

PRIKAZ DVIJE RIJETKE MUTACIJE U CISTIČNOJ FIBROZI

VIDA ČULIĆ¹, LIVIO BALARIN¹, HANNELORE ZIERLER², JADRANKA SERTIĆ³, SRDANA ČULIĆ¹, BISERKA REŠIĆ¹, BERNARDA LOZIĆ¹, DARINKA GLAMUZINA⁴, DRAGAN PRIMORAC¹, MARINO KALITERNA⁵, TADE TADIĆ⁵, STIPAN JANKOVIĆ¹, KLAUS WAGNER²

Cistična fibroza najčešća je autosomno-recesivno nasljedna bolest epitela egzokrinih žlijezda. U populaciji je učestalost heterozigota 1:20, a bolest se javlja u otprilike 1:2500 poroda, što se razlikuje među etničkim skupinama. Dijagnoza se temelji na nalazu povišene koncentracije klorida u znoju, a kliničkom slikom dominiraju kronična plućna bolest i malapsorpcija. Cistična fibroza uzrokovana je promjenom u genu koji se nalazi na dugom kraku 7. kromosoma (7q31.2), a zauzima 250 kb i sadržava 27 egzona. Ekspresija ovoga gena povezana je s patofiziologijom bolesti i stvaranjem CFTR-proteina, tj. "cystic fibrosis transmembrane regulator protein" koji se sastoji od 1480 aminokiselina.

U genetskom savjetovaštvu u Splitu ispitivane su dvije obitelji s cističnom fibrozom, te je genetska analiza izvršena u Grazu, Austrija. Nađeni su ovi genotipovi: $\Delta F508/3849+1G \rightarrow A$ (Exon 19) i $\Delta F508/E585X$ (Exon 12). Prenatalna dijagnoza uspješno je izvršena u obitelji s genotipom $\Delta F508/E585X$ (Egzon 12). Prikazat ćemo dva bolesnika s cističnom fibrozom, opisati njihove kliničke slike i obiteljsko stablo. Istaknut ćemo jednu bolesnicu s teškim fenotipom i rijetkim genotipom ($\Delta F508/E585X$) koji smo ustanovili indirektnim putem od zdravih roditelja (heterozigota).

Deskriptori: CISTIČNA FIBROZA-genetika; FENOTIP; MUTACIJA; CISTIČNI FIBROZNI TRANSMEMBRANSKI REGULACIJSKI GEN PROVOĐLJIVOSTI-genetika

UVOD

Cistična fibroza (CF) najčešća je autosomno-recesivna nasljedna bolest epitela egzokrinih žlijezda, a prosječnom incidencijom homozigota (bolesnih) 1:2500, a heterozigota (nosioca) je 1:20. Učestalost varira u različitim etničkim i zemljopisnim skupinama (1, 2).

Kliničkom slikom cistične fibroze dominira kronična plućna bolest i malapsorpcija, a dijagnoza se temelji na nalazu povišenih vrijednosti klorida u znoju. Kliničke promjene nastaju uslijed poremećenog elektrolitnog transporta u raz-

nim organima kao što su pluća, žlijezde znojnice, gušterača i crijeva. Bolest je posljedica pogrešnog odgovora cikličnog AMP-a za transport kloridnih jona u epitelnim stanicama egzokrinih žlijezda (1, 2).

CFTR gen (cystic fibrosis transmembrane regulator protein) nalazi se na 7. kromosomu (7q31.2). Protein se sastoji od 12 transmembranskih i 3 intracitoplazmatske domene. Transmembranski dio je organiziran u dva puta po 6 alfa uzvojnica, koje okružuju dva kanala u membrani, a služe za prolaz kloridnih jona kroz hidrofobnu strukturu membrane. Povećana koncentracija cAMP-a u stanici djeluje kao signal za aktivaciju protein kinaze, koja je odgovorna za fosforilaciju CFTR proteina. Konformacijska promjena proteina ima za posljedicu otvaranje kanala i pasivni prolaz kloridnih jona iz stanice u vanstanični okoliš (1, 2).

Cističnu fibrozu uzrokuje mutacija u jednom genu, pa se ona smatra glavnim kandidatom za gensku terapiju (3, 4). Otprilike pola opisanih mutacija u CFTR-u nastaju zamjenom jedne aminokiseline (missense mutacije). Ostale mu-

tacije su: nonsense, frame shift (uslijed insercije ili delecije malog broja nukleotidnih parova) i splice-site mutacije (6, 7, 11). Glavna intragenska mutacija je delecija 508. troslovnog zapisa u desetom egzonu ($\Delta F508$), koji je odgovoran za aminokiselinu fenilalanin. Nalazimo je kod 70% svih bolesnika sa CF, a preostalih 30% pripada drugim, vrlo rijetkim mutacijama.

Genska analiza ovih promjena moguća je RFLP metodom (restriction fragment length polymorphism) (1, 5, 6, 7).

Zemljopisna distribucija mutacija nije slučajna. Učestalost mutacija u prvoj citoplazmatskoj domeni koja veže ATP veća je od učestalosti u drugoj domeni. Incidencija CF varira u različitim krajevima svijeta i unutar različitih naroda. U Europi i Aziji, u područjima koja graniče s Europom, postoje razlike u broju bolesnika s $\Delta F508$ mutacijom od sjevera prema jugu. Najveća učestalost $\Delta F508$ mutacije je u Danskoj i Engleskoj, a najmanja u Izraelu i Turskoj (1, 2, 7, 14). U različitim regijama Europe otkriveno je do sada oko 55 čestih mutacija. Kod manje od 1% bolesnika nađeno je 217 rijetkih mutacija

¹ Klinička bolnica Split

² Institut für Medizinische Biologie und Humangenetik, Graz, Austria

³ Klinički bolnički centar Zagreb

⁴ Klinička bolnica Mostar

⁵ University of Connecticut Health Centre, Connecticut, USA

Adresa za dopisivanje:

Mr. sc. dr. Vida Čulić, Klinička bolnica Split, Klinika za dječje bolesti, Odsjek za razvojnu neurologiju i medicinsku genetiku s laboratorijem za humanu (cito) genetiku i genetskim savjetovaštvom, Spinićeva 1, 21000 Split, Hrvatska
vida.culic@st.tel.hr

(14). 70% do danas opisanih mutacija u CFTR genu je na $\Delta F508$, dok samo 5% od svih CF bolesnika ima mutaciju tipa pre-maturnog stop kodona. U nekim mutacijama možemo naći različite kliničke fenotipove.

Ovdje smo opisali dva bolesnika s cističnom fibrozom i rijetkim mutacijama u CFTR genu. Istakli smo obitelj i bolesnicu s $\Delta F508/E585X$ mutacijom, a nju smo potvrdili indirektnom metodom u zdravih roditelja heterozigota koji su zatražili savjet genetičara.

Kako nam je poznato ovo je prvi opisani slučaj s genotipom $\Delta F508/E585X$, teškom kliničkom slikom i ranim letalnim ishodom.

MATERIJAL I METODE

U razdoblju od 1978. do 1994. godine u Kliničkoj bolnici Split na Odjelu za dječje bolesti, liječeno je 15 bolesnika s cističnom fibrozom. Genotip je utvrđen kod samo 3-je bolesnika i njihovih obitel-

ji: $\Delta F508/\Delta F508$, $\Delta F508/E19$ i $\Delta F508/E12$. Do danas je prenatalnu dijagnozu zatražila jedna od ovih obitelji. Ona je uspješno napravljena u obitelji s genotipom $\Delta F508/E12$. Ustanovljeno je da trudnica nosi fenotipski zdravo dijete, koje je heterozigot za $\Delta F508$ što je naslijedilo od majke.

Za gensku analizu i izolaciju DNA upotrebljeni su limfociti iz periferne krvi roditelja, brata i sestre, te amniociti uzgajeni nakon amniocenteze. Ne- $\Delta F508$ mutacija analizirana je DGGE (denaturing gel electrophoresis) metodom. Egzoni koji su pokazali promjene u elektroforezi tijekom DGGE su sekvencionirani za otkrivanje mutacije metodom dideoxynucleotide chain termination (8, 9, 11).

PRIKAZ SLUČAJA

Bolesnik 1. $\Delta F508/3849+1G \rightarrow A$ (Egzon 19)

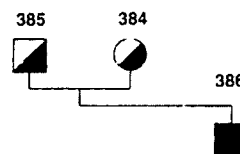
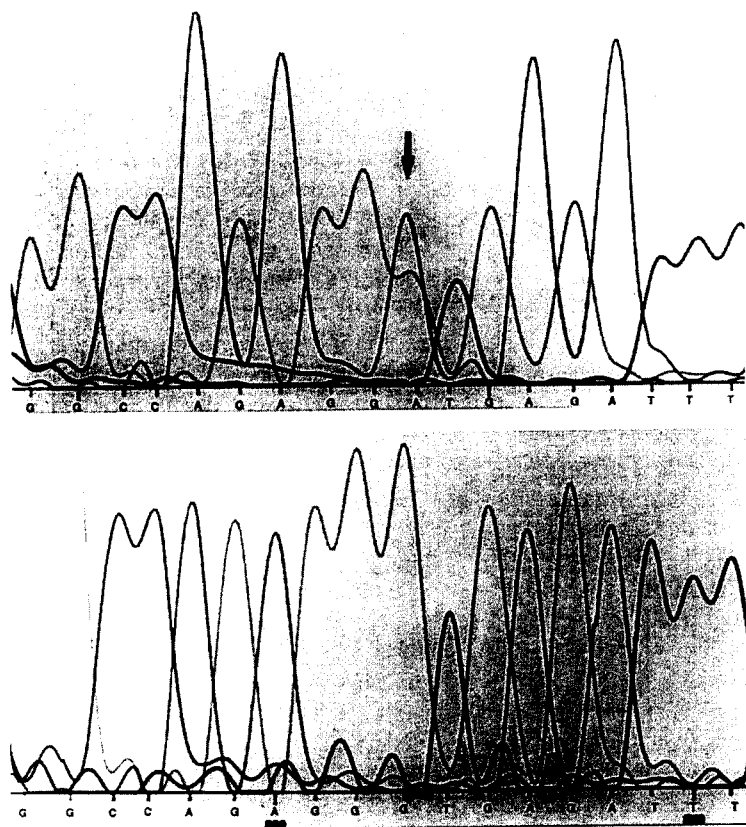
Bolesnik (proband) muško je dojenče koje je prvi puta hospitalizirano u prvom

mjesecu života sa gastrointestinalnim simptomima. U dobi od 2,5 mjeseca nastupaju plućni simptomi. Do 11. mjeseca života nekoliko je puta hospitaliziran u Mostaru, a nakon toga 5 puta u Splitu. Najduža remisija postignuta je između 1. i 3. godine života. Uz somatsku retardaciju, javljaju se simptomi globalne plućne insuficijencije sa znakovima kroničnog plućnog srca. Umire u 5.-oj godini života, pod slikom kardiopulmonalne insuficijencije.

Genski smo analizirali cijelu obitelj još 1990. godine, ali zbog komplicirane mutacije kod oca, rezultate iz Graza dobili smo tek 1992. godine.

Dok se objavljuje nova mutacija, majka je ponovno trudna, ali zbog rata ne dolazi na prenatalnu dijagnozu. Rađa se žensko dijete s plućnim znakovima CF. Doznajemo da umire u dobi od 3,5 godine. U naredne dvije trudnoće obitelj je izgubila još dvoje djece. Nisu željeli izvršiti prenatalno ispitivanje.

Mutacija koja je nađena u jednom od 160 ne- $\Delta F508$ kromosoma ispitanih u



11	12	12	CS7
22	21	21	XV2C
11	12	12	KM19
11	12	12	D9
NN	NE	NE	F508
NE	NN	EN	Exon19: 3849+1G->A
11	22	12	pJ3.11
22			WR1+2
11			RZ11+12
11	11	11	WR5+6

Intron 19: 3849+1G->A Splice-Mutation

Slika 1. Originalni nalaz rezultata molekulske analize 1. bolesnika ($\Delta F508/Exon19:3849+1G \rightarrow A$)

Slika DGGE iz (11) Greil I, Wagner K, Rosenkranz W. Identification of a new splice site mutation (3849+1G->A) in the intron 19 of the CFTR gene, gdje je opisana nova mutacija pronađena kod našeg bolesnika br. 1.

Figure 1. Results of molecular analysis of the first patient ($\Delta F508/Exon19:3849+1G \rightarrow A$)

Figure DGGE from (11) Greil I, Wagner K, Rosenkranz W. Identification of a new splice site mutation (3849+1G->A) in the intron 19 of the CFTR gene from our patient.

Austriji zahvaća prvi nukleotid u slijedu koji je visoko konzerviran u svim CFTR egzon/intron graničnim područjima. Promjena od G->A dovela je do promjenjenog slijeda (splicing mutacija) i stvaranja mutiranog egzona, što je uzrokovalo stvaranje nefunkcionalnog CFTR proteina (slika 1) (6, 11).

Bolesnik 2. $\Delta F508/E585X$

Djevojčica (proband) (II/O, slika 2) drugo je dijete u obitelji mladih zdravih roditelja. Rođena je 1987. godine, prije otkrića CFTR gena. Tijekom prva dva mjeseca života slabije dobiva na tjelesnoj težini, a prvi je puta hospitalizirana u dobi od 3 mjeseca sa znakovima opstrukcijskog bronhitisa. Nakon početnih plućnih simptoma, nastavljaju dominirati gastrointestinalni simptomi, s poremećenim vrijednostima jetrenih enzima. U dobi od 2 mjeseca ima tek masu kao na rođenju (3680 grama). Nakon opsežne kliničke i laboratorijske obrade, uz nalaze visokih vrijednosti klorida u znoju (70 mEq/L->100 mEq/L), postavlja se dijagnoza cistične fibroze.

Tijekom života hospitalizirana je radi gastrointestinalnih i plućnih komplikacija

CF u Splitu i Zagrebu, da bi u dobi od 14 mjeseci, pod slikom kardiopulmonalne insuficijencije i marazma, umrla. Patohistološki se nađe kronična fibrozna upala gušterače i jetre, kronične upalne promjene u bronhima i bronhiolima, obostrana upala pluća i kronični fibrozni sialoadenitis.

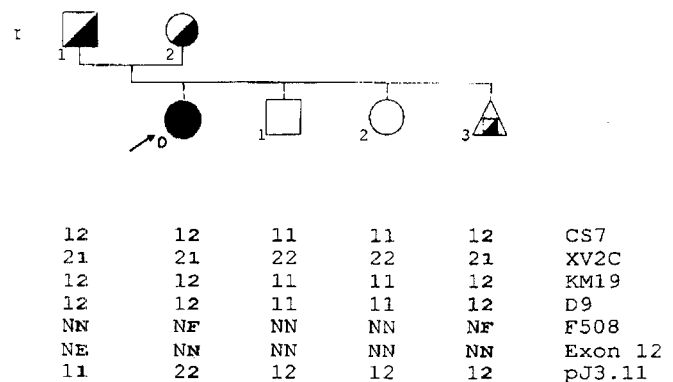
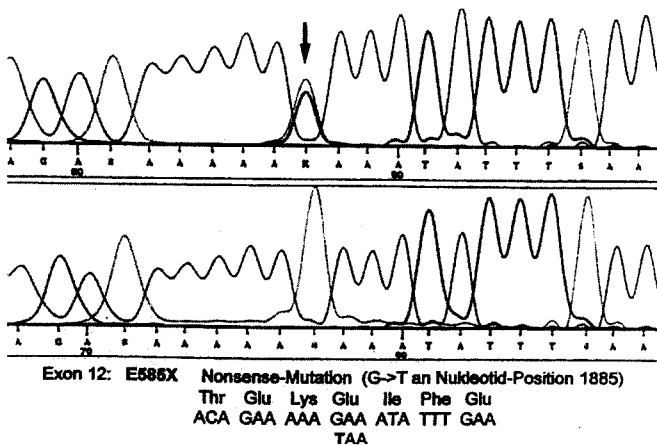
Obitelj je zatražila genetski savjet 1988. godine u našem centru. 1989. godine rađa se zdrava djevojčica, homozigot (II/2, slika 2). Prenatalna dijagnoza izvršena je metodom biokemijske enzimatske analize plodne vode (Prof. Boué, Pariz), prije otkrića genske mutacije na 7. kromosomu.

U posljednoj trudnoći (II/3, slika 2) 1994. godine, amniocentezom u 16. tjednu trudnoće (Klinika za ženske bolesti i porode, Zagreb) iz kulture amniocita izolirana je DNA (KBC Rebro, Zagreb, Molekulski laboratorij i Zavod za medicinsku genetiku), koja je upućena u Genetische Beratung und Untersuchungstelle, Graz, Austria. Indirektnom metodom iz krvi zdravih roditelja (otac I/1:zdravi heterozigot za E585X mutaciju na 12. egzonu; majka I/2:zdravi heterozigot za $\Delta F508$ mutaciju) i amniocita ploda (II/3:zdravi heterozigot za $\Delta F508$ mutaci-

ju) bili smo u mogućnosti izvršiti prenatalnu dijagnozu. Retrogradno smo zaključili da je proband, djevojčica umrla 1987. godine, nosila kompleksnu mutaciju $\Delta F508/E585X$. 1994. godine rođeno je zdravo muško dijete (II/3, slika 2), heterozigot za $\Delta F508$ mutaciju koju je naslijedio od majke. Drugi članovi obitelji (brat: II/2 i sestra: II/1 slika 2) genski su potvrđeni kao zdravi homozigoti.

DISKUSIJA

Delta F508 najučestalija je mutacija odgovorna za cističnu fibrozu u skoro svim ispitivanim populacijama. Ipak, postoji jasan gradijent učestalosti u različitim populacijama (1, 2, 13, 14). Od tri genotipizirana bolesnika s CF iz našeg genetskog savjetovaništa, samo jedan je nosio $\Delta F508/\Delta F508$ mutaciju (33%). Od 1978. do 1994. godine na Odjelu za dječje bolesti hospitalizirano je 30 000 djece. Od tog broja, 15 bolesnika liječeno je s kliničkom dijagnozom cistične fibroze (0,05%). Samo smo kod 3-je pacijenata (20%) mogli potvrditi mutaciju. Dvije obitelji su zatražile genetski savjet. Prenatalna dijagnoza izvršena je kod jedne



Slika 2. Obiteljsko stablo i originalni rezultat molekulske analize 2. slučaja
Legenda:

I/1 Otac-fenotipski zdrav, heterozigot za Exon 12:E585X

I/2 Majka-fenotipski zdrava, heterozigot za $\Delta F508$

II/O+ Proband (rod. 1986.)

II/I Dječak (1985) zdravi homozigot

II/2 Djevojčica (1989) zdravi homozigot, rođena nakon PD (1988. god.) određivanjem enzima mikrovilusnih membrana crijevnog epitela (Pariz, Prof. Boue) iz plodne vode, prije otkrića CFTR gena.

II/3 Amniocenteza (1994) fenotipski zdrav dječak, heterozigot za $\Delta F508$ (naslijedeno od majke)

Figure 2. Family tree and results of molecular analysis of second patient

I/1 Father-phenotypic healthy, heterozygous Exon 12:E585X

I/2 Mother-phenotypic healthy, heterozygous $\Delta F508$

II/O+ Proband (born in 1986)

II/I A Boy (1985) healthy homozygous

II/2 A Girl (born in 1989) healthy homozygous, born after PD (1988)

obitelji, a indirektnom metodom dobili smo genotip umrlog probanda.

Genska analiza za prenatalnu dijagnozu može se izvršiti i onda kada mutacija još nije poznata. To radimo indirektnom DNA dijagnostikom iz haplotipova zdravih srodnika, upotrebljavajući RFLP markere ili intragenske mikrosatelitne probe (11). U prvom slučaju, direktnom analizom probanda ustanovljena je nova splice site mutacija u egzonu 19 (3849+1G->A). Nasljeđena je od oca, a proizvela je nefunkcionalni CFTR protein. U ovoj obitelji četvero je djece umrlo prije 6. godine života, ali nisu željeli prenatalnu dijagnozu (11). Kod druge obitelji, opisali smo rijetku mutaciju (E585X) CFTR gena, nasljeđenu od oca i potvrđenu indirektnom metodom iz DNA zdravih srodnika (slika 2). Ferrari i suradnici navode da su otkrili 4 ovakve mutacije kod 95 CF ne- Δ F508 ispitana kromosoma i 42 normalna kromosoma (8). Ovakva mutacija rezultira prematurnim stop kodonom TAA, koju nalazimo u drugim genima, a može proizvesti brzo razaranje mRNA unutar citoplazmatskog dijela i dovesti do greške u nuklearnom transportu (9, 10). Kakav god bio uzrok, rezultat je nul alel. U ovom slučaju, donor site mutacija čini da mRNA bude zarobljena unutar nuklearnog dijela (kako se vidi kod bolesnika s nul alel-mutacijom), te se ne stvara protein (12).

Kod bolesnika br. 2 (Δ F508/E585X9), s teškom kliničkom slikom, nađenu mutaciju možemo opisati kao nonsense mutaciju, koja ne stvara CFTR protein. Ova bolesnica predstavlja, nažalost, nesretnu kombinaciju s dvije nul mutacije. One su benigne same za sebe, ali udružene dovođe do letalnog ishoda.

Među tri obitelji s našeg područja, imamo samo jednu obitelj s Δ F508/ Δ F508 mutacijom, koja je najčešća u srednjeeuropskoj populaciji. Omjer Δ F508/ Δ F508: Δ F508/? za Split je 33, 3%:66, 7%, a za Zagreb 53, 7%:48, 3% (13).

Pokušali smo to objasniti podacima iz literature (14). Geografska distribucija kod 272 CF mutacija ispitivana je u 29 europskih i tri zemlje Sjeverne Afrike. Delta F508 mutaciju najčešće nalazimo u Danskoj (87, 2%), a najrjeđe u Alžiru (26, 3%). Mutacija G542X česta je u mediteranskim zemljama (6,1%). Sedamnaest mutacija ima učestalost od 0,1-0,9%. Široka rasprostranjenost mutacija sugerira staro porijeklo ovih naroda. Neke mutacije su česte u udaljenim krajevima Europe, a druge samo u nekim malim regijama (14). Na primjer, 3849+10 kb C->T nađena je u Izraelu među rijetkim mutacijama (14). Kliničkoj bolnici Split gravitira stanovništvo južnog dijela Hrvatske, te dijelova Bosne i Hercegovine. Iz povijesnih podataka o različitim migracijama naroda u ovo područje, možemo razumjeti raznolikost naših podataka, iako se ova razmišljanja temelje na malom uzorku.

LITERATURA

1. Pignatti PF. Cystic Fibrosis. In: Humphries SE, Malcom S. eds. From genotype to phenotype. Oxford, London: BIOS Scientific Publishers, 1994: 14-48.
2. Hamosh A, Fitz-Simmons SC, Mace MJr, Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatr* 1998; 132: 202-3.
3. Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Rosenthal ER, Dalemans W, Fukayama M, Bargon J, Stier LE, Stratford-Perricaudet L, et al. In vivo transfer of the human cystic fibrosis tran-

- smembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 1992; 68: 143-55.
4. Rosenecker J, Schmalix WA, Schindelhauer D, Plank C, Reinhardt D. Towards gene therapy of cystic fibrosis. *Eur J of Med Research* 1998; 3: 149-56.
5. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, Rommens J, Tsui LC. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 1991; 10: 214-28.
6. Chillon M, Dork T, Casals T, Gimenez J, Fonknechten N, Will K, Ramos D, Nunes V, Estivill X. A novel donor splice site in intron 11 of the CFTR gene, created by mutation 1911+1.6 kba->G, produces a new exon: high frequency in Spanish cystic fibrosis chromosomes and association with severe phenotype. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 623-9.
7. Tsui LC. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends in Genetics* 1992; 8: 392-8.
8. Cremonesi L, Ferrari M, Belloni E, Magnani C, Seia M, Ronchetto P, Rady M, Russo MP, Romeo G, Devoto M. Four new mutations of the CFTR gene (541delC, R347H, R352Q, E585X) detected by DGGE analysis in Italian CF patients, associated with different clinical phenotypes. *Hum Mutat* 1992; 1: 314-9.
9. Primorac D, Johnson CV, Lawrence JB, McKinstry M, Stover ML, Andelinovic S, Rowe WD, Schanfield MS. Influence of premature termination on aggregase gene to mRNA transport. *Am J Hum Genet* 1998; 10: A189.
10. Primorac D, Stover ML, Clark SH, Rowe WD. Molecular basis of nanomelia, a heritable chondrodystrophy of chicken. *Matrix* 1994; 14: 297-305.
11. Greil I, Wagner K, Rosenkranz W. Identification of a new splice site mutation (3849+1G->A) in the intron 19 of the CFTR gene. *Hum Mol Genetics* 1993; 2: 2171-2.
12. Stover ML, Primorac D, Liu SC, McKinstry M, Rowe WD. Defective splicing of $\alpha 1$ (I) collagen mRNA in nondeforming (Type I) osteogenesis imperfecta. *J Clin Invest* 1993; 92: 1994-2002.
13. Zergollern LJ, Stavljenić-Rukavina A, Barišić I, Sertić J. Δ F508 deletion in Croatian cystic fibrosis patients. *Acta Med Croatica* 1992; 46: 181-4.
14. Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat* 1997; 10: 135-54.

S u m m a r y

TWO RARE MUTATIONS IN CYSTIC FIBROSIS

Vida Čulić, Livio Balarin, Hannelore Zierler, Jadranka Sertić, Srđana Čulić, Biserka Rešić, Bernarda Lozić, Darinka Glamuzina, Dragan Primorac, Marino Kaliterna, Tade Tadić, Stipan Janković, Klaus Wagner

Cystic fibrosis (CF) is the most frequent autosomal recessive disease of the exocrine glands in the Caucasian population. CF has three main diagnostic criteria: chronic sinopulmonary disease, pancreatic insufficiency and high concentration of chloride in sweat. The gene responsible for CF consists of 27 exons, distributed over 250 kb of the genomic DNA on the long arm of human chromosome #7. The pathophysiological explanation of the disease is the alteration of the protein, 1480 amino acid long named "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein (CFTR)".

Two families underwent genetic counselling and the following genotypes were obtained: $\Delta F508/3849+1G-A$ (exon 19), $\Delta F508/E585X$ (exon 12). Prenatal diagnosis for cystic fibrosis by molecular DNA examinations was performed in one family with genotype $\Delta F508/E585X$. We present our findings on two patients with CF and their families, with the emphasis on one patient with a unique genotype ($\Delta F508$ and $E585X$). We have indirectly detected this mutation through a healthy heterozygous parents in a patient with severe phenotype and final lethal outcome.

Descriptors: : CYSTIC FIBROSIS-genetics; PHENOTYP; MUTATION; CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR-genetics

Primljeno/Received 23. 12. 1999.