

**DOI:** 10.5152/jarem.2018.2176

**Manuscript Type:** Original Article

**Turkish Title:** Şanlıurfa İlindeki Ter Testi Sonucu Şüpheli Olan ve Klinik Ön Tanısı Kistik Fibrozis Olan Hasta Gruplarındaki CFTR Gen Mutasyonlarının Yeni Nesil Dizileme Yöntemi ile İncelenmesi

**Turkish Running Head:** NGS ile CFTR Mutasyonlarının İncelenmesi

**Title:** Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province

**Running Head:** Investigation of CFTR Gene Mutations with NGS

**Authors:** Evren Gümüş

**Institutions:** Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

**Address for Correspondence:** Evren Gümüş [evreng@harran.edu.tr]

**Cite this article as:** Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

**Received:** 25.05.2018

**Accepted:** 24.07.2018

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

©Copyright 2018 by University of Health Sciences Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital. - Available online at [www.jarem.org](http://www.jarem.org)

## Özet

**Amaç:** Kistik Fibrozis (KF) günümüzde 1/20-25 taşıyıcı frekansı ve 1/2500-3300 görülme oranı ile, beyaz ırktaki otozomal resif geçiş gösteren ölümcül hastalıklar içerisinde ilk sırada yer almaktadır. KF, klor geçirgen transmembran kanal olarak da bilinen kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu açığa çıkmaktadır. Mutasyonların dağılım oranları hasta grupları arasında ve bölgesel olarak farklılık göstermektedir. Bu çalışmada Şanlıurfa ilinde ter testi şüpheli olan ve klinik ön tanısı KF olan bireyler mutasyon dağılımları açısından incelenmiştir.

**Yöntemler:** Ter testi sonucu şüpheli olan 40 hasta ve klinik ön tanısı KF olan 62 hasta yeni nesil sekanslama yöntemi ile CFTR gen mutasyonları açısından değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** 40 bireyin yer aldığı ter testi sonucu şüpheli olan hasta grubunda; 11 birey heterozigot (%27.5), 1 birey compound-heterozigot (%2.5) ve 28 birey de homozigot (%70) mutasyona sahip olarak değerlendirildi. 62 bireyin yer aldığı klinik ön tanısı KF olan grupta; 16 birey heterozigot (%25.8), 3 birey compound heterozigot (%4.8) ve 13 birey homozigot (%21) mutasyona sahip olarak değerlendirildi. En sık gözlenen mutasyonlar ise I148T ve ΔF508 olarak bulundu.

**Sonuç:** Çalışmamız hem ter testinin tanısal değerinin klinik değerlendirmeden daha önemli olduğunu hem de ter testi sonucu şüpheli olan bireylerin zaman kaybetmeden araştırılması gerektiğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** kistik fibrozis, yeni nesil sekanslama, ter testi, mutasyon

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

©Copyright 2018 by University of Health Sciences Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital. - Available online at [www.jarem.org](http://www.jarem.org)

**Abstract**

**Objective:** Cystic fibrosis (CF) is the most seen autosomal recessive mortal disease in the Caucasians. It's prevalence is 1/2500-3300 and it's carrier frequency is 1/20-25. A mutation at the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene which is also none as chlorine permeable transmembrane channel results CF. There is a difference in the distribution of patients between patient groups and regions. This paper is to investigate the mutation dispersion in the state of Sanliurfa which patients who have borderline sweat test results or a clinic suspicion of CF.

**Methods:** 40 patients with borderline sweat test results (first group) and 62 patients with clinically suspected CF (second group) were investigated with next generation sequencing for CFTR gene mutations.

**Results:** In the first group; 11 heterozygous (27,5%), 1 compound heterozygous (2,5%) and 28 homozygous (70%) mutations were determined. In the second group; 16 heterozygous (25,8%), 3 compound heterozygous (4,8%) and 13 homozygous (21%) mutations were determined. The most frequent mutations were I148T and  $\Delta$ F508.

**Conclusion:** Our research points out that the sweat test is more important than clinic suspicion and every patient with borderline sweat test should be investigated rapidly.

**Key Words:** cystic fibrosis, next generation sequencing, sweat test, mutation

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

©Copyright 2018 by University of Health Sciences Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital. - Available online at [www.jarem.org](http://www.jarem.org)

## GİRİŞ

Yaklaşık 80 yıl önce, New York şehrindeki 49 hastada Dorothy Andersen tarafından tanımlanan Kistik Fibrozis (KF; MIM# 219700), günümüzde 1/20-25 taşıyıcı frekansı ve 1/2500-3300 görülme oranı ile, beyaz ırktaki otozomal resif geçiş gösteren ölümcül hastalıklar içerisinde ilk sırada yer almaktadır. Hastalıkta cinsiyet baskınlığı gözlenmez. KF, birçok organ ve sistemi etkileyerek mortalite ve morbiditeye neden olur. Moratlitenin en önemli nedeni bronşektazi, küçük havayolu obstrüksüyonları ve enfeksiyonlara bağlı progresif akciğer hasarıdır. En önemli morbidite nedenleri ise; epitelyal hücre disfonksiyonuna bağlı ekzokrin pankreas yetmezliği, bilier siroz ve vas deferens yokluğuna bağlı infertilitedir. KF, klor geçirgen transmembran kanal olarak da bilinen anyon transportunda ve mukosilyer klirensde görevli kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu açığa çıkmaktadır (1–5). CFTR yaklaşık 190 kb'lık genomik DNA dizisi içeren, 27 ekzondan oluşan, 7. kromozomun uzun kolunda yer alan bir gendir (6). CFTR geninde 2000'in üzerinde mutasyon tanımlanmıştır, bu mutasyonlar içerisinde en sık missense ve nonsense mutasyonlar gözlenirken, tek başına en sık gözlenen mutasyon ise Phe508del mutasyonudur (1). CFTR mutasyonları protein fonksiyonuna olan etkilerine göre altı ayrı grupta incelenir (7). Sınıf I mutasyonlarda (Gly542X, Trp1282X ve Arg553X) protein yapımı gözlenmez. En sık gözlenen mutasyon olan Phe508del mutasyonunun da yer aldığı sınıf II mutasyonlarda ise (Asn1303Lys ve Arg560Thr), endoplazmik retikulumda yanlış katlanan proteinlerin, proteozomlarda degradasyonu gözlenir. Sınıf III mutasyonlarda ise (Gly551Asp, Gly178Arg ve Gly551Ser) kanal regülasyonu bozulmuştur. Sınıf I, II, III mutasyonlarda CFTR fonksiyonu rezidüel düzeyde bile olmadığından, bu sınıflardaki mutasyonlara sahip bireyler ağır fenotipik etkilenme gösterir. Sınıf IV mutasyonlarda (Arg117His, Arg347Pro ve Arg117Cys) ise patojenite, azalmış iyon akışı sonucu oluşur. Sınıf V ( 2789+5G→A, 3120+1G→A ve

3849+10kbC→T) ve VI (4326delTC, Gln1412X ve 4279insA) mutasyonlarda ise sırasıyla; azalmış

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

mRNA miktarı ve plazma membran instabilitesi patojeniteden sorumludur (8). Sınıf IV, V, VI mutasyonlarda ise fonksiyonel CFTR proteini bulunması nedeniyle fenotipik olarak daha ılımlı bir tablo olduğunu söylemek mümkündür (1). Bu nedenle KF hastasında gözlenen mutasyona göre, hastalığın şiddeti, kliniğe yansıyan özellikleri ve progresyonu tahmin edilebilir.

Hastalığın erken dönemde tanımlanması çok önemlidir. Bu nedenle 01.01.2015 tarihinden itibaren ülkemizde de yenidoğan tarama programına dahil edilmiştir. Doğumdan sonra topuktan alınan kan örneğinde immün reaktif tripsinojen (IRT) ölçümü yapılır. Sonucun referans değer aralığından yüksek çıkması durumunda test tekrarlanır. Tekrarlanan test sonucunun da yüksek bulunması halinde, hastalık şüphesi olan bebek, ülkemizdeki ter testi yapılan merkezlerden birine yönlendirilir. Ter testi sonucunun >60 mmol/L olması durumunda hasta CFTR gen analize yönlendirilir (9). Ter testi sonucunun 30-60 mmol/L olması durumunda ise birey dikkatlice değerlendirilmeli ve uzun süreli bir takip programına dahil edilmeli ya da CFTR gen mutasyon analizi ile araştırılmalıdır, çünkü yaşamın erken yıllarında asemptomatik olarak seyreden klinik, ilerleyen yıllarda KF fenotipine dönüşebilir. Bu bireyler genellikle sınıf IV, V, VI mutasyonlara sahip olan rezidüel CFTR aktivitesi gözlenen bireylerdir. Bu durum bazı kaynaklarda kistik fibrozis-metabolik sendrom olarak ifade edilmektedir (10). Kistik fibrozis mutasyonlarının sıklık dağılımları ülkeden ülkeye hatta aynı ülke içinde bile büyük farklılıklar göstermektedir, bu nedenle bölgesel veriler ışığında 19, 23, 36, 97 ve 188 adet farklı mutasyonu tarayan çeşitli ticari kitler geliştirilmiştir (11). Amerikan Obstetri ve Jinekoloji Derneği (ACOG) ile Amerikan Tıbbi Genetik Derneği (ACMG) üreme çağına gelmiş bireylerin 23 mutasyon içeren panel test ile taranmasını önermektedir (12). Bu panel testin mutasyon tespit etme oranı Avrupa halkları üzerinde yapılan bir araştırmada %49-94 oranında bulunmuştur (13). Ülkemizde yapılan 36 farklı

mutasyonu araştıran panel testte bu oran %75 olarak tespit edilmiştir (14). Taranan mutasyonların

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

farklılığına ek olarak farklı moleküler yöntemler de mutasyon analizi için kullanılmaktadır; en sık kullanılanlar: allel spesifik oligonükleotid (ASO), reverse dot-blot hibridizasyon (RDB), amplifikasyon refraktör mutasyon sistem (ARMS), oligonükleotid ligasyon assay (OLA) ve yeni nesil sekanslama (NGS) dir (5). Bu çalışmada Şanlıurfa ilinde ter testi sonucu şüpheli (30-60 mmol/L) olan ve ya klinik olarak KF ön tanısı alan hastaların yeni nesil sekanslama yöntemi ile yapılan CFTR tüm gen analizleri retrospektif olarak incelenmiş, bölgemizdeki, ülkemizdeki ve dünyadaki sıklıkları literatür verileri ışığında karşılaştırılmıştır.

## YÖNTEMLER

XXXXXXXXXXXXXXXXXX'na Ekim 2016- Mayıs 2018 tarihleri arasında başvurup, ter testi sonucu şüpheli olan ya da klinik olarak KF ön tanısı alan 102 birey (farklı zamanlarda yapılmış iki ter testi sonucundan en az biri şüpheli olan 40 birey ve klinik olarak KF ön tanısı alan 62 birey) retrospektif olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya aile ya da taşıyıcılık taraması yapılan bireyler dâhil edilmemiştir. Hastaların demografik bilgileri elektronik dosyalarından öğrenilmiş ve not edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 102 hastadan 3ml'lik ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) içeren tüplere alınan venöz kan örneklerinden Magpurix Blood DNA Extraction Kit 200 ile DNA izole edildi. Elde edilen DNA örneklerinin Nanodrop SMA1000 spektrofotometre cihazında saflık ve miktar analizleri yapıldıktan sonra Qubit 3 fluorometer (Invitrogen , Türkiye) cihazında da flourometrik tayin yapıldı ve DNA örnekleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işlemi yapılana kadar uygun koşullarda saklandı. PZR işlemi BIORAD T100TM Thermal Cyclers (Türkiye) termal döngü cihazında NEXTflex Cystic Fibrosis Amplicon Panel (Bioo Scientific, Austin, USA) ile hedef KF amplifikasyonu (PZR 1), temizlik, adaptör ligasyonu, temizlik ve forward dizisi

5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT'3 olan barkodlu

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

©Copyright 2018 by University of Health Sciences Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital. - Available online at [www.jarem.org](http://www.jarem.org)

primer mix dizisi ile PZR 2 aşamaları yapıldıktan sonra NGS yöntemi kullanılarak üreticinin öngördüğü protokol uyarınca Miniseq (Illumina GmbH, Almanya) cihazı ile sekanslama yapıldı. **Herhangi bir patojenik varyantın saptanmadığı ya da sadece bir patojenik varyantın saptandığı durumda CFTR geni delesyon/duplikasyon analizi Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi ile araştırıldı.** Çalışmamız XXXXXX Üniversitesi Etik Kurulu tarafından 2018 Ocak ayında 01 numaralı oturumda onay almıştır.

### İstatiksel Analiz

Veriler Microsoft Excel programına girilerek SPSS 25.0 programı ile incelendi. Sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında parametrik testler kullanılarak veriler ortalama±standart sapma olarak bildirilmiştir.

### BULGULAR

Çalışmaya katılan bireylerin ortalama yaşı 5.71 olarak değerlendirildi. Ter testi sonucu şüpheli olan hasta grubunda ortalama yaş  $0.68 \pm 0.24$  iken KF ön tanısı alan birey grubunda ise ortalama yaş  $8.96 \pm 1.47$  olarak bulundu. Çalışmaya katılan 102 bireyden 50'si kadın 52'si erkekti. 40 bireyin yer aldığı ter testi sonucu şüpheli olan hasta grubunda; 11 birey heterozigot (%27.5), 1 birey compound-heterozigot (%2.5) ve 28 birey de homozigot (%70) mutasyona sahip olarak değerlendirildi (**Şekil 1.**).

Bu gruptaki bireylerde allel frekansı değerlendirildiğinde en sık gözlenenler; I148T (%20),  $\Delta F508$  (%11.25), I1000Lfs\*2 (%11.25), I1234V (%8.75) ve I807M (%8.75) şeklinde gözlendi (Tablo 1.). 62 bireyin yer aldığı klinik ön tanısı KF olan grupta; 16 birey heterozigot (%25.8), 3 birey compound heterozigot (%4.8) ve 13 birey homozigot (%21) mutasyona sahip olarak değerlendirildi (**Şekil 1.**). 30

bireyde ise (%48.4) herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Bu gruptaki allel frekanslarına bakıldığında **This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176**

$\Delta F508$  (%7.2) en sık gözlenen allel olarak görüldü (Tablo 2.). İki gruptaki bireyler beraber değerlendirildiğinde 27 birey heterozigot (%26.5), 4 birey compound heterozigot (%3.9), 41 birey homozigot (%40.2) genotipte gözlenirken, 30 bireyde ise (%29.4) herhangi patolojik bir varyanta rastlanmadı. İki grup beraber değerlendirildiğinde en sık gözlenen alleller; I148T (%9.8) ve  $\Delta F508$  (%8.8) olarak tespit edildi. Toplam 102 hastada 22 farklı mutasyon gözlemlendi. Toplam 204 allelde 117 mutant allel tespit edildi (tanısal etkinlik %57.3). Mutasyonların büyük çoğunluğu missense mutasyon olarak gözlemlendi. En sık sınıf II ve IV mutasyonları gözlemlendi. Delesyon-duplikasyon analizi çalışılan hastalarda patojenik bir durum tespit edilmedi. Çalışma öncesi katılımcılardan yazılı onam alınmıştır.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada Şanlıurfa ilindeki ter testi sonucu şüpheli olan ve klinik ön tanısı KF olan toplam 102 hasta yeni nesil sekanslama yöntemi ile CFTR gen mutasyonları açısından incelenmiştir. Avrupa ülkelerinde ciddi bir sorun olarak gösterilen ve moleküler tedavi yöntemleri üzerinde çalışmaların sürdüğü KF ile ilgili beklentiler ve tahminler 2025 yılına kadar KF'li erişkin sayısının %70 oranında artacağı ve hastalığın daha da önem kazanacağı yönündedir (15). Hastalık ilk dekatta bronşektazi, ekzokrin pankreas yetmezliği, anormal karaciğer fonksiyon testleri ve mekonyum ileusu ile prezente olurken, ikinci dekad sonrası hemoptizi, pnömotoraks, ilerleyici akciğer yetmezliği, diyabet, siroz, portal hipertansiyon ve osteoporoz gözlenebilmektedir (1,9,15,16). Hastalığın birçok sistemi etkilemesi ve bu etkinin yaşla birlikte değişmesi nedeniyle KF'li hastalarda multidisipliner yaklaşım ve yaşa özgü bakım hizmetleri önem kazanmaktadır. Bu değişimler göz önüne alındığında, hastalığın erken tanısının konulması en önemli parametre olarak öne çıkmaktadır. Tanı genellikle yaşamın ilk yılı

içerisinde konulur. Özellikle 2015 yılından itibaren KF'in ulusal yenidoğan tarama programına dahil

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176



edilmesi ile beraber ülkemizde de erken dönemde tanı konulma oranları zaman içerisinde artacaktır. Ancak bazı hastalarda tanı alma yaşı 50'li yaşları bulabilmektedir. Bu nedenle KF'li hastaların herhangi bir yaşta, herhangi bir polikliniğe, farklı semptomlarla başvurabileceği unutulmamalıdır (3,9,10). Bu duruma etki eden faktörlerden en önemlisi şüphesiz mutasyon tipi ve mutasyonun protein fonksiyonuna olan etkisidir.

Dünya genelinde ve Avrupa'da CFTR geninde en sık gözlenen mutasyon  $\Delta F508$ 'dir (1,13).  $\Delta F508$  mutasyonu Avrupa ve Asya'da kuzeybatıdan güneydoğuya doğru kademeli olarak azalan bir oran göstermektedir (17). Danimarka gibi kuzey Avrupa ülkelerinde bu oran %100'e yakinken ülkemizde %14-28.5 olarak gözlenmektedir (2,3,18). Şanlıurfa iline coğrafi olarak yakın konumda bulunan Adana bölgesinde yapılan bir çalışmada bu oran %11.9 olarak bulunmuş olup çalışmamız verileri ile yakınlık göstermektedir (3). Bu oran ülkemizde %4-4.7 oranı ile en düşük İzmir'de bulunmuştur (19,20). Çalışmamızdaki oranlara en yakın oranlar ise Ürdün ve Bahreyn'de yapılan çalışmalarda elde edilmiştir (21,22). Çalışmamızdaki en dikkat çekici veri  $\Delta F508$  mutasyon oranında gözlenen düşüklükten ziyade, Türk toplumunda hiçbir çalışmada en sık gözlenen ilk üç mutasyon içinde yer almayan I148T mutasyonunun çalışmamızdaki en sık mutasyon olarak gözlenmesidir. Bu mutasyon bir çok toplumda KF'li hastalar içinde %3'den az gözlenmesine rağmen Mısır'da %4 ve Suriye'de %6 olarak gözlenmiştir (23,24). Şanlıurfa'nın Suriye'ye komşu olması ve birçok Suriyeli göçmene ev sahipliği yapmasının bu veriler ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Düşük bir ihtimal olsa da I148T değişikliği bölgede geçmiş dönemlerde 'kurucu etki' göstermiş olabilir. Son dönemde yapılan bazı çalışmalar I148T'nin hastalık etkeni olarak değerlendirilmeyip fenotip modifiye edici olarak değerlendirilmesi gerektiğini belirtmektedir. Yine son dönemde yapılan çalışmalarda I148T'nin klasik

KF semptomlarına değil, atipik ve hafif semptomlara yol açtığı gösterilmiştir (25–27). İlgili

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

mutasyonun in-silico veritabanlarında patojenik olarak değerlendirilmesi ve çalışmamızdaki ter testi şüpheli birey grubunda yüksek oranda gözlenmesi nedeniyle, tipik KF semptomlarını göstermese bile hafif KF formları ile ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. Her iki bakış açısının da daha fazla örnekleme prospektif olarak dizayn edilmiş bir çalışma ile doğrulanmaya ihtiyacı olduğunu düşünmekteyiz. ACOG ve ACMG tarafından önerilen 23 mutasyonlu panelde bu mutasyon 2004 yılından bu yana yer almamaktadır, bunun nedeni ilgili mutasyonun Amerika kıtasında gözlenme oranının %0.5'den daha az olmasıdır (12,25). Çalışmamızdaki mutasyonlar genel olarak değerlendirildiğinde ise ACOG ve ACMG tarafından önerilen 23 mutasyonluk panel çalışmamızdaki bireylerin sahip olduğu mutasyonların birinci ve ikinci frupta %11.25-%15.2'ini tespit edebilmektedir. Bu durum bölgemizdeki mutasyon çeşitliliğinin oldukça fazla olması ve çalışmamızın NGS yöntemi ile yapılması ile açıklanabilir. Bölgemize yakın bir bölge olan Adana'da farklı kliniklerde KF tanısı alan 63 hasta 19 farklı mutasyon için taranmış ve analiz sonucunda tanısız etkinlik %22.3 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda bu oranın %57.3 olarak bulunması, kullanılan yöntem, ter testi sonucu şüpheli olan hasta grubu içermesi ve konulan klinik tanı başarısı ile açıklanabilir.

Kistik fibrozis klinik olarak; immun yetmezlik sendromları, astım, primer bilier atrezi, primer silier diskinezi ve Shwachman-Diamond sendromu ile karışabilir. Ter testi sonuçları bronşektazi ilişkili sendromlar başta olmak üzere izole hiperklorhidrozis, sürrenal yetmezlik, glikojen depo hastalıkları, nefrojenezik diabet insipidus ve glukoz-6 fosfat dehidrojenaz eksikliğinde de pozitif olarak gözlenebilir (28,29). Bu durum da tanısız etkinlik oranını etkileyen önemli bir parametredir.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

©Copyright 2018 by University of Health Sciences Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital. - Available online at [www.jarem.org](http://www.jarem.org)

### **Çalışma Kısıtlılıkları**

Çalışmamız, iki hasta grubu içermesi, şüpheli ter testi sonucuna sahip bireylere odaklanması ve çalışmanın NGS yöntemi ile yapılması nedeniyle değerli olup, en önemli dezavantajı çalışmanın retrospektif olarak yapılması ve bireylerin mutasyon analiz sonuçları ile klinik ve ter testinin rakamsal düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelememesidir.

### **SONUÇLAR**

Ter testi sonucu şüpheli olan gruptaki hastaların analiz sonucu ile KF tanısı %72.5 (29/40) oranında desteklenirken, bu oran klinik ön tanısı KF olan hasta grubunda %25.8 (16/62) olarak bulunmuştur. Bu durumun hem ter testinin tanısal değerinin klinik değerlendirmeden daha önemli olduğunu hem de ter testi sonucu şüpheli olan bireylerin zaman kaybetmeden araştırılması gerektiğini göstermesi nedeniyle oldukça önemli olduğu kanaatindeyiz. Sonuç olarak ter test sonucu şüpheli olan ve klinik ön tanısı KF olan 102 birey NGS yöntemi ile retrospektif olarak incelenmiş; güncel bilgiler ışığında bölgesel ve ülkesel veriler eşliğinde tartışılmıştır.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

©Copyright 2018 by University of Health Sciences Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital. - Available online at [www.jarem.org](http://www.jarem.org)

## Kaynaklar

1. Elborn JS. Cystic fibrosis. Lancet 2016;388:2519–31.
2. Tug E, Tug T. Kistik Fibrozis ve Moleküler-Genetik Yaklaşımlar. Toraks Derg 2003;4:198–204.
3. Öztürk ÖG, Kibar F, Karaçor EDZ, Çetiner S, Şahin G, Yaman A. Adana İlinde CFTR Gen Mutasyonlarının Değerlendirilmesi. Cukurova Med J 2014;38:202–8.
4. Oskoui M, Gazzellone MJ, Thiruvahindrapuram B, et al. Clinically relevant copy number variations detected in cerebral palsy. Nat Commun 2015;6:7949.
5. Richards CS, Bradley LA, Amos J, et al. Standards and Guidelines for CFTR Mutation Testing. Genetics In Medicine 2002;4:379.
6. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. Genomics 1991;10:214–28.
7. Wilschanski M, Zielenski J, Markiewicz D, et al. Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. J Pediatr 1995;127:705–10.
8. Boyle MP, De Boeck K. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. Lancet Respir Med 2013;1:158–63.
9. Üstü Y, Uğurlu M. Ulusal Erken Tanı ve Tarama Programı: Kistik Fibrozis National Early Diagnosis and Screening Program: Cystic Fibrosis. Ankara Med J 2016;16:239–41.
10. McCloskey M, Redmond AOB, Hill A, Elborn JS. Clinical Features Associated with a Delayed Diagnosis of Cystic Fibrosis. Respiration 2000;67:402–7.
11. Lucarelli M, Porcaro L, Biffignandi A, et al. A New Targeted CFTR Mutation Panel Based on Next-Generation Sequencing Technology. J Mol Diagnostics 2017;19:788–800.
12. Loukas YL, Thodi G, Molou E, Georgiou V, Dotsikas Y, Schulpis KH. Clinical diagnostic Next-  
This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

- Generation sequencing: The case of CFTR carrier screening. *Scand J Clin Lab Invest* 2015;75:374–81.
13. Lao O, Andrés AM, Mateu E, Bertranpetit J, Calafell F. Spatial patterns of cystic fibrosis mutation spectra in European populations. *Eur J Hum Genet* 2003;11:385–94.
  14. Kılınc MO, Ninis VN, Dağlı E, et al. Highest heterogeneity for cystic fibrosis: 36 mutations account for 75% of all CF chromosomes in Turkish patients. *Am J Med Genet* 2002;113:250–7.
  15. Burgel P-R, Bellis G, Olesen H V, et al. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *Eur Respir J* 2015;46:133–41.
  16. Gokdemir Y, Erdem E, Akpınar IN, Ersu R, Karadag B KF. Orta ve ağır akciğer tutulumu olan kistik fibrozlu hastalarda ölüme etki eden diğer risk etmenleri. *Türk Pediatr Arşivi* 2012;47:267–71.
  17. De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen HV, Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2014;13:403–9.
  18. Bonyadi M, Omrani O, Rafeey M, Bilan N. Spectrum of CFTR Gene Mutations in Iranian Azeri Turkish Patients with Cystic Fibrosis. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011;15:89–92.
  19. Kosova B, Eroglu Z, Yılmaz B et al.  $\Delta F508$ ,  $\Delta I507$  ve F508C kistik fibroz mutasyonlarının gerçek-zamanlı multipleks PCR ile hızlı analizleri. *Ege Tıp Derg* 2008;47:103–9.
  20. Ülgenalp A. Strip Assay Metodu Kullanılarak “Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)” Geni Mutasyonlarının Analizi,. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg* 2009;23:47–51.
  21. Rawashdeh M, Manal H. Cystic fibrosis in Arabs: a prototype from Jordan. *Ann Trop Paediatr* 2000;20:283–6.
  22. Eskandarani HA. Cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations in Bahrain. *J Trop*
- This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. *JAREM* 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

- Pediatr 2002;48:348–50.
23. Shahin WA, Mehaney DA, El-Falaki MM. Mutation spectrum of Egyptian children with cystic fibrosis. Springerplus 2016;5:686.
  24. Jarjour RA, Al-Berrawi S, Ammar S, Majdalawi R. Spectrum of cystic fibrosis mutations in Syrian patients. Minerva Pediatr 2018;70:159–64.
  25. Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. Genet Med 2004;6:387–91.
  26. Brennan M-L, Schrijver I. A Review of Associated Phenotypes, Use of Molecular Diagnostic Approaches, Genetic Characteristics, Progress, and Dilemmas. The Journal of Medical Diagnostic 2016;18:3-14.
  27. Monaghan KG, Highsmith WE, Amos J, et al. Genotype-phenotype correlation and frequency of the 3199del6 cystic fibrosis mutation among I148T carriers: Results from a collaborative study. Genet Med 2004;6:421–5.
  28. Feldshtein M, Elkrinawi S, Yerushalmi B, et al. Hyperchlorhidrosis Caused by Homozygous Mutation in CA12, Encoding Carbonic Anhydrase XII. Am J Hum Genet 2010;87:713–20.
  29. Sheridan MB, Fong P, Groman JD, et al. Mutations in the beta-subunit of the epithelial Na<sup>+</sup> channel in patients with a cystic fibrosis-like syndrome. Hum Mol Genet 2005;14:3493–8.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

Tablo I. Ter Testi Pozitif Sonuçlanan Bireylerdeki CFTR Allel Sıklıkları

<b>Mutasyon</b>	
	<i>Allel Frekansları (%)</i>
I148T	20
ΔF508	11.25
I1000Lfs*2	11.25
I1234V	8.75
I807M	8.75
M348K	6.25
S1426P	6.25
E1044G	5
P5L	3.75
A120T	2.5
A399V	1.25
L997F	1.25
Tanımlanamayan	13.75
<b>Toplam</b>	<b>100</b>

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

©Copyright 2018 by University of Health Sciences Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital. - Available online at [www.jarem.org](http://www.jarem.org)

Tablo II. Klinik Ön Tanısı KF Olan Bireylerdeki CFTR Allel Sıklıkları

<b>Mutasyon</b>	
	<i>Allel Frekansları (%)</i>
ΔF508	7.2
I1000Lfs*2	5.6
I148T	3.2
K684R	3.2
I1234V	2.5
I807M	2.5
P1013L	2.5
W1282X	1.6
E1044G	1.6
c.489+1G>T	1.6
G542X	0.8
R117H	0.8
M348K	0.8
R553X	0.8
G551D	0.8
c.1585-1G>A	0.8
S1426P	0.8
c.2052delA	0.8
R3W	0.8
Tanımlanamayan	61.3

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

©Copyright 2018 by University of Health Sciences Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital. - Available online at [www.jarem.org](http://www.jarem.org)



---

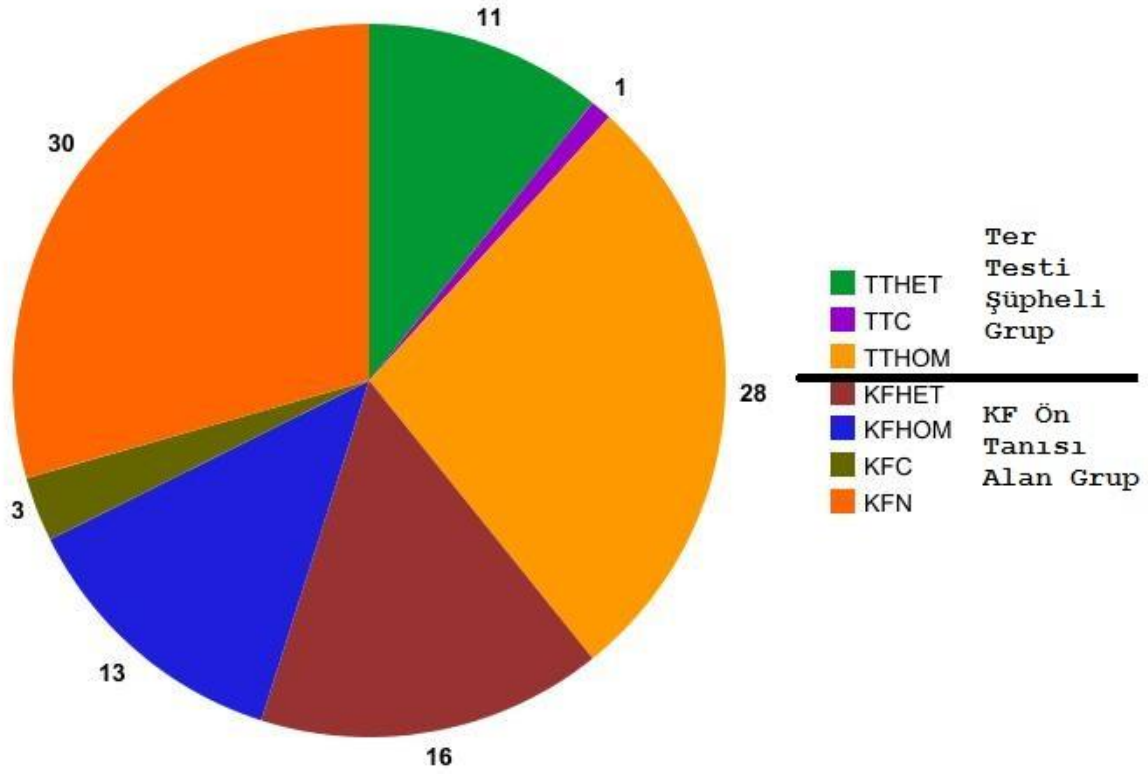


---

<b>Toplam</b>	<b>100</b>
---------------	------------

---

Şekil I. Her iki gruptaki bireylerin tüm gen analizi sonuçlarının grafiksel gösterimi



TTHET: Ter testi şüpheli gruptaki heterozigot bireyler

TTC: Ter testi şüpheli gruptaki compound heterozigot bireyler

TTHOM: Ter testi şüpheli gruptaki homozigot bireyler

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

©Copyright 2018 by University of Health Sciences Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital. - Available online at [www.jarem.org](http://www.jarem.org)

KFHET: KF ön tanılı gruptaki heterozigot bireyler

KFHOM: KF ön tanılı gruptaki homozigot bireyler

KFC: KF ön tanılı gruptaki compound heterozigot bireyler

KFN: KF ön tanılı gruptaki mutasyon saptanmamış (normal) bireyler

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as: Gümüş E. Examination of CFTR Gene Mutations in Patient Groups with Borderline Sweat Test and Clinical Preliminary Diagnosis of Cystic Fibrosis by Next Generation Sequencing Method in Sanliurfa Province. JAREM 2018; DOI: 10.5152/jarem.2018.2176

©Copyright 2018 by University of Health Sciences Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital. - Available online at [www.jarem.org](http://www.jarem.org)