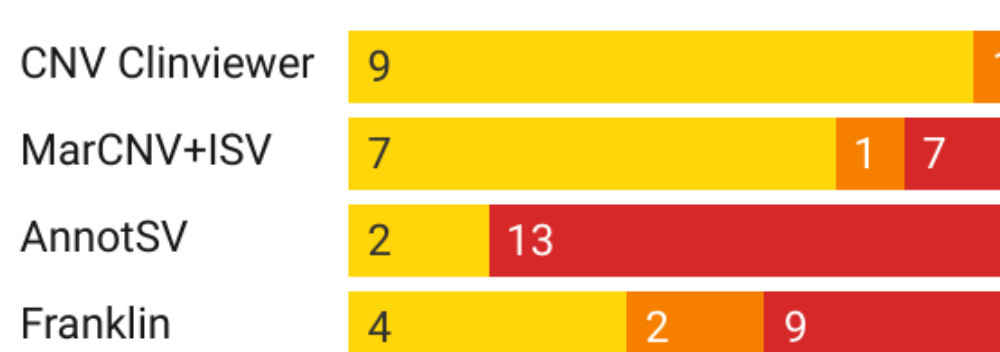
Třída 3 - varianty nejasného významu

■ BEN ■ P_BEN ■ VOUS ■ P_PAT ■ PAT



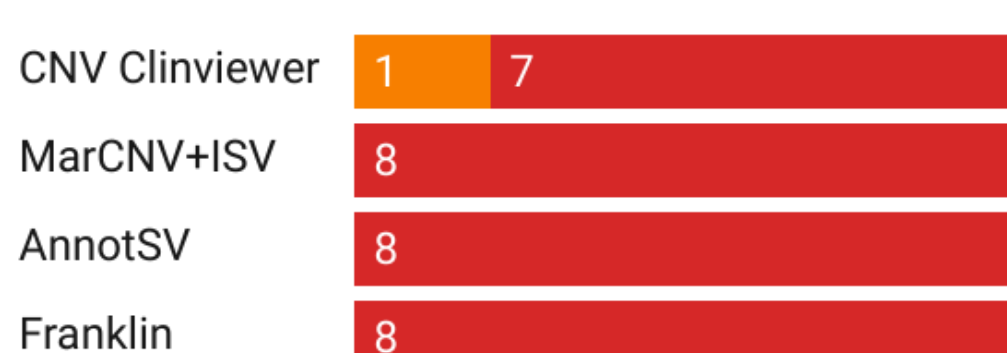
Třída 4 - pravděpodobně patogenní CNVs

■ BEN ■ P_BEN ■ VOUS ■ P_PAT ■ PAT



Třída 5 - patogenní CNVs

■ BEN ■ P_BEN ■ VOUS ■ P_PAT ■ PAT



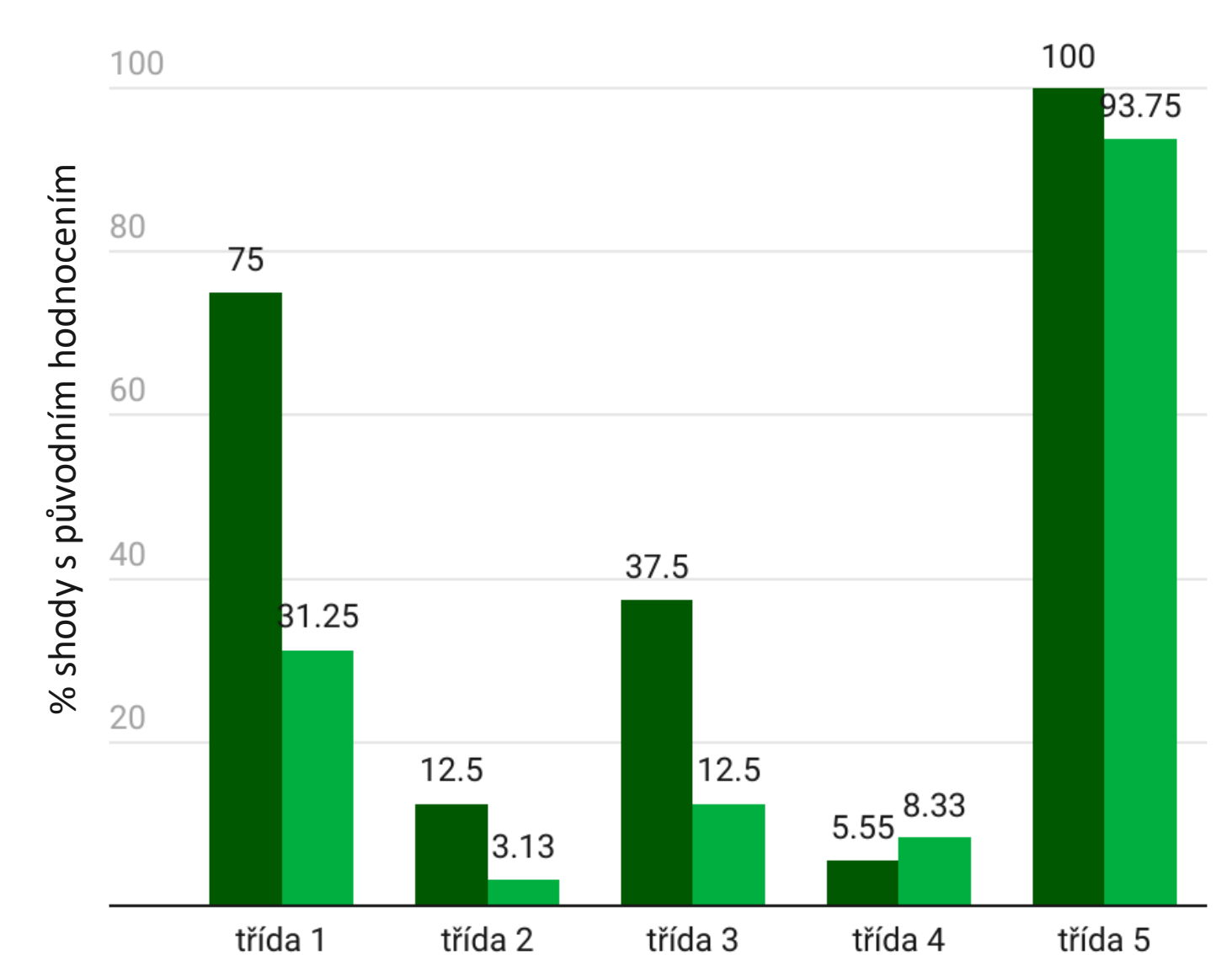
Legenda:

• BEN – benigní; P_BEN – pravděpodobně benigní; VOUS – varianta nejasného významu; P_PAT – pravděpodobně patogenní; PAT – patogenní

• čísla v barevných polích uvádí počet hodnocených variant

Shoda hodnocení

■ del ■ dup



- třída 1 – nejvyšší shodu v této skupině má kalkulátor MarCNV+ISV³, nejmenší naopak Franklin⁵, který je obecně velmi opatrný v označení varianty za benigní; zároveň došlo kalkulátorem AnnotSV⁴ k určení jedné varianty jako patogenní
- třída 2 – došlo k navýšení počtu variant nejasného významu; kalkulátor Franklin⁵ označil nejvíce variant (4) jako „pravděpodobně benigní“; AnnotSV⁴ určil jednu variantu jako patogenní
- třída 3 – u velké části variant nedošlo ke změně klasifikace; nejvíce se od původní klasifikace lišily kalkulátory AnnotSV⁴ a Franklin⁵
- třída 4 – došlo k navýšení počtu patogenních variant; nejvíce variant (2 z 8) jako „pravděpodobně patogenní“ určil kalkulátor Franklin⁵
- třída 5 – tuto třídu všechny kalkulátory určily s nejvyšší přesností ze všech
- s původním hodnocením se kalkulátory shodly častěji v případě delecí

B) Příklad hodnocení dup 3q26.32 (521,5 kb; geny TBL1XR1, LINC00501):

Fenotyp: vývojové opožďení, porucha autistického spektra Původní klasifikace: VOUS/P_PAT

CNV Clinviewer²: nepřihodil variantě žádné body => výsledné skóre 0 => hodnocení VOUS

MarCNV³: hodnocení VOUS

ISV²: hodnocení BEN => hybridní konzervativní skóre: konečné hodnocení VOUS

AnnotSV⁴: překryv s regulačním elementem genu PIK3CA a s patogenním CNV z databáze dbVar => hodnocení PAT

Franklin⁵: zohlednil skóre triplosenzitivity genu TBL1XR1, tedy přiřadil 0,5 bodu v sekci 2, dále přidělil 0,15 bodu v sekci 4 na základě jedné studie v databázi DECIPHER hodnocené jako pravděpodobně patogenní => hodnocení VOUS

[GRCh38/hg38] 3q26.32q26.32(176910044_177431516)x3

Uncertain Significance

Variant Summary

Variant	Type	Classification based on ACMG ¹
Chr: chr3	Copy number gain	Classification: Uncertain Significance
Start: 176910044		Total score: 0 ²
End: 177431516		ClassifyCNV score: 0
Size: 0.5215Mb		Manual user score: NA

1 Number of intersecting genes

1 Number of intersecting gene disease pairs from ClinGen

0 Number of intersecting CNV syndromes from DECIPHER

report z kalkulátoru Clinviewer²

Závěr:

Ve většině případů se na klasifikaci jedné varianty kalkulátory neshodly. Kalkulátory proto mohou být v hodnocení CNVs pomocným nástrojem, ale nelze spoléhat jen na jeden z nich. Jako nejlepší kombinací se jeví Franklin⁵ ve spojení s MarCNV+ISV³. Franklin⁵ umožní komplexní pohled na hodnocenou variantu a díky ISV³ lze získat na hodnocení pohled pomocí strojového učení. Další dva hodnocené kalkulátory neukázaly příliš velký potenciál pro usnadnění klasifikace – AnnotSV⁴ má relativně velké riziko falešně pozitivních (resp. patogenních) výsledků a CNV Clinviewer² nemá žádnou přidanou hodnotu v rámci urychlení analýzy. Obecně došlo při hodnocení CNVs kalkulátory k nárůstu počtu variant nejasného významu oproti hodnocení odbornými pracovníky Sekce klinické cytogenomiky CMBG IHOK FN Brno.

V případě dalších Vašich zkušeností práce s kalkulátory budeme velmi rádi za jakékoliv připomínky a poznatky. Obrátit se můžete na mail: cnvs.kalkulator@gmail.com

Zdroje:

¹Riggs, E.R., Andersen, E.F., Cherry, A.M., Kantarci, S., Kearney, H., Patel, A., Raca, G., Ritter, D.I., South, S.T., Thorland, E.C. and Pineda-Alvarez, D., 2020. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen).
²Macnee, M., Pérez-Palma, E., Bringer, T., Klöckner, C., Platzer, K., Stefanski, A., Montanucci, L., Bayat, A., Radtke, M., Collins, R.L. and Talkowski, M., 2023. CNV-ClinViewer: enhancing the clinical interpretation of large copy-number variants online. Bioinformatics, 39(5), p.btad290.
³Sládeček, T., Gažiová, M., Kucharik, M., Zatková, A., Póš, Z., Póš, O., Krámpal, W., Tomková, E., Hyblíková, M., Minárik, G. and Radvánský, J., 2023. Combination of expert guidelines-based and machine learning-based approaches leads to superior accuracy of automated prediction of clinical effect of copy number variations. Scientific Reports, 13(1), p.10531.
⁴Geoffroy, V., Lamouche, J.B., Guignard, T., Nicaise, S., Kress, A., Scheidecker, S., Le Béche, A. and Muller, J., 2023. The AnnotSV webserver in 2023: updated visualization and ranking. Nucleic acids research, 51(W1), pp.W39-W45.
⁵<https://franklin.genoox.com/> - Franklin by Genoox