

## DNA-alfa-1-antitrypsin, sekvens, DNA

Gäller för  
Klinisk kemi

LU

## DNA- alfa- 1- antitrypsin, sekvens med Big Dye Direct

### Bakgrund, indikation och tolkning

Proteinet alfa-1-antitrypsin (A1AT, AAT) är en av kroppens viktigaste proteashämmare och tillhör proteinsuperfamiljen serpiner. Ärftlig alfa-1-antitrypsinbrist predisponerar för kronisk obstruktiv lungsjukdom och leversjukdom, främst cirrhos och hepatocellulärt carcinom, men alfa-1-antitrypsinbrist har också kopplats till ovanligare tillstånd som pannikulit och vaskulit [1, 2].

Olika fenotyper klassificeras oftast med ett PI-system (PI=proteasinhämmare), där namnet på den ärvda allelen beskrivs med en bokstav som beskriver migrationen av proteinvarianten vid isoelektrisk fokusering. Exempel på detta är PI\*MM som motsvarar individer som är homozygota för den normala "M"-allelen och PI\*ZZ som indikerar homozygoti för "Z"-allelen.

Runt en halv miljon svenskar har någon form av alfa-1-antitrypsinbrist. Den kliniska relevansen och den ungefärliga prevalensen av de vanligaste bristvarianterna ses i **tabell 1** nedan [3]. De två vanligaste genetiska varianterna som är kopplade till sänkt halt av AAT i plasma och ärftlig AAT-brist är Z-allelen respektive S-allelen. Båda har sitt ursprung i punktmutationer som ger upphov till ett aminosyraskifte men i olika delar av genen. Om man vill verifiera den specifika alleluppsättningen hos den enskilda patienten kan man utföra genetisk analys.

Genen *SERPINA1* som kodar för proteinet AAT ligger på kromosom 14 (14q31-32.3). *SERPINA1* har flera olika spliceformer men endast en isoform av proteinet har beskrivits. Genen är 13,9 Kb och den längsta spliceformen består av tre icke kodande och fyra kodande exon. Olika exonnumreringar förekommer p.g.a. de olika spliceformerna. Flera genetiska varianter har beskrivits, där de vanligaste är "Z-allelen" (*SERPINA1*:c.1096G>A, p.Glu366Lys) och "S-allelen" (*SERPINA1*:c.863A>T, p.Glu288) [3]. Eftersom olika referenssekvenser och nomenklatur har använts genom åren kallas exempelvis Z-mutationen nu p.Glu366Lys istället för p.Glu342Lys. För valda referenssekvenser se **tabell 2**.

Alfa-1-antitrypsinvarianter kan grupperas enligt olika karakteristika där såväl kvantitativa som kvalitativa störningar kan identifieras. Den kliniska bilden påverkas av både variantens karaktär och om patienten är enkel eller dubbel anlagsbärare.

**DNA-alfa-1-antitrypsin, sekvens, DNA**Gäller för  
Klinisk kemi

LU

PI-typ	Klinisk bild	Prevalens i Sverige
PI MM	Normal.  Inga hållpunkter för hereditär alfa-1-antitrypsinbrist.	ca 91%.
PI MS	Patienten är heterozygot för alfa-1-antitrypsinbrist.  MS är inte kopplad till ökad risk för lung- eller leversjukdom.	4-5%
PI FM	Patienten är heterozygot för en genetisk alfa-1-antitrypsinvariant utan känd klinisk signifikans.	
PI MZ	Lätt brist.  Patienten är heterozygot för alfa-1-antitrypsinbrist.	4-5%.
PI FS	Patienten är dubbelheterozygot för alfa-1-antitrypsinbrist av typen S samt alfa-1-antitrypsinvarianten F.  Ingen känd koppling föreligger mellan FS och ökad risk för lungsjukdom.	
PI SZ	Måttlig brist.  Patienten är dubbelheterozygot för alfa-1-antitrypsinbrist.  SZ är kopplad till ökad risk för emfysem.	ca 0,1%
PI FZ	Patienten är dubbelheterozygot för alfa-1-antitrypsinbrist av typen Z samt alfa-1-antitrypsinvarianten F.  FZ kan vara kopplad till lätt ökad risk för emfysem	
PI ZZ	Svår brist.  Patienten är homozygot för alfa-1-antitrypsinbrist.  ZZ är bland annat kopplad till ökad risk för emfysem och leversjukdom	ca 0,05%
PI SS	Patienten är homozygot för alfa-1-antitrypsinbrist.  SS är inte kopplad till ökad risk för lungsjukdom.	ca 0,06%
PI FF	Patienten är homozygot för en genetisk alfa-1-antitrypsinvariant utan känd klinisk signifikans.	

**Tabell 1.** Klinisk signifikans och ungefärlig prevalens i Sverige av de vanligaste alfa-1-antitrypsinvarianterna [3].

**DNA-alfa-1-antitrypsin, sekvens, DNA**Gäller för  
Klinisk kemi

LU

Gen	Allelbeteckning	dbSNP rs-nr	Nomenklatur	Refseq
<i>SERPINA1</i>	Z	rs28929474	c.1096G>A	NM_001002236.2
			p. Glu366Lys	NP_000286.3
			g.17083G>A	NG_008290.1
<i>SERPINA1</i>	S	rs17580	c.863A>T	NM_001002236.2
			p.Glu288Val	NP_000286.3
			g.14768A>T	NG_008290.1
<i>SERPINA1</i>	F	rs28929470	c.739C>T	NM_001002236.2
			p.Arg247Cys	NP_000286.3
			g.14644C>T	NG_008290.1

**Tabell 2.** Valda referenssekvenser.**Analysprincip**

Sekvenseringsmetoden syftar till att sekvensbestämma samtliga exon och exon/intron gränser samt 3'UTR. Först görs den primära PCR reaktionen, då delar av den specifika genen amplifieras ifrån isolerat genomiskt DNA med genspecifika, tailade (M13) primers. PCR-produkterna används därefter i en sekvens-PCR-reaktion med universella primers och efterföljande rening. Härfter görs analys med kapillärelektrofores. Sekvensdata produceras genom att "basecalling" utförs på rådata. Data jämförs sedan sinsemellan och mot en känd referenssekvens genom analys med SeqScape.

**Referensintervall**

Ej tillämbart.

**Metodkaraktistika****Interferenser och felkällor**

Om DNA provet innehåller kontamination som t.ex. inhibitorer så ser vi det som frånvaro av signal och ett omprov får göras. Principiellt kan andra homologa DNA-sekvenser hybridisera med primers och ge felaktig information. Detta har eliminerats i den initiala optimeringen av metoden och sedermera validerats. Alignment av provsekvens och referenssekvens visar detta i så fall. Eftersom sekvensdataba-

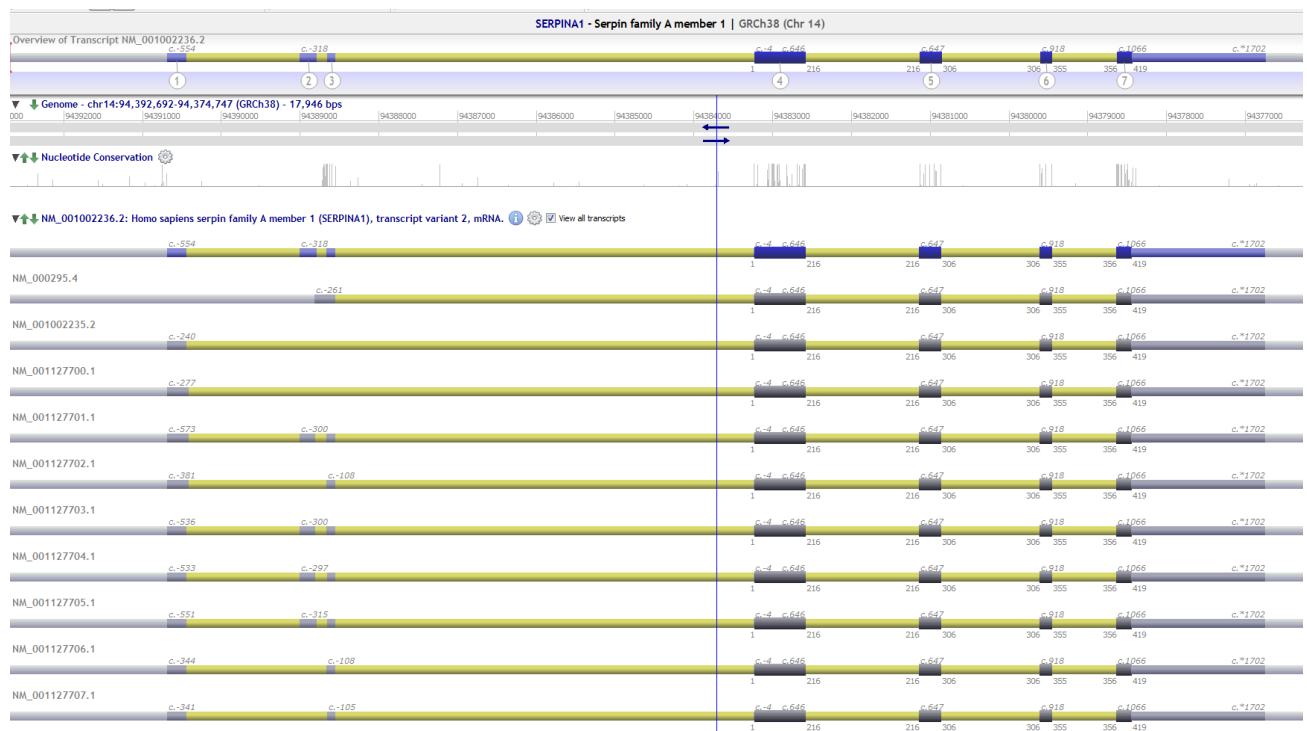
**DNA-alfa-1-antitrypsin, sekvens, DNA**Gäller för  
Klinisk kemi

LU

sen innehåller många sekvenser och vi normalt genererar mycket DNA-sekvens från varje individ erhålls en mycket god bild av polymorfimönstret för varje individ. Detta kan användas för att konfirmera korrektheten hos DNA-sekvensen.

**Mätområde**

Serpina1 NCBI RefSeqGene NG\_008290. Transkriptöversikt tagen från Alamut 2017-11-30.

**Detektionsgräns**

4 ng patient-DNA används i reaktionen.

Utarbetad av

Dokumentförvaltare

Dokument id

Athina Papadopoulou 161427

C-10389

**DNA-alfa-1-antitrypsin, sekvens, DNA**Gäller för  
Klinisk kemi

LU

**Mätosäkerhet**

Ej tillämbart.

**Spårbarhet**

Serpina1 NCBI RefSeqGene NG\_008290. SERPINA1 har 11 beskrivna isoformer och samtliga dessa har identiska proteinkodande sekvenser. Dock skiljer sig 3'UTR mellan de olika formerna. Någon vävnadsspecificitet för dessa isoformer finns inte beskriven. Den valda NM-sekvensen (NM\_001002236.2) representerar ett av de längre transkripten.

Gen	RefSeq
SERPINA1	NG_008290
	NM_001002236.2
	NP_001002236.1

Samtliga primers blastades med NCBI PRIMER BLAST, se valideringsrapport från 2014 .

**Imprecision**

Akrediterings-CV är ej tillämbart på kvalitativ analys.

**Riktighet**

Metodens riktighet är ställd mot referenssekvens Serpina1 NCBI RefSeqGene NG\_008290 samt att metodens riktighet bedöms efter jämförelse med publicerade sekvenser på tidigare utförd sekvensering.

Vid metodvalideringen sekvenserades 7 prover med känd PI-fenotyp, med perfekt överensstämmelse mellan fenotyp och genotyp. Ytterligare fem prover med förmodat skandinaviskt ursprung sekvenserades för att få en uppfattning om polymorfimönstret. Bland dessa hittades inga Z-eller S-alleler. Fyra patientprover sekvenserades för att identifiera eventuella sjukdomsframkallande mutationer. Sex prover med känd PI-fenotyp och som ingår i en masspektrometristudie sekvenserades i sin helhet för att ytterligare bekräfta metodens riktighet och funktion. PI-fenotyperna bekräftades av sekvensresultaten för alla sex proverna. Se AAT Valideringsrapport.

Utarbetad av

Dokumentförvaltare

Dokument id

Athina Papadopoulou 161427

C-10389

## **DNA-alfa-1-antitrypsin, sekvens, DNA**

Gäller för  
Klinisk kemi

LU

---

### **Ackreditering**

Metoden är ej ackrediterad.

### **Referenser**

1. Fregonese, L. and J. Stolk, *Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences*. Orphanet J Rare Dis, 2008. **3**: p. 16.
2. Peter Nilsson-Ehle, M.B.S., Elvar Theodorsson, ed. *Laurells klinisk kemi*. 9th ed. 2012, Studentlitteratur.
3. Blanco, I., et al., *Estimated numbers and prevalence of PI\*S and PI\*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries*. Eur Respir J, 2006. **27**(1): p. 77-84.