



Medizinisch Genetisches Zentrum

Implementierung von Optical Genome Mapping in die Routinediagnostik für seltene Erkrankungen

BVDH Jahrestagung

Berlin, 10.11.2023

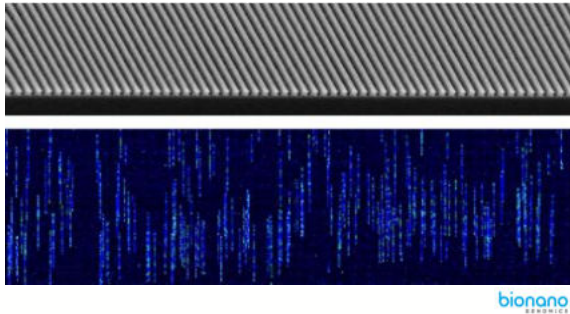
- Optical Genome Mapping, OGM = Optische Genomkartierung
- untersucht **Strukturvarianten (SVs)** des Genoms
 - Translokation, Inversion, Insertion
 - CNVs: Deletion, Duplikation
 - Balanciert und unbalanciert
- Große Anwendung in der Hämato-Onkologie

Methodik



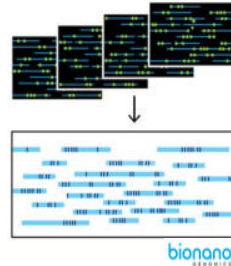
- 120,000 parallel Nanochannels linearize long DNA in solution

DNA-Moleküle werden auf einen Chip mit > 120 000 Nanokanälen appliziert



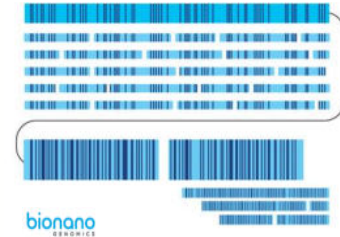
Linearisierung der DNA-Moleküle

Algorithms Convert Images into Molecules



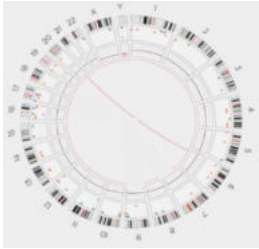
Scannen

Assembly Algorithms Align Molecules *de novo* to Construct Consensus Genome Maps



Scandaten werden mit einer Software zu Konsensus-Maps zusammengefasst, die dem Referenzgenom zugeordnet werden.

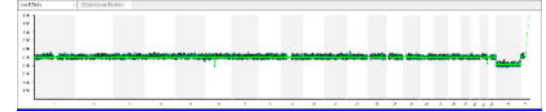
Was kann OGM?



Optical Genome Mapping - OGM



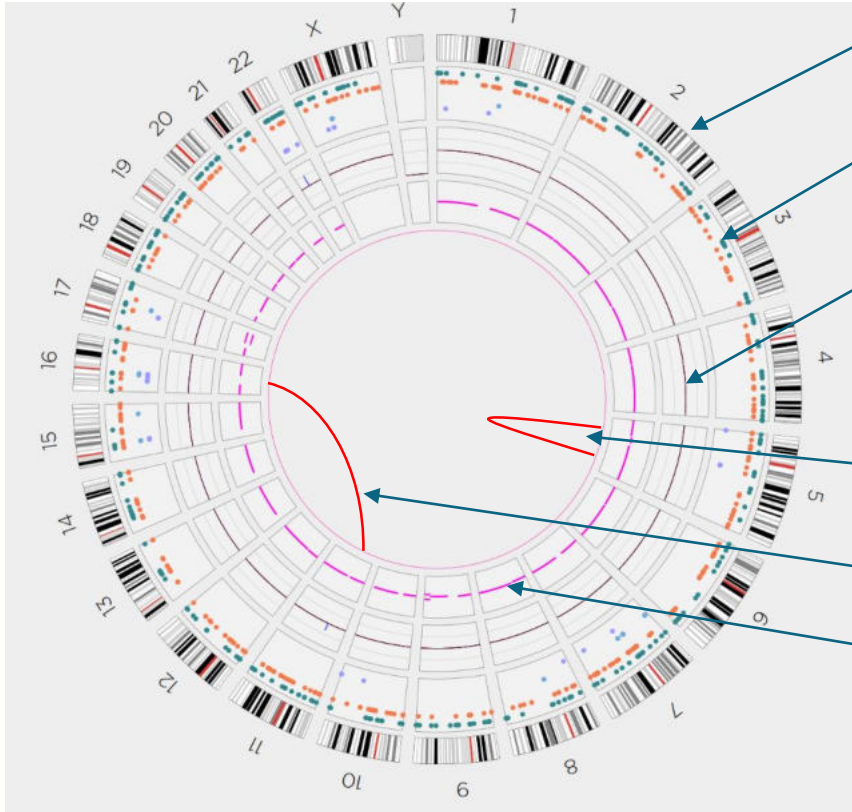
Karyotypisierung



Chromosomen-Microarray-Analyse - CMA

Balancierte Veränderungen	+	Balancierte Veränderungen	+	Balancierte Veränderungen	-
Unbalancierte Veränderungen	+	Unbalancierte Veränderungen	+	Unbalancierte Veränderungen	+
Integrationsstellen von Kopienzahlzugewinnen und Insertionen	+	Integrationsstellen von Kopienzahlzugewinnen und Insertionen	(+)	Integrationsstellen von Kopienzahlzugewinnen und Insertionen	-
Potentiell pathogene Genunterbrechungen in balanc. und unbalanc. Aberrationen	+	Potentiell pathogene Genunterbrechungen	-	Potentiell pathogene Genunterbrechungen (nur in unbalancierten CNVs)	(+)

Ergebnisdarstellung



Chr.banden

SVs

CNVs

Inversion

Translokation

VAF

Name: 196480 - De novo
Sample: 196480
Reference: hg38_OLE1_Okb_Olabels.cmap

SV Filters

Feature SV Overlap Precision (Kbp):	3
SV Masking Filter:	all
VAF Filter:	0-1
Self Molecule Count:	5
% in Control Database:	50
% in Control Database for Enzyme:	50
SV Chimeric Score:	pass
Found in Self Molecules:	yes
Overlap Genes:	all

CNV Filters

Feature CNV Overlap Precision (Kbp):	15
Copy Number Type:	all
Copy Number Confidence:	0.99
Copy Number Min Size (bp):	150,000
Copy Number Masking Filter:	all

Aneuploidy Filters

Aneuploidy Type:	all
Aneuploidy Confidence:	0.95

AOH/LOH Filters

AOH/LOH Minimum Size (bp):	25,000,000
----------------------------	------------

SV Filter

	Confidence	Min Size (bp)
● Insertion	0	1500
● Deletion	0	1500
● Inversion	0.7	
● Duplication	-1	
● Intra-Fusion	0.05	
● Inter-Translocation	0.05	

Feature File

Feature File	SV	CNV	Action
Add Feature			

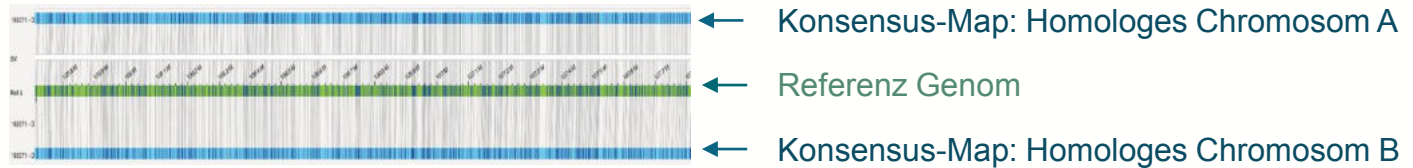
Category

Category	Count
● Insertion	360
● Deletion	364
● Inversion	23
● Duplication	37
● Intra-Fusion	0
● Inter-Translocation	0
AOH/LOH Region	0
● CNV Gain Segment	2
● CNV Loss Segment	0
● Aneuploidy Gain	0
● Aneuploidy Loss	0

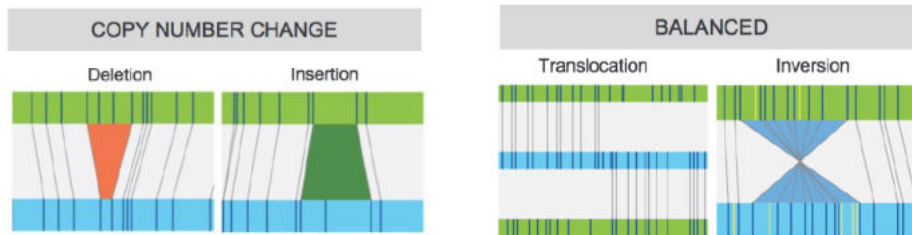
Circos Tracks (start from outer rings)

- Cytoband
- SV track
- CNV track
- VAF segments
- Translocations

Unauffälliges Ergebnis: Konsensus-Maps der homologen Chromosomen annotieren regelrecht zum Referenz-Genom



Auffälliges Ergebnis: Konsensus-Map weicht vom Referenz-Genom ab



1. Präzisierung bekannter struktureller Aberrationen

- Charakterisierung komplexer Chromosomenrearrangements
- Kopienzahlzugewinne nach Microarray:
 - Integrationsort / tandem / direkt / invertiert?
- Bruchpunktbestimmung balancierter Chromosomenveränderungen
 - Betroffene Gene in Bp-Bereichen, die Phänotyp erklärend sein können

2. Schließen der diagnostischen Lücke

- nach unauffälliger Exom- / Microarray-Analyse

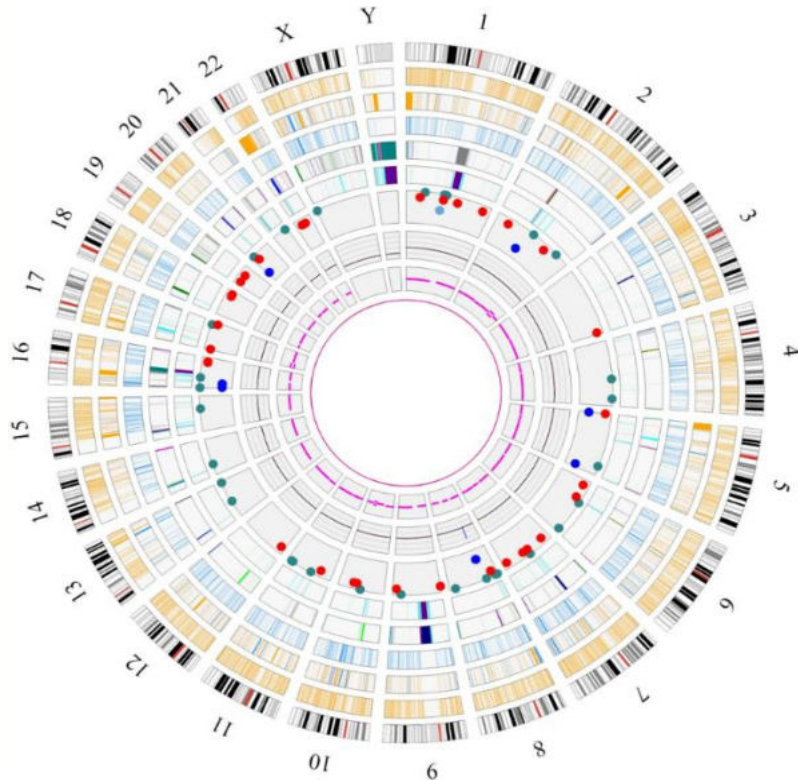
3. Untersuchung von Strukturvarianten in ausgewählten Genen / Gen-Panels

- Gute Auflösung auch in intronischen Bereichen

4. Repeat-Erkrankungen

- Fazioskapulohumerale Muskeldystrophie 1, FSHD1
- Bestimmung der D4Z4-Repeatlänge und des Haplotyps

Filtereinstellungen



Name: 203078 - De novo
Sample: 203078
Reference: hg38_DLE1_0kb_Olabels.cmap

SV Filters

Feature SV Overlap Precision (Kbp):	3
SV Masking Filter:	all
VAF Filter:	0-1
Self Molecule Count:	5
% in Control Database:	5
% in Control Database for Enzyme:	5
SV Chimeric Score:	pass
Found in Self Molecules:	yes
Overlap Genes:	all

CNV Filters

Feature CNV Overlap Precision (Kbp):	15
Copy Number Type:	all
Copy Number Confidence:	0.99
Copy Number Masking Filter:	all

Aneuploidy Filters

Aneuploidy Type:	all
Aneuploidy Confidence:	0.95

AOH/LOH Filters

AOH/LOH Minimum Size (bp):	25,000,000
----------------------------	------------

SV Filter

SV Filter	Confidence	Min Size (bp)
Insertion	0	1500
Deletion	0	1500
Inversion	0,7	
Duplication	1	
Intra-Fusion	0,05	
Inter-Translocation	0,05	

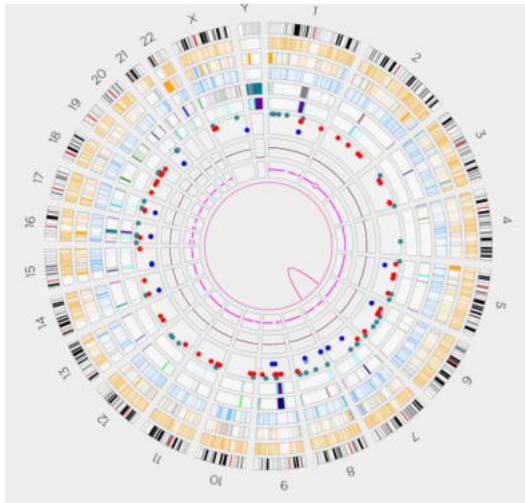
Feature File

Feature File	SV	CNV	Action
MANE_hg38_v10_Ensembl	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Horbid_hg38_merged	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
GenCC_hg38_MANE	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
hg38.cnv.mask	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
hg38.DLE1.SV.Mask	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Category

Category	Count
Insertion	31
Deletion	54
Inversion	0
Duplication	9
Intra-Fusion	0
Inter-Translocation	0
AOH/LOH Region	0
CNV Gain Segment	1
CNV Loss Segment	0
Aneuploidy Gain	0
Aneuploidy Loss	0

Beurteilung der Strukturvarianten



Category	Count
● Insertion	46
● Deletion	56
● Inversion	1
● Duplication	24
● Intra-Fusion	N/A
● Inter-Translocation	3
● AOH/LOH Region	0
● CNV Gain Segment	0
● CNV Loss Segment	1
● Aneuploidy Gain	0
● Aneuploidy Loss	0

Kuratierte Variantenliste

classification	Notes	Type	Chr	RefStartPos (bp)	RefEndPos (bp)	Size (bp)	ICSN	SVID	Overlap Genes
Unclassified	Likely false positive call not su...	loss	8	22,884,954	23,172,755	827002	cgml(GRCh38) 8q11.2C...	148	AC009302,AC009303,Z18BC1CF2AB89F8M84L...
Unclassified significance	RNF2	insertion	1	15,177,648	15,386,573	8,829	cgml(GRCh38) 15q17.1C...	852	TNMD3F
Unclassified	This is a typical map misassem...	duplication	1	149,352,353	149,475,300	122,947	cgml(GRCh38) 14q11.2C...	697	SEC22B,ACM2842,ENOT424M.C
Unclassified significance	RNF2	deletion	1	245,459,538	245,486,011	9,548	cgml(GRCh38) 14q42.2C...	139	KIF26B
Unclassified significance	RNF2	insertion	3	194,479,014	194,546,691	3,260	cgml(GRCh38) 3q12.3C...	3781	ATP10A1,UNC0088,LOC608061
Unclassified significance	RNF2	duplication	5	32,029,301	32,855,977	56,676	cgml(GRCh38) 5q42.3C...	5385	P00252,AC025578,1G0L1912EY, RNA
Unclassified significance	RNF2	insertion	5	154,954,096	154,962,853	2,701	cgml(GRCh38) 5q15.2C...	5769	MRF1,22
Unclassified significance	RNF2	deletion	6	154,988,384	154,996,752	1,713	cgml(GRCh38) 6q17.2C...	6420	TIAM2
Unclassified significance	The gene is associated with Aki...	translocation_inverchr	6,7	108,976,886	128,336,239	1	cgml(GRCh38) 6q17.2C...	7033	SRFBF1
Unclassified significance	The gene is associated with Aki...	translocation_inverchr	6,7	108,976,886	128,336,239	1	cgml(GRCh38) 6q17.2C...	7035	SRFBF1
Likely pathogenic		translocation_inverchr	6,7	108,962,237	128,340,032	1	cgml(GRCh38) 6q17.2C...	7037	SRFBF1
Unclassified significance	associated with Leukemioepith...	insertion	6	86,922,441	86,922,447	2,815	cgml(GRCh38) 6q16.3C...	7138	AL358611
Unclassified	likely artifact assembly due to s...	duplication_inverted	8	2,095,523	2,277,624	162,101	cgml(GRCh38) 8q11.2C...	6254	MYCQ2,AC043842
Unclassified	likely artifact assembly due to s...	duplication_inverted	8	2,095,523	2,277,624	162,101	cgml(GRCh38) 8q11.2C...	6258	MYCQ2,AC043842
Unclassified significance	RNF2	inversion	8	86,336,639	86,367,071	149,468	cgml(GRCh38) 8q11.2C...	6200	-
Unclassified significance	RNF2	duplication_inverted	8	86,367,071	86,336,639	149,468	cgml(GRCh38) 8q11.2C...	6208	AC084281,SLC7A13
Unclassified significance	RNF2	duplication	8	81,920,407	81,935,479	15,072	cgml(GRCh38) 8q11.2C...	9570	AL358542,5P1A3J3D4,AL358543
Likely benign	Intrinsic, common in gnomAD - ...	deletion	9	127,467,439	127,474,364	1,805	cgml(GRCh38) 9q33.3C...	9717	LRSAM2Y, RNA
Unclassified significance	RNF2	deletion	10	5,359,177	5,388,161	4,411	cgml(GRCh38) 10q15.1C...	9996	LCNT
Unclassified significance	RNF2	deletion	11	114,595,351	114,648,504	6,353	cgml(GRCh38) 11q23.2C...	1020	NXPE4
Unclassified significance	RNF2	deletion	12	29,728,117	29,743,685	1,521	cgml(GRCh38) 12q11.2C...	1030	TMCT
Unclassified significance	RNF2	insertion	12	56,279,222	56,281,744	4,266	cgml(GRCh38) 12q12.1C...	1261	CS
Unclassified significance	RNF2	insertion	16	28,229	94,933	3,792	cgml(GRCh38) 16q11.1C...	14025	ZNF723,18,IMP13,CH,HLN,NANP15,RI60K1,2697...

Ergebnisse der Validierungskohorte

METHODE					Gesamt
	Deletionen	Duplikationen / Insertionen	Translokationen / Inversionen	Repeats (FSHD1)	
CA, CMA, FISH	22	38	18	10	88
OGM	22	36*	16**	10	84
Konkordanz	100%	95%	89%	100%	96%

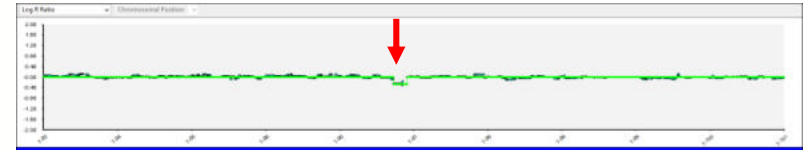
*Duplikation im Perizentromerbereich (1) und Duplikation (1) in pseudoautosomaler Region 1

**Bruchpunkt in Zentromerregion (2)

Abkürzungen: CA: Chromosomenanalyse, CMA: Chromosomen-Microarray-Analyse, FISH: Fluoreszenz-in situ Hybridisierung, OGM: Optical Genome Mapping, FSHD1: Fazioskapulohumerale Muskeldystrophie Typ 1

Beispiel: Deletion

Deletion 7q21.3



CNV track

SV track

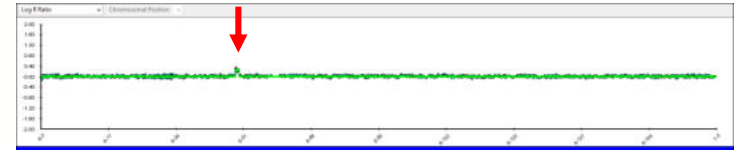
Feature tracks, Gene

Referenzgenom

Konsensus-Map

Beispiel: Duplikation

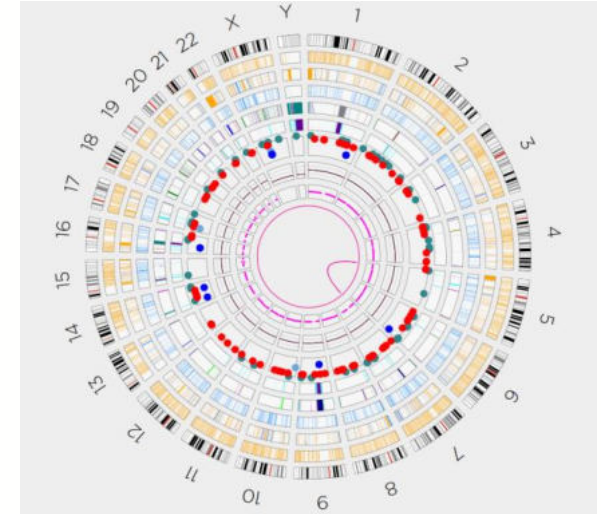
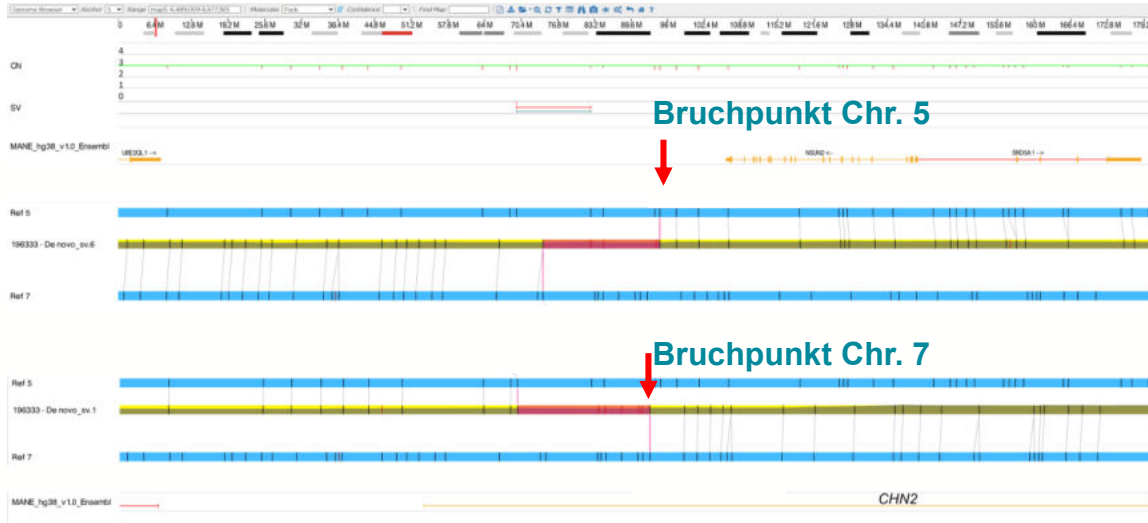
Duplikation 6p12.3p12.3



Tandem-Duplikation

Beispiel: Balancierte Translokation

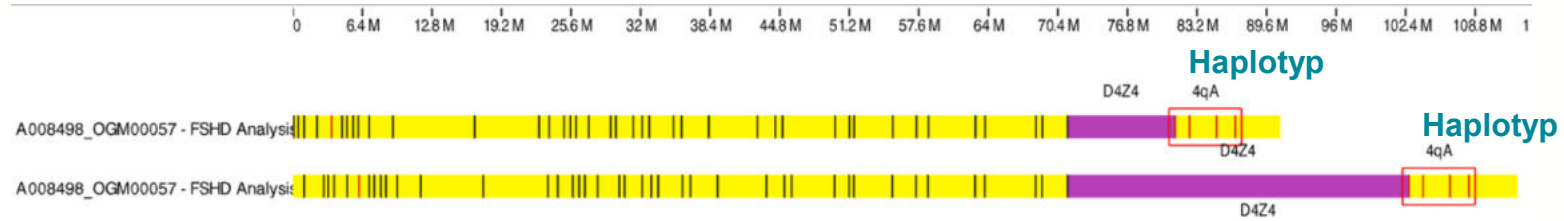
Reziproke Translokation (5;7)(p15.3;p15)



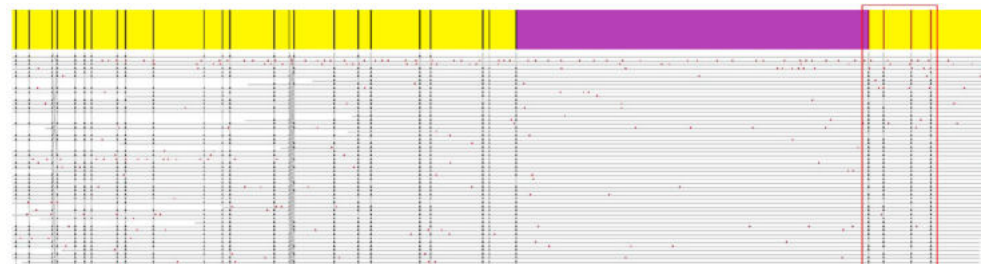
ogm[GRCh38] t(5;7)(p15.31;p14.3)(6,561,202~6,587,205;29,216,867~29,235,765),(-;CHN2)

ogm[GRCh38] t(5;7)(7pter→7p14.3(29,216,867)::(6,587,205)5p15.31→5qter;5pter→5p15.31(6,561,202)::(29,235,765)7p14.3→7qter)

Beispiel: FSHD1

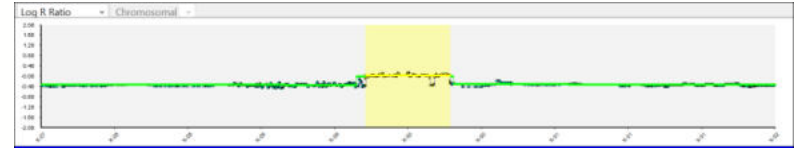


Chr	Map ID	Calculated repeat count (units)	Haplotype	Repeat-spanning coverage (X)
4	271	5	4qA	82
4	22	26	4qA	72
10	292	4	10qA	71
10	11	9	10qA	85



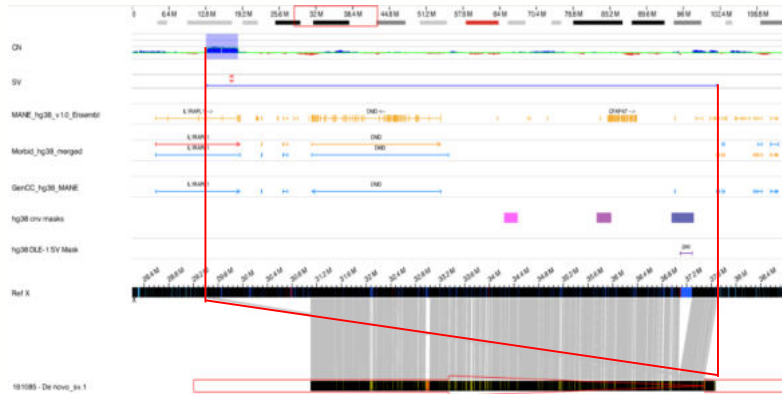
Präzisierung einer Strukturvariante

CMA: Duplikation Xp21.2, IL1RAPL1



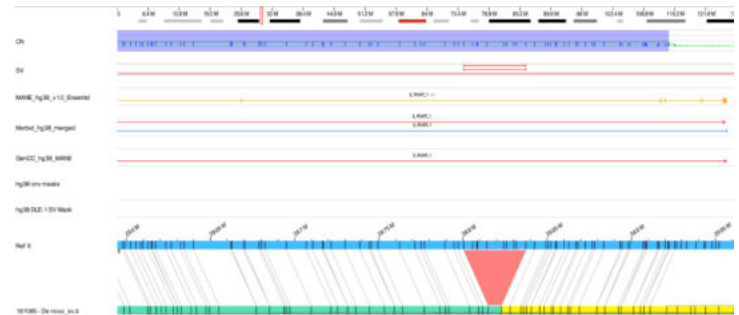
OGM:

1. Keine Tandem-Duplikation
2. Dupliziertes Segment: ~ 7 Mb proximal inseriert



↑ Integrationsposition

3. + intronische IL1RAPL1-Deletion

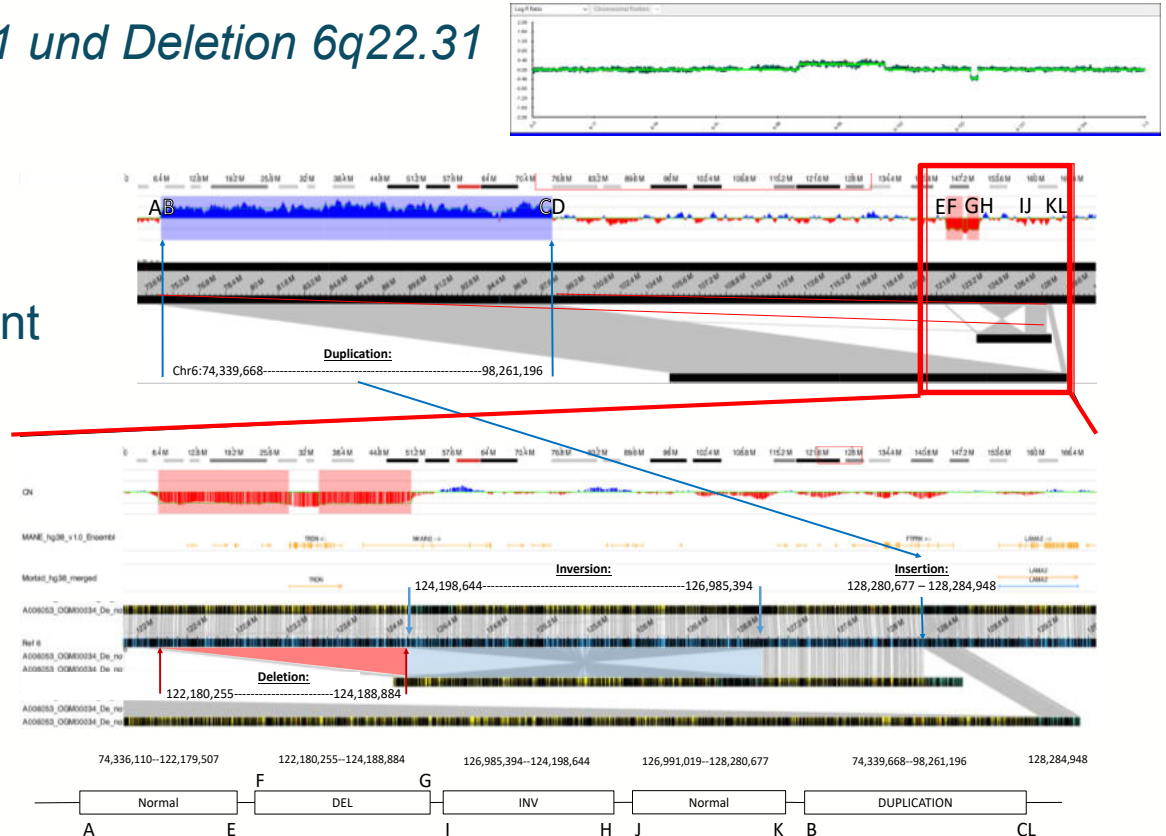


Präzisierung einer Strukturvariante

CMA: Duplikation 6q13q16.1 und Deletion 6q22.31

OGM:

1. Bruchpunktpräzisierung
2. Komplexes Rearrangement

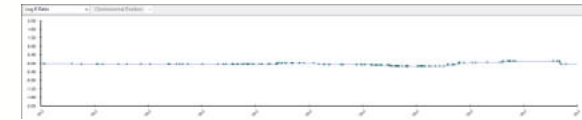


Diagnostischer Zugewinn

- Neugeborenes mit klinisch gesicherter Tuberösen Sklerose
- Targeted Panel, Whole Exome, CMA: alle unauffällig

OGM:

Deletion mehrerer Exons in *TSC2* im Mosaik (~ 15%)

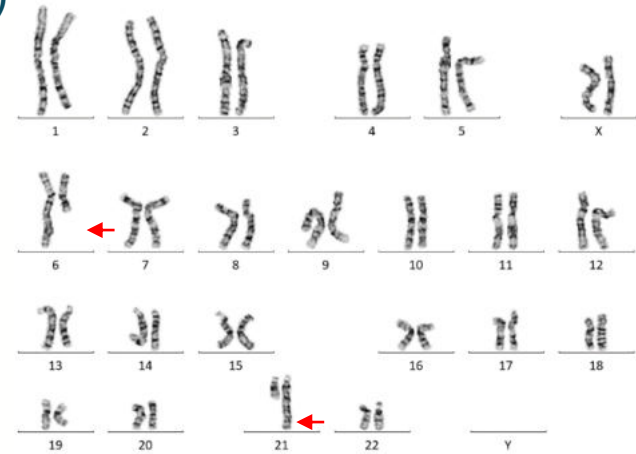


Maps ohne Deletion

Map mit Deletion

Diagnostischer Zugewinn

- Mädchen, 16 Jahre: schwere DD, MR, Microcephalie, pathol. EEG
- Karyotyp: Reziproke Translokation 46,XX,t(6;21)(q15;q22.3)
- CMA: keine Kopienzahlveränderung (CNV)
- Umfangreiche Molekulargenetik:
 - Unauffällig für:
 - AS/PWS, MECP2, FOXP1,
 - CDKL5, Kabuki-Syndrom,
 - WES

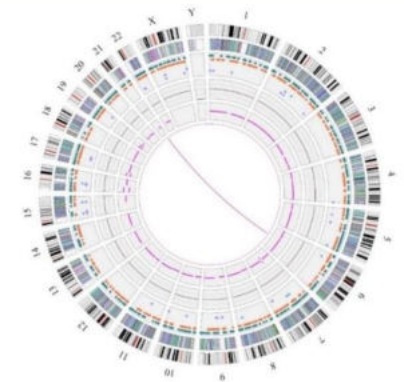
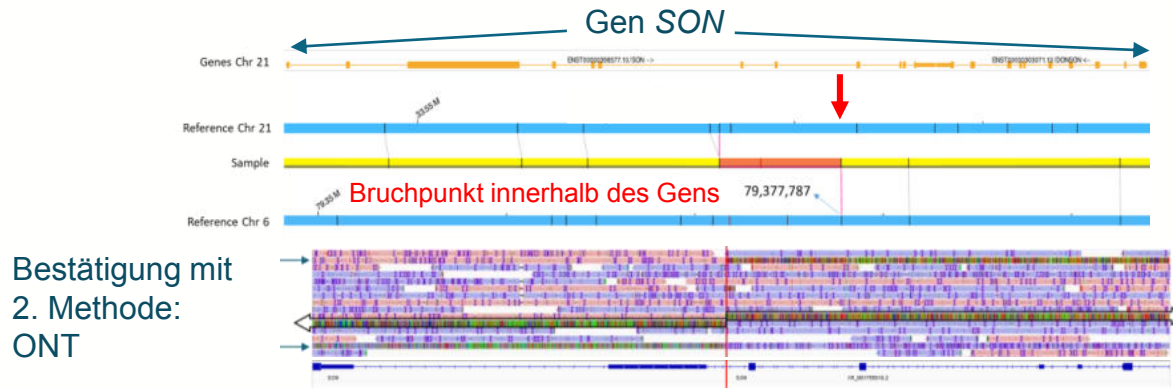


11012006 | 005 | A | 46,XX,t(6;21)(q15;q22.3) | 46

OGM:

1. Identifizierung des Bruchpunkts in Gen *SON*, Chromosom 21q22.11
2. Identifizierung der die Symptomatik erklärenden Strukturvariante:

ZTTK-Syndrom, schwere DD, MR, pathol. EEG, Dysmorphiezeichen

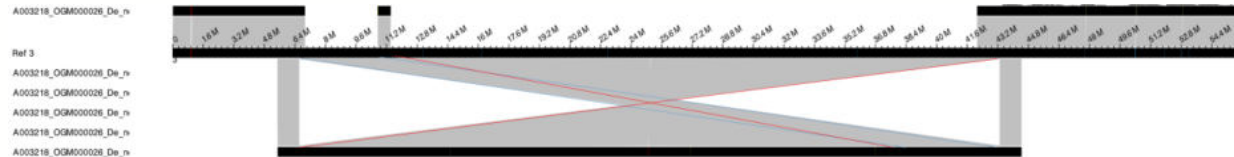


Überraschendes Ergebnis

- Mädchen, 12 Jahre: Cerebralparese, Epilepsie, Entwicklungsstörung
- Fragestellung: Inversion 14, Gene in Bruchpunkt?

OGM: Zwei parazentrische Inversionen 3p

Bruchpunkt 3p25.3 in unmittelbarer Nähe zu *SLC6A1*



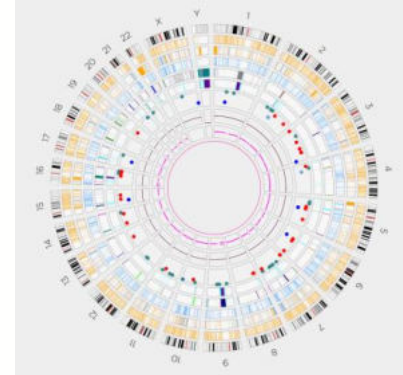
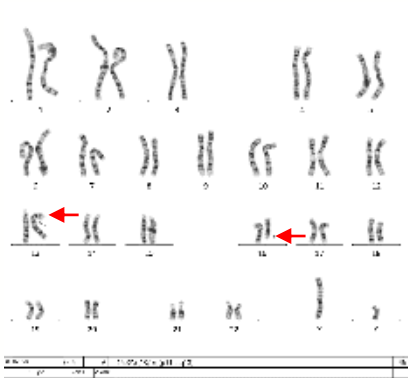
Inversion 1: 3p26.1p25.3: 6,610,335-11,071,134

Inversion 2: 3p25.3p22.1: 11,086,262-43,308,605

chr3:6,608,589::43,308,605->11,086,262::6,610,335->11,071,134::43,314,384

Balancierte Translokation, Bruchpunkte in Zentromerregionen

Karyotyp 46,XY,t(13;16)(p11.2;q13)



OGM: kein Nachweis der Translokation

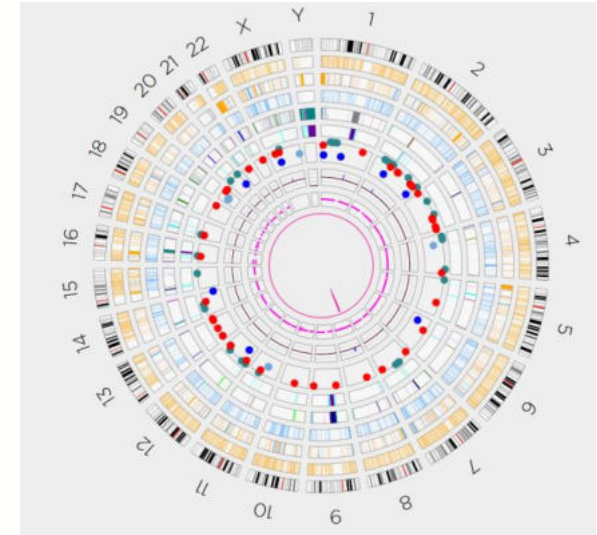
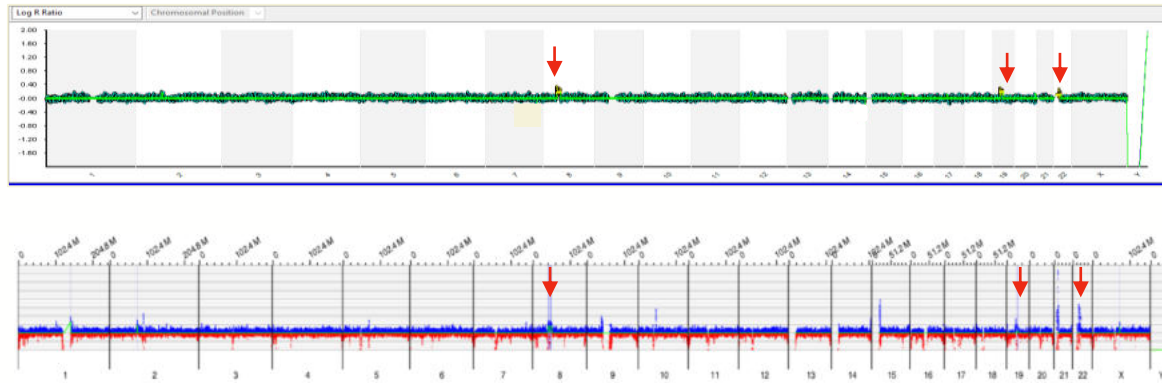
Maps in zentromernahen Regionen können keinem Chrom. zugeordnet werden

Limitierungen

Markerchromosomen

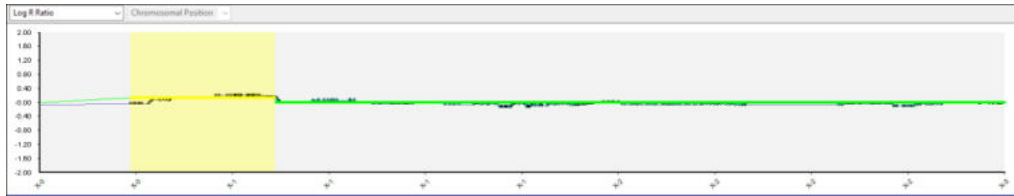
Karyotyp: 48,XX,+ mar1,+mar2,+mar3

CMA: dup 8pq, dup19pq, dup22q



Pseudoautosomale Regionen

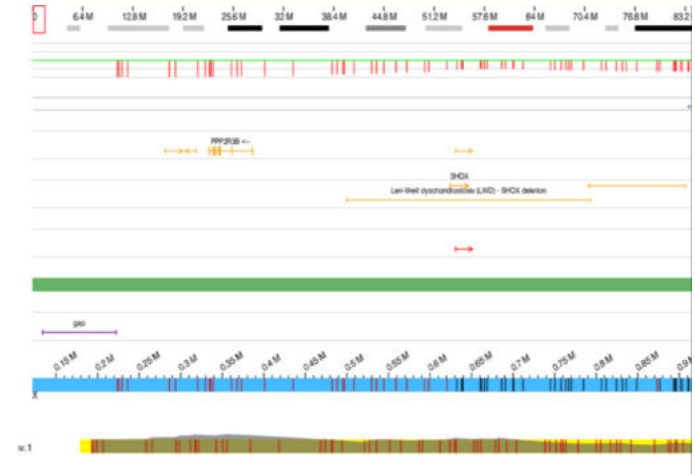
CMA: Duplikation Xp22.33



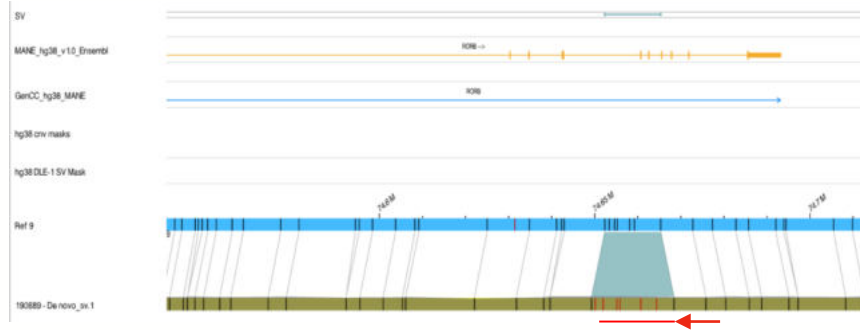
OGM: Kein Nachweis der Duplikation

stattdessen:

Deletion wird angezeigt



Insertionen



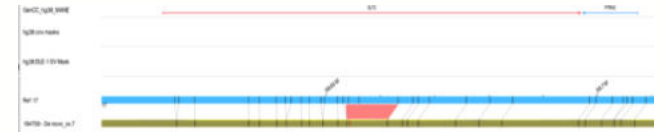
1 Motiv mehr in Map als in Referenzgenom

- Beispiel: Patient mit Epilepsie
- *RORB*: autosomal dominante generalisierte Epilepsie
- Insertion pathologisch? Bislang beschrieben: Deletionen / Translokation
- Follow-up dann, wenn Phänotyp-Übereinstimmung

Notwendigkeit von Datenbanken für SVs

Abwägung, wann follow-up sinnvoll ist

- Priorisierung?
 - Phänotyp Übereinstimmung,
 - HPO-Terms!
 - Deletionen > Insertionen
 - Exons betroffen > keine Exons betroffen
 - Insertionen mit zusätzlichen Labels
 - > Insertionen ohne zusätzlichen Labels



➤ Generierung einer Datenbank für Strukturvarianten

- Löst komplexe Strukturaberrationen in einem methodischen Ansatz
- Noch unzureichender Nachweis von SVs in Zentromerbereichen / repetitiven Bereichen, Verbesserung mit -> T2T assembly?
- Derzeit noch zeitaufwändige Interpretation
- **Wunsch: einheitliche Filtereinstellungen +**
- **Erweiterte Kontrolldatenbank und Datenbank für SVs**
- **EBM-Ziffer? - > ISCN Nomenklatur 2024**



Medizinisch Genetisches Zentrum

Vielen Dank!

Doris Eisenreich

Evgenia Lindt

Kai Sendelbach

Hayk Barseghyan