



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학석사 학위논문

망막색소변성증 차세대염기서열분석기반
유전자패널검사에서
염기변이 해석에 대한 연구

Sequence variant interpretation in
NGS panel testing for retinitis pigmentosa

울 산 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이희라

망막색소변성증 차세대염기서열분석기반
유전자패널검사에서
염기변이 해석에 대한 연구

지 도 교 수 서울주

이 논문을 의학석사 학위 논문으로 제출함

2020년 02월

울 산 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이희라

이희라의 의학석사학위 논문을 인준함

심사위원 서 을 주 인

심사위원 조 영 옥 인

심사위원 고 대 현 인

울 산 대 학 교 대 학 원

2020년 02월

국문요약

망막색소변성증 차세대염기서열분석기반 유전자패널검사에서
염기변이 해석에 대한 연구

배경: 차세대염기서열분석 (next generation sequencing, NGS) 기반의 유전자 패널 검사에서 검출 되는 염기변이들을 정확하고 일관성 있게 해석하기 위해 염기변이 해석 표준화가 제안되었다. 대다수의 임상검사실과 연구자들은 2015 American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)/Association for Molecular Pathology(AMP) 가이드라인을 따르고 있지만, 활용하는 데이터베이스, 예측프로그램 등의 차이로 인해 검사실 간 해석 차이가 지속되고 임상적으로 중요한 불일치가 3%-4% 보고되고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 Clinical Genome Resource (ClinGen)의 Variant Curation Expert Panels (VCEPs)은 질환군별 염기변이 해석에 대한 맞춤 지침을 개발하고 있다. 또한 Sequence Variant Interpretation Working Group (SVI-WG)은 2015 ACMG/AMP를 개선하고 염기변이 해석의 정성적 접근을 위해 전반적 권고 사항을 발표하였다. 본 연구는 망막세포변성증 (retinitis pigmentosa, RP) NGS 패널 검사에서 질환 특이적 염기변이 해석 지침을 개발하고 기존 2015 ACMG/AMP 가이드라인과 비교 분석을 통해 새로운 RP 염기변이 해석 지침의 효율성과 임상적 유용성을 검토하고자 하였다.

대상 및 방법: 서울아산병원에서 2018년 11월부터 2019년 9월까지 129명의 망막색소변성증 환자를 대상으로 88개 유전자로 구성된 RP NSG 패널 검사에서 검출된 2339 염기변이를 코호트로 설정하였다. 이들 염기변이를 2015 ACMG/AMP 가이드라인에 따라 분류하였다. RP 맞춤 염기변이 해석 지침은 현재까지 발표된 SVI의 전반적 권고 사항과 VCEPs의 질환군별 특이 지침들을 차용하였다. 망막색소변성증 유병률, 질병 침투률, 원인 유전자와 주요 변이 등의 정보를 이용하여 BA1, BS1, BS1_P, PM2_P, PM2의 최소대립유전자빈도 (minor allele frequency, MAF)를 결정하였고 2015 ACMG/AMP 가이드라인의 28개의 근거항목

중 11개 근거 강도를 차등화 하여 RP 맞춤 염기변이 해석 기준을 개발하였다. 컴퓨터 예측프로그램은 VCEPs에서 제안하는 REVEL과 MaxEntScan을 이용하였다. 이 기준을 염기변이 코호트에 적용하여 재분류 하였고 기존 결과와 비교 분석하였다. 한편, 한국인 대립유전자 빈도 정보를 염기변이 분석에 추가하여 염기변이 분석 과정과 결과에 미치는 효과를 분석하였다.

결과: 망막색소변성증에서 BA1, BS1, BS1_P & PM2_P에 대한 MAF는 각각 0.005, 0.003, 0.0006, 0.00006로 결정하였다. 기존 2015 ACMG/AMP 가이드라인으로 분류한 염기변이들과 본 연구에서 개발한 RP 맞춤 분석 기준으로 분류한 염기변이들을 비교한 결과, 완전 일치는 89.65%, LP vs P 또는 LB vs B 차이는 4.57%, VUS vs LB/B 차이는 4.92%를 보였고, 임상적으로 중요한 해석 차이는 0.86% (20/2339)로 나타났다. 임상적으로 중요한 차이를 보인 염기변이 중 6개는 LP에서 VUS로, 14개는 VUS에서 LP로 재분류 되었다. 2015 ACMG/AMP 기준으로 VUS로 분류되었던 변이 298개 중 78개는 B, LB, LP로 재분류 되었다. 분석 과정에서 2015 ACMG/AMP 가이드라인의 BA1 기준에 비하여 강화된 MAF 기준 0.005를 적용하면 11.20% (262/2339)의 변이가 추가로 필터 아웃 되었고 VUS가 포함되었다. 추가로 한국인 대립유전자 빈도를 적용할 경우 13.68% (320/2339)의 변이가 필터 아웃 되었는데 2015 ACMG/AMP 혹은 RP 맞춤 기준으로 P/LP가 3개 포함되었다.

결론: 본 연구에서는 RP 맞춤 염기변이 해석 지침을 개발하였고 2015 ACMG/AMP 가이드라인과 비교하여 높은 일치를 보였다. 염기변이를 분석할 때 유병률 등 질환의 특성을 고려하여 설정한 MAF 기준과 한국인 대립유전자 정보를 적용함으로써 분석 과정의 업무 부하를 감소시킬 수 있었다. 전문가 집단에서 제안한 예측 프로그램 활용으로 기존에 in silico 활용 시 발생했던 상충되는 예측결과에 의한 혼란을 제거할 수 있었다. 유전질환의 NGS 분석에는 인종 별 유전정보가 중요하고, 차등화된 근거를 적용하는 것이 정확하고 일관성 있는 염기변이 해석에 중요하므로, 질환 특이적 염기변이 해석 가이드라인의 개발이 필요하다.

중심 단어: Next generation sequencing, Retinitis pigmentosa, sequence variant interpretation

목차

국문요약	i
표와 그림 목차	vi
배경	1
연구대상 및 방법	4
I. 연구대상	4
II. 서울아산병원 RP NGS panel 구성과 분석 방법	4
III. 참고한 데이터베이스	6
IV. 망막색소변성증 맞춤 염기변이 해석 지침 형성	8
V. 망막색소변성증 맞춤 염기변이 해석 지침의 효용성 분석	8
결과	9
I. 망막색소변성증 맞춤 염기변이 해석 지침 개발	9
A. 요약	9
B. 근거항목 변화 시 명명법	9
C. 인구집단	9
i. Benign stand-alone (BA1)과 Hearing loss expert panel의 차용 (PM2, PM2_supporting, BS1, BS1_supporting)	9
ii. 망막색소변성증 코호트	10
iii. 질환군과 정상인구집단에서 대립유전자빈도 (PS4, BS2)	14
D. 추정 정보	14

i.	무효 변이 (PVS1) -----	14
ii.	동일 코톤에 영향을 미치는 염기변이 (PS1, PM5) -----	14
iii.	컴퓨터 예측 도구 (PP3, BP4) -----	15
iv.	동의미변이 (BP7) -----	15
v.	In-frame indel (PM4, BP3) -----	15
E.	대립유전자 정보 (PM3, BP2) -----	16
F.	Segregation (PP1, BS4) -----	16
G.	De novo (PS2, PM6) -----	16
H.	표현형 (PP4, BP5) -----	17
I.	기능 연구 (PS3, BS3) & Hotspot (PM1) -----	17
J.	제외 항목 (과오변이- PP2, BP1 & 권위 있는 데이터베이스- PP5, BP6) -----	17
K.	근거항목 조합 -----	18
II.	2015 ACMG/AMP와 RP 맞춤 염기변이 해석 가이드라인의 비교 분석-	25
A.	근거항목 -----	25
B.	VUS 수 -----	25
C.	BA1 배제 필터 -----	25
고찰	-----	33
결론	-----	36
참고문헌	-----	37
영문요약	-----	41

표와 그림 목차

표 1. 서울아산병원 RP NGS panel Target genes -----	5
표 2. 최소 대립유전자 빈도 기준 -----	13
표 3. 망막색소변성증 맞춤 지침 -----	19
표 4. 염기변이 분석 기준에 따른 염기변이 분류 차이 -----	27
표 5. 임상적으로 의미 있는 염기변이 분류 차이가 발생한 변이들 -----	30
그림 1. https://www.cardiodb.org/allelefrequencyapp/ 예시 -----	7
그림 2. 인구집단 대립유전자 빈도 관련 근거 항목 MAF 기준 -----	12
그림 3. 염기변이 분석 기준에 따른 염기변이 분류 차이 -----	28
그림 4. 임상적으로 의미 있는 염기변이 분류 차이가 발생한 변이들에 적용된 근거 항목 -----	29

배경

염기순서 분석 기술의 발전으로 환자 진료에 차세대염기서열분석 (next generation sequencing, NGS)의 활용이 증가 하고 있다.¹⁾ 임상 분자유전검사실에서 환자 검체로 시행한 검사 결과 발견되는 새로운 염기변이 역시 지속적으로 증가 하고 있다.²⁾ 다수의 염기변이들을 신속하고 정확하게 그 의미와 임상 연관성을 분석 해야 한다.³⁾ 2015년에 American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)과 Association for Molecular Pathology(AMP)가 발표한 가이드라인을 따라 염기변이를 해석하는 검사실이 증가하며 분석결과에 대한 신뢰와 검사실간 분석 일치율이 증가하였다.³⁾

2015 ACMG/AMP 가이드라인은 염기변이가 질환 발생 원인 인지에 대한 근거를 찾고 전문가 판단에 따라 최종 분류 하게 구성되어 있다. 몇 가지 근거 유형들을 근거 강도에 차등을 주어 총 28가지 근거 항목으로 세분화 한다. 근거 유형은 인구집단 정보, 컴퓨터 예측 프로그램 정보, 기능적 정보, 인구 분리 정보 (segregation) 등으로 이루어져 있다. 근거 항목 조합 규칙에 따라 pathogenic (P), likely pathogenic (LP), uncertain significance (VUS), likely benign (LB), benign (B)으로 분류 한다.²⁾

2014년 까지는 검사실 자체 해석 기준 차이가 검사실 간 염기변이 분류 불일치의 큰 원인 이었다. 2015 ACMG/AMP 가이드라인이라는 공통된 해석 기준이 적용 된 이후에도 불일치는 해소 되지 않았다. 이는 검사실 마다 해석 알고리즘 차이와 각 근거 항목에 대한 해석/적용 차이, 접근 가능한 자료 차이 등에 의해 지속되었다. 임상 검사실에서 염기변이 해석 시 참고하는 공개된 권위 있는 데이터베이스 중 ClinVar 내에 2015년 5월 당시 17% 불일치가 있었다. 여기서 불일치라 함은 신뢰할 수 있는 차이 (P와 LP 혹은 B와 LB; likely 차이)는 제외 하고 P/LP, VUS와 LB/B 이렇게 3 분류 간 차이를 보이는 경우를 의미한다. 4개 검사실이 검사실 내부 자료 공유와 2015 ACMG/AMP 가이드라인을 따라 재분석 하여 불일치를 줄이는 시도를 한 문헌에 따르면 88.3% 일치도가 91.7%로 증가 한 것을 보였다.⁴⁾ 2017년 4월 ClinVar 내 49242 염기변이의 일치율은 77.8%, 의학적으로 의미 있는 분류 차이는 4.3% 였다.⁵⁾ 이렇듯 권위

있는 데이터베이스 내의 불일치 지속과 동일한 가이드라인을 따라도 발생하는 주관적 사용에 의한 차이, 검사실간 정보 공유에도 해결 할 수 없는 불일치에 대한 해결이 요구 되었다.

2015 ACMG/AMP 가이드라인은 멘델리안 유전을 따르는 모든 유전체에 광범위한 적용이 가능하도록 형성되어 특정 유전자 혹은 질환군에는 수정 적용이 필요하다.³⁾ 또한, 2015 ACMG/AMP 가이드라인 중 일부 근거항목은 근거 수준과 누적 증례 수에 따라 전문가 판단 하에 근거 강도를 가감하도록 권고 하고 있으나 세부적인 지침은 제시 하지 않아 불명확한 부분이 있다. 근거 항목 해석과 적용에 주관적 해석을 허용해 불일치는 피할 수 없다.⁶⁾ 한편, 해석의 불일치 외에 VUS로 보고되는 염기변이들이 높은 비율을 차지해 그 임상적 의미 해석에 어려움이 있다. VUS로 분류된 염기변이는 추가적 검사나 증례 축적을 통해 보다 명확하게 재분류 되어야 한다.²⁾

이러한 문제점들을 해결하기 위해 Clinical Genome Resource (ClinGen)의 Variant Curation Expert Panels (VCEPs)에서는 특정 유전자, 질환군에 특이적이 맞춤 지침을 개발, 발표 하고 있다. 또한, Sequence Variant Interpretation Working Group (SVI WG)은 경험적, 정성 혹은 반정량적인 2015 ACMG/AMP 가이드라인을 개선하고 염기변이 해석의 정량적 접근을 위해 일반 권고 사항을 개발, 발표 하고 있다. 이를 통해 염기변이 해석 재현성과 객관성을 증대하고 임상적 의미가 불분명한 VUS 보고를 감소하고자 한다.

망막색소변성증 (retinitis pigmentosa, RP)은 유전 망막병 중 가장 흔하며, 유병률이 4000명 중 한 명으로 알려져 있다. 막대와 원뿔 광수용체의 점진적 퇴화와 망막 색소 침착이 특징이다. 임상 증상은 야맹증에서 시작하여 수십 년에 걸쳐 시력이 주변부부터 점차 소실된다. 열성유전 (50-60%), 우성유전 (30-40%), 성염색체유전 (5-15%) 등 다양한 유전 양상을 따른다. 20-30%에서는 전신증상과 동반하는 30개 이상의 신드롬 중 하나로 발생 하지만, 독립적으로 발생 하는 경우가 더 흔하다.⁷⁾ 신드롬의 예로 청력소실이 동반 되는 Usher syndrome, 신장 질환, 인지장애, 비만 등을 동반 하는 Bardet-Biel syndrome이 있다.⁸⁾ RetNet

(<https://sph.uth.edu/retnet/>) 데이터베이스에 따르면 원인 유전자가 94개로 다양하고 동일한 변이를 가진 환자들 사이에도 증상의 정도와 발현 시점에 차이가 크다. 증상이 점진적으로 나타나 유전형 검사 시 표현형이 충분히 발현되지 않을 수 있다. 이런 이유로 유전형-표현형의 일대일 대조가 어렵다. 또한, 인종별 지역별 원인 유전자와 염기변이 차이가 크다.⁹⁾ 백인종에서는 열성유전 망막색소변성증 원인 유전자로 *USH2A*가 가장 큰 반면, 한국인을 포함한 동양인에서는 *EYS*가 가장 흔한 원인 유전자로 알려져 있다.

다양한 유전자와 염기변이가 원인이기 때문에 다수의 유전자를 한번에 검사할 수 있는 차세대염기서열분석기반 유전자 패널 검사가 적합하다.⁹⁾ 다만 큰 유전형과 표현형 이질성 때문에 거기서 발견된 염기변이에 대한 해석에 어려움이 따른다.¹⁰⁾ 망막색소변성증의 유전형과 표현형 연관성은 불명확한 부분이 많고¹¹⁾ 가족검사를 통해 증상 유발 전에 질환 유발 염기변이를 발견한다 하더라도 증상 진행을 막을 수 있는 치료법이 없어 유전검사 시행에 회의적인 입장도 있다. 하지만, 유전검사가 망막에 제한된 질환과 타장기를 포함하는 신드롬과 구별에 도움이 되고 가족상담의 시작점이 된다.¹⁰⁾ FDA 승인을 받은 망막질환 유전 치료가 이미 존재 하고 유전 치료의 개발/적용 가능성이 높아 정확한 분자유전진단의 필요성은 높다.^{9, 11)} 현재 syndromic RP를 포함하여 망막색소변성증의 원인으로 알려진 72~124개 유전자들을 포함하는 RP NGS 패널이 임상 유전자 검사실에서 제공되고 있다.

본 연구에서는 VCEP에서 발표한 유전자/질환군 맞춤 지침들 중 일부를 차용하고 SVI의 일반 권고사항을 적용하여 망막색소변성증에 대한 질환군 맞춤 지침을 개발하고자 한다. 개발한 RP 맞춤 지침을 본원에서 시행한 RP NGS 패널 검사 해석에 적용시켜보고자 한다. 동일한 염기변이를 2015 ACMG/AMP 가이드라인에 따라 해석했을 때와 자체 개발한 지침에 따라 해석 할 때 발생하는 차이와 그러한 차이를 일으킨 근거 항목들을 분석해 본다. 한편, 한국인 대립유전자 정보를 분석에 적용 할 때 생기는 차이점도 확인한다.

연구대상 및 방법

I. 연구대상

2018년 11월 19일부터 2019년 7월 8일까지 접수된 129명 환자 검체에 대한 vcf 파일을 이용하여 관찰된 염기변이들을 재분석 하였다. 망막색소변성증이 의심되거나 진단된 혈연 관계가 없는 환자들이 대다수를 차지하였고 1쌍의 부녀, 1쌍의 모자, 2쌍의 형제, 1쌍의 자매가 포함되었다. 검사를 시행한 시점에 13세부터 81세 (평균 연령 47세, 연령 중앙값 49세)의 여자 69명, 남자 60명으로 이루어졌다.

II. 서울아산병원 RP NGS panel 구성과 분석 방법

서울아산병원 RP NGS panel은 88개의 유전자(표 1)를 포함하며 non-syndromic RP 외 syndromic RP와 그 외 유전 망막변성 (inherited retinal degeneration, IRD)의 원인으로 알려진 유전자로 구성되어 있다. 환자의 EDTA 혈액 검체에서 DNA를 추출하고 Ion Chef (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 라이브러리를 생성한 후 템플릿 준비와 칩 로딩을 시행하였다. Ion S5 XL (Thermo Fisher Scientific)에서 염기서열 분석을 실시하였다. Hg19 표준 유전체에 맞춰 Torrent Suite/Ion Reporter 5.10/5.10, CLC Genomics Workbench 12.0.1를 이용해 분석하였다. 3' & 5' untranslated region (UTR)과 deep intron 부분 (± 25 초과)은 염기변이 분석 시 benign으로 일괄 분류 하였다. 185명 (환자 검체 129, 검증에 이용된 양성/음성 대조 검체 56)의 유전 자료로 이루어진 검사실내 데이터에서 15회 이상 관찰된 염기변이 ($15/185 \times 2 = 4\%$)는 benign으로 분류 하여 추가적인 분석을 시행하지 않았다. 검체 당 평균 커버리지 깊이는 510.8X, 20X에서 타겟 커버리지는 98.86%, 타겟 내 리드 (on target reads)는 98.85%로 확인 되었다.

표 1. 서울아산병원 RP NGS panel Target genes

88 genes (coding region and +/-25 base pair intron)	
Inheritance pattern	Genes
AR only	<i>ABCA4</i> , <i>ARL6</i> , <i>BBS2</i> , <i>BEST1</i> , <i>C2orf71</i> , <i>CERKL</i> , <i>CLRN1</i> , <i>CNGA1</i> , <i>CNGB1</i> , <i>CRB1</i> , <i>DHDDS</i> , <i>EYS</i> , <i>FAM161A</i> , <i>IDH3B</i> , <i>IFT140</i> , <i>IFT172</i> , <i>IMPG2</i> , <i>LRAT</i> , <i>MAK</i> , <i>NR2E3</i> , <i>PDE6A</i> , <i>PDE6B</i> , <i>PDE6G</i> , <i>PROM1</i> , <i>RBP3</i> , <i>RGR</i> , <i>RLBP1</i> , <i>SPATA7</i> , <i>TTC8</i> , <i>TULP1</i> , <i>USH2A</i> , <i>ZNF408</i> , <i>ZNF513</i>
AD and AR	<i>NRL</i> , <i>RHO</i> , <i>RP1</i> , <i>RPE65</i> , <i>SAG</i>
AD only	<i>CA4</i> , <i>CRX</i> , <i>IMPDH1</i> , <i>KLHL7</i> , <i>PRPF3</i> , <i>PRPF31</i> , <i>PRPF6</i> , <i>PRPF8</i> , <i>PRPH2</i> , <i>RDH12</i> , <i>ROM1</i> , <i>SEMA4A</i> , <i>SNRNP200</i> , <i>TOPORS</i>
X-linked	<i>RP2</i> , <i>RPGR</i>
Etc.	<i>AIPL1</i> , <i>ALMS1</i> , <i>ATF6</i> , <i>CACNA1F</i> , <i>CACNA2D4</i> , <i>CDH23</i> , <i>CDHR1</i> , <i>CNNM4</i> , <i>DFNB31</i> , <i>FLVCR1</i> , <i>FSCN2</i> , <i>GUCA1A</i> , <i>GUCA1B</i> , <i>GUCY2D</i> , <i>HARS</i> , <i>HGSNAT</i> , <i>IL1A</i> , <i>IL1B</i> , <i>KCNV2</i> , <i>MFRP</i> , <i>MYO7A</i> , <i>NPHP4</i> , <i>OFD1</i> , <i>PANK2</i> , <i>PCDH15</i> , <i>PDE6C</i> , <i>PDZD7</i> , <i>PITPNM3</i> , <i>RIMS1</i> , <i>RPGRIP1</i> , <i>RRM2B</i> , <i>TTPA</i> , <i>UNC119</i> , <i>USH1G</i>

Autosomal recessive (AR), autosomal dominant (AD)

Ⅲ. 참고한 데이터베이스

염기변이 분석을 위해 gnomAD, Exome Aggregation Consortium (ExAC), 5000Exomes, 1000 Genomes Project와 Korean reference genome database (KRADB)의 인구집단 대립유전자 빈도 자료를 사용하였다. 컴퓨터 예측 프로그램은 Ensemble 내 REVEL, MaxEntScan과 Human splicing finder (HSF)를 활용하였다. 과오변이는 2015 ACMG/AMP 가이드라인 기준으로 분석 시에는 InterVar를 활용하였으나 새로운 RP 맞춤 해석 지침에 따라 분석 시에는 InterVar를 활용 하지 않았다. 질환 데이터 베이스는 ClinVar와 HGMD professional를 이용하였다. 최소대립유전자빈도 (minor allele frequency, MAF) 계산은 온라인에 공개 되어 있는 <https://www.cardiodb.org/allelefrequencyapp/> 을 사용하였다.

Frequency Filter | HOME | calculate AF | calculate AC | explore architecture | inverse AF | penetrance | about

Inheritance:
 monoallelic
 biallelic

Prevalence = 1 in ... (people)

Allelic heterogeneity:

Genetic heterogeneity:

Penetrance:

Confidence:
 0.9 0.95 0.99 0.999

Reference population size (alleles)

Maximum credible population AF:
0.00459

Maximum tolerated reference AC:
596

그림 1. <https://www.cardiodb.org/allelefrequencyapp/> 예시

IV. 망막색소변성증 맞춤 염기변이 해석 지침 형성

RP 맞춤 염기변이 해석 지침을 만들기 위해 현재까지 발표된 유전자/질환군 맞춤 염기변이 해석 지침을 고찰하였다. 그 중 망막색소변성증과 같이 다수의 유전자와 다양한 유전양상을 갖는 유전적 청력소실(hearing loss, HL) 맞춤 지침을 기준으로 삼았다.¹²⁾ SVI에 발표한 일반 권고사항에 해당하는 근거 항목에 대해서는 SVI 권고사항을 우선적으로 참고 하였다. 망막색소변성증의 유병률, 질병침투도 등 특이점을 확인 하기 위해 문헌을 고찰하였다. 원인 유전자, 원인 염기변이의 종류와 질병기여도를 확인 하기 위해 온라인 데이터 베이스와 증례 보고 문헌을 참고 하였다.

V. 망막색소변성증 맞춤 염기변이 해석 지침의 효용성 분석

RP 맞춤 염기변이 해석 지침의 효용성을 분석하기 위해 2015 ACMG/AMP 가이드라인 기준으로 분석했을 때와 염기변이 분류 변화 여부와 변화 시 그 근거가 된 근거항목들을 분석 하였다. 코호트 염기변이 중 최종적으로 VUS로 분류된 변이의 개수 변화 여부를 확인하고 BA1 배제 필터 적용 시 MAF 기준과 한국인 대립유전자빈도 적용에 따라 필터 아웃/인 되는 변이의 수와 필터 아웃 되는 변이의 분류에 대해 분석하였다.

결과

I. 망막색소변성증 맞춤 염기변이 해석 지침 개발

A. 요약

망막색소변성증 맞춤 지침은 SVI가 발표한 일반 권고사항 7가지 근거항목 (PVS1, PS2, PM6, PM3, PP5, BA1, BP6)에 대해서 수정 없이 차용 하였다. 그 외 근거항목에 대해서는 전문가 집단이 발표한 특이 지침들 중 유전적 청력소실 맞춤 지침을 주로 차용하였다. 최종적으로 2015 ACMG/AMP 가이드라인의 28개 항목 중 4개 (PP2, BP1, PP5, BP6) 항목은 제외하고 11개 항목은 근거 강도에 차등을 주었다. 4개 (PM1, PM4, BS4, BP3) 항목은 변화 없이 사용하고 그 외 9개 항목은 일부 수정 하였다.

B. 근거항목 변화 시 명명법

2015 ACMG/AMP 가이드라인은 근거 항목 명명에 염기변이의 병인 방향성- benign, pathogenic-, 근거의 강도- stand-alone (A), very strong (VS), strong (S), moderate (M), 혹은 supporting (P)-와 근거 항목 종류를 나타내는 번호로 구성된다. 근거 강도를 변화시킬 때 SVI는 2015 ACMG/AMP 가이드라인에서 사용했던 근거 항목 이후에 아래붙임표 표시(_)를 하고 변화된 근거 강도를 쓰도록 했다.

C. 인구집단

- i. Benign stand-alone (BA1)과 Hearing loss expert panel의 차용 (PM2, PM2_supporting, BS1, BS1_supporting)

Benign stand-alone 1 (BA1)은 2015 ACMG/AMP 가이드라인에서 Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, 혹은 Exome Aggregation Consortium에서 MAF가 5%를 초과 하는 것으로 정의되었다. BA1 하나 만으로 염기변이가 benign으로 분류 되는 강력한 근거 항목이다. 임상 검사실에서 NGS 검사 시행 후 염기변이 분석 시 BA1을 배제 필터로 널리 사용 하고 있다. BA1에

해당되면 추가적인 pathogenic 여부에 대한 분석을 시행하지 않는 것이다. SVI는 대립유전자빈도가 5%를 초과하지만 VUS, LP, P로 알려진 염기변이들을 조사하여 BA1 적용 예외 염기변이 목록을 제시하였다. 인구집단에서 높은 유병률, 불완전한 침투도 때문에 흔하게 관찰되지만 benign이 아닌 염기변이들 정리하여 발표한 것이다. 또한, 분석에 사용할 수 있는 인구집단자료를 대륙 별 자료 중 2000 염기서열 이상, 즉 1000명 이상이 포함된 자료로 한정하였다.¹³⁾

서울아산병원에서 시행 하는 RP NGS 패널에 포함된 88개 유전자 중 BA1 적용 예외 목록에 포함된 유전자는 없다. 본 검사실은 2015 ACMG/AMP 가이드라인 기준에 따라 분석을 실시 할 때는 ExAC과 Iron Report에서 제공하는 5000Exomes의 대립유전자 빈도 중 모든 대륙별 자료를 사용하였다. 새로운 RP 맞춤 해석 지침에 따라 분석할 때는 ExAC의 아프리카인, 동아시아인, 서아시아인, 핀란드인이 포함되지 않은 유럽인, 아메이칸 (라티노)와 Iron Report에서 제공하는 5000Exomes의 아프리카인 아메리칸, 유럽피안 아메리칸, 세계적인 인구 집단 등 총 8개의 인구집단 자료 만을 분석에 사용하였다. 추가로 KRGDB와 gnomAD의 한국인 대립유전자 빈도를 BA1 배제 필터에 추가 적용 시켰을 때 필터 인/아웃 되는 변이 수의 차이를 분석 하였으나, 개별 염기변이 분석에는 한국인 대립유전자 빈도 자료를 활용하지 않았다.

SVI는 염기변이 분석을 경험적이고 정성적인 현재 방법에서 정량적으로 개선하고자 한다. 표준지침을 Bayesian framework에 적용하는 등 수학적 모델을 적용해 궁극적으로 염기변이 해석 자동화를 실현하고자 노력 하고 있다.¹⁴⁾ Bayesian framework에 따르면 BA1은 posterior probability pathogenicity가 0.1% 미만이 되어야 하고 이는 2015 ACMG/AMP 가이드라인과 그 의도가 일치한다. ¹³⁾ 유전자 혹은 질환군 별로 BA1 MAF 기준을 0.05로 동일하게 적용 하는 것은 부적합하다. 현재까지 발표 된 전문가 집단 유전자/질환군 맞춤 지침들은 유병률, 침투도, 유전 형태 자료 등을 활용하여 특이 BA1 기준을 새롭게 제시 했다.

ii. 망막색소변성증 코호트

HL 맞춤 지침에서 인구집단 근거항목에 대한 MAF를 결정 할 때 2개 환자군 코호트를 이용했다. RP 코호트에 대한 문헌 조사를 실시 하였으나 충분한 수의

환자를 포함한 자료는 찾을 수 없었다. 코호트 마다 syndromic RP 포함 여부, 포함 시킨 유전 형태 조합이 상이하였다. 또한 인종 별, 지역별로 RP 유발 유전자와 염기변이가 상이 하였다. 일부 문헌에서 RP 유발 유전자의 기여 정도와 염기변이의 기여 정도를 추론 할 수 있었다.

329명이 포함 된 한 일본인 코호트에서 *EYS*가 28.9%로 가장 높은 RP 유발 유전자 기여도를 보여 이를 BA1의 MAF를 정하는데 사용 하였다.¹⁵⁾ 66명이 포함 된 한 스페인 코호트에서 *USH2A*가 19.6%로 가장 높은 RP 유발 유전자 기여를 보여 BS1 MAF를 정하는데 사용 하였다.¹⁶⁾ 앞서 언급한 일본인 코호트에서 NM_001142800.1(*EYS*):c.4957dupA가 4.25%로 가장 높은 RP 유발 염기변이 기여를 보여 BS1_P의 MAF를 정하는데 활용하였다.¹⁵⁾ PM2 MAF 기준은 BS1_P MAF의 1/10로 정하였다.¹⁵⁾

망막색소변성증 유병률은 인종과 인구집단에 따라 1/750에서 1/9000까지 상이 한 것으로 알려져 있으나 가장 널리 통용되는 1/4000을 유병률로 선정하였다.¹⁷⁾ ¹⁸⁾ 이는 nonsyndromic RP 유병률로 syndromic RP 유병률은 아직 정립되어 있지 않았다. RP 유병률은 HL의 1/200 보다 낮아 HL과 다르게 우성유전과 열성유전 각각에 대한 MAF 기준 상정이 용이하지 않다. 따라서, HL 맞춤 지침과 다르게 유전형태에 따른 MAF 기준을 구분 하여 산정하지 않았다.

망막색소변성증 침투도는 100%로 선정하였다. *PRPF31*등 일부 유전자에서 낮게는 20% 까지 침투도가 감소되는 것으로 알려져 있으나 원인 유전자 대부분은 100%에 가까운 높은 침투도를 보이는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁾ 우성유전과 열성유전 모두를 따르는 유전자는 유전형태에 따라 임상 양상이 달라져 정확한 망막색소변성증 침투도는 알려져 있지 않다.

각 근거항목에 대한 MAF는 하디-와인버그 평형을 이룬다는 가정하에 계산하였고 웹 기반 도구인 <https://www.cardiodb.org/allelefrequencyapp/>에서 신뢰구간 95%로 추출하였다.¹²⁾ 최종적으로 BA1은 0.005 (0.5%) 이상, BS1은 0.003~0.005, BS1_P는 0.0006~0.003, PM2_P는 0.00006~0.0006, PM2는 0.00006 (0.006%) 미만으로 설정 하였다.

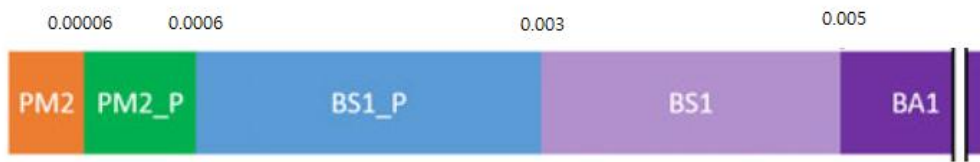


그림2. 인구집단 대립유전자 빈도 관련 근거 항목 MAF 기준

표 2. 최소 대립유전자 빈도 기준

2015 ACMG/AMP criteria	MAF	Prevalence	Gene / Variant	Allelic heterogeneity	Cohort	Penetrance
BA1	≥0.005 (0.5%)	1/4000	<i>EYS</i>	28.9% (35/121)	The most common pathogenic gene*	100%
BS1	≥0.003 (0.3%)	1/4000	<i>USH2A</i>	19.6% (13/66)	The most common pathogenic gene†	100%
BS1_Supporting	≥0.0006 (0.06%)	1/4000	NM_001142800.1(<i>EYS</i>): c.4957dupA	4.25% (28/658)	The most common pathogenic variant*	100%
PM2_Supporting	<0.0006 (0.06%)	1/4000				100%
PM2	≤0.00006 (0.006%)	1/4000				100%

* 15)

† 16)

iii. 질환군과 정상인구집단에서 대립유전자빈도 (PS4, BS2)

질환이 발현된 환자군에서 정상 대조군과 비교 하여 승산비를 계산하여 염기변이 대립유전자빈도가 증가해 있을 때 PS4를 부여한다. HL 맞춤 지침에서는 환자-대조군 연구 자료가 없는 경우에도 관찰된 증례 수에 따라 근거 강도를 달리하여 PS4, PS4_moderate, PS4_supporting를 부여할 수 있게 하였다. 이를 RP 맞춤 지침에 동일하게 적용하였다.

어린 나이에 완전한 침투를 보이는 질환의 경우 건강한 성인에서 변이가 관찰 되면 BS2를 부여 한다. 망막색소변성증은 증상의 발현이 점진적이고 일찍 발병 해도 보상작용으로 진단이 오히려 늦게 되어 어린 나이에 완전한 침투를 보이는 질환이라 보기 어렵다. BS2는 RP 맞춤 지침의 근거항목에서 제외 하지 않았으나 일부 전신 질환을 동반한 망막색소변성증 외에는 적용이 적절치 않다고 생각된다. 이와 같은 이유로 염기변이 코호트 분석에 적용 된 적은 없다.

D. 추정 정보

i. 무효 변이 (PVS1)

PVS1은 기능소실 (loss of function, LOF)이 질환의 기전인 유전자에서 null 염기변이 (nonsense, frameshift, canonical ± 1 or 2 splice site, initiation codon, single or multi-exon deletion)가 나타나는 경우 적용 할 수 있다. PVS1은 그 근거 강도가 강력하여 사용에 더욱 유의 해야 한다. 2015 ACMG/AMP 가이드라인에서는 어떤 유전자가 기능소실을 질환의 기전으로 가지는지에 대해 정의하고 있지 않다. 변이의 종류, 위치, 전사체의 생물학적 연관성 등의 근거에 따른 null 효과의 상대적 가능성 판단 기준 역시 제시 하지 않는다. SVI는 이러한 점을 보완한 지침을 제안 하였고 RP 맞춤 지침에 이를 동일하게 적용 하였다.²⁰⁾

ii. 동일 코돈에 영향을 미치는 염기변이 (PS1, PM5)

과오변이 중 기존에 pathogenic 염기변이가 알려진 코돈 부위에 새로운 과오변이가 발견되면 PM5를 적용 할 수 있다. 어떤 염기로 치환 되었던 기존에 알려진 pathogenic 염기변이와 동일한 아미노산으로 변화하면 PS1을 부여 하였다. 염기변이가 아미노산 수준이나 단백질 수준에서 변화를 일으키는지 확인

하여야 한다. 컴퓨터 예측 도구를 이용해 DNA 수준에 영향이 한정되는 경우는 PM5와 PS1을 적용 할 수 없다.

HL 맞춤 지침에서는 동일한 코돈 부위에 pathogenic 과오변이가 2개 이상 알려진 경우, 새로 발견된 염기변이에 대해 근거 강도를 증가 시켜 PM5_Strong을 부여 할 수 있게 하였다. 한편, PS1을 적용 시킬 수 있는 위치 중 짜집기에 영향을 강하게 미칠 것으로 예상되는 보존부위에 한하여 PS1을 적용 시킬 수 있게 하였다. 이는 엑손의 첫 핵산과 마지막 세 핵산, 인트론의 -12에서 -1까지와 +1에서 +6까지를 포함한다. PVS1이 적용되는 위치인 ± 1 혹은 2 splice site은 중복을 막기 위해 제외 했다. RP 맞춤 지침은 HL 맞춤 지침에서 제안한 사항을 동일하게 적용하였다.

iii. 컴퓨터 예측 도구 (PP3, BP4)

컴퓨터 예측 도구는 임상 검사실에서 높은 접근 용이성 때문에 염기변이 해석에 널리 사용 된다. 하지만 도구 마다 상반된 예측 결과를 보일 경우 오히려 해석에 혼란을 더한다. HL 맞춤 지침에서는 Ensemble에 연결된 도구 2개를 지정하여 사용하도록 했다. 먼저, 과오변이 분석에는 REVEL²¹⁾을 사용하도록 했는데 benign과 pathogenic으로 판단 하는데 적용할 기준을 각각 0.15 이하, 0.7 이상으로 제시 하였다. 과오변이, 침묵변이, 짜집기 공통서열 변이에 의한 짜집기 영향 여부는 MaxEntScan²²⁾을 이용하도록 하였다. RP 맞춤 지침에서 이를 동일하게 적용하였다.

iv. 동의미변이 (BP7)

염기의 중간 보존이 높지 않은 경우 동의미변이가 컴퓨터 예측 도구에서 새로운 짜집기 부위를 형성하거나 짜집기 공통서열에 영향을 미치지 않을 것으로 추정되면 BP7을 부여 할 수 있다. 2015 ACMG/AMP 가이드라인과 동일 하게 작용 하였다. 다만, MaxEntScan은 동의미변이의 짜집기 영향에 대해 추정하지 못 하여 HSF를 이용하였다.

v. In-frame indel (PM4, BP3)

In-frame 삽입/결손에 의한 단백질 길이 변화가 생길 경우 PM4, BP3를 적용

한다. 두 근거항목은 2015 ACMG/AMP 가이드라인을 그대로 유지 했다. 삼입/결손의 크기가 큰 경우 PVS1의 적용을 고려하여야 한다.

E. 대립유전자 정보 (PM3, BP2)

부모 검사를 통해 발단자 (proband)에서 관찰 된 2개의 염기변이가 같은 대립유전자에 위치하는지 확인 하여 PM3와 BP2를 적용 할 수 있다. SVI는 부모 검사로 대립유전자 배열을 확인 하지 않아도 여러 증례에서 관찰된 것을 점수화 하여 PM3를 PM3_VeryStrong, PM3-Strong, PM3, PM3_Supporting으로 근거강도를 달리하여 사용하도록 권고하였다. 또한, 질환이 발현된 환자에 한해서 만 사용하도록 조건을 강화하는 한편 likely pathogenic과 같이 관찰 되었을 때도 활용 할 수 있게 하였다. RP 맞춤 지침은 SVI의 새로운 권고 사항을 따랐고, BP2는 2015 ACMG/AMP 가이드라인을 구체화 하여 적용하였다.

F. Segregation (PP1, BS4)

질환에 이환 된 친척들에서 특정 염기변이가 반복적으로 관찰되면 PP1을, 관찰 되지 않으면 BS4를 부여 할 수 있다. 염기변이를 가지는 친척의 수가 증가 할 수록 근거는 강력해 진다. HL 맞춤 지침에서는 PP1_Strong, PP1_Moderate, PP1로 증거 강도 차등을 주었고, 그 기준으로 공산비를 각각 32:1, 16:1, 4:1로 정했다. 이를 충족시키는 이환 된 친척들의 수를 유전형태에 따라 계산하여 각각 몇 명인지 제시 하였다. RP 맞춤 지침은 이를 동일하게 차용하였고 BS4 근거 항목은 2015 ACMG/AMP 가이드라인을 수정 없이 적용하였다.

G. De novo (PS2, PM6)

De novo 염기변이 여부를 부모검사를 통해 확인 한 경우는 PS2를, 추측 가능한 경우는 PM6를 사용하도록 2015 ACMG/AMP 가이드라인은 제안 하였다. SVI는 두 근거 항목을 합치고, 점수 시스템을 이용하도록 권고 하였다. De novo 확인/추정 여부, 표현형과 일치 여부, 관찰된 발단자 수, 이렇게 3가지 항목에 따라 점수를 부여하고 총합에 따라 PS2&PM6_Supporting, PS2_Moderate 혹은 PM6, PS2 혹은 PM6_Strong, PM2&PM6_VeryStrong으로 근거 강도를 부여하게 하였다. RP 맞춤 지침에 SVI의 권고 사항을 차용하였다.

H. 표현형 (PP4, BP5)

HL 맞춤 지침은 PP4를 적용 시킬 수 있는 전신 증상을 동반하는 HL 중 구체적인 표현형과 유전자 쌍을 정리하여 제시하였다. 이와 같은 쌍은 Bayesian framework를 2015 ACMG/AMP 가이드라인에 대입시켰을 때 supporting 수준의 근거 강도가 공산비를 2배 증가시키는 것에 착안 하여, 특정 표현형과 특정 유전자와의 연관성이 최소 2배 이상 될 때로 정하였다. RP 맞춤 지침에서는 HL 처럼 표현형과 유전자 쌍을 제안 하지 않지만 분석 시 HL 맞춤 지침의 판단 근거를 차용하였다.

동정된 염기변이 외에 질병에 대한 설명이 가능할 경우 BP5를 주도록 했던 2015 ACMG/AMP 가이드라인을 HL 맞춤 지침은 더 구체화 하였다. 우성유전을 따르는 유전자에서 발생 한 경우로 제한을 두되, 열성유전을 따르는 유전자에서 동형접합이나 복합이형접합인 경우도 적용 할 수 있게 하여 RP 맞춤 지침은 구체화된 기준을 적용 하였다.

I. 기능 연구 (PS3, BS3) & Hotspot (PM1)

잘 확립된 체내 혹은 체외 기능 연구에서 손상 효과 유무가 증명 된 경우 PS3, BS3를 부여할 수 있었다. HL 전문가 집단은 문헌 고찰 후 대부분의 기능 연구가 strong 수준의 근거 강도를 지지할 만큼 충분한 타당성을 갖지 못 하다고 판단하였다. PS3를 적용 시킬 수 있는 기능 연구 자체를 지정하고 그 외에는 PS3_Supporting, BS3_Supporting으로 근거 강도를 낮추도록 하였다. RP 맞춤 지침에서도 특정 염기변이 knock-in mouse 모델에서 pathogenicity가 증명된 경우 만 PS3를 적용 하고 그 외는 근거 강도를 낮추어 부여하였다.

염기변이 hot spot이나 치명적이고 잘 정립된 기능 도메인에서 발견된 염기변이에 대해 적용 하는 PM1은 2015 ACMG/AMP 가이드라인을 그대로 유지하였다.

J. 제외 항목 (과오변이- PP2, BP1 & 권위 있는 데이터베이스- PP5, BP6)

망막색소변성증 유발 유전자로 알려진 유전자 중 과오변이가 해당 유전자의 주요 질환 발생 기전이면서 낮은 빈도의 benign 과오변이를 갖는 PP2을

부여하기 위한 전제 조건에 부합하는 경우가 없기 때문에 해당 근거항목은 제외 하였다. BP1은 기능소실이 질환 유발의 유일한 원인으로 알려진 유전자에서 과오변이가 관찰 될 때 적용하는 가능하며 RP 맞춤 지침에서는 제외 하였다.

한편, SVI는 권위 있는 염기변이 데이터 베이스에서 보고 한 분류에 따라 적용 하던 PP5와 BP6의 제외를 권고 하여 RP 맞춤 지침에서도 사용하지 않았다.²³⁾

K. 근거항목 조합

2015 ACMG/AMP 가이드라인의 근거항목 조합 규칙을 그대로 유지 하되 2가지 추가 규칙을 HL 가이드라인을 차용하여 적용 하였다. PVS1과 PM2_supporting 만 적용하는 경우 LP로, BS1이 적용되고 기타 pathogenic 근거가 발견되지 않으면 LB로 분류 할 수 있다. 이는 질환 특이적이면서 기준이 강화된 MAF 기준을 인구집단 대립유전자 빈도 관련 근거 항목에 적용했기 때문에 이다.

표 3. 망막색소변성증 맞춤 지침

Evidence of pathogenicity		Category																	
PVS1		Same as Hum Mutat. 2018 Nov;39(11):1517-1524.																	
PS1		Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change, OR splice variants at same nucleotide and with similar impact prediction as previously reported pathogenic variant																	
PS2&PM6	PS2_Supp PM6_Supp	0.5																	
	PS2_Moderate PM6	1																	
	PS2 PM6_Strong	2																	
	PS2_VeryStrong PM6_VeryStrong	4																	
<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Phenotypic consistency</th> <th colspan="2">Points per Proband</th> </tr> <tr> <th>Confirmed de novo</th> <th>Assumed de novo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Phenotype highly specific for gene</td> <td>2</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Phenotype consistent with gene but not highly specific</td> <td>1</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>Phenotype consistent with gene but not highly specific and high genetic heterogeneity*</td> <td>0.5</td> <td>0.25</td> </tr> <tr> <td>Phenotype not consistent with gene</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Maximum allowable value of 1 may contribute to overall score</p>			Phenotypic consistency	Points per Proband		Confirmed de novo	Assumed de novo	Phenotype highly specific for gene	2	1	Phenotype consistent with gene but not highly specific	1	0.5	Phenotype consistent with gene but not highly specific and high genetic heterogeneity*	0.5	0.25	Phenotype not consistent with gene	0	0
Phenotypic consistency	Points per Proband																		
	Confirmed de novo	Assumed de novo																	
Phenotype highly specific for gene	2	1																	
Phenotype consistent with gene but not highly specific	1	0.5																	
Phenotype consistent with gene but not highly specific and high genetic heterogeneity*	0.5	0.25																	
Phenotype not consistent with gene	0	0																	

표 3. 계속

PS3	PS3	Knock-in mouse model demonstrates the phenotype
	PS3_Moderate	Validated functional studies show a deleterious effect
	PS3_Supporting	Functional studies with limited validation show a deleterious effect
PS4	PS4	Fisher Exact or Chi-Squared analysis shows statistical increase in cases over controls, OR autosomal dominant: ≥ 5 probands with variant, and variant meets PM2
	PS4_Moderate	Autosomal dominant: 3~4 probands with variant, and variant meets PM2
	PS4_Supporting	Autosomal dominant: 1~2 probands with variant, and variant meets PM2
PM1*		Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g., active site of an enzyme) without benign variation
PM2	PM2	Absent/rare from controls (absent or ≤ 0.00006 (0.006%))
	PM2_Supporting	Low MAF in population databases (< 0.0006 (0.06%))

표 3. 계속

PM3	PM3_VeryStrong	4													
	PM3_Strong	2													
	PM3	1													
	PM3_Supporting	0.5													
	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Classification/Zygotity of other variant ¹</th> <th colspan="2">Points per Proband</th> </tr> <tr> <th>Confirmed in <i>trans</i></th> <th>Phase unknown</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Pathogenic or Likely pathogenic variant</td> <td>1.0</td> <td>0.5 (P) 0.25 (LP)</td> </tr> <tr> <td>Homozygous occurrence (<i>max point 1.0</i>)</td> <td>0.5</td> <td>N/A</td> </tr> <tr> <td>Uncertain significance variant (<i>max point 0.5</i>)</td> <td>0.25</td> <td>0.0</td> </tr> </tbody> </table> <p>¹All variants should be sufficiently rare (meet PM2 specification); P - Pathogenic; LP - Likely pathogenic</p>		Classification/Zygotity of other variant ¹	Points per Proband		Confirmed in <i>trans</i>	Phase unknown	Pathogenic or Likely pathogenic variant	1.0	0.5 (P) 0.25 (LP)	Homozygous occurrence (<i>max point 1.0</i>)	0.5	N/A	Uncertain significance variant (<i>max point 0.5</i>)	0.25
Classification/Zygotity of other variant ¹	Points per Proband														
	Confirmed in <i>trans</i>	Phase unknown													
Pathogenic or Likely pathogenic variant	1.0	0.5 (P) 0.25 (LP)													
Homozygous occurrence (<i>max point 1.0</i>)	0.5	N/A													
Uncertain significance variant (<i>max point 0.5</i>)	0.25	0.0													
PM4*		Protein length changes as a result of in-frame deletions/insertions in a non-repeat region or stop-loss variants													
PM5	PM5_Strong	Missense change at same codon as two different pathogenic missense variants													
	PM5	Missense change at same codon as another pathogenic missense variant													

표 3. 계속

PP1	PP1_Strong	Segregation in three affected relatives for recessive and 5 affected relatives for dominant
	PP1_Moderate	Segregation in two affected relatives for recessive and 4 affected relatives for dominant
	PP1	Segregation in one affected relative for recessive and two affected relatives for dominant
PP2		Not applicable
PP3		REVEL score ≥ 0.7 , or predicted impact to splicing using MaxEntScan
PP4		Patient's phenotype highly specific for gene or fully sequenced gene set
PP5		Not applicable

표 3. 계속

BA1		MAF of ≥ 0.005 (0.5%) Defined subsets of the ExAC database (African, East Asian, European[non-Finnish], Latino, and South Asian) and 5000Exome
BS1	BS1	MAF of ≥ 0.003 (0.3%)
	BS1_Supporting	MAF of ≥ 0.0006 (0.06%)
BS2		Observation of variant (biallelic with known pathogenic variant for recessive) in controls inconsistent with disease penetrance.
BS3	BS3	Well-established in vitro or in vivo functional studies show no damaging effect on protein function or splicing
	BS3_Supporting	Functional study shows no deleterious effect
BS4*		Lack of segregation in affected members of a family
BP1		Not applicable
BP2		Observed in trans with a dominant variant/observed in cis with a pathogenic variant (use with caution) For genes that are associated with both dominant and recessive RP, consider whether an earlier onset/more severe phenotype could be present if variant is identified in trans with a dominant variant.
BP3*		In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function

표 3. 계속

BP4		Computational evidence suggests no impact; REVEL score ≤ 0.15 or no impact to splicing in MaxEntScan.
BP5		Variant in an autosomal dominant gene found in a patient with an alternate explanation
BP6		Not applicable
BP7		A synonymous (silent) variant for which splicing prediction algorithms predict no impact to the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved

*Same as 2015 ACMG/AMP guideline

II. 2015 ACMG/AMP와 RP 맞춤 염기변이 해석 가이드라인의 비교 분석

A. 근거항목

2015 ACMG/AMP 가이드라인과 RP 맞춤 분석 기준으로 각각 분류된 변이들을 비교한 결과, 완전 일치는 89.65%, 신뢰 할 수 있는 정도의 차이 (LP vs P 또는 LB vs B 차이)는 4.57%, 임상적으로 의미 있는 수준의 차이 (VUS vs LB/B 차이)는 4.92%를 보였고, 임상적으로 중요한 해석 차이는 0.86% (20/2339)로 나타났다. 임상적으로 중요한 차이를 보인 염기변이 중 6개는 LP에서 VUS로, 14개는 VUS에서 LP로 재분류 되었다.

임상적으로 의미 있는 염기변이 중 LP에서 VUS로 재분류 된 6개의 경우 MAF 기준에 따라 BS1_P가 적용 된 경우가 2 케이스 있었다. REVEL score가 각각 0.516, 0.687로 예측되어 0.7에 부합하지 못해 PP3를 적용 시키지 못한 2 케이스가 있고, PP5이 비적용 된 경우도 있었다.

반면, VUS에서 LP로 재분류 된 염기변이들은 PP5를 적용 시키지 않아도 관련 문헌 고찰과 검사실 내부 누적 증례 자료를 이용하여 De novo (PS2&PM6) 근거 항목이나 질환에 이완된 환자에서 이미 알려진 pathogenic 변이와 trans로 관찰된 변이 증례 수 (PM3) 항목이나 segregation (PP1)이 적용 된 경우가 7 케이스 있었다. 2쌍의 형제와 한 쌍의 부녀에서 각각 동일하게 관찰 된 염기변이 외에도 혈연 관계 없이 동일한 염기변이가 3번 관찰 되어 관찰 된 환자 증례 누적으로 인한 근거 강도 강화가 가능하였다.

B. VUS 수

2015 ACMG/AMP 가이드라인 기준으로 VUS로 분류되었던 변이 298개 중 78개는 B, LB, LP로 재분류 되어 26.17%의 해결률을 보였다. 새로운 RP 맞춤 지침에 따라 분류 시 총 VUS 수는 277개로 감소 하였다. 220개의 VUS는 질환 맞춤 기준을 적용 하여도 재분류가 불가능 했는데 77개는 PM2_Supporting에 해당하는 대립유전자 빈도를 보였다.

C. BA1 배제 필터

분석 과정에서 2015 ACMG/AMP 가이드라인의 BA1 기준에 비하여 강화된 MAF 기준을 적용하면 11.20% (262/2339)의 염기변이가 추가로 필터 아웃 되었고 VUS 가 포함되었다. 추가로 한국인 대립유전자 빈도를 적용할 경우 13.68% (320/2339)의 변이가 필터 아웃 되었는데 2015 ACMG/AMP 가이드라인 기준으로 P, LP, VUS 가 각각 1 개씩 포함되었다. 이들 변이는 2015 ACMG/AMP 가이드라인을 적용 하였을 때 PM2 가 적용되었고, RP 맞춤 기준에 따르면 BS1_P 가 적용되고 gnomAD 한국인 대립유전자빈도를 적용 시키면 BA1 이 적용되었다. RP 맞춤 기준 적용 시 NM_000283.3(PDE6B):c.1811C>T 변이는 P 에서 LP 로 NM_006269.1(RP1):c.5797C>T 변이는 LP 에서 VUS 로 재분류 되었다. NM_001142800.1(EYS):c.525_527delGGA 변이는 혈연 관계가 없는 4 명의 망막색소변성증 환자에서 관찰 되었고 그 중 3 명의 환자에서 다른 P 혹은 LP 변이와 함께 관찰되었다. 증례 누적으로 PM3 가 적용 되어 VUS 에서 LP 로 재분류 되었다.

표 4. 염기변이 분석 기준에 따른 염기변이 분류 차이

	2015 ACMG/AMP guideline	RP specific guideline	Case	%
Agreed	B	B	1672	71.48%
	LB	LB	182	7.78%
	VUS	VUS	220	9.41%
	LP	LP	14	0.60%
	P	P	9	0.38%
Subtotal			2097	89.65%
Confidence	P	LP	28	1.20%
	LP	P	3	0.13%
	LB	B	74	3.16%
	B	LB	2	0.09%
Subtotal			107	4.57%
Other confidence	VUS	LB	41	1.75%
	VUS	B	23	0.98%
	B	VUS	10	0.43%
	LB	VUS	41	1.75%
Subtotal			115	4.92%
Medically significant difference (MSD)	P	VUS	0	0.00%
	LP	VUS	6	0.26%
	VUS	P	0	0.00%
	VUS	LP	14	0.60%
	P or LP	B or LB	0	0.00%
Subtotal			20	0.86%
Total			2339	100.00%

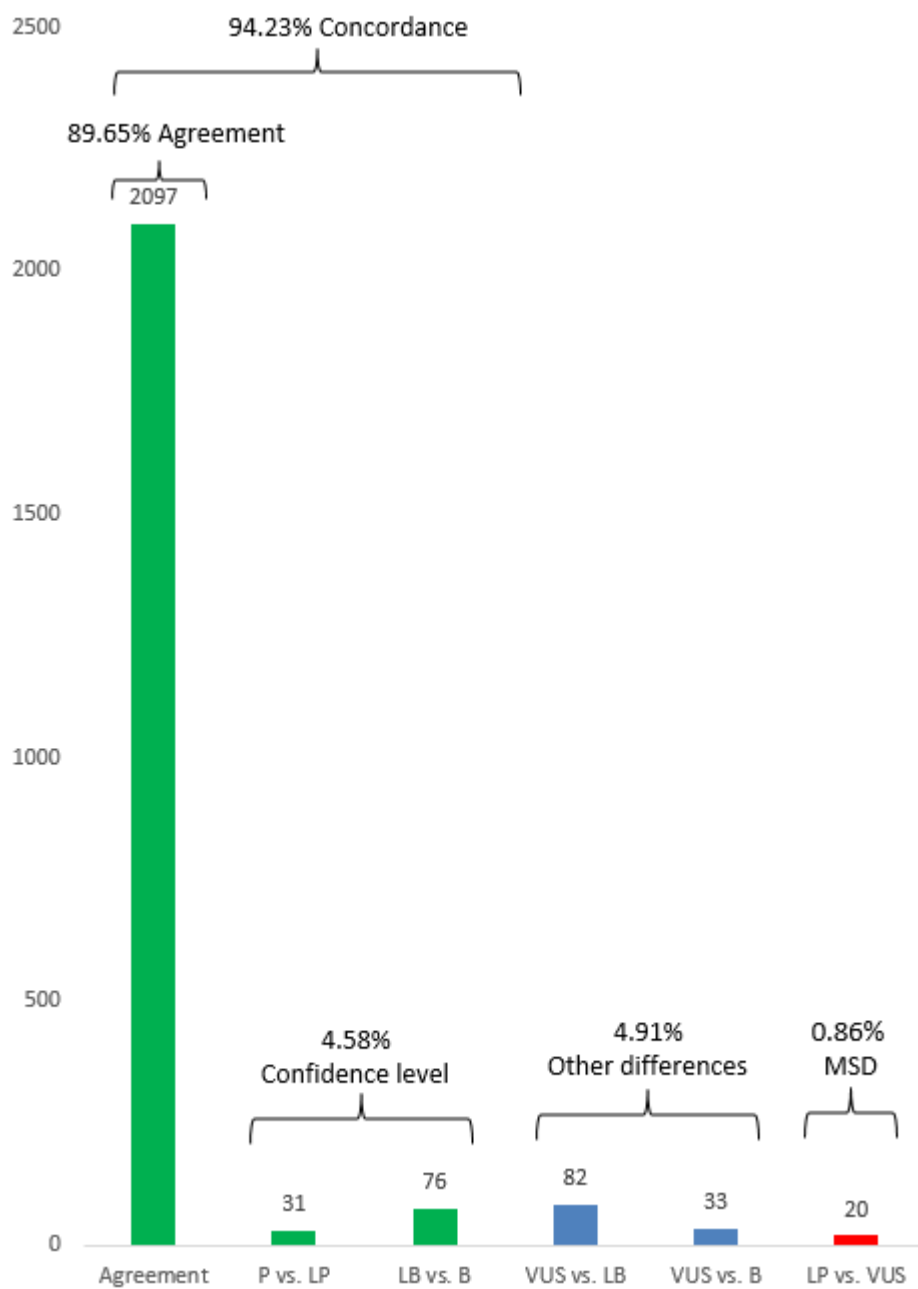


그림 3. 염기변이 분석 기준에 따른 염기변이 분류 차이

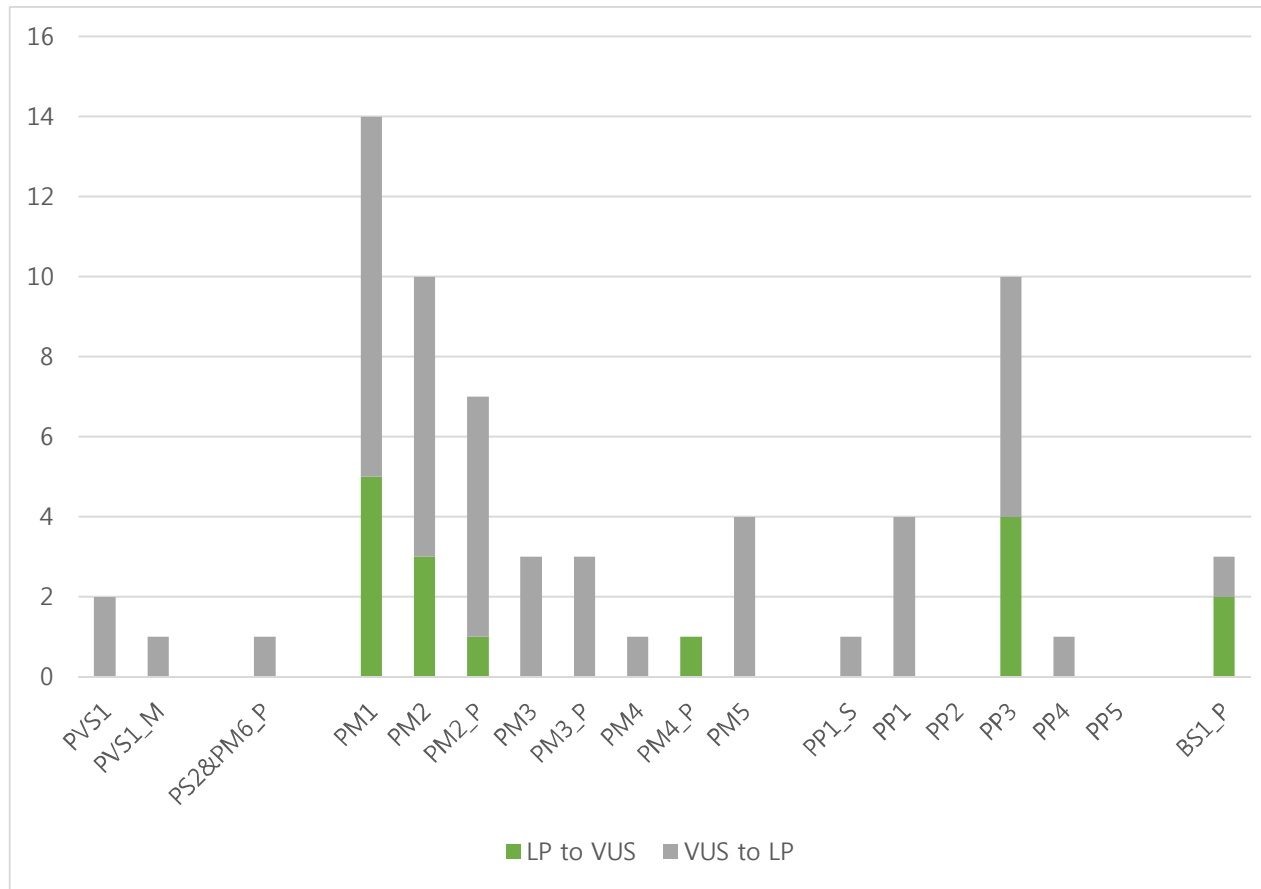


그림 4. 임상적으로 의미 있는 염기변이 분류 차이가 발생한 변이들에 적용된 근거항목

표 5. 임상적으로 의미 있는 염기변이 분류 차이가 발생한 변이들

# Locus	Genotype	Gene	Transcript	Protein	Coding	2015 ACMG/AMP guideline Pathogenicity	2015 ACMG/AMP evidence criteria	RP specific Pathogenicity	RP specific evidence criteria
chr16:57998386	C/G	<i>CNGB1</i>	NM_001297.4	p.?	c.217+5G>C	LP	PM1 PM2 PP3 PP5	VUS	PP3 PM3_P BS1_P
chr19:54625320	T/C	<i>PRPF31</i>	NM_015629.3	p.Leu107Pro	c.320T>C	LP	PM1 PM2 PP3 PP5 BP1	VUS	PM1 PM2 PP3
chr4:654335	T/C	<i>PDE6B</i>	NM_000283.3	p.Leu516Pro	c.1547T>C	LP	PM1 PM2 PP3 PP5	VUS	PM1 PM2 PP3
chr4:656386	C/T	<i>PDE6B</i>	NM_000283.3	p.Thr604Ile	c.1811C>T	LP	PM1 PM2 PP3 PP5	VUS	PM1 PP3 BS1_P
chr7:128040224	T/C	<i>IMPDH1</i>	NM_000883.3	p.Arg267Gly	c.799A>G	LP	PM1 PM2 PP2 PP3	VUS	PM1 PM2_P

표 5. 계속

chrX:467 12957	C/C	<i>RP2</i>	NM_0069 15.2	p.Val50Ala	c.149T>C	LP	PM1 PM2 PM3 PP3	VUS	PM1 PM2
chr1:215 807920	A/G	<i>USH2A</i>	NM_2069 33.2	p.Ser5060Pro	c.15178T>C	VUS	PM2	LP	PP1_S PM2_P PS2&PM6_P
chr1:215 933077	C/T	<i>USH2A</i>	NM_2069 33.2	p.Arg3719His	c.11156G> A	VUS	PM1 PM2 PP5	LP	PM1 PM3 PM2_P PP1
chr1:216 052410	C/T	<i>USH2A</i>	NM_2069 33.2	p.Gly2752Arg	c.8254G>A	VUS	PM1 PM2 PP3	LP	PM1 PM2 PM3
chr1:216 497648	A/T	<i>USH2A</i>	NM_2069 33.2	p.Ile397Lys	c.1190T>A	VUS	PM1 PM2 PP3	LP	PM1 PM2 PP3 PP4
chr10:55 582239	AG/A	<i>PCDH1</i> 5	NM_0011 42763.1	p.Pro1756fs	c.5267delC	VUS	PM2	LP	PVS1 PM2_P
chr11:76 868003	G/A	<i>MYO7A</i>	NM_0002 60.3	p.Ala230Thr	c.688G>A	VUS	PM1 PM2 PP3	LP	PM1 PM5 PM2_P PP3

표 5. 계속

chr17:15 54202	G/A	<i>PRPF8</i>	NM_0064 45.3	p.Pro2301Le u	c.6902C>T	VUS	PM1 PM2 PP3	LP	PM1 PM2 PM5 PP3
chr2:969 53698	G/A	<i>SNRNP 200</i>	NM_0140 14.4	p.Arg1090Trp	c.3268C>T	VUS	PM1 PM2 PP3	LP	PM1 PM2 PM5 PP3
chr4:479 38584	G/A	<i>CNGA1</i>	NM_0011 42564.1	p.Arg712Ter	c.2134C>T	VUS	PM2 PP3	LP	PVS1 PM2_P PM3_P
chr4:654 357	G/T	<i>PDE6B</i>	NM_0002 83.3	p.Met523Ile	c.1569G>T	VUS	PM1 PM2	LP	PM1 PM2PM5
chr4:656 020	C/T	<i>PDE6B</i>	NM_0002 83.3	p.Thr571Met	c.1712C>T	VUS	PM1 PM2	LP	PM1 PM2 PP1 PP3
chr6:644 99037	C/G	<i>EYS</i>	NM_0011 42800.1	p.Ala2498Pro	c.7492G>C	VUS	PM1 PM2 PP3	LP	PM1 PM2 PM3_P PP1 PP3
chr6:662 04776	TTCC/ T	<i>EYS</i>	NM_0011 42800.1	p.Glu176del	c.525_527d elGGA	VUS	PM2 PM4	LP	PM3 PM4 BS1_P
chr8:555 42620	GA/G	<i>RPI1</i>	NM_0062 69.1	p.Ile2061fs	c.6181delA	VUS	PM2 PP5	LP	PVS1_M PM2_P PM3_P PP1

고찰

본 연구에서는 망막색소변성증 맞춤 염기변이 해석 지침을 개발하였고 2015 ACMG/AMP 가이드라인과 비교하여 높은 일치율을 보였다. 임상적으로 중요한 해석의 차이는 0.865로 다른 문헌에서 ClinVar 내 혹은 검사실간 관찰 된 3~4% 보다 낮았다.^{4, 5)} 본 연구에서 두 가이드라인의 일치율이 높았던 것은 ClinVar 내 자료는 수년에 걸쳐 누적된 반면, 2015 ACMG/AMP 가이드라인을 따라 분석했을 때와 RP 맞춤 기준에 따라 분석한 시점이 수개월 간격 이었던 것이 가장 큰 이유라 생각된다.²⁴⁾ 또한, 검사실 마다 사용 가능한 자료가 다르나 본 연구는 검사실내 비교로 접근 가능한 데이터가 동일 했다.

개발한 RP 맞춤 지침의 장점으로 기존 가이드라인에서 임상검사실에서는 활용이 어려웠던 항목들의 활용도 증가를 들 수 있다. 대표적 예로 기존에 phase나 de novo 여부를 추가 검사를 통해 확인한 경우에만 적용 가능했던 근거 항목을 증례 수에 따라 점수 차등을 주고 그 점수를 합산하는 방식으로 변화시켜 확인 없이 추정 가능한 경우도 적용 할 수 있게 되었다. 특히 성인에서 부모의 사망 등의 이유로 trio 검사 시행에 어려움이 있고, phase 확인을 위해 추가 검사를 시행할 필요가 없어졌다. PM3의 경우 기존에 pathogenic 염기변이와 같이 발견된 경우에만 적용 가능 했으나 LP 혹은 VUS와 같이 관찰되어도 낮은 점수를 부여하여 활용이 가능하게 되었다. 이와 같이 검사실내 혹은 문헌 고찰로 찾은 증례 수가 증가할수록 증거 강도가 정량적으로 변화되기 때문에 검사실내 증례 축적과 정리 및 검사실간 정보 공유가 더욱 중요해 질 것이라 생각된다.

권위 있는 염기변이 데이터베이스에서 제공하는 염기변이 분류에 대한 근거 항목인 PP5, BP6는 제외 되었다. 이는 데이터베이스에서 주장하는 분류에 대한 근거를 제시 하지 않거나 수년 전 정보가 수정 없이 누적되어 있어 그 근거 강도가 부족하다고 판단했기 때문이다.²³⁾ 이 두 항목을 사용 하지 않는 대신 염기변이에 대한 문헌을 찾아 적용 시킬 수 있는 근거항목을 판단해야 한다. 이는 시간이 많이 걸리는 과정이지만 이를 통해 데이터베이스가 수정되어 신뢰도가 증가 하면 추후 다시

적용 가능한 근거 항목이라 여겨진다.

다른 유전자/질환군 특이 가이드라인에서와 같이 RP 맞춤 지침에도 MAF 기준이 설정 되었다. 기존에는 인구집단에서 관찰되는 대립유전자 빈도가 충분히 작은지 큰지를 매 염기변이 분석 시 마다 고민하여 대립유전자 빈도 근거 항목 적용 여부를 정해야 했다. BA1부터 PM2까지 MAF 기준을 지정 하여 모든 염기변이에 대해 한 개의 대립유전자빈도 근거 항목이 할당 되게 되었다. 이로써 객관화 되었지만 근거 항목 적용에 유연성이 떨어졌다. 예를 들어, 한 염기변이에 대해 다수의 pathogenic 근거가 확인이 되어도 대립유전자빈도가 BS1_P에 해당 되면 원칙적으로 VUS로 분류 하게 한다.

환자 검체에서 VUS가 발견 될 경우 환자는 물론, 유전학을 전문으로 하지 않는 임상 의사도 어떻게 해석해야 할 지 어려움을 겪는다. 그래서 VUS로 염기변이가 분류된 경우 benign이나 pathogenic 변이로 재분류 하기 위한 노력이 요구된다. 유전자/질환군별 맞춤 기준들은 모든 염기변이에 적용 시킬 수 있게 형성된 2015 ACMG/AMP 가이드라인을 맞춤화 하여 VUS를 재분류 하고자 하는 노력의 일환이다. 이러한 노력에도 VUS 총 수에는 큰 감소가 없었는데, 앞서 언급한 대립유전자빈도 관련 증거 항목의 일률적 적용이 일부 원인으로 여겨 진다. VUS로 분류된 대부분의 염기변이는 PM2 혹은 PM2_P에 해당하여 정상인에서 굉장히 낮은 빈도로 관찰 된다. 사용되는 정상인 대립유전자빈도 정보가 정상인만 포함하지 않는다는 점과, 전체 유전체가 아닌 엑손 자료가 큰 부분을 차지한다는 점을 해석 시 고려 해야 할 것이다.

컴퓨터 예측 도구는 서로 유사한 원리로 작동 하지만, 여러 도구를 사용 할 경우 서로 상충 되는 예측 결과를 보일 때가 있다. 이럴 때 컴퓨터 예측 도구 근거항목을 어떻게 적용 할지, 적용 자체를 해서는 안 되는 것인지에 대한 혼란이 생긴다. RP 맞춤 지침에서는 2개의 예측 도구만 사용 할 수 있어 업무 부하가 감소 하고 앞서 언급한 혼란을 피할 수 있다. 그러나 REVEL과 MaxEntScan이 예측할 수 없는 위치는 해당 근거 항목 자체를 사용 할 수 없는 제한이 되었다. 기준이 되는 컴퓨터 예측 도구를 상정 하되 다른 도구의 사용 자체를 제한 하지 않는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

마지막으로 BA1 배제 필터 적용 시 MAF 기준에 따른 차이는 2015 ACMG/AMP 가이드라인 기준에 비해 강화된 0.005 기준을 적용하면 11.20% (262/2339)의 변이가 추가로 필터 아웃 되어 추가 분석이 필요한 변이가 그만큼 줄어 든다. 이때 배제된 염기변이 중 2015 ACMG/AMP 가이드라인 기준으로 VUS가 23 개 포함된다. 이 변이들이 강화한 BA1 MAF 기준에 따라 B 로 분류되어 추가 분석 없이 benign 으로 판단되어도 괜찮은 변이인지 아니면 실제로 VUS 로 분류하는 것이 옳은 지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

GnomAD 와 KRADB 가 2000 개 이상의 대립유전자 자료로 이루어져 있지만 SVI 가 일반적 권고 사항으로 제시한 대륙별 자료에는 해당 되지 않는다. 한국인 대립유전자 빈도를 적용 하였을 때 필터 아웃 된 3 변이와 그 환자들을 고찰한 결과 benign 으로 판단하기 어려웠다. 염기변이 분석에 한국인 대립유전자빈도를 활용하는 것은 도움이 되나 해석 알고리즘 자체 (필터 기준)에 포함시키는 것은 부적절 하다 생각된다. 한국인에서 높은 빈도로 관찰되는 변이의 창시자효과 여부는 추가적인 확인이 필요하며, 한국인 BA1 배제 목록 작성이 요구된다.

건강보험심사평가원이 희귀질환등록 자료를 분석한 한 연구에 따르면 한국인 망막색소변성 유병률은 1/9000 이고 40 대 이상에서는 1/6000 으로 밝혀 다른 인종에 비해 낮은 빈도로 발생한다.¹⁷⁾ 열성유전형 망막색소 변성의 원인 유전자 중 동아시아와 한국인에서 *EYS* 가 높은 기여도를 보인다 (40%).⁹⁾ 인종 별로 망막색소변성증 유발 원인 유전자 기여 정도와 원인 변이 기여 정도가 매우 상이하지만 동아시아 인구집단 대립유전자 빈도와 한국인 대립유전자빈도는 유사한 경향성을 보인다.

결론

유전질환에서 질환 특이적 염기변이 해석 가이드라인은 보다 객관적이고 정확한 염기변이 해석에 도움이 된다. 본 연구에서 개발한 RP 맞춤 염기변이 해석 지침은 기존 가이드라인과 높은 일치율을 보였다. 또한, 염기변이를 분석할 때 유병률 등 질환의 특성을 고려하여 설정한 MAF 기준을 적용하고 한국인 대립유전자 정보를 적용함으로써 분석 과정의 업무 부하를 감소시킬 수 있었다. 전문가군이 제안한 예측 프로그램의 활용으로 기존에 컴퓨터 예측 도구 활용 시 발생했던 상충되는 예측결과를 제거할 수 있었다. 유전질환의 NGS 분석에서는 인종 별 유전정보가 중요하고, 차등화된 근거를 적용하는 것이 정확하고 일관성 있는 염기변이 해석에 중요하므로, 질환 특이적 염기변이 해석 가이드라인의 개발이 필요하다.

참고문헌

1. Li Q, Wang K. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *Am J Hum Genet.* 2017;100(2):267-80.
2. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.
3. Rivera-Munoz EA, Milko LV, Harrison SM, Azzariti DR, Kurtz CL, Lee K, et al. ClinGen Variant Curation Expert Panel experiences and standardized processes for disease and gene-level specification of the ACMG/AMP guidelines for sequence variant interpretation. *Hum Mutat.* 2018;39(11):1614-22.
4. Harrison SM, Dolinsky JS, Knight Johnson AE, Pesaran T, Azzariti DR, Bale S, et al. Clinical laboratories collaborate to resolve differences in variant interpretations submitted to ClinVar. *Genet Med.* 2017;19(10):1096-104.
5. Harrison SM, Dolinsky JS, Chen W, Collins CD, Das S, Deignan JL, et al. Scaling resolution of variant classification differences in ClinVar between 41 clinical laboratories through an outlier approach. *Hum Mutat.* 2018;39(11):1641-9.
6. Kim YE, Ki CS, Jang MA. Challenges and Considerations in Sequence Variant Interpretation for Mendelian Disorders. *Ann Lab Med.* 2019;39(5):421-9.
7. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet.* 2006;368(9549):1795-809.
8. Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:40.
9. Kim MS, Joo K, Seong MW, Kim MJ, Park KH, Park SS, et al. Genetic Mutation Profiles in Korean Patients with Inherited Retinal Diseases. *J Korean Med Sci.* 2019;34(21):e161.
10. Yoon CK, Kim NK, Joung JG, Shin JY, Park JH, Eum HH, et al. The diagnostic application of targeted re-sequencing in Korean patients with retinitis pigmentosa. *BMC Genomics.* 2015;16:515.

11. Chang S, Vaccarella L, Olatunji S, Cebulla C, Christoforidis J. Diagnostic challenges in retinitis pigmentosa: genotypic multiplicity and phenotypic variability. *Curr Genomics*. 2011;12(4):267-75.
12. Oza AM, DiStefano MT, Hemphill SE, Cushman BJ, Grant AR, Siegert RK, et al. Expert specification of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for genetic hearing loss. *Hum Mutat*. 2018;39(11):1593-613.
13. Ghosh R, Harrison SM, Rehm HL, Plon SE, Biesecker LG. Updated recommendation for the benign stand-alone ACMG/AMP criterion. *Hum Mutat*. 2018;39(11):1525-30.
14. Tavtigian SV, Greenblatt MS, Harrison SM, Nussbaum RL, Prabhu SA, Boucher KM, et al. Modeling the ACMG/AMP variant classification guidelines as a Bayesian classification framework. *Genet Med*. 2018;20(9):1054-60.
15. Oishi M, Oishi A, Gotoh N, Ogino K, Higasa K, Iida K, et al. Comprehensive molecular diagnosis of a large cohort of Japanese retinitis pigmentosa and Usher syndrome patients by next-generation sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(11):7369-75.
16. Bravo-Gil N, Gonzalez-Del Pozo M, Martin-Sanchez M, Mendez-Vidal C, Rodriguez-de la Rúa E, Borrego S, et al. Unravelling the genetic basis of simplex Retinitis Pigmentosa cases. *Sci Rep*. 2017;7:41937.
17. Na KH, Kim HJ, Kim KH, Han S, Kim P, Hann HJ, et al. Prevalence, Age at Diagnosis, Mortality, and Cause of Death in Retinitis Pigmentosa in Korea-A Nationwide Population-based Study. *Am J Ophthalmol*. 2017;176:157-65.
18. Nangia V, Jonas JB, Khare A, Sinha A. Prevalence of retinitis pigmentosa in India: the Central India Eye and Medical Study. *Acta Ophthalmol*. 2012;90(8):e649-50.
19. Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Genes and Mutations Causing Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;5(10).
20. Abou Tayoun AN, Pesaran T, DiStefano MT, Oza A, Rehm HL, Biesecker LG, et al. Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP

- variant criterion. *Hum Mutat.* 2018;39(11):1517-24.
21. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet.* 2016;99(4):877-85.
 22. Shamsani J, Kazakoff SH, Armean IM, McLaren W, Parsons MT, Thompson BA, et al. A plugin for the Ensembl Variant Effect Predictor that uses MaxEntScan to predict variant spliceogenicity. *Bioinformatics.* 2019;35(13):2315-7.
 23. Biesecker LG, Harrison SM. The ACMG/AMP reputable source criteria for the interpretation of sequence variants. *Genet Med.* 2018;20(12):1687-8.
 24. Yang S, Lincoln SE, Kobayashi Y, Nykamp K, Nussbaum RL, Topper S. Sources of discordance among germ-line variant classifications in ClinVar. *Genet Med.* 2017;19(10):1118-26.

Web-based Databases

gnomAD

<https://gnomad.broadinstitute.org/>

Exome Aggregation Consortium

<http://exac.broadinstitute.org/> (no longer available)

5000Exomes

<https://ionreporter.thermofisher.com/ionreporter/>

1000 Genomes Project

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>

Korean reference genome database

<http://coda.nih.go.kr/coda/KRGDB/index.jsp>

ClinVar

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

OMIM

<http://www.omim.org>

Human Gene Mutation Database

<http://www.hgmd.org>

REVEL

http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP

MaxEntScan

http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP

Human Splicing Finder

<http://www.umd.be/HSF3/>

PhyloP

<http://compgen.cshl.edu/phast/>

Abstract

**Sequence variant interpretation
in next generation sequencing panel testing for retinitis pigmentosa**

Heerah Lee

Department of Laboratory Medicine, Graduate School,
University of Ulsan College of Medicine

Background: The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Association for Molecular Pathology (AMP) have issued standards and guidelines for deriving accurate and consistent interpretation of sequence variants. However, there is persistent discordance in the interpretations owing to differences in available data, in silico predictive programs, etc., in spite of universal implementation of the 2015 ACMG/AMP guidelines by most clinical molecular genetic labs. Clinical Genome Resource (ClinGen) convened Variant Curation Expert Panels (VCEPs) to institute guidelines on a specific gene or groups of genes. On the other hand, the Sequence Variant Interpretation (SVI) Working Group has provided general recommendations to refine the 2015 ACMG/AMP guidelines in order to improve consistency in clinical applications. In this study, retinitis pigmentosa (RP) specific sequence variants interpretation guidelines were developed, the efficacy of which was compared to the 2015 ACMG/AMP guidelines.

Methods: A pilot of 2339 variants were selected from the test results of the next generation sequencing (NGS) panel of 129 RP patients, who underwent the test between November 2018 and September 2019 at the Asan medical center, Seoul. The variants were initially classified according to the 2015 ACMG/AMP guidelines. The newly developed RP specific guidelines were derived from the general recommendations published by SVI and the gene/disease specific guidelines developed by the VCEPs. Minor allele frequency (MAF) cutoffs were established for

BA1, BS1, BS1_P, PM2_P, and PM2 based on the prevalence of RP, the penetrance, the related genes, and the causative variants. Of the 28 criteria of the original guidelines, 11 had strength level specifications. VCEPs recommend REVEL and MaxEntScan as the computational predictive tools to be employed. The newly developed RP specific guidelines were applied to reclassify the pilot variants and to compare with the original classification. In addition, Korean allele frequency filter was applied to identify changes in the interpretation process and the results.

Results: The specific MAF cutoffs applied for BA1, BS1, BS1_P, and PM2_P were 0.005, 0.003, 0.0006, and 0.00006 respectively. Of the 2339 variants, 89.65% clearly complied with the 2015 ACMG/AMP and RP specific guidelines and 4.57% differed in confidence levels. 0.86% (20/2339) showed medically significant discordance, of which 6 variants were reclassified from likely pathogenic (LP) to variants of uncertain significance (VUS) and 14 were reclassified conversely. Seventy eight out of 298 variants initially interpreted as VUS were reclassified as benign (B), likely benign (LB), or LP. By applying a more stringent BA1 MAF cutoff of 0.005, additional 11.20% (262/2339) variants were filtered out in the initial step of variant analysis. On filtering based on Korean allele frequencies, an additional 13.68% (320/2339) variants including 3 pathogenic (P)/LP variants were filtered as per the 2015 ACMG/AMP or the RP specific criteria.

Conclusions: In this study an RP specific sequence variant interpretation guideline was developed which demonstrated high concordance with 2015 ACMG/AMP guidelines. Applying RP specific MAF cutoffs based on disease characteristics such as prevalence and filtering based on Korean allele frequencies reduced manual work. Use of designated computational predictive tools eliminated the uncertainties caused by conflicting predictions from multiple tools. Disease/gene specific variant interpretation guidelines are thus required to perform reliable, accurate, and consistent analysis of vast amount of genomic data collected from NGS based panel tests.