

## GENOMISK UTREDNING AV OVANLIGA SJUKDOMAR OCH SYNDROM MED METODERNA ARRAY OCH EXOMSEKVENSERING (POSTNATALT) – PM

Inför en genomisk utredning krävs tydlig och utförlig beskrivning av aktuell symptomatologi.

! Fyll därför i samtliga delar av de särskilt framtagna remisserna för patient respektive anhöriga.

**Signerat samtyckesformulär rekommenderas**, där patient eller vårdnadshavare tar ställning till delning av oidentifierad information och till vidare klinisk forskning, se ”Information och samtyckesformulär inför genomisk utredning av ovanliga sjukdomar och syndrom med array och exomanalys”. Samtyckesformuläret finns även på sida 3 i remissen ”Genomisk utredning med array och exomsekvensering (skrivbar PDF)”, se länk nedan.

**Utredningen påbörjas först när adekvat ifylld remiss samt patient och föräldraprov inkommit.**

Särskilda omständigheter beaktas.

**Remisser för patient och föräldrar samt information och samtyckesformulär finns tillgängliga här:**

<http://vardgivare.skane.se/vardriktlinjer/laboratoriemedicin/>, under ”Remisser och blanketter”:

- Genomisk utredning med array och exomsekvensering (skrivbar PDF)
- Genomisk utredning med array och exomsekvensering, anhörig (skrivbar PDF)
- Information och samtyckesformulär för genomisk utredning av ovanliga sjukdomar och syndrom med array och exomanalys (Under rubriken ”Patientinformation”)

**Provtagningsanvisningar** finns tillgängliga på ”Analysportalen”:

[www.analysportalen-labmedicin.skane.se](http://www.analysportalen-labmedicin.skane.se). Under ”Genomisk array och exomsekvensering”.

### Bakgrund

Tidigare genetisk diagnostik var begränsad då vanligen endast en gen i taget kunde undersökas. Därför tog det ofta lång tid, eller var inte möjligt, att identifiera orsaken till genetiskt heterogena sjukdomar och syndrom. Genetiskt klarlagd diagnos utgör en viktig del för ett adekvat omhändertagande inom sjukvård och rehabilitering av patienter med ofta svåra sjukdomar. En diagnos ger också familjen möjlighet till genetisk vägledning, beräkning av återupprepningsrisk och till att söka kunskap och stöd genom öppet tillgängliga informationskällor och anhöriggrupper såsom: [socialstyrelsen.se/ovanligadiagnoser](http://socialstyrelsen.se/ovanligadiagnoser) och [rarechromo.org](http://rarechromo.org) (Unique).

Genomisk array och exomsekvensering är breda genetiska analyser, som kompletterar varandra<sup>1</sup> och som i många fall kan förklara orsaken till ovanliga sjukdomar och syndrom. Med dessa metoder är det möjligt att undersöka, i stort sett, samtliga gener parallellt. Genomisk array detekterar kromosomförändringar som förluster (deletioner) eller tillskott av genetiskt material (duplikationer), gemensamt kallade kopietalsförändringar (*eng.* copy number variations), vilka har kopplats till ett stort antal ovanliga sjukdomar och välbeskrivna syndrom. Genomisk arrayanalys i trio (d.v.s. föräldrar

och patient tillsammans) rekommenderas som förstahandsanalys vid utvecklingsförsening av oklar anledning, medfödda missbildningar och autismspektrumtillstånd<sup>2-4</sup>, såvida inte en stark misstanke finns om ett specifikt underliggande genetiskt tillstånd. Trioanalys säkerställer även att uniparentell disomi (UPD) alltid upptäcks. UPD innebär att en person fått två kopior av en kromosom från en förälder och ingen från den andra föräldern. Vid negativt arrayfynd rekommenderas sekvensering av proteinkodande gener (exom, trio) för identifiering av förändringar på sekvensnivå, vilka ej kan ses med arrayanalys. På remiss anges önskemål om fortsatt analys med exomsekvensering vid negativ genomisk array.

### Kostnad

Klinisk genetik's priser för genomisk array och exomsekvensering anges här:

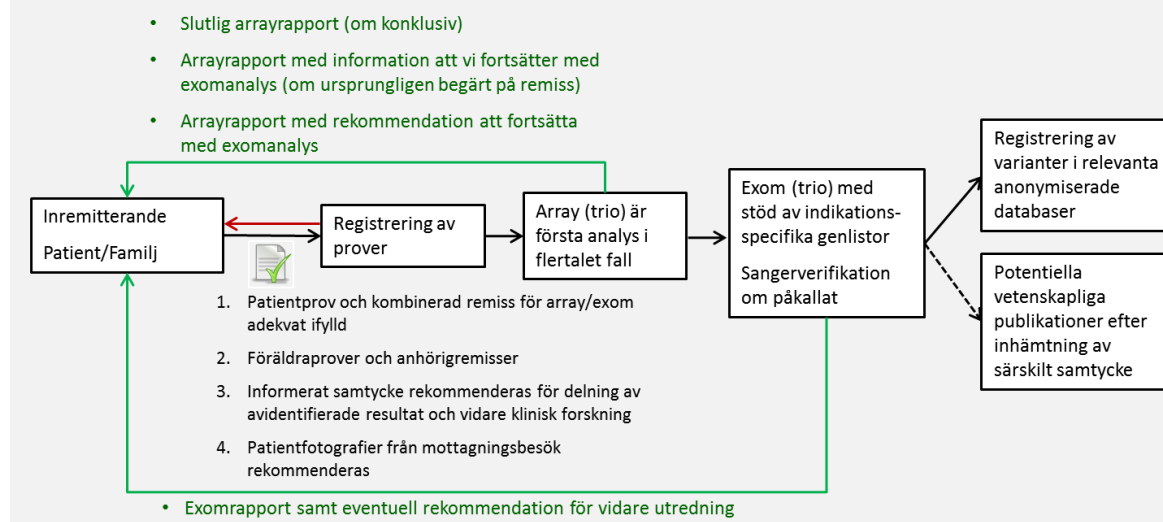
<http://vardgivare.skane.se/patientadministration/avgifter-och-prislistor/prislistor/>

Välj Laboratoriemedicin och klicka på Klinisk genetik. Biobanking av DNA för ev. vidare utredning ingår utan extra kostnad.

### Svarstider

Svar ges normalt inom sex veckor för genomisk array och inom fyra månader för exomsekvensering då föräldraprov och korrekt underlag bifogas (uttömmande information på remisser för patient och anhöriga). I annat fall kan analysen fördröjas avsevärt. Analyser kan prioriteras vid behov.

## Arbetsflöde vid genomisk utredning av ovanliga sjukdomar och syndrom med array och exomanalys



### Anamnes inför genomisk array och exomsekvensering

I vår bedömning av funna varianter utgår vi från den kliniska information som angivits på remiss. Fyll utförligt i de för ändamålet framtagna remisserna. En separat remiss till syndromrond vid Centrum för Sällsynta Diagnoser (sodrasjukvardsregionen.se/csd/) kan vara av hjälp om det behövs stöd i bedömning av kliniska symptom. Ange även om någon av föräldrarna (eller andra släktingar) har symptom eller utseendemässiga avvikelser som kan vara kopplade till barnets symptom

(släktanamnes). Tolkningen av resultaten från de genetiska undersökningarna underlättas avsevärt om vi kan jämföra med bägge föräldrarna och vid behov med syskon eller andra nära släktingar. Orsaken till att vi måste undersöka föräldrar och i vissa fall syskon är att alla bär på flera vanligen helt ofarliga genetiska förändringar (polymorfismer), vilka oftast är specifika för den enskilda familjen. Genom att jämföra barnets analysresultat med föräldrarnas har vi möjlighet att snabbare och säkrare fastställa om ett detekterat genetiskt fynd är den verkliga orsaken till den aktuella sjukdomen/tillståndet.

### Rapportering och uppföljning

Vid alla breda kliniska analyser, inklusive genomisk array och exomsekvensering men även vid t.ex. bilddiagnostik såsom röntgen, finns det en viss sannolikhet för sekundära fynd, vilka inte klart kan kopplas till den aktuella frågeställningen, men som kan vara av medicinsk betydelse. Vid trio exomanalys gör våra bioinformatiska verktyg att denna sannolikhet är relativt liten. Sekundära fynd kan dock komma att rapporteras såtillvida de är kliniskt behandlingsbara eller har annan signifikant klinisk betydelse för patienten eller övriga undersökta familjemedlemmar. Vid exomsekvensering av enskilda exom, utan föräldraprover, utgår vi ifrån de av inremitterande (på remiss) valda indikationsspecifika genlistor, vilka begränsar rapporterade varianter till säkra eller sannolikt sjukdomsorsakande varianter inom valda indikationer, t.ex. muskuloskeletal sjukdom.

Vid genomisk array och exomsekvensering rapporteras rutinmässigt endast klart patogena varianter (klass 5) och sannolikt patogena varianter (klass 4). Oklara varianter (klass 3) kan komma att rapporteras om det bedöms finnas möjlighet till klinisk uppföljning.

Om analysen visar ett avvikande fynd erbjuds vanligen genetisk vägledning för information om resultatet. Om de genetiska analyserna visar på en förändring som är svårtolkad kan det krävas fler analyser för att klargöra om det finns ett samband med sjukdomen. I så fall kan vi behöva nya prover från olika familjemedlemmar.

Kunskapen ökar hela tiden kring hur gener och de proteiner de kodar för samverkar. Många av våra geners funktion är i dagsläget inte kartlagd, varför framtida kunskap kan komma att leda till att resultat omtolkas. Exomanalys kan inte utesluta risk för andra genetiskt betingade sjukdomar eftersom vi i vårt arbete bara letar efter förklaringen till den aktuella sjukdomen/tillståndet. Om det i senare skede skulle uppkomma misstanke om en annan genetisk sjukdom måste sekvenseringsresultaten reanalyseras.

## Fördjupad information om genomisk arrayanalys

Plattformen som används vid genomisk array är Affymetrix CytoScan HD. Metoden detekterar den absoluta majoriteten av de beskrivna mikrodeletions- och duplikationssyndromen. Vid analysen undersöks hela genomet med hjälp av 2,67 miljoner markörer fördelade över samtliga kromosomer för att se tillskott (duplikationer) eller förlust (deletioner) av kromosomsegment. Omkring 750 000 av dessa markörer är polymorfa, så kallade SNP-markörer. Vid trio-analys, dvs. när föräldraprover analyseras med genomisk array tillsammans med patientprovet, säkerställs att ingen provförväxling skett. Uniparentell disomi (UPD) upptäcks alltid med hjälp av dessa SNP-markörer. Vid trio-analys ges också besked om en upptäckt UPD är av maternellt eller paternellt ursprung, vilket är diagnostiskt för t.ex. Prader-Willis syndrom (maternell UPD 15) och Angelmans syndrom (paternell UPD 15). Om föräldrar är besläktade är bitar av deras arvs massa identiska. Detta resulterar i att barnet har en, i förhållande till släktskapet, proportionerligt ökad risk för genomslag av homozygota recessiva sjukdomsanlag som föräldrarna är bärare av. De delar av arvs massan som nedärvs i identisk form från föräldrar är detekterbara med SNP array (s.k. ROHs, regions of homozygosity) och kan användas som underlag för att söka efter recessiva sjukdomsanlag vid exomsekvensering eller vid *in silico*-bearbetning. När släktskap (konsanguinitet) ses med array rekommenderar vi numera vidare utredning med exomsekvensering, vilken visats vara en effektiv analys för detektion av nedärvda homozygota recessiva sjukdomar.

Eftersom alla, dvs. även friska personer, bär på kopieantalsförändringar (copy number variations, CNVs) utvärderas varje enskild variant i ljuset av fyndet hos föräldrarna och mot databaser med kända CNVs. Det är således av stor vikt att alltid skicka med blodprov från föräldrarna och informera dem om att det, trots detta förfarande, kan uppstå situationer där det i dagsläget inte går att avgöra om en kopietalsförändring är sjukdomsorsakande.

**Begränsningar för genomisk arrayanalys:** Ger ej information om punktmutationer, låggradig mosaicism (<10-20%) mindre deletioner/duplikationer (avhängigt på probtätheten inom respektive område), balanserade translokationer, Fragilt X eller andra sjukdomar orsakade av s.k. trinukleotidexpansioner.

## Fördjupad information om exomsekvensering

Sekvensanalys av proteinkodande gener (exomsekvensering) utförs för att hitta varianter på sekvensnivå. Till skillnad från analys av enskilda gener, eller predefinierade paneler av gener, siktar exomsekvensering mot att täcka alla våra omkring 21000 proteinkodande gener. Varje gen består vanligen av både kodande sekvens (exon) och icke kodande sekvens mellan exon (intron). Termen **exom** omfattar alla exon och den aktuella analysen täcker >99,7% av "Consensus Coding Sequences (CCDS) annotation" ([www.ensembl.org/info/genome/genebuild/ccds.html](http://www.ensembl.org/info/genome/genebuild/ccds.html)) och minst fem baspar läses på vardera sidan om respektive exon för att möjliggöra upptäckt av s.k. splicingmutationer.

För ett flertal patientgrupper kan symptombilden inte tydligt peka mot att en särskild gen har en sjukdomsorsakande förändring (variant), vilket försvårar diagnostiken för dessa grupper.

Exomsekvenser, efter en initial genomisk arrayanalys, rekommenderas för heterogena sjukdomar där vanliga indikationer inkluderar autism, utvecklingsstörning, epilepsi, medfödda missbildningar och neurologiska tillstånd. Exomsekvenser ger i dagsläget inte någon kvalitetssäkrad information om kopietalsförändringar, vilket är grunden för rekommendationen att en genomisk array (trio) ska ha utförts initialt vid flertalet pediatrika frågeställningar (klinisk förklaringsgrad på omkring 15-20%).

Riktade analyser av enskild gen bör övervägas om det finns en stark misstanke om ett specifikt underliggande genetiskt tillstånd, dock leder traditionell sekvensanalys, utredning av en gen i taget, ofta till en långdragen diagnostik. Exomsekvenser har en stor fördel på grund av att ett brett spektrum av mutationer kan upptäckas i en och samma analys och har visats vara ett kostnadseffektivt diagnostiskt test med en hög klinisk förklaringsgrad (överlag omkring 15-35% utöver vad som ses med array)<sup>1,5</sup>.

#### **En exomsekvenser utförs i två huvudsteg vilka utgörs av:**

##### **1. Läsning av proteinkodande gener**

- DNA-extraktion från blodprov (se provtagningsanvisningar nedan)
- Sekvensbibliotek skapas med SureSelect Clinical Research Exome V2 (CREV2, Agilent)
- Exomsekvenser med NextSeq 500 (Illumina)

##### **2. Dataanalys, tolkning och rapportering**

- Sekvensinpassning och variantbestämning utförs enligt GATK "Best Practices for Germline SNP & Indel Discovery in Whole Genome and Exome Sequence" (Broad Institute) med genomversion GRCh37/hg19 som referenssekvens.
- Filtrering och ranking av varianter (mot t.ex. vanligt förekommande varianter, genlistor och nedärvningsmönster) görs i Scout (framtaget vid SciLifeLab, [www.scilifelab.se](http://www.scilifelab.se)).
- Manuell bedömning av enskilda kandidatvarianter (mot t.ex. Alamut Visual/HGMD)
- Rapportering utförs av erfaren expertis vid Klinisk Genetik & Patologi i Lund

#### **Läsning av proteinkodande gener - exomsekvenser (steg 1)**

För sekvensering behövs blodprov (DNA) från patienten och i flertalet fall även från föräldrar för att kunna fastställa nedärvningsmönster (trioanalys). DNA isoleras ur blodprov (EDTA-rör, se ovan för länk till provtagningsanvisningar), men ibland kan man i stället använda prover från hud eller material som tagits bort vid en operation. DNA kommer sedan att undersökas med hjälp av exomsekvenser, varefter analysresultaten bearbetas och tolkas. Kvalitetsriktvärden omfattar bland annat 100 gångers medeltäckning och att >90% av målsekvenserna är lästa minst 20 gånger.

#### **Dataanalys, tolkning och rapportering (steg 2)**

**För enskilda exom**, vilka ej analyseras i trio med föräldraprover, selekteras bioinformatiskt endast gener vilka ingår i de indikationsspecifika genlistor som markerats på remiss. Säkert och sannolikt sjukdomsorsakande varianter inom valda listor rapporteras till inremitterande. Genlistorna utvecklas löpande allteftersom ny kunskap framkommer kring sjukdomsorsakande genförändringar inom

respektive indikationsområde. Aktuella genlistor och analysens täckning av respektive gen finns att tillgå vid förfrågan.

**För trio exom**, då patientprov analyseras tillsammans med föräldraprov, söks alla proteinkodande gener igenom, s.k. öppet exom, avseende *de novo* mutationer, homozygota varianter vilka nedärvs recessivt, sammansatt heterozygota varianter och X-bundna varianter. De indikationsspecifika genlistorna tjäna i detta syfte en vägledande roll vid analysen.

Om analysen av enskilda exom eller exom i trio visar på en förändring som sannolikt eller säkert kan förklara patientens symptom kommer vi normalt bekräfta fynd med traditionell Sangersekvensering.

**Begränsningar för exomsekvensering:** Ej lämpligt för analys av kopietalförändringar (deletioner och duplikationer) på grund av ojämnt utspridda målsekvenser (exon) och på grund av brister i de verktyg som finns att tillgå för den typen av analys. Exomsekvensering och genomisk arrayanalys kompletterar varandra och är internationellt rekommenderade som standardanalyser vid pediatrika utredningar vid bl.a. autism, missbildning och utvecklingsstörning. Initialt bör således en arrayanalys (trio) utföras, vilken sedan kan följas av en exomsekvensering (trio). De två analystyperna har visats ge i stort sett icke överlappande fynd, t.ex. vid autismspektrumtillstånd<sup>1</sup>. Exomsekvensering ger vidare ej information om icke kodande sekvens, såsom intron, och täcker ej alla proteinkodande gener fullständigt. Exomsekvensering kan ej heller detektera längre repetitiva sekvenser och därmed inte Fragilt X eller andra sjukdomar orsakade av s.k. trinukleotidexpansioner (på grund av begränsad längd på de fragment som sekvenseras).

## Referenser

1. Tammimies K. *et al.*, Molecular Diagnostic Yield of Chromosomal Microarray Analysis and Whole-Exome Sequencing in Children With Autism Spectrum Disorder. *Jama*, 2015. PMID: 26325558
2. Gijbbers AC *et al.*, A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *Eur J Hum Genet*, 2009. PMID: 19436329
3. Miller DT *et al.*, Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010. PMID:20466091
4. Kearney HM *et al.*, American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*, 2011. PMID:21681106
5. Fitzgerald TW *et al.*, Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature*, 2015. PMID: 25533962

## Kontakta oss om du har vidare frågor:

Klinisk genetik i Lund tel. 046-17 63 73.

Postadress: Lund sjukhusområde, Klinisk Genetik & Patologi, 221 85 Lund