

CYSTISK FIBROS – MEDICINSK TEXT SAMT ÖVERGRIPANDE BESKRIVNING AV METODEN – PM

Inledning

Cystisk fibros (CF) orsakas av nedsatt funktion i kloridkanalen CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), där defekt jontransport leder till bildandet av tjockt sekret i lungor, pankreas och andra exokrina vävnader. Diagnosen ställs utifrån kliniska och laboriemässiga konsensuskriterier, i första hand en kombination av typiska symptom från lungor och/eller pankreas samt ett patologiskt svett-test. Sjukdomen nedärvs autosomt recessivt, och ofta kan man vid molekyllärgenetisk analys identifiera två sjukdomsassocierade varianter i *CFTR*-genen. Utöver cystisk fibros kan bialleliska varianter i *CFTR* även orsaka andra diagnoser, s.k. CFTR-RD (CFTR-related diseases). CFTR-RD utgörs främst av manlig infertilitet beroende på kongenital bilateral avsaknad av vas deferens (CBAVD), disseminerade bronkiektasier, kronisk pankreatit eller kronisk rhinosinuit. Det finns över 2000 rapporterade varianter i *CFTR* som dokumenterats i "the Cystic Fibrosis Mutation Database", även kallad CFTR1 (<http://www.genet.sickkids.on.ca/>). Cirka 300 av dessa varianter har beskrivits tillräckligt ingående för att man ska kunna dra en slutsats avseende variantens kliniska betydelse. Denna subgrupp dokumenteras i databasen CFTR2, "Clinical and Functional TRanslation of CFTR" (<http://cftr2.org/>).

Teknikplattform

Med massivt parallell sekvensering (MPS, även kallat NGS) detekteras den absoluta majoriteten av sjukdomsassocierade varianter i *CFTR*, c:a 98% (Tayoun et al, Clin Chem 2013). Med undantag för CFTRdele2,3 detekterar metoden inte med säkerhet större deletioner inom *CFTR*-genen, som representerar någon procent av sjukdomsassocierade *CFTR*-alleler i den västeuropeiska befolkningen. Man kan därför i vissa fall behöva komplettera med annan teknik, t.ex. MLPA. En annan begränsning är homopolymer-regioner, inkluderande poly(T) området i intron 8 (5T, 7T, 9T). För att identifiera poly(T)-varianterna kompletteras MPS-undersökningen vid frågeställning om CFTR-RD eller efter påvisad R117H med ett s.k. Reflex-test (se i övrigt nedan). Reflex-testet är en enkel PCR-analys som utförs separat från MPS-undersökningen.

Sekvenseringsplattformen som används är Ion Torrent S5, och genpanelen är Ion AmpliSeq™ *CFTR* Panel, båda från Thermo Fisher Scientific. Basbestämning och sekvensinpassning utförs i mjukvaran Torrent Suite, med genomversion GRCh37/hg19 som referenssekvens. För variantbestämning användes mjukvaran Ion Reporter. Kända varianter som associerats till cystisk fibros enligt CFTR2 samt CF-teamet vid SUS har ett särskilt fokus under analysen och filtreras fram genom ett egenutvecklat rapporteringsverktyg. Mer ovanliga varianter som är trunkerande, icke-synonyma eller finns i intron splice-sites inkluderas också. Djupa intronvarianter, synonyma varianter och vanligt förekommande polymorfier (SNP:ar) exkluderas.

CYSTISK FIBROS - MEDICINSK TEXT SAMT ÖVERGRIPANDE BESKRIVNING AV METODEN - PMInstämpling

1. Vid klinisk frågeställning om **cystisk fibros** utförs primärt endast MPS-analys.
2. Vid **prenatal screening** p.g.a. hyperekogena tarmar/loopdilatation utförs endast MPS-analys. Maternell kontaminationsanalys med QF-PCR är tillsvidare ett nödvändigt komplement.
3. Vid klinisk frågeställning om **CFTR-RD** utförs MPS-analys samt Reflex-test.
4. Vid frågeställning om **bärarskap av familjär mutation** utförs i allmänhet endast MPS-analys. Ett undantag är om en större deletion/duplikation annan än CFTRdele2,3 finns i familjen (gäller även vid partneranalys om ingifte föreligger). Vid prenatal frågeställning (om bägge föräldrarna är heterozygota bärare) behöver också maternell kontaminationsanalys med QF-PCR utföras.

Tolkning

1. Vid klinisk frågeställning om **cystisk fibros (MPS-analys utförd)**:
 - a) Om två kända sjukdomsassocierade varianter i *CFTR*-genen påvisas (enligt databasen <http://cftr2.org/> eller tidigare påvisade lokala varianter vid CF-teamet i Lund) så är diagnosen CF i princip molekylärgenetiskt bekräftad. Man bör dock alltid rekommendera analys av föräldrarna för att säkerställa att varianterna befinner sig på olika alleler (i *trans*).
 - b) Om ingen eller endast en känd sjukdomsassocierad variant påvisas, så utvärderas eventuella övriga varianter vidare. Fynd som bedöms som möjligt sjukdomsassocierade rapporteras av sjukhusgenetiker och bedöms tillsammans med läkare innan ev utsvarning. Som grund används här ACMGs kriterier för variantklassning.
 - c) Om endast 0-1 sjukdomsassocierade varianter påvisats även efter sökning enligt 1b) ovan kan man överväga om det är relevant att skicka DNA till externt laboratorium för analys avseende större deletioner/duplikationer (t.ex. med MLPA). Detta bör ske först efter diskussion med inremitterande om säkerheten i den kliniska diagnosen. Om man hittat en CF-associerad variant vid MPS-analysen så är det vid kliniskt säkerställd CF c:a 1-2% sannolikhet att en större deletion kan föreligga på den andra allelen. Om man inte hittat någon mutation vid MPS så är det i den europeiska befolkningen ytterst osannolikt (c:a 1/2000) att man skulle identifiera två sådana deletioner. Sannolikheten kan vara högre i befolkningsgrupper med ingifte eller foundermutationer.
 - d) Om mutationen R117H påvisas skall Reflex-test utföras. För tolkning avseende R117H och Reflex-test, se nedan.
2. Vid **prenatal screening** p.g.a. hyperekogena tarmar/loopdilatation (**MPS-analys utförd**):
 - a) Om två kända sjukdomsassocierade varianter i *CFTR*-genen (enligt databasen <http://cftr2.org/> eller tidigare påvisade lokala varianter vid CF-teamet i Lund) så är diagnosen CF i princip molekylärgenetiskt bekräftad. Man bör dock alltid rekommendera analys av föräldrarna för att säkerställa att varianterna befinner sig på olika alleler (i *trans*).
 - b) Om ingen eller endast en mutation påvisas så avslutas analysen, och diagnosmisstanken kan således inte bekräftas. Observera att vi vid denna indikation inte går vidare med sökning utanför kända sjukdomsassocierade mutationer.

CYSTISK FIBROS - MEDICINSK TEXT SAMT ÖVERGRIPANDE BESKRIVNING AV METODEN - PM3. Vid klinisk frågeställning om **CFTR-RD (MPS samt Reflex-test utförda)**:

- a) Om två kända sjukdomsassocierade varianter i *CFTR*-genen påvisas (enligt databasen <http://cftr2.org/> eller tidigare påvisade lokala varianter vid CF-teamet i Lund) så är diagnosen cystisk fibros (*sic!*) i princip molekylärgenetiskt bekräftad, se även punkt 1a). Observera att det bör föranleda rekommendation om klinisk utredning vid CF-center, om så inte redan har skett.
- b) Om en känd sjukdomsassocierad variant samt varianten 5T påvisas så är diagnosen CFTR-RD i princip molekylärgenetiskt bekräftad. Man bör dock alltid rekommendera analys av föräldrarna för att säkerställa att varianterna befinner sig på olika alleler (i *trans*). Man kan i detta fall överväga att även gå vidare och analysera antalet närliggande TG-repeats, 11TG/12TG/13TG, för tolkning se nedan. Notera dock att vi för närvarande inte själva har en analys uppsatt som med säkerhet kan detektera antalet TG-repeats.
- c) Om ingen eller endast en sjukdomsassocierad variant eller endast 5T påvisas sker utvidgad analys enligt punkt 1b) och ev. 1c) ovan.
- d) För tolkning avseende R117H och Reflex-test, se nedan.

Komplexa alleler - om R117H och Reflex-testet

Vissa varianter i *CFTR*, t.ex. R117H, har varierande klinisk betydelse. Effekten beror till viss del på andra vanligt förekommande varianter (polymorfier) på samma allel, d.v.s. i *cis*. Den s.k. "poly-T tract" i intron 8, IVS8 5T/7T/9T, påverkar effektiviteten av splicing till exon 9 på så sätt att splicing-effektiviteten är sämre ju färre thymidiner som finns. Det innebär att 5T har lägst effektivitet, och därför påverkar proteinuttrycket mest. Splicing till exon 9 modifieras ytterligare av den närliggande TG-repetitionen, 11TG/12TG/13TG och i sällsynta fall 15TG. Här är förhållandet det omvända: 15TG har den största negativa effekten på splicing till exon 9. Sammanfattningsvis påverkar således 5T och en längre TG-repetition splicing mest.

Påvisande av endast 5T i *trans* med en känd sjukdomsassocierad variant har i första hand beskrivits vara kopplat till CBAVD och andra CFTR-RD. Däremot kan förekomst av 5T i *cis* med en variant av intermediär effekt som R117H ibland kopplas till klinisk CF. Dessa resonemang kan sammanfattas i följande tabeller:

Tolkning av Reflex-test utan annan påvisad variant i *cis*

Allel 1	Allel 2	Förväntad symptomatologi
Sjukdomsassocierad mutation, t.ex. F508del	5T och 11TG	Denna kombination är sannolikt <u>inte</u> associerad med cystisk fibros – de flesta individer har inte kliniska symptom på CF. Män har en ökad risk för CBAVD, men kombinationen har också identifierats hos många fertila män (reducerad penetrans).
Sjukdomsassocierad mutation, t.ex. F508del	5T och 12TG/13TG/15TG	Denna kombination <u>kan</u> vara CF-associerad, med patologiskt svett-test och kliniska symptom på CF. Symptomen kan variera eller vara mildare än vid förekomst av bialleliska sjukdomsassocierade mutationer. Det föreligger en klart ökad risk för manlig infertilitet (CBAVD) och annan CFTR-RD.

CYSTISK FIBROS - MEDICINSK TEXT SAMT ÖVERGRIPANDE BESKRIVNING AV METODEN - PMTolkning av R117H och Reflex-test i *cis*

Allel 1	Allel 2	Förväntad symptomatologi
Sjukdomsassocierad mutation, t.ex. F508del	R117H och 5T	R117H agerar sannolikt som en CF-associerad mutation. De flesta patienter med denna kombination har patologiskt svett-test och kliniska symptom på CF. Symptomen kan dock vara mildare/variabla.
Sjukdomsassocierad mutation, t.ex. F508del	R117H och 7T	R117H agerar sannolikt <u>inte</u> som en CF-associerad mutation, men kan resultera i manlig infertilitet (CBAVD) och annan CFTR-RD.
Sjukdomsassocierad mutation, t.ex. F508del	R117H och 9T	Det är <u>ytterst osannolikt</u> att R117H agerar som en sjukdomsassocierad mutation. Den absoluta majoriteten av individer med denna kombination har inte CF. För det allra mesta ses inte heller någon påverkan på manlig fertilitet.

Referenser

1. CFTR2 database, Clinical and Functional Translation of CFTR. <http://cftr2.org/>
2. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations. Dequeker E, et al. Eur J Hum Genet. 2009 Jan;17(1):51-65.
3. The improvement of the best practice guidelines for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis: toward an international consensus. Girardet A, et al. Eur J Hum Genet. 2016 Apr;24(4):469-78.
4. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. Bombieri C, et al. J Cyst Fibros. 2011 Jun;10 Suppl 2:S86-102.
5. The very low penetrance of cystic fibrosis for the R117H mutation: a reappraisal for genetic counselling and newborn screening. Thauvin-Robinet C, et al. J Med Genet. 2009 Nov;46(11):752-8.
6. A comprehensive assay for CFTR mutational analysis using next-generation sequencing. Abou Tayoun AN, et al. Clin Chem. 2013 Oct;59(10):1481-8.