

Mutațiile CFTR la pacienții cu fibroză chistică din Republica Moldova

Svetlana Sciuca¹, Oxana Turcu¹, Hans Georg Posselt², Patricia Fergelot³, Silke Hedtfeld⁴, Sylvie Labatut³, Christian Oberkanins⁵, Helene Pühringer⁵, Marie-Pierre Reboul³, Burkhard Tümmler⁴

¹Departamentul de pediatrie, clinica de pneumologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

²Universitäts-Kinderklinik, Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main, Germania;

³Service de génétique médicale, CHU de Bordeaux, Groupe Hospitalier Pellegrin, Bordeaux, Franța;

⁴Klinische Forschergruppe, Molekulare Pathologie der Mukoviszidose, Klinik für Pädiatrische Pneumologie, Allergologie und Neonatologie, Medizinische Hochschule Hannover, Germania;

⁵ViennaLab Diagnostics GmbH, Wien, Austria.

Autor corespondent:

Svetlana Sciuca, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Departamentul de pediatrie, clinica de pneumologie

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: svetlana.sciuca@usmf.md

Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Incidența fibrozei chistice și fonul genetic al mutațiilor CFTR în Republica Moldova, deocamdată, nu au fost determinate.

Ipoteza de cercetare

Distribuția mutațiilor genei CFTR în Moldova este similară cu cea din România și din țările ale căror predecesori au guvernat Moldova în trecut (Imperiul Otoman, Imperiul Rus / Uniunea Sovietică).

Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Din câte cunoaștem, acesta este primul raport al distribuției mutațiilor CFTR în Moldova.

Rezumat

Introducere. Spectrul de mutații ce cauzează fibroză chistică (FC) în Republica Moldova, deocamdată, nu a fost determinat.

Material și metode. Analiza mutației genei CFTR a fost efectuată pe mostre de ADN, colectate de la 61 de pacienți cu FC, examinați în Departamentul de pediatrie, clinica de pneumologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, în perioada anilor 2006-2011.

CFTR mutations of patients with cystic fibrosis from Republic of Moldova

Svetlana Sciuca^{1*}, Oxana Turcu¹, Hans Georg Posselt², Patricia Fergelot³, Silke Hedtfeld⁴, Sylvie Labatut³, Christian Oberkanins⁵, Helene Pühringer⁵, Marie-Pierre Reboul³, Burkhard Tümmler⁴

¹Department of pediatrics, division of pneumology, Nicolae Testemitanu State Medical and Pharmaceutical University, Chisinau, Republic of Moldova;

²Universitäts-Kinderklinik, Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main, Germany;

³Service de génétique médicale, CHU de Bordeaux, Groupe Hospitalier Pellegrin, Bordeaux, France;

⁴Klinische Forschergruppe, Molekulare Pathologie der Mukoviszidose, Klinik für Pädiatrische Pneumologie, Allergologie und Neonatologie, Medizinische Hochschule Hannover, Germany;

⁵ViennaLab Diagnostics GmbH, Wien, Austria.

Corresponding author:

Svetlana Sciuca, PhD, university professor

Department of pediatrics, Division of pneumology

Nicolae Testemitanu State Medical and Pharmaceutical University

165, Ștefan cel Mare și Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova

e-mail: svetlana.sciuca@usmf.md

What is not known, yet, about the topic

The incidence of cystic fibrosis and the population genetics of CFTR mutations have yet not been determined in Moldova.

Research hypothesis

The distribution of CFTR gene mutations in Moldova is similar to that in Romania or in states whose predecessors had governed Moldova in the past (Ottoman Empire, Russian Empire / Soviet Union).

Article's added novelty on this scientific topic

To our knowledge, this is the first report on the distribution of CFTR mutations in Moldova.

Abstract

Introduction. The spectrum of cystic fibrosis (CF) – causing mutations in Republic of Moldova has yet not been determined.

Material and methods. CFTR gene mutation analysis was performed on DNA samples from 61 patients with CF seen 2006-2011 at the Department of pediatrics, Division of pneumology, Nicolae Testemitanu State Medical and Pharmaceutical University.

Rezultate. Mutațiile cu o frecvență mai mare de 3% au fost următoarele: F508del (57%), 2789+5 G-A (4%), 2184insA (4%) și G542X (3%).

Concluzii. Distribuția mutației genei *CFTR* în Moldova este similară cu cea din România.

Cuvinte cheie: fibroză chistică, gena *CFTR*, mutație, Moldova.

Introducere

Moldova este un stat din Europa de Est, localizat între România (Vest) și Ucraina (Nord, Est și Sud). Populația este eterogenă din punct de vedere etnic. Compoziția etnică a părții principale a țării sub conducerea guvernării centrale este: moldoveni / români (78,8%), ucraineni (8,4%), ruși (6,0%), găgăuzi (4,4%), și câteva minorități - bulgari, rromi, evrei (date colectate din recensământul din 2004) [1].

Incidența FC și a mutației *CFTR* în populație, deocamdată, nu a fost determinată în Moldova. Din câte știm noi, aceasta este prima raportare a distribuției mutației *CFTR* în Moldova.

Material și metode

Mostrele sangvine K-EDTA au fost colectate de la 61 de persoane cu FC care au fost examinate în Clinica de pneumologie pediatrică a USMF „Nicolae Testemițanu” în perioada 2006-2011. Diagnosticul clinic de FC a fost pus pe bază de simptome de boală sinopulmonară cronică și / sau de anomalii gastrointestinale / nutriționale și care au fost confirmate prin valori ale testului de sudorație mai mari de 60 mmol/L, efectuat prin sistemele *Macroduct* (*Wescor*, SUA) sau *Exsudose systems* (*TEM*, Lormont, Franța).

ADN-ul leucocitar a fost extras din mostrele sangvine în concordanță cu protocoalele locale din Bordeaux, Chișinău și Hanovra, respectiv. Mostrele ADN, colectate în perioada 2006-2009, au fost supuse unui screening pentru mutații *CFTR* cu ajutorul testării ELUCIGENE™ CF29 (*Gene-Probe Life Sciences Ltd.*, Marea Britanie). Cele 50 de probe, colectate în 2010, au fost testate, mai întâi, pentru statutul F508del, și testate, ulterior, cu ajutorul CF StripAssay (*ViennaLab Diagnostics GmbH*, Austria; 24 de mostre), care detectează 34 de mutații *CFTR* și variantele poliT IVS8, sau testate printr-un screening-cascadă completă de mutații (13 mostre), după cum urmează. În primul rind, mostrele au fost testate pentru 35 de mutații frecvente la caucazieni prin PCR multiplex și ulterioare hibridizări blot (INNO-LiPA *CFTR19* și *CFTR17+Tn*, *Innogenetics*, Belgia). Apoi, promotorul *CFTR*, 5'UTR și 27 de exoni (inclusiv, joncțiunea intron-exon), au fost analizați prin secvențierea produselor PCR cu terminatori colorați, utilizând dispozitivul ABI 3130 (*Applied Biosystems*, USA). Informația despre secvențele primerilor, condițiile PCR și procedurile de secvențiere sunt disponibile la cerere.

Rezultate

Tabelul 1 reprezintă o listă de distribuție a mutațiilor *CFTR* în cohortă, investigate la pacienți cu FC din Moldova. La nivel mondial, cea mai frecventă mutație este F508del [2] și a fost identificată la 54,7% dintre alelele FC (70/122). A doua cea

Results. Mutations with a frequency of more than 3% were F508del (57%), 2789+5 G-A (4%), 2184insA (4%) and G542X (3%).

Conclusions. The distribution of *CFTR* gene mutations in Moldova is similar to that in Romania.

Key words: cystic fibrosis, *CFTR* gene, mutation, Moldova.

Introduction

Moldova is a state in Eastern Europe, located between Romania to the West and Ukraine to the North, East and South. The population is ethnically heterogeneous. The ethnic composition of the main part of Moldova under the central government control are Moldovans / Romanians (78.0%), Ukrainians (8.4%), Russians (6.0%), Gagauzians (4.4%) and several minorities such as Bulgarians, Gypsies and Jews (data taken from the 2004 census) [1].

The incidence of CF and the population genetics of *CFTR* mutations have yet not been determined in Moldova. To our knowledge, this is the first report on the distribution of *CFTR* mutations in Moldova.

Material and methods

K-EDTA blood samples were taken from 61 individuals with cystic fibrosis (CF) who had been seen at the Department of pediatrics, Division of pneumology, *Nicolae Testemitanu* State University of Medicine and Pharmacy between 2006 and 2011. The clinical diagnosis of CF had been made by symptoms of chronic sinopulmonary disease and/or gastrointestinal / nutritional abnormalities and had been confirmed by a sweat chloride value >60 mmol/L in sweat tests performed with either the *Macroduct* (*Wescor*, USA) or the *Exsudose systems* (*TEM*, Lormont, France).

Leukocyte DNA was extracted from the blood samples according to in-house protocols at the sites Bordeaux, Chisinau and Hannover, respectively. The DNA samples collected between 2006 and 2009 were screened for *CFTR* mutations by the ELUCIGENE™ CF29 assay (*Gene-Probe Life Sciences Ltd*, United Kingdom). The 50 samples collected in 2010 were first assessed in their F508del status and were then further analyzed by either the CF StripAssay (*ViennaLab Diagnostics GmbH*, Austria; 24 samples) that tests 34 *CFTR* mutations and the IVS8 polyT variants or by a comprehensive cascade mutation screening (13 samples) as follows: first, the specimens were screened for 35 frequent mutations in Caucasians by multiplex PCR and subsequent reverse blot hybridization (INNO-LiPA *CFTR19* and *CFTR17+Tn*, *Innogenetics*, Belgium). Next, the *CFTR* promoter, 5' UTR and 27 exons (including the intron-exon junctions) were analyzed by sequencing of PCR products with Dye Terminators on a ABI 3130 (*Applied Biosystems*, USA). Information about primer sequences, PCR conditions and sequencing procedures are available upon request.

Results

Table 1 lists the distribution of *CFTR* mutations in the investigated cohort of Moldovan CF patients. The worldwide most common mutation F508del [2] was identified on 57.4%

mai frecventă mutație este 2789+5 G-A (4,1 %). Alte mutații, cu o frecvență mai mare de 2%, sunt G542X și 2184insA (Tabelul 1).

Testele ELUCIGENE, INNO-LiPA și testul FC cu benzi a cuprins 80% dintre alelele FC. În contrast, secvențierea *in-depth*, a indentificat mutațiile ce cauzează FC la toți cei 13 subiecți investigați, inclusiv 6 mutații rare [3] și o mutație *frameshift*, deocamdată nedescrisă, situată în exonul 5 663dupT (c.531dupT). Doi subiecți sunt homozigoți pentru mutația non-F508del, aceasta însemnând mutația *frameshift* 4015delA și mutația intronului 19 splice 3849 + 10 kb C-T, respectiv.

of CF alleles (70/122). The second most common mutation was 2789+5 G-A (4.1%). Further mutations with a frequency of more than 2% were G542X and 2184insA (Table 1).

The ELUCIGENE, INNO-LiPA and CF Strip Assay covered about 80% of the CF alleles. In contrast, the *in-depth* sequencing identified both CF-causing mutations in all 13 investigated subjects including six known rare mutations [3] and the yet undescribed frameshift mutation in exon 5 663dupT (c.531dupT). Two subjects were homozygous for a non-F508del mutation, i.e. the frameshift mutation 4015delA and the intron 19 splice mutation 3849+10 kb C-T, respectively.

Tabelul 1

Distribuția mutațiilor CFTR la indivizii cu fibroza cistică din Moldova

Table 1

Distribution of CFTR mutations in Moldovan individuals with cystic fibrosis

Mutația CFTR (CFTR mutation)	nr. de alele (no. of alleles)	Moldova, %	România, % (Romania), % [4]	Ucraina de vest, % (W. Ukraine), % [5]	Rusia, % (Russia), % [2]	Turcia, % (Turkey), % [2]
F508del (c.1520_1522CTT)* ^{§¶}	70	57.4	56.3	54.2	54.4	24.5
2789+5 G>A (c.2657+5G>A)* ^{§¶}	5	4.1	0.4			
2184insA (c.2052_2053insA) [#]	4	4.0 [§]		7.2		
G542X (c.1624G>T)* ^{§¶}	4	3.3	3.9	2.7	0.9	2.6
CFTRdele2,3 (21 kb) (c.54_273) ^{§¶}	2	2.0 [§]	1.6	4.2	5.0	
1898+1 G>A (c.1766+1G>A)* ^{§¶}	2	1.6		1.1		
3849+10 kb C>T (c.3717+12191C>T)* ^{§¶}	2	1.6	0.4	0.8		
W1282X (c.3846G>A)* ^{§¶}	2	1.6	2.3	2.3	1.0	
4015delAC (c.3883delA)	2	1.6				
N1303K (c.3909C>G) * ^{§¶}	2	1.6	0.8	4.9		2.9
185+1G>T (c.53 + 1G>T)	1	0.8		0.4		
296+1G>C (c.164 + 1G>C)	1	0.8				
G85E (c.254G>A)* ^{§¶}	1	0.8				
621+1G>T (c.489 + 1G>T)* ^{§¶}	1	0.8	0.8	0.8		2.6
663dupT (c.531dup)	1	0.8				
1248+1G>A (c.1116 + 1G>A)	1	0.8				
1677delTA (c.1545_1546delTA)	1	0.8	0.4		0.8	4.1
G551D (c.1652G>A)* ^{§¶}	1	0.8				
R553X (c.1657C>T)* ^{§¶}	1	0.8		0.4	3.5	
Necunoscut (Unknown)	18	14.8	27.7	16.3		
Total	122	100				

Note: Mutations are designated by their common legacy name followed by the cDNA name in parenthesis. The mutation in italics is novel. Percentage (%) of alleles is only given if the whole panel of 122 CF chromosomes (no symbol) or the 2010 subset of 100 CF chromosomes (symbol: [§]) were tested for this mutation. *^{§¶} Mutation is included in the ELUCIGENE™ CF29 (*), INNO-LiPA ([§]) and/or the CF StripAssay ([#]) mutation detection panels. [¶]Distribution of F508del genotypes: F508del/F508del: n=25 (41%); F508del/non-F508del: n=20 (33%); non-F508del/non-F508del: n=11 (18%), unknown mutation n=5 (8%).

Notă: Mutațiile sunt designate cu denumirile lor conventionale, urmate în paranteze de denumirile lor conform ADN-ului. Mutațiile scrise în stil italic sunt noi. Procentajul (%) alelelor este dat doar în cazul când a fost testată toată gama 122 a cromosomului FC (fără simbol) sau subsetul 2010 din 100 de cromosomi FC (simbol: [§]). *^{§¶} Mutația este inclusă în ELUCIGENETM CF29 (*), INNO-LiPA ([§]) și/sau în panoul de detecție a mutațiilor FC StripAssay ([#]). Distribuția genotipurilor F508del: F508del/F508del: n=25 (41%); F508del/non-F508del: n=20 (33%); non-F508del/non-F508del: n=11 (18%), mutații necunoscute n=5 (8%).

Discuții

Analiza mutației *CFTR* a identificat F508del și 2789+5 G-A ca fiind mutații majore ce cauzează FC printre populația contemporană din Moldova. În lume, mutațiile frecvente au fost detectate în proporție de 80% pe cromosomii FC. Cu alte cuvinte, 20% dintre alelele FC la populația din Moldova sunt rare, private sau, deocamdată nedescrise.

Tabelul 1 compară spectrul mutațiilor *CFTR* în Moldova și țările vecine, România [4] și Ucraina [5], și cu țările, ale căror predecesori au guvernat Moldova în trecut (Imperiul Otoman, Imperiul Rus, Uniunea Sovietică) [2]. Dintre țările enumerate în Tabelul 1, distribuția mutațiilor *CFTR* în Moldova cel mai mult se aseamănă cu cea din România. Mutațiile de origine slavă (*CFTR*del2,3 (21kb), 2184insA) sunt mai puțin frecvente în Republica Moldova, comparativ cu Rusia și Ucraina [5, 6].

În cadrul acestui studiu, evaluarea *StripAssay* al FC a fost efectuată în condiții de diagnostic standard. Acest test de hibridizare inversă scanează cele 23 de mutații ale *CFTR*, recomandate de către Colegiul American de Genetică Medicală [7], plus 11 mutații adiționale, ce prevalează în diferite părți ale Europei. Testul *StripAssay* pentru FC s-a dovedit a fi rapid și a oferit rezultate absolute și reproductibile ale genotipurilor *CFTR*. Una dintre posibilele aplicații în practică a *StripAssay* ar putea fi *screening*-ul neonatal al mostrelor cu nivele elevate de tripsină imunoreactivă. O rată de detectare a mutațiilor de 80% a fost obținută la cromosomii CF din Moldova. Acest grad de acoperire este acceptabil în calitate de compromis pentru ratele fals negative ale copiilor afectați (0 mutații) și rate reduse, fals pozitive, ale purtătorilor neafectați [7].

Conflict de interese

Autorii declară lipsa conflictelor de interese.

Contribuția autorilor

Toți autorii au contribuit în mod egal la realizarea studiului și la elaborarea manuscrisului.

Referințe / references

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Moldova#Languages>
2. Bobadilla J., Macek M. (Jr), Fine J., Farrell P. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of *CFTR* mutations – correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*, 2002; 19 (6): 575-606.
3. <http://genet.sickkids.on.ca/app>
4. Frențescu L., Brownsell E., Hinks J. *et al.* The study of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in a group of patients from Romania. *J Cyst Fibros*, 2008; 7: 423-8.
5. Makukh H., Krenková P., Tyrkus M. *et al.* A high frequency of the Cystic Fibrosis 2184insA mutation in Western Ukraine: genotype-

Discussion

CFTR mutation analysis identified F508del and 2789+5 G-A as the two major CF-causing mutations in the contemporary Moldovan patient population. Worldwide common mutations were detected on about 80% of CF chromosomes. In other words, 20% of the CF alleles in the Moldovan population are rare, private or yet undescribed regional *CFTR* mutations.

Table 1 compares the spectrum of *CFTR* mutations in Moldova with that in its neighbors Romania [4] and Ukraine [5] and with that in states whose predecessors had governed Moldova in the past (Ottoman Empire, Russian Empire / Soviet Union) [2]. Of the states listed in Table 1, the distribution of *CFTR* mutations in Moldova is most similar to that in Romania. Mutations of Slavic origin (*CFTR*dele2,3 (21kb), 2184insA) are less frequent in Republic of Moldova than in Ukraine or in Russia [5, 6].

Within the frame of this study the novel CF *StripAssay* was tested under routine diagnostic settings. This reverse-hybridization assay scans the 23 *CFTR* mutations recommended by the American College of Medical Genetics [7] plus 11 additional ones prevalent in different parts of Europe. In our hands the CF *StripAssay* was rapid and yielded unequivocal and reproducible *CFTR* genotypes. One of the possible applications of the *StripAssay* could be CF neonatal screening on samples with a raised immunoreactive trypsin. A mutation detection rate of 80% was achieved for CF chromosomes in Moldova. This mutation coverage is accepted as a compromise to have low false negative rates of affected babies (0 mutation) and low positive rates of unaffected carriers [7].

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' contribution

All authors contributed equally in conducting research and writing of the manuscript.

phenotype correlations, relevance for newborn screening and genetic testing. *J Cyst Fibros*, 2010; 9: 371-5.

6. Dörk T., Macek M. (Jr), Mekus F. *et al.* Characterization of a novel 21-kb deletion, *CFTR*dele2,3 (21kb), in the *CFTR* gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet*, 2000; 106: 259-68.
7. http://www.acmg.net/Pages/ACMG_Activities/stds-2002/cf.htm
8. Castellani C., Southern K., Brownlee K. *et al.* European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros*, 2009; 8: 153-73.