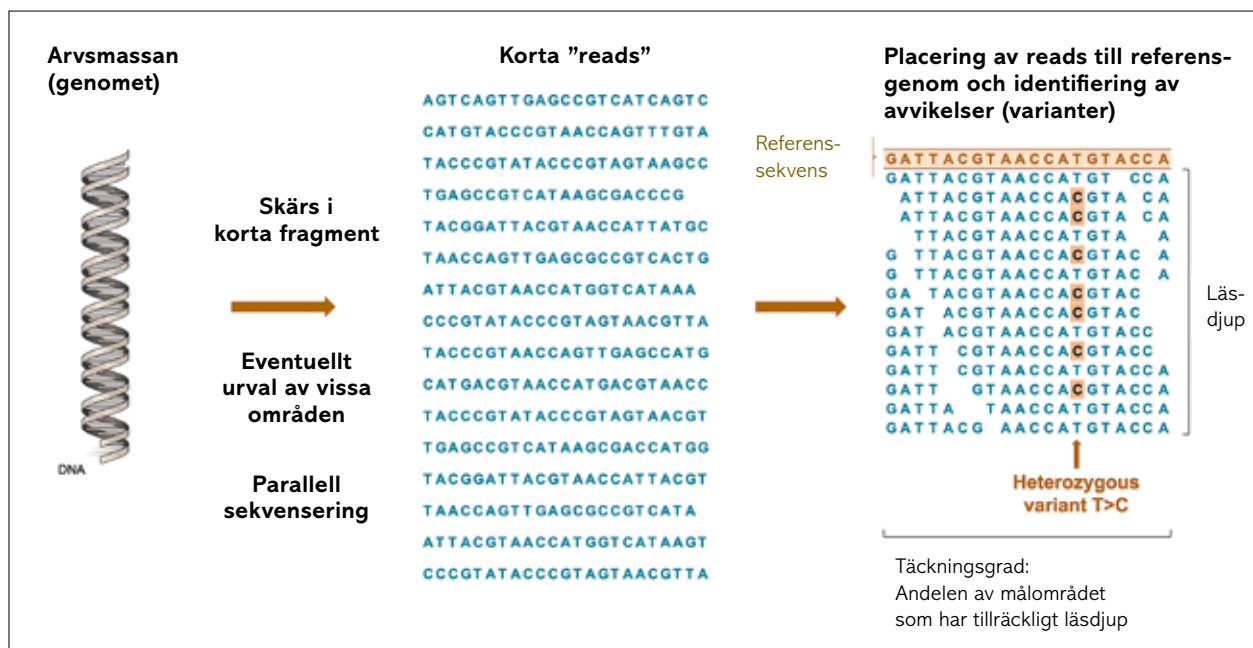


Nya gensekvenseringsmetoder
underlättar diagnostik av

sällsynta sjukdomar

Nya gensekvenseringsmetoder har under de senaste få åren kommit till användning vid rutinmässig diagnostisk testning av medfödda sjukdomar i svensk sjukvård. Många av dessa sjukdomar har neurologisk symtologi. De flesta av dessa sjukdomar är var för sig sällsynta, men alla patienter med sällsynta medfödda genetiska sjukdomar sammantaget utgör en betydande andel av patienterna vid våra neurologimottagningar. Ofta har patienterna svåra och komplexa symtom och gått genom omfattande utredning. Med denna artikel vill docent **Andreas Puschmann** ur vuxenneurologiskt perspektiv ge en överblick över de nya gentestmetoderna, ge förslag på hur och för vilka patientgrupper dessa metoder på ett rationellt sätt kan tillämpas för klinisk diagnos, och belysa vikten av att sträva efter en exakt, genetiskt verifierad diagnos vid utredning av dessa patientgrupper.





Figur 1: Nya generationens gensekvenseringsteknologi. DNA skärs i korta segment vars följd av baser läses. Dessa "reads" placeras sedan i passande ställe av det kända mänskliga referensgenomet. Avvikelser från referensgenomet markeras som varianter. Läsdjupet indikerar hur många gånger ett och samma ställe finns analyserad; ett läsdjup av x20 till x30 är önskvärd för tillförlitliga analyser. Täckningsgraden är ett annat kvalitetsmått för analysen, och anger andelen av det området som skulle analyseras verkligen blev analyserad med tillfredsställande läsdjup. Modifierad ur Gorcenco S, Ilinca A, Almasoudi W, Kafantari E, Lindgren AG, Puschmann A. New generation genetic testing entering the clinic. *Parkinsonism Relat Disord.* 2020 Apr;73:72-84. doi: 10.1016/j.parkreldis.2020.02.015, reproducerad med tillåtelse från Elsevier.¹

Massively parallel sequencing eller *Nya generationens sekvensering* (NGS) betecknar ett förfarande som tillåter att alla en individs gener eller till och med hela arvsmassan undersöks i en och samma analys. Principen är att DNA från ett patientprov – oftast ett vanligt blodprov – skärs i många små bitar vars bassekvens (50–400 baser) läses av. En dator placerar sedan dessa bitar in i det kända mänskliga referensgenomet. Det registreras var den undersökte individens bassekvens avviker från referensgenomet, och således bär genetiska varianter [Figur 1].¹ Förfarandet kan användas på förut selekterade områden på arvsmassan: **Genpaneler** sekvenserar enbart gener med känd koppling för en viss klinisk presentation (exempelvis ataxi) och **helxomsekvensering** (eng. whole exome sequencing, WES) de proteinkodande områden (exon) i alla kända cirka 20.500 gener [Figur 2].¹ Eller så kan

bassekvensen av nästan hela arvsmassan kartläggas (**helgenomsekvensering**, eng. whole genome sequencing, WGS). Detta initiala urval av analysmetoden avgör huruvida framtaget grunddata senare kan användas för eventuella utvidgade analyser. Vid genpanelundersökning tas från början enbart fram data i gener som hade känd koppling till sjukdomen eller syndromet ifråga när genpanelen sammanställdes. WES och WGS tar däremot fram data över alla gener; WGS inkluderar även data över introner (områden kring och mellan exonerna) eller andra icke-proteinkodande områden på DNA som exempelvis kodar för siRNA eller tRNA, där fler och fler sjukdomsassocierade varianter upptäckts. WGS erbjuder alltså de största möjligheterna för senare kompletterande analyser av redan framtaget grunddata, men innebär högre initial kostnad.

Alla dessa metoder detekterar ett stort antal genetiska varianter i varje undersökt individ. Beroende på exakt metodologi upptäcker WES av en person 30.000–90.000 och WGS 3–5 miljoner genvarianter. Vid WES- eller WGS-baserade analyser letar man därför vanligen enbart i gener som har en känd koppling till patientens kliniska symtom eller syndrom (genlista), även om man därefter kan komplettera med genomgång av ytterligare genlistor. Detta steg förutsätter en noggrann klinisk kartläggning så att rätt genlista väljs ut. Med bioinformatiska metoder filtreras sedan varianter bort som inte bedöms relevanta, exempelvis eftersom de i stora databaser har påträffats hos för många friska individer eller därför att de inte bedöms påverka det kodade proteinets funktion. De allra flesta laboratorier tillämpar konsensusriktlinjer från American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) och Association of Molecular Pathology (AMP)² för

” Med bioinformatiska metoder filtreras sedan varianter bort som inte bedöms relevanta, exempelvis eftersom de i stora databaser har påträffats hos för många friska individer eller därför att de inte bedöms påverka det kodade proteinets funktion.

att bedöma huruvida vissa genvarianter orsakar sjukdom. Enligt dessa strikta riktlinjer bedöms varianter med flera olika, fastslagna kriterier och betecknas sedan efter ett schema som *patogena*, *sannolikt patogena*, *av osäker signifikans* (eng. "variant of uncertain significance", VUS), *sannolikt benigna* eller *benigna*. Svenska enheter för klinisk genetik brukar enbart rapportera patogena och sannolikt patogena varianter, medan externa laboratorier ibland även meddelar vissa varianter av osäker signifikans när de bedöms ha relativ hög sannolikhet att vara sjukdomsframkallande. Viktigt att notera är att denna interpretation av genvarianter ger uttryck för sannolikheten att varianten är sjukdomsframkallande, ofta i relation till alla andra genvarianter, och behöver tolkas tillsammans med patientens kliniska bild.³ Olika laboratorier skiljer sig avseende exakta metodologin, och det kan diskuteras vilka av åtskilliga datorprogram ("prediktionsverktyg") för bedömning av varianterna som är mest användbara för klinisk diagnostik. Invändningar har gjorts mot att ACMG/AMP-kriterier är svåra att tillämpa för mycket sällsynta sjukdomar. En rapport från genetiskt laboratorium innehåller ofta information om en eller flera genvarianter som anses relevanta för patientens kliniska bild, sammanfattande data om förekomsten av samma variant i olika databaser och om varianten anses ha en effekt som nämnvärt påverkar proteinet.

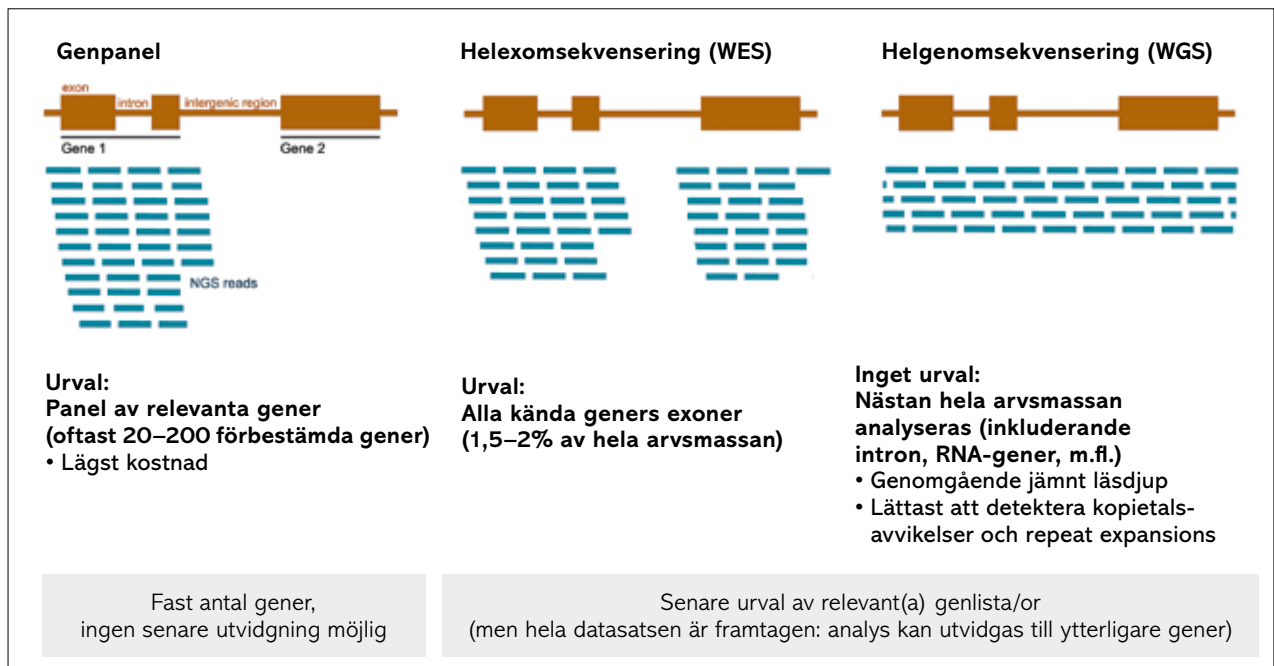
Neurologiska sjukdomar kan orsakas av olika typer av genvarianter. Direkt kan NGS-metoderna detektera varianter med en eller ett fåtal förändrade baser, som punktmutationer eller korta (upp till cirka 10–20 baser långa) insertioner eller deletioner. Med datordriven analys kan även deletioner eller multiplikationer (duplikationer, triplikationer, etc) av längre områden som exempelvis hela exon, gener eller kro-

mosomavsnitt identifieras, samt numera även expanderade basparsupprepningar (repeat expansions) upp till en viss längd⁴ men eftersom detta beror på indirekta metoder så är NGS-metoderna med automatiserad efteranalys ofta inte i stånd att med säkerhet utesluta sådana genvarianter. Vid hög klinisk misstanke på en sjukdom som orsakas av större deletion, multiplikation eller av repeat expansions kan kompletterande testmetoder behövas.

RÄTT TEST FÖR RÄTT PATIENT

Erfarenheter från stora patientserier som har analyserats genetiskt för utredning av neurologiska sjukdomar finns numera publicerade. Tillsammans ger dessa arbeten god vägledning avseende patientgrupper för vilka genetisk utredning kan förväntas leda fram till en diagnos. Andelen patienter i dessa publikationer som genom NGS-utredning har erhållit en genetisk diagnos varierar brett och beror av naturliga skäl på patienturval, om det användes smala eller breda testmetoder, hur funna varianters patogenicitet interpreterades och när i tiden analyserna genomfördes. Tabellen nämner några av dessa sjukdomsgrupper där god evidens för NGS-testningens effektivitet för att få en klar diagnos numera föreligger. Vid testning av de i tabellen nämnda patientgrupperna och visst urval av personer med yngre debutålder eller positiv familjeanamnes kan man i dag förvänta sig att erhålla en genetiskt verifierad diagnos hos varannan till var fjärde testad patient.

Samtidig analys av många gener med NGS-teknologi är särskilt värdefull när samma eller snarlika klinisk bild är kopplad till ett större antal gener. Även för många patienter med komplexa neurologiska syndrom med kombinationer av flera olika delsymtom (exempelvis epilepsi, intellektuell funk-



Figur 2: Genpanel, WES, och WGS. Jämförelse av genpanel, där enbart selekterade gener undersöks, med helxomsekvensering som analyserar proteinkodande delar av alla kända gener och helgenomsekvensering, som utan föregående urval tar fram bassekvensen av alla analyserbara delar av hela arvsmassan. De bruna rutorna representerar exon, i detta exempel visas två gener, och de blåa strecken indikerar överlappande korta "reads" med sekvensinformation. Modifierad ur Gorcenco S, Ilinca A, Almasoudi W, Kafantari E, Lindgren AG, Puschmann A. New generation genetic testing entering the clinic. *Parkinsonism Relat Disord.* 2020 Apr;73:72-84. doi:10.1016/j.parkreldis.2020.02.015, reproducerad med tillåtelse från Elsevier.¹

tionsnedsättning, rörelsestörning, neuropati, avvikande fynd i hjärn-MRI, dysmorf, kortvuxenhet, hudförändringar, andra somatiska sjukdomstecken, med flera) kan bred genetisk analys leda till diagnos. Om det dessutom finns hereditet för samma åkomma, eller om föräldrarna är besläktade, så ökar sannolikheten att en säker genetisk diagnos kan ställas genom NGS-test. Låg insjuknandeålder och hög svårighetsgrad av symtomen är vanligare hos i dag kända genetiska syndrom och ökar också sannolikheten att hitta en monogen orsak.

SNABB KUNSKAPSÖKNING

Eftersom NGS-metoder internationellt används allt mer i forskning och sjukvård, utvecklas kunskapen inom klinisk neurogenetik mycket snabbt. Nya genetiska syndrom och nya kopplingar av klinisk bild med genotyp publiceras nästan varje vecka, som de stora neurologiska och genetiska fakttidskrifternas innehållsförteckningar vittnar om. Nya studier intygar att även sjukdomsgrupper där genetisk orsak hittills inte var vedertagen härbärgerar ett stort antal patienter med genetisk diagnos: Hos 37 procent av över 3.000 patienter med cerebral pares utan perinatale händelser identifierade NGS-testning en monogen sjukdom,⁵ liksom hos 28 procent av 1.290 personer med epilepsi och intellektuell funktionsnedsättning.⁶

Den dynamiska kunskapsökningen gör att ovan nämnda databaser blir allt större och bättre, och studier har visat att förnyad genomgång av NGS-data ett fåtal år efter första analysen ger ett högre utbyte av diagnoser.³ Däremot har enbart en mindre andel patienter med vanliga neurologiska sjukdomar som stroke, Parkinsons sjukdom eller MS en monogen sjukdom. Undantag är fall med avvikande symtom eller kliniska fynd, samt de med ovanlig stark familjeanamnes eller ovanligt ung debutålder.⁷ För merparten av patienter med dessa vanligare neurologiska sjukdomar har intressanta modeller om samspel av varianter i flera eller många gener som varje för sig inte är tillräckliga att förklara sjukdomen (oligogen/polygen nedärvning) tagits fram, men dessa lämpar sig i dag inte för klinisk diagnostik.

VARFÖR UTREDA?

Patienter med svår eller komplex neurologisk sjukdom som genom NGS-test erhåller en entydig genetisk diagnos kan ofta avsluta en diagnostisk odysseé och en ibland lång tid med osäkerhet. Patienter som hittills enbart har fått en syndromdiagnos (exempelvis ”heredoataxi”) kan få veta exakt vilken subtyp de har. Diagnosen möjliggör för patient och vårdgivare att inhämta mer specifik information om sjukdomen, dess prognos och förväntade förlopp samt effekt av behandlingar. Den kan också leda till att patient- och anhörigföreningar bildas kring en specifik diagnos. NGS-gentestning har börjat användas allt tidigare i utredning, ibland som första tekniska undersökning inom neurologin, och kan undvika andra mer invasiva eller kostsamma undersökningar som muskel- och nervbiopsier, biokemiska specialanalyser, lumbalpunktioner. För ett fåtal sällsynta sjukdomar finns i dag kausal behandling, men antalet behandlingsbara sällsynta sjukdomar ökar. När exakta diagnosen är identifierad kan patienten på ett målinriktat sätt monitoreras för kända sjukdomsspecifika komplikationer (exempelvis kardiomyopati vid Friedreichs ataxi eller olika muskelsjukdomar), och vid upptäckt kan dessa då behandlas tidigt. Behandlingar som ibland används så länge andra differentialdiagnoser (exempelvis behandlingsförsök med immundämpande läkemedel) inte kan uteslutas kan undvikas. En exakt genetisk diagnos möjliggör genetisk vägledning samt deltagande i forskningsstudier om sjukdomens naturlförlopp och biomarkörer samt behandlingsstudier.⁸

Gentestning kan medvetandegöra för patienten och dess familj att sjukdomen även kan drabba andra i familjen eller släkten. När en recessiv sjukdom diagnostiseras kan däremot informationen ges att den som regel inte förs vidare till nästa generation. NGS-utredningar kan leda till fynd vars betydelse förblir oklar, exempelvis patogena varianter i en gen som inte är känd att leda till exakt den kliniska bild som patienten uppvisar, eller varianter av osäker signifikans. Det är därför en fördel att ha informerat patient och anhöriga om

Några möjliga indikationer för NGS test

Tabellen visar några exempel på patientgrupper inom neurologin där studier med NGS testning av större patientserier föreligger och där NGS-testning kan vara indicerad för klinisk utredning. Listan är inte fullständig. Andelen patienter som har erhållit en genetisk diagnos genom analysen (diagnostiskt utbyte) har successivt ökat i takt med att analysmetoderna och bioinformatisk databearbetning har förbättrats under senaste år. Den brukar vara högst vid nyare studier som använde WGS eller WES och lägre vid äldre studier med genpanelanalyser.

Sjukdom/-sgrupp	Antal analyserade patienter/familjer	Referens
Parkinsons sjukdom med tidig debut eller markant familjeanamnes	1.031	(Gorcenco, Ilinca et al. 2020) ¹
Kroniskt framskridande ataxi	Över 1.200	(Gorcenco, Ilinca et al. 2020) ¹
Neuropatier	17.198	(Winder, Tan et al. 2020) ⁹
Primära muskelsjukdomar	3.275	(Winder, Tan et al. 2020) ⁹
Epilepsi med intellektuell funktionsnedsättning	1.290	(Stefanski, Calle-Lopez et al. 2021) ⁶
Hereditär spastisk parapares	1.550	(Mereaux, Banneau et al. 2022) ¹⁰
Cerebral pares	2.419	(Srivastava, Lewis et al. 2022) ⁵

riskerna att gentestet inte ger entydiga svar. Ibland behövs senare blodprov från andra familjemedlemmar (patientens föräldrar) för att styrka eller tillbakavisa att varianter hos patienten är kopplade till sjukdomen.

NYA SJUKVÅRDSSTRUKTURER

NGS-sekvenseringsteknologi, tillsammans med lättillgänglig medicinsk information via internet, har skapat helt nya möjligheter för att diagnostisera och bemöta det stora antalet patienter med sällsynta neurologiska sjukdomar som hittills inte har fått en klar diagnos. Förutsättningar för att utreda och, med hjälp av på internet lättillgänglig medicinsk information [Faktaruta], att bli expert på sin patients sällsynta sjukdom finns nu för varje vårdgivare i landet. Det är svårt att tänka sig att utredning och vidare omhändertagande av det stora antalet patienter och familjer med sällsynta sjukdomar uteslutande kan komma att hanteras vid Sveriges få genetiska kliniker och neurologiska expertcentrum. Kring dessa centrum behöver snarare regionala och nationella nätverk av intresserade kliniker byggas upp, även för att säkerställa jämn tillgång till genetisk diagnostik oberoende på hemort och behandlande neurolog. Ett nationellt kvalitetsregister för sällsynta diagnoser (RaraSwed, <https://sodrasjukvardsregionen.se/centrum-for-sallsynta-diagnoser-csd-syd/kvalitetsregister/>) är under uppbyggnad, vilket bland annat vill möjliggöra att alla patienter med sällsynt diagnos snabbt kan identifieras när nya behandlingar eller behandlingsstudier för specifika sjukdomar lanseras. Arbetet för läkare och andra vårdgivare blir mycket mer tillfredsställande med exakta diagnoser och patienter och anhöriga uppskattar att få den uppmärksamhet inom sjukvården som motsvarar deras sjukdoms och livssituations svårighetsgrad.



ANDREAS PUSCHMANN
Överläkare, docent i neurologi,
Skånes Universitetssjukhus, Lund
andreas.puschmann@med.lu.se

REFERENSER

1. Gorcenco S, Ilinca A, Almasoudi W, Kafantari E, Lindgren AG and Puschmann A. New generation genetic testing entering the clinic. *Parkinsonism Relat Disord* 2020; 73:72-84.
2. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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. Gannamani R, van der Veen S, van Egmond M, de Koning TJ and Tijssen MAJ. Challenges in Clinico-genetic Correlations: One Phenotype - Many Genes. *Mov Disord Clin Pract* 2021; 8(3):311-321.
4. Ibanez K, Polke J, Hagelstrom RT, Dolzhenko E, Pasko D, Thomas ERA, Daugherty LC, Kasperaviciute D, Smith KR, WGS for Neurological Diseases Group, Deans ZC, Hill S, Fowler T, Scott RH, Hardy J, Chinnery PF, Houlden H, Rendon A, Caulfield MJ, Eberle MA, Taft RJ, Tucci A and Genomics England Research Consortium. Whole genome sequencing for the diagnosis of neurological repeat expansion disorders in the UK: a retrospective diagnostic accuracy and prospective clinical validation study. *Lancet Neurol* 2022; 21(3):234-245.
5. Srivastava S, Lewis SA, Cohen JS, Zhang B, Aravamuthan BR, Chopra M, Sahin M, Krueger MC and Poduri A. Molecular Diagnostic Yield of Exome Sequencing and Chromosomal Microarray in Cerebral Palsy: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol* 2022 Oct 24. doi:10.1001/jamaneurol.2022.3549.
6. Stefanski A, Calle-Lopez Y, Leu C, Perez-Palma E, Pestana-Knight E and Lal D. Clinical sequencing yield in epilepsy, autism spectrum disorder, and intellectual disability: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsia* 2021; 62(1):143-151.
7. Puschmann A. Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism Relat Disord* 2013; 19(4):407-415.
8. Ng KWP, Chin HL, Chin AXY and Goh DL. Using gene panels in the diagnosis of neuromuscular disorders: A mini-review. *Front Neurol* 2022; 13:997551.
9. Winder TL, Tan CA, Klemm S, White H, Westbrook JM, Wang JZ, Entezam A, Truty R, Nussbaum RL, McNally EM and Aradhya S. Clinical utility of multigene analysis in over 25,000 patients with neuromuscular disorders. *Neurol Genet* 2020; 6(2):e412.
10. Mereaux JL, Banneau G, Papin M, Coarelli G, Valter R, Raymond L, Kol B, Ariste O, Parodi L, Tissier L, Mairey M, Ait Said S, Gautier C, Guillaud-Bataille M, French SPATAX clinical network, Forlani S, de la Grange P, Brice A, Vazza G, Durr A, Leguern E and Stevanin G. Clinical and genetic spectra of 1550 index patients with hereditary spastic paraplegia. *Brain* 2022; 145(3): 1029-1037.

GLOSSAR

- **Monogen:** orsakad av varianter i en enda gen (en variant vid dominant nedärvning, två varianter – en i varje allel – vid recessiv nedärvning), innebär att varianterna har hög biologisk effekt.
- **Oligogen:** orsakad av varianter i ett fåtal olika gener. Polygen: orsakad av varianter i många olika gener som samspelar.
- **Variant:** neutralt uttryck för förändring i arvsmassan. Begreppet föredras numera framför beteckningen mutation för sjukdomsassocierad eller -framkallande genvariant och polymorfism för genvariant utan direkt inverkan på sjukdom eller annat kännetecken.

ANVÄNDBARA DATABASER

- **GeneReviews** (<http://www.genereviews.org/>): uppdaterade översikter för många genetiska sjukdomar.
- **Online Mendelian Inheritance in Man** (<https://www.omim.org/>): gener och genetiska sjukdomar.
- **Human Phenotype Ontology** (<https://hpo.jax.org/>): standardiserad terminologi för kliniska fenotyper och listor över gener som är kopplade till dessa.
- **ClinVar** (<http://www.clinvar.com/>): genetiska varianter och förekomst hos patienter.
- **gnomAD** (<https://gnomad.broadinstitute.org/>): frekvens av genetiska varianter i internationell datasamling.