

**INSTYTUT MATKI I DZIECKA  
ZAKŁAD GENETYKI MEDYCZNEJ**

**Kierownik Zakładu Prof. dr hab. Tadeusz Mazurczak**

TADEUSZ MAZURCZAK, JERZY BAL, EWA OBERSZTYN, AGNIESZKA  
SOBCZYŃSKA-TOMASZEWSKA, WOJCIECH WISZNIEWSKI

ZASADY DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ  
MUKOWISCYDOZY. IDENTYFIKACJA MUTACJI I ZMIAN  
POLIMORFICZNYCH W GENIE *CFTR*. KRYTERIA I  
ZASADY PROCEDURY DIAGNOSTYCZNEJ ORAZ  
SYSTEMU KONTROLI JAKOŚCI BADAŃ

***EKSPERTYZA NAUKOWA***  
***WYKONANA NA ZLECENIE MINISTERSTWA ZDROWIA***

*WARSZAWA 1999*

## SPIS TREŚCI

1. WSTĘP .....	3
2. DZIEDZICZENIE MUKOWISCYDOZY .....	4
3. PODŁOŻE MOLEKULARNE .....	5
3.1. Struktura genu .....	5
3.2. Funkcja białka .....	5
3.3. Mutacje .....	6
3.4. Mutacja $\Delta F508$ .....	6
3.5. Mutacje specyficzne dla określonej populacji .....	7
3.6. Heterogenność mutacji w genie CFTR .....	7
4. NIETYPOWE FORMY MUKOWISCYDOZY .....	7
5. DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA .....	8
5.1. Typ badania .....	8
5.1.1. Identyfikacja mutacji .....	8
5.1.2. Analiza markerów polimorficznych .....	9
6. POSTĘPOWANIE DIAGNOSTYCZNE .....	10
6.1. Weryfikacja rozpoznania klinicznego .....	10
6.2. Określenie nosicielstwa mutacji w rodzinie ryzyka genetycznego .....	11
6.3. Diagnostyka prenatalna .....	12
6.4. Badania przesiewowe .....	12
7. INTERPRETACJA WYNIKÓW ANALIZY DNA .....	13
8. MODEL POSTĘPOWANIA DIAGNOSTYCZNEGO .....	15
9. KOSZTY BADAŃ .....	18
10. BADANIA MOLEKULARNE MUKOWISCYDOZY W POLSCE .....	18
11. SYSTEM KONTROLI BADAŃ .....	19
12. ZAKOŃCZENIE .....	20
13. PIŚMIENNICTWO UZUPEŁNIAJĄCE .....	20
14. PIŚMIENNICTWO ZAKŁADU GENETYKI MEDYCZNEJ Z ZAKRESU MUKOWISCYDOZY .....	21
15. ANEKSY .....	24
15.1. Izolacja DNA z pełnej krwi .....	24
15.2. Identyfikacja markerów polimorficznych .....	25
15.2. Identyfikacja mutacji .....	25

### 1. WSTĘP

Mukowiscydoza (*Mucoviscidosis, cystic fibrosis*, torbielowate zwłóknienie trzustki) jest wieloukładową chorobą dzieci i dorosłych, klinicznie charakteryzującą się przewlekłymi zmianami obturacyjnymi i zakażeniami dróg oddechowych oraz zaburzeniami procesów trawienia wraz z ich konsekwencjami. Dysfunkcja gruczołów wydzielania zewnętrznego jest dominującym czynnikiem patogenetycznym odpowiedzialnym za bogatą symptomatologię kliniczną choroby. Wśród osób należących do rasy białej jest ona najczęstszą z chorób uwarunkowanych genetycznie.

Mukowiscydoza jest jednym z ważniejszych problemów pediatrycznych, stanowiąc częstą przyczynę ciężkich i przewlekłych zmian w układzie oddechowym, niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki, polipowatości błony śluzowej nosa, zapaleń zatok obocznych nosa, wypadania błony śluzowej odbytu, zaburzeń odżywiania, czasami marskości wątroby i innych form dysfunkcji tego narządu.

Częstość występowania mukowiscydozy, ciężki, przewlekły przebieg ograniczający istotnie czas przeżycia, oraz konieczność stosowania wielospecjalistycznego i kosztownego leczenia określają społeczne znaczenie choroby. Szczęólnego charakteru chorobie nadaje fakt, że rozpoznanie mukowiscydozy u dziecka jest jednoznaczne z rozpoznaniem rodziny wysokiego ryzyka genetycznego.

Częstość występowania mukowiscydozy w Polsce oceniana jest na 1:2300 żywo urodzonych. Chorobą tą dotknięte są zarówno noworodki, niemowlęta, dzieci starsze, jak i dorośli. Długość przeżycia, jak i jakość życia pacjentów w dużej mierze zależą od wczesnego rozpoznania i prawidłowego leczenia. Mimo znacznego postępu konwencjonalnych metod terapii, średnia długość życia chorych nie przekracza 30 roku życia.

**Przy częstości urodzeń 400 000, w Polsce rocznie rodzi się około 200 dzieci dotkniętych tą chorobą. Około dwóch milionów Polaków, w równym stopniu mężczyzn i kobiet, jest nosicielami zmutowanego genu *CFTR*. Polski Rejestr Mukowiscydozy, prowadzony w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc (Zespół Pediatryczny im Jana i Ireny Rudników w Rabce), w 1998 zawierał informacje o 899 żyjących chorych z mukowiscydozą.**

## **2. DZIEDZICZENIE MUKOWISCYDOZY**

Mukowiscydoza jest chorobą monogenową i dziedziczy się jako cecha autosomalna recesywna. Rozpoznanie choroby u dziecka oznacza, że jego rodzice są nosicielami

zmutowanego genu. Sami nie wykazując cech klinicznych choroby mogą przekazywać zmutowany gen swojemu potomstwu. W takim związku szansa urodzenia chorego dziecka wynosi jak 1 do 4 (stan homozygotyczności dla genu zmutowanego). W pozostałych przypadkach (3/4) urodzą się dzieci zdrowe (oba geny prawidłowe, stan homozygotyczności dla genu prawidłowego), względnie jeden gen zmutowany i jeden prawidłowy (stan heterozygotyczności, nosicielstwo, tak jak u rodziców). Z punktu widzenia praktycznego, można pominąć udowodnione, choć rzadkie (2 : 1000) przypadki choroby, kiedy to oba nieprawidłowe geny u chorego dziecka pochodzą od jednego z rodziców.

Przypomnieć trzeba, że raz określone ryzyko genetyczne dla danej pary małżeńskiej jest stałe, dotyczy każdej ciąży i nie zmienia się w zależności od liczby posiadanych już dzieci chorych lub zdrowych. W związku z powyższym, **każdej rodzinie w której urodzi się dziecko z mukowiscydozą należy zapewnić możliwość uzyskania pełnej porady genetycznej.** Jej treść przekazana w odpowiedniej formie i czasie może w sposób istotny wpłynąć na podejmowane decyzje dotyczące planowania kolejnych ciąż, co stanowi ważny element w profilaktyce choroby.

### **3. PODŁOŻE MOLEKULARNE**

#### **3.1. Struktura genu**

Gen *CFTR* (ang. cystic fibrosis transmembrane regulator) został sklonowany w 1989 roku. Stało się to w niespełna cztery lata od chwili określenia jego lokalizacji w długim ramieniu chromosomu 7 (prążek q31.3). Pozycja mapowa została ustalona dzięki wykazaniu sprzężenia genu *CFTR* ze znanymi markerami chromosomalnymi.

Gen *CFTR* zajmuje obszar około 250 kb i składa się z 27 eksonów. Jest jednym z większych znanych genów człowieka. Wielkość eksonów jest zróżnicowana: od 38 nukleotydów (ekson 14b) do 724 nukleotydów (ekson 13). Wielkości intronów wahają się od 1,1 kb do 40 kb.

#### **3.2. Funkcja białka**

Sekwencja aminokwasów białka kodowanego przez gen *CFTR* została określona na podstawie analizy sekwencji nukleotydów. Kodowany w tym genie polipeptyd, o masie cząsteczkowej około 170 kD, złożony jest z 1480 aminokwasów. Wyróżnia się w nim szereg domen. Pozycję centralną białka zajmuje domena R (regulacyjna). Po obu jej stronach znajdują się domeny określane jako: domena wewnątrzłonowa i domena wiążąca nukleotydy (ang. nucleotide binding folds, NBF).

Białko CFTR ze względu na swoją strukturę i funkcje zostało zaklasyfikowane do dużej grupy białek transportowych tzw. "ABC family" (ang. ATP-binding cassette) występujących zarówno u bakterii, drożdży, muszki owocowej oraz u ssaków. Jest ono błonową glikoproteiną i. U człowieka pełni funkcje kanału chlorkowego w komórkach nabłonkowych. Przypisuje mu się również rolę w transporcie białek przez błonę komórkową. Uszkodzenie tych funkcji, w wyniku mutacji, prowadzi do zmiany kwasowości w organellach komórkowych, powstawania lepkiego (zahamowanie przepływu, wraz z jonami Cl<sup>-</sup>, wody) o odmiennym składzie białek śluzu i jest prawdopodobnie odpowiedzialne za plejotropowość objawów klinicznych.

#### **3.3. Mutacje**

Większość z opisanych w genie *CFTR* mutacji to mutacje punktowe. W ich wyniku następuje zmiana sensu (ang. missense) zapisu informacji genetycznej lub tzw. mutacje nonsens, odpowiedzialne za przerwanie biosyntezy polipeptydu.

Mutacje missens stanowią około 45% wszystkich znanych mutacji, mutacje nonsens około 18%. Opisano również mutacje o charakterze małych wstawek/delekcji (około 23% wszystkich znanych mutacji). Oprócz mutacji eksonowych znanych jest również szereg mutacji na złączach intron/ekson/intron oraz mutacji wewnątrz intronowych odpowiedzialnych za błędną obróbkę transkryptu. Stanowią one około 14% wszystkich typów mutacji. W genie *CFTR* wielkie delekcje występują rzadko. Największa znana delekcja, około 40 tysięcy nukleotydów obejmuje eksony od 11 do 18.

Rozkład mutacji jest nierównomierny. Większość z nich koncentruje się w eksonach kodujących domeny wiążące nukleotydy i w domenie regulacyjnej.

Oprócz mutacji opisano szereg tak zwanych wariantów polimorficznych. W ten sposób są określane zmiany w sekwencji nukleotydów, których wystąpienie nie pociąga za sobą zmian w sekwencji aminokwasów. Różne typy zmian polimorficznych są wykrywane również w sekwencjach genu nie kodujących informacji o białku, na przykład w intronach.

### **3.4. Mutacja $\Delta F508$**

Najczęściej występującą mutacją, w genie *CFTR*, jest trójnukleotydomowa delekcja w eksonie 10. Mutacja ta jest odpowiedzialna średnio za około 70% wszystkich mutacji tego genu. W wyniku mutacji  $\Delta F508$  z sekwencji nukleotydów zostaje usunięty, mieszczący się w ramce odczytu, kodon CTT co w konsekwencji powoduje, że fenyloalanina (pozycja 508) „wypada” z łańcucha polipeptydowego. Powstający produkt białkowy jest krótszy tylko o jeden aminokwas, ale polipeptyd nie posiada już zdolności do osiągnięcia w komórce odpowiedniej dla niego lokalizacji.

### **3.5. Mutacje specyficzne dla określonej populacji**

Większość z kilkuset mutacji opisanych dla genu *CFTR* to mutacje występujące sporadycznie. Pewnym wyjątkiem, poza mutacją  $\Delta F08$ , są mutacje charakterystyczne dla grupy etnicznej czy populacji. Częstość występowania takich mutacji jest niekiedy wielokrotnie wyższa niż wynikałoby to z uśrednionych danych dla populacji kaukaskiej.

„Swoiste” mutacje, których częstość występowania przekracza 5%, stwierdzono w populacjach skandynawskich oraz wśród Żydów Aszkenazyjskich w Izraelu.

### **3.6. Heterogenność mutacji w genie *CFTR***

Do końca 1999 roku w genie *CFTR* opisano około 800 różnych mutacji odpowiedzialnych za modyfikację lub brak jego funkcji. Trudno obecnie wyjaśnić przyczynę tak wielkiej różnorodności mutacji w tym genie. Nawet w populacjach określanych jako wysoce homogenne heterogenność mutacji jest znaczna. Do wyjątków należy kanadyjska populacja Hutteire, w której badając częstość występowania dwóch mutacji ( $\Delta F08$  i M1101K) identyfikuje się wszystkie zmutowane geny *CFTR*.

## **4. NIETYPOWE FORMY MUKOWISCYDOZY**

Wykazano, że mutacje genu *CFTR* stwierdza się także w niezależnie dotychczas klasyfikowanych chorobach takich jak obu- i jednostronna niedrożność przewodów nasiennych, przewlekłe zapalenie oskrzeli, rozstrzenie oskrzeli, przewlekłe zapalenie zatok obocznych nosa z polipowatością, aspergillusowe alergiczne odoskrzelowe zapalenie płuc. Wydaje się, że w tych przypadkach wielość objawów choroby jest przejawem zmienności na poziomie genu, a wymienione schorzenia należałoby klasyfikować jako łagodne postaci mukowiscydozy.

## **5. DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA**

### **5.1. Typ badania**

W analizie DNA, na potrzeby diagnostyki chorób dziedzicznych, obserwuje się zasadniczo dwa typy analizy molekularnej. Pierwszym jest **identyfikacja mutacji**, drugim **badanie markerów polimorficznych**.

Identyfikacja mutacji w obu allelach genu *CFTR* chorego stanowi molekularne potwierdzenie rozpoznania klinicznego. W przypadku analizy markerów polimorficznych badaniu, obok chorego, muszą być poddani jego rodzice. Opiera się bowiem ono na śledzeniu sposobu dziedziczenia się danego genu w rodzinie ryzyka genetycznego. Analiza

markerów polimorficznych jest badaniem pośrednim. Opiera się na rozpoznaniu klinicznym ustalonym u probanda i nie może stanowić o weryfikacji rozpoznania.

### 5.1.1. Identyfikacja mutacji

Podstawą większości metod identyfikacji mutacji w genie *CFTR* jest analiza powielanego, w reakcji PCR (ang. polymerase chain reaction), odpowiedniego fragmentu genu. Delecje czy też wstawki można wykrywać różnicując elektroforetyczną wielkość wykrywanych produktów. Pomocna w identyfikowaniu wielu mutacji jest analiza restrykcyjna. W taki sposób mogą być wykrywane mutacje, których powstanie wiąże się z utworzeniem lub zanikiem sekwencji nukleotydów rozpoznawanej przez dany enzym restrykcyjny. Wykrywanie szeregu mutacji wymaga jednak w dalszym ciągu stosowania bardziej złożonych technik molekularnych. Identyfikacja mutacji w badaniach rutynowych opiera się o handlowo dostępne testy diagnostyczne. Umożliwiają one identyfikację 8 - 12 najczęściej występujących mutacji w genie *CFTR*.

Tabela 1  
Mutacje najczęściej odpowiedzialne za defekt genu *CFTR*

Nazwa mutacji	Lokalizacja	Badana populacja	Świat*
		(%)	(%)
ΔF508	ex 10	54	66
del21kb	del2,3	2,6	
G542X	ex 11	2,5	2,4
3849+10kb >T	in 19	2,3	0,2
1717-1G>A	in 10	2,2	0,6
N1303K	ex 21	1,9	1,3
R553X	ex 11	1,2	0,7
2184insA	ex4	0,9	0,1
W1282X	ex 20	0,6	1,2
mutacje sporadyczne		5,0	
allel CF (nieokreślony)		26,8	

\* dane Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium

Zacieniowano mutacje najczęściej występujące w populacji polskiej



Przeprowadzone do tej pory, w Zakładzie Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka, badania dla ponad 780 chorych na mukowiscydozę wskazują, że obecnie możliwa jest identyfikacja ponad 70% wszystkich mutacji w tym genie (Tabela 1).

### 5.1.2. *Analiza markerów polimorficznych*

Pod pojęciem markera polimorficznego rozumiemy możliwą do wykrycia sekwencję nukleotydów w DNA występującą minimum w dwóch postaciach allelicznych. Ze względu na położenie markery polimorficzne dzieli się na zewnętrzne i wewnętrzne. Identyfikacja markera polimorficznego możliwa jest zarówno techniką hybrydyzacji jak i techniką powielania (PCR). Bardzo przydatna diagnostycznie jest tak zwana analiza haplotypów. Haplotyp określa układ alleli kilku różnych markerów polimorficznych. Analiza haplotypu znacznie uprawdopodobnia wynik badania diagnostycznego.

Gdy wybraną metodą diagnostyczną jest badanie polimorfizmu markerów, analizie DNA muszą być poddani, oprócz chorego, także jego rodzice. **Tylko wynik, który umożliwia prześledzenie sposobu dziedziczenia zmutowanych alleli danego genu od obojga rodziców jest diagnostycznie informacyjny.** Analiza markerów polimorficznych obciążona jest ryzykiem związanym z możliwością wystąpienia rekombinacji pomiędzy miejscem mutacji a *locus* wykrywanego markera polimorficznego. Ryzyko to dla markerów polimorficznych stosowanych w diagnostyce mukowiscydozy jest niewielkie (0,004).

Dla populacji polskich rodzin ryzyka mukowiscydozy określono informacyjność 11 zewnętrznych markerów polimorficznych. Najczęściej wyniki informacyjne otrzymano dla markerów KM19/PstI, XV2c/TaqI i D9/MspI (Tabela 2). Analiza haplotypów markerów XV2c i KM19 wykazała, że tak zwany haplotyp B (allel 1 XV2c i allel 2 KM19) w populacji polskiej w ponad 70% występuje wraz ze zmutowanym genem *CFTR*. Jest to haplotyp największego ryzyka występowania mutacji w tym genie. W populacji polskiej haplotyp B sprzężony jest z mutacją  $\Delta F508$  w 98% a w ponad 40% towarzyszy również innym mutacjom.

## 6. POSTĘPOWANIE DIAGNOSTYCZNE

## 6.1. Weryfikacja rozpoznania klinicznego

Tak jak dla szeregu innych chorób dziedzicznych pełna weryfikacja rozpoznania klinicznego mukowiscydozy możliwa jest tylko na poziomie molekularnym. **W mukowiscydozie taką weryfikację zapewnia identyfikacja mutacji w obu allelach genu *CFTR*.** W populacji polskiej weryfikacja rozpoznania możliwa jest dla około połowy diagnozowanych przypadków. Wynika to ze stosunkowo niskiej, niespełna 70%, częstości wykrywania mutacji w genie *CFTR*.

## 6.2. Określanie nosicielstwa mutacji w rodzinie ryzyka genetycznego

Badania nosicielstwa zmutowanego genu *CFTR* możliwe jest poprzez identyfikację mutacji lub analizę sposobu dziedziczenia genu. Badanie oferowane jest wszystkim członkom rodziny probanda dla którego określono pełny genotyp tj. zidentyfikowano mutacje w obu allelach genu *CFTR*, względnie otrzymano wynik informacyjny w badaniu markerów polimorficznych.

Tabela 2  
Informacyjność badanych markerów polimorficznych

RFLP <sup>1</sup>	informacyjność badania (%)		
	pełna <sup>2</sup>	częściowa <sup>3</sup>	brak <sup>4</sup>
KM19/PstI	42	47	11
XV2c/TaqI	23	56	21
D9/MspI	32	54	14
metH/TaqI	11	49	40
metD/TaqI	4	42	54
J3.11/MspI	9	39	52
metD/BanI	6	50	44
7c22/EcoRI	0	36	64
E6/TaqI	11	67	22
W3D1.4/HindIII	0	25	75
met5/MspI	0	20	80

<sup>1</sup> - Typ markera polimorficznego i rodzaj analizy DNA.

- <sup>2</sup> - *Możliwość ustalenia dziedziczenia się genu CFTR od obojga rodziców*  
<sup>3</sup> - *Możliwość ustalenia dziedziczenia się genu CFTR od jednego z rodziców*  
<sup>4</sup> - *Brak możliwości ustalenia sposobu dziedziczenia genu CFTR*  
*Zacieniowano markery o najwyższym stopniu informacyjności*

### 6.3. Diagnostyka prenatalna

Diagnostyka prenatalna mukowiscydozy oferowana jest w I i II trymestrze ciąży. Źródłem DNA do analizy molekularnej są komórki trofoblastu lub amniocyty. Z doświadczeń Poradni Genetycznej Zakładu Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka wynika, że wiele rodzin ryzyka mukowiscydozy zainteresowanych jest tą formą pomocy, akceptuje ją a niekiedy wręcz uzależnia planowanie ciąży od możliwości przeprowadzenia badania prenatalnego. **Decyzje o poddaniu się badaniom prenatalnym podejmowane są także przez te rodziny, które nie decydują się na przerwanie ciąży po rozpoznaniu prenatalnym choroby.**

Analiza molekularna umożliwia wykonanie diagnostyki prenatalnej już w 10 tygodniu ciąży. Badanie zasadniczo oferowane jest tylko tym rodzinom ryzyka mukowiscydozy, dla których wcześniej określono genotyp probanda względnie otrzymano wynik informacyjny w analizie markerów polimorficznych. Ze względu na możliwości rekombinacji DNA na odcinku pomiędzy miejscem mutacji a lokalizacją markera, ten typ badania nie jest zalecany. W przypadku analizy markerów polimorficznych, ze względu na małe ilości DNA, diagnostyka powinna być wykonana techniką PCR.

### 6.4. Badania przesiewowe

Metody analizy DNA umożliwiają podjęcie badań przesiewowych, których celem byłoby ustalanie nosicielstwa zmutowanego genu *CFTR* w ogólnej populacji. Zasadność tego typu badań określa zarówno częstość występowania nosicieli zmutowanego genu *CFTR* w populacji jak i charakter choroby. Oddzielnej dyskusji wymagają problemy natury etycznej i prawnej dotyczące wprowadzenia tego typu programów.

Ze względu na wysoką heterogenność mutacji w genie *CFTR* badania przesiewowe opierają się głównie o identyfikację mutacji występujących najczęściej, w praktyce o identyfikację mutacji  $\Delta F508$ . Stosunkowo niska częstość występowania tej mutacji w

populacji polskiej poddaje jednak w wątpliwość zasadność podjęcia takiego programu niezależnie od oceny kosztów finansowych takiego przedsięwzięcia. Wydaje się, że do czasu ewentualnego podwyższenia wykrywalności mutacji w genie *CFTR* w populacji polskiej, molekularne badania przesiewowe powinny być prowadzone jedynie dla rodzin ryzyka genetycznego.

## 7. INTERPRETACJA WYNIKÓW ANALIZY DNA

Spośród wszystkich znanych do tej pory mutacji występujących w genie *CFTR*,  $\Delta F508$  jest mutacją najczęściej odpowiedzialną za defekt genu. Częstość jej występowania w populacji polskiej wynosi 54%. Wśród chorych na mukowiscydozę, osoby o genotypie  $\Delta F508/\Delta F508$  stanowią 29% (Tabela 3).

Tabela 3  
Możliwość weryfikacji rozpoznania klinicznego mukowiscydozy badaniem mutacji  $\Delta F508$

Genotyp	Częstość występowania <sup>1</sup>
$\Delta F508/\Delta F508$	$0,54 \times 0,54 = 0,292$
$\Delta F508/ m$	$2 \times 0,54 \times 0,46 = 0,496$
$m / m$	$0,46 \times 0,46 = 0,212$

<sup>1</sup> - częstość występowania  $\Delta F508 = 0,54$   
*m* - inna niż  $\Delta F508$  mutacja w genie *CFTR*

Tylko więc u niespełna 1/3 chorych na mukowiscydozę identyfikacja mutacji  $\Delta F508$  umożliwia weryfikację rozpoznania klinicznego choroby. W pozostałych przypadkach u około połowy badanych  $\Delta F508$  jest tylko jedną z mutacji warunkujących chorobę, a w 19% za mukowiscydozę odpowiedzialne są inne, niż delecja F508, mutacje w genie *CFTR*.

Tabela 4  
Określanie ryzyka urodzenia dziecka z mukowiscydozą na podstawie wyników badania mutacji  $\Delta F508$  w małżeństwach zgłaszających się po poradę

Osoba badana	Badanie obecności mutacji $\Delta F508$		Ryzyko urodzenia dziecka z CF <sup>1</sup>
	wykonano	wynik	
1/2	nie	?	1 : 2500
1	tak	-	1 : 5882
2	nie	?	
1/2	tak	-	1 : 13158
1	tak	+	1 : 232
2	tak	-	
1	tak	+	1 : 102 <sup>2</sup>
2	nie	?	

<sup>1</sup> - dla uproszczenia obliczeń przyjęto ryzyko nosicielstwa zmutowanego genu jak 1 do 25

<sup>2</sup> - wartość prawdziwa dla każdego pewnego nosiciela mutacji w genie *CFTR*

+ / - - obecność / brak mutacji  $\Delta F508$

? - nie badano

1/2 - matka/ojciec

Możliwość identyfikacji mutacji  $\Delta F508$  modyfikuje również ocenę ryzyka urodzenia się dziecka z mukowiscydozą w rodzinach, zgłaszających się do poradni genetycznej, w których obawa wynika np. z faktu straty dziecka, u którego podejrzewano, lecz nie potwierdzono rozpoznania mukowiscydozy. W Polsce 1 dziecko na 2300 żywo urodzonych obciążone jest mukowiscydozą. Fakt nie stwierdzenia, w danej rodzinie, mutacji  $\Delta F508$  u obojga małżonków zmniejsza ok. 6-krotnie, w stosunku do populacyjnego, ryzyko urodzenia się chorego dziecka (Tabela 4).

Analiza markerów polimorficznych umożliwia również ocenę ryzyka występowania mutacji w genie *CFTR*. W populacji polskiej 71% chromosomów niosących mutacje w tym genie posiada haplotyp B. Przy założeniu, że częstość występowania zmutowanego genu *CFTR* w populacji jest 1/50, prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji u osoby, u której zidentyfikowano haplotyp B jest jak 1 na 16, a haplotyp C (allele 2 i 2) jak 1 na 244 (Tabela 5).

Tabela 5

Ryzyko z jakim chromosom o danym haplocie (XV2c i KM19) jest "chromosomem CF"

Haplotyp	Ryzyko
----------	--------

XV2c : KM19 <sup>1</sup>		
A	1 : 1	1 : 75
B	1 : 2	1 : 16
C	2 : 1	1 : 244
D	2 : 2	1 : 147

<sup>1</sup> 1/2 - Allele danego markera polimorficznego odpowiednio o większej/mniejszej masie cząsteczkowej.

## 8. MODEL POSTĘPOWANIA DIAGNOSTYCZNEGO

Znajomość genu i występujących w nim mutacji sprawia, że wykrywanie mutacji powinno być podstawowym testem analizy molekularnej w przypadkach rozpoznania klinicznego mukowiscydozy. Wykrycie obu mutacji umożliwia weryfikację rozpoznania klinicznego, identyfikację nosicieli zmutowanego genu oraz diagnostykę prenatalną. Występowanie w genie *CFTR* kilkuset mutacji powoduje jednak, że analiza wszystkich znanych mutacji z punktu widzenia diagnostyki klinicznej jest niemożliwa. **W diagnostycznym badaniu rutynowym identyfikowane powinny być mutacje występujące w populacji polskiej najczęściej.** Fakt wysokiej heterogenności zmian mutacyjnych w genie *CFTR* powoduje, że identyfikacja mutacji musi być tam gdzie jest to możliwe poszerzona o analizę markerów polimorficznych. Badanie polimorfizmu DNA opierające się w swojej istocie na rozpoznaniu klinicznym może być wykorzystane jednak tylko w badaniu nosicielstwa genu wśród krewnych chorego i w diagnostyce prenatalnej choroby.

W wyniku badań polskiej populacji chorych na mukowiscydozę i ich rodzin oraz doświadczeń innych, światowych ośrodków badawczych zaproponowano optymalny tok postępowania diagnostycznego (Rycina 1).

Kolejność badania poszczególnych mutacji powinna być funkcją częstości występowania tych mutacji oraz łatwości identyfikacji. Analizę powinno prowadzić się dla mutacji, które w populacji polskiej występują z częstością minimum 1% (por. Tabela 2).

Określenie informacyjności, w populacji polskiej, 11 markerów polimorficznych jest podstawą zaproponowania optymalnej procedury diagnostycznej wykorzystującej ten typ analizy DNA. W pierwszej kolejności należy przebadać miejsca polimorficzne wykrywane po cięciu enzymem PstI (sonda KM19) lub MspI (sonda D9). W poszukiwaniu

informacyjnego układu alleli kolejnym badanym RFLP powinna być analiza polimorfizmów wykrywanych po cięciu enzymem TaqI z zastosowaniem w kolejności sond XV2c, metD, metH i E6. Często wyniki informacyjne przynosi dopiero badanie polimorfizmu metD/BanI. W praktyce każde badanie powinno rozpocząć się od przebadania polimorfizmów KM19/PstI i XV2c/TaqI co w przypadku uzyskania informacyjnego układu alleli daje dodatkowo możliwość analizy haplotypów.

Tabela 6  
Koszty diagnostyki molekularnej mukowiscydozy

Ośrodek	Typ badania	Cena \$	Uwagi
Johns Hopkins DNA Diagnostic Lab (Baltimore, USA)	postnatalne	100	17 mutacji
j.w.	prenatalne	360	j.w.
j.w.	postnatalne	270	analiza polimorfizmu KM19/PstI i XV2X/TaQ1
j.w.	prenatalne	600	j.w.
Hospital for Sick Children (Toronto, Kanada)	postnatalne	263	identyfikacja mutacji
Health Maintenance Organization <a href="http://www.geneletter.org">www.geneletter.org</a>	postnatalne	85	zakres badań nieznany





## 9. KOSZTY BADAŃ

W praktyce, w badaniach rutynowych identyfikowane są te mutacje, które włączono w handlowo dostępne zestawy diagnostyczne. W chwili obecnej poza del21kb identyfikacja wszystkich pozostałych mutacji jest możliwa za pomocą takich testów. Wykorzystywane do tej pory testy firmy Inogenetics umożliwiały identyfikację 8 mutacji ( $\Delta F508$ ,  $\Delta I507$ , G542X, 1717-1G>A, N1303K, R553X, W1282X, G551D). Mutacje del21kb, i 3849+10kb wymagały wykonania dodatkowo niezależnej analizy. **Koszty materiałowe testu Inogenetics dla jednego pacjenta kształtowały się w granicach 250 zł. Nowe zestawy umożliwiają identyfikację 27 mutacji za cenę dwukrotnie wyższą.** Mogą być one również wykorzystywane w diagnostyce molekularnej atypowych postaci mukowiscydozy.

Dla porównania w Tabeli 6 przedstawiono koszty badań diagnostycznych mukowiscydozy w trzech amerykańskich ośrodkach.

## 10. BADANIA MOLEKULARNE MUKOWISCYDOZY W POLSCE

Analizę DNA w mukowiscydozie w Polsce rozpoczęto w 1986 roku w Zakładzie Genetyki Instytutu Matki i Dziecka. Od kilku lat badania molekularne prowadzone są również w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. W obu tych ośrodkach rutynowo identyfikuje się najczęściej występujące mutacje w genie *CFTR*. Diagnostyka prenatalna mukowiscydozy wykonywana jest jedynie w Zakładzie Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka.

Zainteresowanie mukowiscydozą sprawia, że obecnie obserwujemy wzrost liczby ośrodków podejmujących się diagnostyki molekularnej tej choroby. Badania tego typu prowadzone są w Zakładzie Genetyki Medycznej CMUJ, w Akademiiach Medycznych w Lublinie, we Wrocławiu, a ostatnio w Łodzi.

## 11. SYSTEM KONTROLI BADAŃ

Wykonanie molekularnego badania diagnostycznego wymaga: 1) otrzymania DNA genomowego, 2) powielenia, w reakcji PCR, odpowiednich fragmentów genu *CFTR*, 3) wykonania analizy, 4) interpretacji wyniku.

Dostępne na rynku proste testy diagnostyczne stwarzają możliwość wykonania analizy DNA w prawie każdym laboratorium biochemicznym. Wydaje się jednak, że badania molekularne, w tym badania molekularne mukowiscydozy, powinny być koncesjonowane przynajmniej z dwóch powodów.

Po pierwsze w większości analiz źródłem DNA są leukocyty krwi obwodowej. Praca z krwią wymaga zachowania rygorystycznych zasad zarówno standardu pracowni jak i przeszkolenia i zabezpieczenia personelu laboratorium.

Po drugie interpretacja wyniku powinna być przeprowadzona najlepiej przez doświadczonych lekarzy z poradni genetycznej. Błędna lub niepełna interpretacja analizy DNA, wynikająca z braku znajomości sposobu dziedziczenia czy rodzaju i częstości występowania mutacji w genie *CFTR* może z jednej strony prowadzić do niepotrzebnego stresu, z drugiej zaś do braku zapewnienia odpowiedniej opieki medycznej i możliwości dodatkowych badań genetycznych. Ponadto wynik analizy DNA jest istotny nie tylko dla badanego, ale również jego rodziny. Powinien podlegać ochronie tak jak ochrona danych osobowych. Jego udostępnianie regulowane jest bowiem zasadami etyki lekarskiej i przepisami odpowiednich ustaw. Ujawnienie wyniku analizy DNA osobom lub instytucjom do tego nie powołanym może bowiem naruszać prawa jednostki.

Wydaje się, że kilka laboratoriów specjalizujących się w diagnostyce mukowiscydozy byłoby zdolne do zapewnienia, w Polsce, pełnego serwisu badań molekularnych.

## **12. ZAKOŃCZENIE**

Mukowiscydoza jest chorobą przewlekłą. Ze względu na częstość występowania, konieczność długotrwałego, wielospecjalistycznego i drogiego leczenia oraz przebieg choroby, stanowi problemem społecznym. Ranga tego problemu będzie rosła wraz z rozwojem i bogaceniem się polskiego społeczeństwa.

Podstawowym celem molekularnych badań diagnostycznych w mukowiscydozie jest weryfikacja rozpoznania klinicznego oraz zapewnienie rodzinom ryzyka genetycznego odpowiedniej opieki lekarskiej. Wydaje się jednak, że badania molekularne mukowiscydozy, tak jak i innych chorób dziedzicznych mają dodatkowy wymiar jakim jest profilaktyka. Jednym z elementów profilaktyki wtórnej są badania przesiewowe. Badania przesiewowe w kierunku nosicielstwa choroby Taya-Sachsa u Żydów aszkenazyjskich prowadzone w ciągu dwudziestu lat doprowadziły do dwudziestokrotnego spadku częstości występowania tej choroby. Podobnie obiecujące wyniki zanotowano po badaniach przesiewowych w kierunku talasemii u osób z basenu Morza Śródziemnego. Również po dwudziestu latach realizacji programu częstość występowania tej choroby obniżyła się z 1 na 2500 do 1 na 1200.

### **13. PIŚMIENICTWO UZUPEŁNIAJĄCE**

1. CF Genetic Analysis Consortium (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>)
2. CF Genetic Analysis Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *New Engl. J. Med.* (1993) 329:1308-13
3. CF Genetic Analysis Consortium (1994) Population variations of common cystic fibrosis mutations. *Hum. Mut.* 4:167-77
4. Chillon M. i wsp. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *New Engl. J. Med.* (1995) 332:1475-80
5. Estivill X. i wsp., Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European population. *Human Mutation* 1997, 10: 135-154
6. Kerem B. i wsp. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* (1989) 245:1073-80
7. Riordan J.R., i wsp. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* (1989) 245:1066-73
8. Rommens J.M., i wsp. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* (1989)245:1059-65
9. Welsh M.J. i wsp. Cystic fibrosis. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D (wyd.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* McGraw-Hill Inc., New York., (1995) 3: 3799-3876
10. Zielenski J. i wsp. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* (1991) 10:214-28

11. Zielenski J., Tsui L-C. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Ann. Rev. Genet.* (1995) 29:777-807
12. Zielenski J. Genetyczne determinanty zmienności fenotypowej w mukowiscydozie. *Medycyna Wieku Rozwojowego* 1997, 1 (4), 649.

#### **14. PIŚMIENNICTWO ZAKŁADU GENETYKI MEDYCZNEJ Z ZAKRESU MUKOWISCYDOZY**

1. Bal J. i wsp., Zastosowanie metod analizy DNA w diagnostyce chorób genetycznie uwarunkowanych. *Ped Pol* 1987, 62, 192.
2. Maciejko D. i wsp., Badanie polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych DNA w diagnostyce mukowiscydozy. *Ped Pol* 1989, 64,81
3. Bal J. i wsp., Frequency of the cystic fibrosis mutation  $\Delta F508$  in Poland. *Hum Genet* 1991, 86, 329.
4. Bal J. i wsp., A cystic fibrosis patient homozygous for the nonsense mutation R553X. *J Med Gen* 1991, 28, 715
5. Reiss J. i wsp., Discrimination between recurrent mutation and identity by descant: application to point mutation in exon 11 of CFTR gene. *Hum Mut* 1991, 87, 457.
6. Bal J. Molekularne podłoże mukowiscydozy. *Postępy Biochemii* 1991,37, 153
7. Bal J. i wsp., Mukowiscydoza - nowe możliwości diagnostyczne wykorzystujące metody analizy DNA *Ped Pol* 1991, 66, 111.
8. Bal J. i wsp., Simple non-radiation detection of CFTR mutation N1303K by artificial creation of restriction site. *Mol Cell Probes* 1992, 6, 9.
9. Bal J. i wsp., Zastosowanie sond molekularnych DNA w diagnostyce mukowiscydozy - analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA (RFLP) w 22 rodzinach wysokiego ryzyka. *Tygodnik Lekarski* 1992, 47, 216
10. Bal J. i wsp., The frequency of mutations in exon 11 of CF gene in Polish patients. *Acta Biochem Pol* 1992, 39, 245.
11. Maciejko D. i wsp., Wyniki badania polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA (RFLP) w mukowiscydozie. Optymalny sposób postępowania diagnostycznego. *Ped Pol* 1992, 67, 213.
12. Osborne L. i wsp., Incidence and expression of the N1303K mutation of the cystic fibrosis (CFTR) gene. *Hum Mut* 1992, 89, 653
13. Maciejko D. i wsp., Znaczenie wyników badań molekularnych mukowiscydozy w Polsce w kontekście ich przydatności dla poradnictwa genetycznego. *Ped Pol* 1992,67, 222.

14. Bal J. i wsp., Zastosowanie badań molekularnych w prenatalnym rozpoznawaniu mukowiscydozy. *Ped Pol* 1994, 69,329
15. Bal J. Mukowiscydoza - podstawy wprowadzenia somatycznej terapii genowej. *Postępy Biochemii* 1994,40, 86
16. Bal J. i wsp., Mukowiscydoza - od genu do terapii. *Kosmos* 1994, 43, 419.
17. Kazazian H.H. i wsp., Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mut* 1994, 4, 167.
18. Nowakowska A. i wsp., Próba oceny zależności pomiędzy fenotypem a genotypem wśród 65 chorych na mukowiscydozę. *Ped Pol* 1995, 70, 633.
19. Bal J. i wsp., Rodzaj i częstość występowania mutacji w genie CFTR - znaczenie wyników identyfikacji mutacji w genie CFTR w Polsce dla poradnictwa genetycznego i badań przesiewowych. *Ped Pol* 1995, 70, 627.
20. Devoto M. i wsp., No evidence for segregation distortion of cystic fibrosis alleles among sibs of cystic fibrosis patients. *Eur J Hum Genet* 1995,3, 324.
21. Estivil X. i wsp., Geographic distribution and regional origin of 264 cystic fibrosis mutations in European population. *Hum Genet* 1997, 10, 135.
22. Witt M. i wsp., Częstość występowania mutacji genu CFTR u chorych na mukowiscydozę w Polsce. *Ped Pol* 1997, 72, 665.
23. Sobczyńska A. i wsp., Azoospermia obstrukcyjna a mutacje w genie CFTR - genetyczne podstawy zespołu obustronnej niedrożności nasieniowodów (CBVAD). *Terapia* 1997, 12, 25.
24. Bal J., Sobczyńska A. Mukowiscydoza – modelowa choroba dziedziczna. *Postępy Biologii Komórki* 1998, 25, sup. 10, 105.
25. Pogorzelski A. i wsp., Mutacje genu CFTR u chorych na mukowiscydozę w Polsce. *Acta Pneumonologica et Allergologica Pediatrica* 1998, 2, 5.
26. Zieleński J. i wsp., Detection of a cystic fibrosis modifier (CFM1) locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nature Genetics* 1999, 22, 128.
27. Witt M. i wsp., Częstość występowania mutacji oraz genotypów genu CFTR u dorosłych chorych na mukowiscydozę w Polsce. *Pneumonologia i Alergologia Polska*, 1999 (w druku).
28. Macek M. i wsp., Common CFTR mutation distribution study in Eastern Europe. *Europ. J. Hum. Genet.* 2000 (w druku).
29. Dork T. i wsp., A novel 21-kilobase deletion, CFTR del2,3(21kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet* 2000 (w druku).

30. Sobczyńska A. i wsp., Identyfikacja mutacji i zmian polimorficznych w genie CFTR u pacjentów z azoospermią obstrukcyjną. *Wiadomości Lekarskie* 2000 (w druku).

## 15. ANEKSY

### 15.1. Izolacja DNA z pełnej krwi (świeżej lub zamrożonej)

Mieszanina LIZ-MIX 5x (500 ml)

- 20,73 g NH<sub>4</sub>Cl
- 2,3 g KHCO<sub>3</sub>
- 10 ml 0,5 M EDTA

#### Liza erytrocytów

Do probówki zawierającej 200 µl 0,5 M EDTA pobrać około 5 - 10 ml krwi. Odwirować przez 10 min. przy 3 tys. rpm. w temp. 4<sup>0</sup>C. Usunąć osocze i dodać po 15 ml mieszaniny LIZ-MIX 1x. Delikatnie wymieszać i wstawić do lodu na 10-15 min. (do przejaśnienia krwi). Po zlizowaniu wirować 10 min. przy 3 tys. rpm. w 4<sup>0</sup>C. Supernatant usunąć a pelet zawiesić w 5 ml mieszaniny 1x i ponownie wirować 10 min. przy 3 tys. w 4<sup>0</sup>C. Osad leukocytów na tym etapie można zamrozić lub kontynuować dalej procedurę.

Liza leukocytów (metoda wysalania NaCl wg Millera i wsp. Nucl. Acid Res. 1088,16, 1215)

- 5 ml jałowej mieszaniny 75 mM NaCl/1mM EDTA
- 12 µl proteiny K (20 mg/1ml)
- SDS 10%

Osad leukocytów delikatnie zawiesić w 5 ml NaCl/EDTA a następnie dodać 500 µl 12 µl proteiny K. Inkubować w 37<sup>0</sup>C pozostawiając do następnego dnia.

#### Izolacja DNA.

Dodać 1,5 ml 6 M NaCl i wytrząsać na Vorteksie 15 sekund. Wirować 10 min. 15 tys. rpm. w temp. pokojowej. Po ponownym odwirowaniu do supernatantu dodać równą objętość zimnego izopropanolu. Wytrącić DNA delikatnie mieszając lub nawijać DNA na bagietkę. Kłak DNA przepłukać 70% etanolem. Po wysuszeniu DNA zawiesić w ok. 500 µl buforu TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,0)

### 15.2. Identyfikacja markerów polimorficznych

Omówienie metod identyfikacji wykorzystanych markerów polimorficznych przedstawiono w Bal J. i wsp. Tygodnik Lekarski 1992, 39, 245.

### **15.3. Identyfikacja mutacji**

Mutacje  $\Delta$ F508, G551D, G542X, R553X, W1282X,  $\Delta$ I507, N1303K, 1717-1 wykrywano stosując zestaw CF-2 (Inogenetics). Analizę wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta. Mutację 3849+10kb identyfikowano wg Highsmith W.E. i wsp. (New England J. Med. 1994, 13, 974) a mutację del21kb wg Dork T. i wsp. Hum Genet. (w druku).