

Diagnostika cystickej fibrózy so zameraním na molekulárnogenetickú analýzu CFTR génu

Mária Giertlová, Adriana Šprincová

Lekárska genetika, Medirex, a. s., Košice

Cystická fibróza (CF) je ako jedno z najčastejších závažných geneticky podmienených ochorení odôvodnene objektom výskumu s neustálym rozvojom diagnostiky a liečby. Najvýznamnejším pokrokom v starostlivosti o CF pacientov za posledných desať rokov je včasné zachytenie ochorenia už v novorodeneckom veku vďaka plošnému zavedeniu novorodeneckého skríningu. Genetická diagnostika umožnila navyše rozvoj špecifickej terapie viazanej na konkrétne mutácie.

Kľúčové slová: CFTR, cystická fibróza, molekulárna diagnostika, novorodenecký skríning, IRT, imunoreaktívny trypsinogén

Trends in cystic fibrosis diagnostic with focus on the molecular analysis of CFTR gene

Cystic fibrosis (CF), one of the most frequent genetic diseases, is rationally the subject of research resulting in permanent improvement in diagnostic and therapy. In the last decade, the most important improvement in clinical management of CF patients has been the early diagnosis in newborns by extensive newborn screening in many countries. In addition, routine genetic diagnostics allows development and implementation of mutation-specific therapy.

Keywords: CFTR, cystic fibrosis, molecular diagnostics, newborn screening, IRT, immunoreactive trypsinogen.

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 98 – 101

Prvé historické zmienky o tomto ochorení siahajú do stredoveku, keď sa slaný pot u detí spájal s poruchami pankreasu a rizikom včasného úmrtia a tieto deti boli považované za obeť bosoráctva. Exaktný medicínsky pohľad na cystickú fibrózu medzi prvými priniesla americká patologička a pediatrička Dorothy Andersenová v roku 1938, keď opísala toto ochorenie v pitevnom náleze ako „cystickú fibrózu pankreasu“. Pre diagnostiku CF bol dôležitý objav zvýšenej koncentrácie chloridov v pote Paulom di Sant' Agnesom, ktorý sa stal základom dodnes používaného potného testu zavedeného v roku 1953.

O desať rokov sa Dr. Andersenová podieľala aj na vývoji potného testu, ktorý má odvtedy nezastupiteľné miesto v diagnostike CF. Ďalšími významnými míľnikmi bola identifikácia poruchy chloridového kanála ako základného patofyziologického mechanizmu (1983) a následne objav CFTR génu (1989). Odvtedy sa diagnostika a klinický manažment CF rozvíja míľovými krokmi, čo sa odrazilo na výraznom zlepšení kvality a predĺžení života. Medián veku vo vyspelých krajinách aktuálne dosahuje 37 rokov⁽¹⁾.

Novorodenecký skríning CF na Slovensku

Skríning cystickej fibrózy sa na Slovensku zaviedol od 1. 9. 2009. Princípom metódy je stanovenie imunoreaktívneho trypsinogénu (IRT) v suchej kvapke krvi podľa algoritmu IRT/IRT, teda dvojstupňového stanovovania hladiny IRT. Trypsinogén je pankreatický proteín – neaktívny prekurzor trypsinu, ktorý sa v dôsledku obštrukcie pankreatických kanálikov pri CF dostáva do krvného obehu. Hraničný limit (cut-off) pre prvý odber (IRT/1) vo vzorke odobratej v 72. – 96. hodine života je 70 ng/ml (99. percentil) a pre druhý odber (IRT/2) medzi 14. – 21. dňom života hodnota 60 ng/ml. Pri celoplošnom novorodeneckom skríningu CF musí byť zohľadňovaný aj

etnický pôvod dieťaťa. Skúsenosti z národného referenčného skríningového centra preukázali, že novorodenci rómskeho etnika majú často falošne pozitívne výsledky skríningu a signifikantne vyššie hladiny IRT (až o 34 %) v porovnaní s majoritnou populáciou. Pre rómske etnikum sa preto zvýšila hraničná hodnota IRT/1 na 84 ng/ml a IRT/2 na 72 ng/ml⁽⁴⁾. Podobná situácia je dokumentovaná v USA u detí afro-američanov.

Celosvetovo sa pri skríningu cystickej fibrózy uvádza falošná negativita 5 až 9 %^(2,3), preto pri zodpovedajúcom klinickým náleze je potrebné zvážiť možnosť CF aj u detí, ktoré absolvovali novorodenecký skríning s negatívnym výsledkom. Nešpecifické zvýšenie hladiny IRT je opísané u novorodencov s perinatálnou asfyxiou a môže viesť k falošnej pozitivite.

Vďaka novorodeneckému skríningu sa priemerný vek pri diagnostike ochorenia znížil na 6 až 8 týždňov oproti 14 mesiacom pred zavedením skríningu⁽³⁾. Identifikácia pacientov s CF novorodeneckým skríningom a skorá liečba vedú k významne lepšej prognóze.

Klinické prejavy cystickej fibrózy

CF je multiorgánové ochorenie, príznaky ochorenia môžu byť u každého pacienta vyjadrené v rôznej intenzite a postihovať rozličné orgány. V novorodeneckom veku je asi u 1/5 detí s CF prítomný tzv. mekóniový ileus. Typické sinopulmonálne príznaky sú chronická rinosínusitída, nosná polypóza, atelektázy, bronchiektázie, paličkovité prsty, perzistujúce infekcie patogénmi typickými pre CF a pľúcne mykobakterioly, pneumotorax, hemoptýza a alergická bronchopulmonálna aspergilóza. Z prejavov mimo respiračného traktu potom dominujú poruchy tráviaceho traktu: mekóniový ileus, insuficiencia exokrinného pankreasu a recidivujúce pankreatitídy, diabetes mellitus, gastroezofágový reflux, syndróm obštrukcie distálneho čreva, biliárna cirhóza až cirhóza pečene,

cholelitiáza, malnutrícia, metabolická kostná choroba a deficit vitamínov rozpustných v tukoch (A, D, E, K). Abnormality v mineralograme a acidobázickej rovnováhe sú dôležitými príznakmi CF. Pri akútnej hyponatriemickej dehydratácii dochádza k anorexii, vracaniu, hmotnostnému úbytku s rizikom rozvoja poruchy vedomia a kŕčov. Chronická metabolická alkalóza s hypokaliémiou bola opísaná u dospelého pacienta ako prvý príznak cystickej fibrózy⁽⁵⁾.

Diagnostika CF

Pri klinickej suspekcii alebo pozitívnom/hraničom výsledku novorodeneckého skríningu je indikovaný potný test. Tento test je založený na stanovení koncentrácie chloridov v pote pilokarpínovou ionoforézou a má senzitivitu asi 95 %. Hodnoty nad 60 mmol/l sú diagnostické pre CF, hodnoty 30 – 59 mmol/l sú označované ako hraničné a diagnóza CF je možná, pri hodnotách pod 30 mmol/l je CF nepravdepodobná. Test a jeho laboratórne vyhodnotenie musia prebiehať podľa stanovených minimálnych štandardov⁽¹⁾. Následne je indikované molekulárno-genetické vyšetrenie *CFTR* génu, štandardne sa v prvom kroku vyšetruje panel mutácií najčastejších v danej populácii (**tabuľka 1**).

Ochorenia príbuzné *CFTR*

Klinické jednotky s dysfunkciou *CFTR*, ktoré nespĺňajú klinické kritériá pre cystickú fibrózu, sú súhrnne označované ako poruchy príbuzné *CFTR* (*CFTR*-related disorders, *CFTR*-Rds)⁽⁶⁾. Podľa aktuálne platných odporúčaní Nadácie pre cystickú fibrózu (Cystic Fibrosis Foundation) z roku 2017 sú definované tri poruchy príbuzné *CFTR*: rekurentná pankreatitída, kongenitálna bilaterálna agenéza vas deferens (CBAVD) a chronické získané bronchiektázie⁽⁷⁾.

Pre prípady pozitívneho novorodeneckého skríningu a intermediárnych hodnôt potného testu sa v USA používa pojem metabolický syndróm príbuzný *CFTR* (CF transmembrane conductance regulator-related metabolic syndrome, CRMS), ktorý sa prekrýva s jednotkou pozitívny skrínung CF, nejednoznačná diagnóza (CF screen positive, inconclusive diagnosis, CFSPID), používanou v ostatných krajinách. U väčšiny detí s poruchami príbuznými *CFTR* sa v prvých rokoch života nerozvinie obraz cystickej fibrózy. V malej časti sa však rozvíja CF a zatiaľ nie sú dostupné údaje o dlhodobej prognóze týchto pacientov^(8,9).

CFTR-Rds a CRMS/CFSPID nahrádzajú nejasné označenia atypická, neklasická alebo neskorá CF používané v minulosti.

Gén *CFTR*

Gén zodpovedný za CF je označovaný ako *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Je lokalizovaný na 7q31.2, dlhý 250 kb, zložený z 27 exónov dlhých 38 bp až 724 bp⁽¹⁰⁾. Gén kóduje mRNA dlhú 6,5 kb, ktorá je prepisovaná do polypeptidu zloženého z 1 480 aminokyselín.

Proteín *CFTR*, štruktúra a funkcia

Za fyziologických okolností je *CFTR* transmembránový proteín fungujúci ako chloridový kanál s regulačnou funkciou pre niektoré ďalšie iónové kanály. Je zložený z piatich funkčných domén, a to z dvoch transmembránových domén TMD1 a TMD2, dvoch domén NBD1 a NBD2 viažucich ATP a jednej veľkej regulačnej domény R, ktorá spája obe polovice polypeptidu. Proteín *CFTR* je zakotvený v lipidickej dvojvrstve sekretorických buniek, orientovaný je do cytoplazmy (**obrázok 1**).

Varianty v géne *CFTR*

V súčasnosti je opísaných takmer 2 000 variantov v géne *CFTR*, z toho viac než 1 200 patogénnych. Databáza Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium Database CFGAC (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>) obsahuje aktuálny stav variantov *CFTR*. Jednoznačná väčšina variantov je veľmi zriedkavá a ich výskyt je obmedzený na malé izolované populácie. Len 30 variantov v géne *CFTR* sa vyskytuje s podielom viac než 0,1 %.

Najčastejším variantom v géne *CFTR* a prvým identifikovaným⁽¹²⁾ je F508del (označovaný aj ako delta-F508, skrátene Δ F508). Je spôsobený deléciou troch báz v 11. exóne génu *CFTR*, čoho dôsledkom je strata jednej aminokyseliny – fenylalanínu v proteíne *CFTR* na pozícii 508. Výsledný proteín je nefunkčný. Podiel tohto variantu predstavuje na Slovensku od 59,4 do 66,8 %⁽¹³⁾.

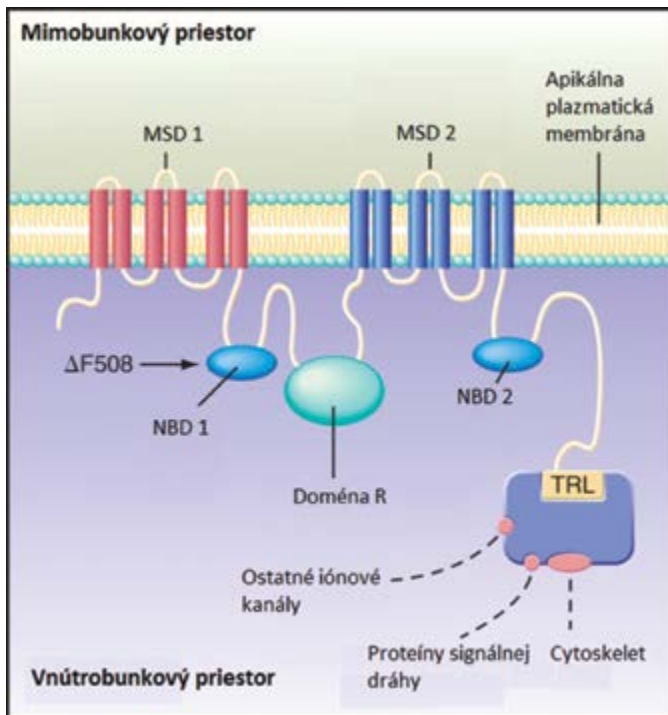
Molekulárna patológia

Zastúpenie rôznych variantov v jednotlivých funkčných doménach *CFTR* je nerovnomerné. Zvýšené množstvo variantov bolo pozorované v doméne R a NBD1. Rôzne typy variantov majú rôzny efekt na priebeh ochorenia. Dôsledkom

Tabuľka 1. Vyšetrované varianty v *CFTR* géne

3120+1G>A	711+1G>T	621+1G>T	1717-1G>A	CFTRdele2,3(21 kb)
3849+10kbC>T	2789+5G>A	1898+1G>A	G542X	G85E
Y1092X(C>A)	G551D	R553X	3659delC	N1303K
R560T	R117H	R1162X	L1077P	R117C
R1066C	L1065P	W1282X	R347H	R347P
I507del	T338I	F508del	I336K	1677delTA
R334W	3272-26 A>G	1078delT 31	2183AA>G	2184insA
2143delT	5 T (9-13TG), 7 T, 9 T	M1V	P5L2	CFTR-dele22
Q39X	Dele17a_18	S549R	Q552X	852del22
CFTRdele1	D110E	R1066H	D110H	G1244E
c.1584+18672 A>G	1259insA	D1152H	2184delA	711+5G->A
R352Q	R1158X	G178R	D579G	E585X
1898+3 A->G	CFTRdele22,23	4382delA	4016insT	Dele14b_17b
Dele2ins182	Dele22_24	G1349D		

Obrázok 1. Štruktúra CFTR. Mechanizmus funkcie CFTR kanálu je založený na fosforylácii R domény, čím sa stimuluje interakcia ATP s NBD doménami. Po hydrolýze ATP sa vytvorí dimér z NBD domén, čím sa zmení konformácia TMD domén a dôjde k otvoreniu kanála.



(MSD – membrane-spanning domain; NBD – nucleotide-binding domain). Zdroj: *The New England Journal of Medicine*⁽¹¹⁾

širokej škály variantov v géne *CFTR* je veľká fenotypová variabilita CF, ku ktorej prispieva aj vplyv vonkajšieho prostredia a genetického pozadia jedinca.

Mechanizmy vplyvu rôznych variantov na funkčnosť proteínu CFTR môžeme rozdeliť do 5 skupín:

1. Netvorí sa žiaden proteín CFTR alebo len zanedbateľné množstvo z dôvodu predčasnej terminácie translácie z dôvodu predčasných stop kodónov: napr. G542X, 621+1G>T, 390insT.
2. Poruchy posttranslačných úprav, v ktorých dôsledku dochádza k predčasnej degradácii polypeptidov: napr. F508del, N1303K, I507del.
3. Poruchy v regulácii spôsobené konformačnými zmenami proteínu CFTR: napr. G551D, G551S, S1255P.
4. Porucha vodivosti chloridového kanála: napr. R117H, R334W, R347P.
5. Znížená hladina transkriptu mRNA a následne aj proteínu: napr. 3849+10kbC>T, 1811+1,6kbA>C.

LITERATÚRA

1. Castellania C, Duff AJA, Belle SC, et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros* 2018; 17: 153-178.
2. Dluholucký S, Knapková M. Ročná správa novorodeneckého skríningu za rok 2013. *Monitor medicíny SLS* 2014; (3-4): 20-24.
3. Lysinová M, Knapková M, Dluholucký S. Novorodenecký skrínning v súčasnosti. *Pediatr prax* 2015; 16(5): 188-191.
4. Urbanová V, Feketeová A, Podracká L. Pseudo-Bartterov syndróm ako prvý prejav cystickej fibrózy. *Čes-slov Pediatr* 2015; 70(1): 33-36.

Molekulárno-genetická analýza génu *CFTR*

Molekulovo-genetická analýza sa realizuje zo vzorky periférnej krvi odobratej do sterilnej skúmavky s EDTA. Molekulárna diagnostika CF je založená na identifikácii kauzálnych variantov, ale existencia takmer 2 000 variantov rozptýlených po celom géne *CFTR* môže spôsobiť falošne negatívny výsledok. Metódou multiplexnej alelovo špecifickej PCR sa vyšetruje 67 variantov v *CFTR* géne, ktoré predstavujú v našej populácii viac ako 90 % všetkých CF variantov (**tabuľka 1**).

Na analýzu celého génu *CFTR* sa využívajú metódy ako dHPLC (denaturing high performance liquid chromatography), HRM (high resolution melting) alebo celogénové sekvenovanie.

Indikácie na testovanie *CFTR* génu

Indikácie na molekulárnogenetickú analýzu *CFTR* génu^(upravené podľa 14):

1. Diagnostické testovanie pri typických prejavoch CF, pri atypických klinických prejavoch a/alebo hraničných hodnotách potného testu, pri mužskej infertilite s CBAVD a pri ostatných *CFTR*-RDs u dospelých.
2. Prenatálna diagnostika (napr. v prípade nosičstva mutácií *CFTR*, pri gravidite s verifikovanou CF u jedného z rodičov alebo u plodu s hyperechogénnym črevom a/alebo dilatáciou črevných kľučiek).
3. Testovanie nosičstva pre CF u jedincov s pozitívnou rodinnou anamnézou. V niektorých krajinách je testovanie nosičstva pre CF zavedené aj u jedincov bez pozitívnej rodinnej anamnézy v rámci vyšetrovania nosičstva pre najčastejšie genetické ochorenia alebo u neplodných párov (neplatí pre SR).

Záver

Genetika v súčasnej dobe predstavuje odbor, ktorý výrazne mení náš pohľad na patofyziológiu ochorení. Cystická fibróza, ako relatívne časté ochorenie, je veľmi podrobne preštudovaná z molekulovo-genetického pohľadu. Od samotného potvrdenia klinickej diagnózy sa dostávame k novorodeneckému skríningu, prenatálnej diagnostike, určovania nosičstva u asymptomatických jedincov, či predimplantačnej diagnostike embryí. Navyše, určenie prítomnosti konkrétnych mutácií nám umožňuje zvoliť najefektívnejšiu liečbu. Cystická fibróza sa takto stáva modelovým ochorením a ukazuje nám potenciál genetickej diagnostiky aj u menej častých monogénových ochorení.

5. Fila L. Cystická fibróza u dospelých. *Interní Med* 2014; 16(2): 54-60.
6. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, et al. Recommendations for the classification of diseases as *CFTR*-related disorders. *J Cyst Fibros* 2011; 10: S86-S102.
7. Farrell PM, Terry B. White, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr* 2017; 181S: S4-15.

8. Ren CL, Borowitz DS, Gonska T. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Related Metabolic Syndrome and Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis. *J Pediatr* 2017; 181: S45-S51.
9. De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L. The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse Med* 2017; 46: e97-e108.
10. Zielanski J, Bozon D, Kerem BS, et al. Identification of mutations in exons 1 through 8 of the Cystic Transmembrane Conductance Regulator (*CFTR*) gene. *Genomics* 1991; 10: 229-235.
11. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic Fibrosis. *The New England Journal of Medicine* 2005; 352: 1992-2001.

12. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-1080.
13. Kádasi L, Poláková H, Začková A, et al. Distribution of 9 common mutations in the *CFTR* gene in Slovak cystic fibrosis patients. *Gene Geogr* 1997; 11: 51-56.
14. Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and *CFTR*-related disorders – updated European recommendations. *European Journal of Human Genetics* 2009; 17: 51-65.



MUDr. Mária Giertlová, PhD.
Lekárska genetika, Medirex, a. s.
Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice
e-mail: maria.giertlova@medirex.sk

DYNEX = KOMPLETNÍ ŘEŠENÍ



Reagencie

Včetně diagnostických souprav pro detekci patogenů a genetické testování

- ◆ DNA, RNA a proteinové technologie
- ◆ PCR technologie
- ◆ Epigenetická analýza
- ◆ Reagencie pro NGS aplikace

Přístroje

- ◆ Biohazardní a laminární boxy
- ◆ Malé laboratorní přístroje
- ◆ Izolační a pipetovací automaty
- ◆ PCR cykly

Služby

- ◆ Aplikační podpora a servis přístrojů
- ◆ Akreditovaná kalibrační laboratoř pipet
- ◆ Demo laboratoř pro molekulárně biologické metody
- ◆ Zkušební laboratoř DYNEX akreditovaná ČIA pro laminární boxy



DYNEX
 ČR: Lidická 977, 273 43 Buštěhrad, Česká republika
 Tel.: +420 220 303 600, e-mail: office@dynex.cz
 SR: Nové Kalište 17, 974 04 Banská Bystrica, Slovenská republika
 Tel.: +421 484 155 045, e-mail: dynex@isternet.sk
 www.dynex.cz