

Stökkbreytingin $\Delta F508$ greind í sjúklingum með cystic fibrosis

Reynir Arngrímsson¹⁾, Benjamín Bjartmarsson²⁾, Jennifer Lambert¹⁾, Sigurður Þorgrímsson²⁾, Þórolfur Guðnason²⁾, Hörður Bergsteinsson²⁾

Arngrímsson R, Bjartmarsson B, Lambert J, Þorgrímsson S, Guðnason P, Bergsteinsson H

The $\Delta F508$ mutation in cystic fibrosis patients

Læknablaðið 1994; 80: 219–22

Cystic fibrosis is a serious autosomal recessive disorder. It is commonest among the white Caucasian populations in North and Western Europe. However, no information is available on this disease in Iceland. Only 21 patients have been diagnosed with this condition in Iceland since 1958, hence the prevalence is estimated to be around 1/7000. Three young children, aged 6–30 months, with clinical symptoms suggestive of cystic fibrosis: namely recurrent respiratory infections, malabsorption of fat, low trypsin and chymotrypsin activity and positive sweat test, were investigated. Mutational analysis revealed that all three children were homozygous for the $\Delta F508$ mutation in the cystic fibrosis gene. This is the first report of cystic fibrosis in Iceland. It is expected that 2–3% of the population are carriers of cystic fibrosis. Identification of all disease-causing mutations in the population should be feasible and encouraged.

Ágrip

Cystic fibrosis er algengastur ókynbundinna erfðasjúkdóma hjá Vesturlandabúum. Þessi sjúkdómur hefur hinsvegar verið talinn sjaldgæfur á Íslandi. Sjúkdómurinn er alvarlegur og

Frá¹⁾ Duncan Guthrie Institute of Medical Genetics, Yorkhill, Glasgow,²⁾ Barnaspítala Hringins, Landspítalanum, Reykjavík. Fyrirspurnir, bréfaskipti: Reynir Arngrímsson, Duncan Guthrie Institute of Medical Genetics, Yorkhill, Glasgow G3 8SJ, Scotland.

Lykilorð: Cystic fibrosis, stökkbreytingar, $\Delta F508$, víkjandi erfðasjúkdómar.

leiðir oftast til dauða innan við þrítugt. Erfðagallann má rekja til stökkbreytinga í geni sem skráir 1480 amínósýrur sem mynda 68 kd prótín (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Hér er í fyrsta sinn lýst íslenskum einstaklingum með stökkbreytingu í þessu geni, sem veldur brottfalli á amínósýrunni phenylalanine og leiðir til cystic fibrosis.

Inngangur

Cystic fibrosis er talinn vera algengasti ókynbundni víkjandi erfðasjúkdómur á meðal Vesturlandabúa (1). Talið er að eitt af hverju 2500 vestrænna barna fæðist með þennan erfðasjúkdóm og að allt að einn af hverjum 20 (5%) sé arfberar (1). Algengi sjúkdómsins er þó breytilegt, gildir það meðal annars á Norðurlöndum. Einn af hverjum 4700 Dönum (3) er talinn hafa cystic fibrosis en sjúkdómurinn er sjaldgæfari meðal Svía, eða einn af hverjum 7700 (2). Hvort tveggja er þetta umtalsvert lægri tíðni en á meðal annarra nágrannaþjóða okkar, til dæmis Íra (1/1700). Engar opinberar tölur eru til um algengi cystic fibrosis á Íslandi. Þó er kunnugt um 21 greint tilfelli frá 1958, þar sem annað eða bæði foreldri eru íslensk. Þar að auki mun einn Íslendingur búsettur erlendis hafa greinst með cystic fibrosis. Samkvæmt þessum tölum má ætla að algengi sjúkdómsins sé um það bil einn af hverjum 7000.

Sjúkdómurinn cystic fibrosis herjar aðallega á slímhimnufrumur í kirtilvef (2). Í svita er aukinn útskilnaður á natríumklóríði. Hefur það verið notað til greiningar á sjúkdóminum. Í brisi stíflar þykkt slím kirtilganga, sem leiðir til skorts á hvötum í meltingarvegi og sjálfsmeltingar á kirtlinum. Ófrjósemi meðal karlmannna sem haldnir eru sjúkdómnum er einnig rakin til stíflunar og síðar skemmdar á kynkirtlum (vas deference og epididymis). Þekktasta einkennið er uppsöfnun á óeðlilega þykku

slími í lungum sem leiðir til endurtekinna sýkinga og er dánarorsök flestra þessara sjúklinga á unga aldri. Þrátt fyrir bætta meðferð á undanföllum árum eru lífshorfur einstaklinga með cystic fibrosis aðeins um 30 ár.

Genagallar sem valda cystic fibrosis voru nýlega uppgötvaðir og genið sjálft einangrað á langa armi litnings númer 7 (4). Gen þetta er skráir 1480 amínósýrur sem mynda 168 kd prótín (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Hlutverk þess er talið tengjast stjórnun á flæði klóríðjóna í slímhimnufrumum (5). Yfir 50 stökkbreytingar sem geta valdið cystic fibrosis, eru nú þekktar í þessu geni (1). Algengust er stökkbreyting sem kölluð er $\Delta F508$. Hún veldur brottfalli þriggja basa-pára sem skrá amínósýruna phenylalanine í stöðu 508 í prótíninu (6). Hér er í fyrsta sinn lýst Íslendingum með þessa stökkbreytingu.

Aðferðir og efniviður

Stökkbreytingar voru kannaðar hjá þremur sjúklingum sem voru grunaðir um að hafa cystic fibrosis. Fyrstu tveir sjúklingarnir eru sex mánaða gamlir tvíburar. Mánaðargamlir voru þeir báðir lagðir inn til rannsóknar vegna endurtekinna kröftugra uppkasta og gengust undir uppskurð vegna þrengsla í neðra magaopi. Lengd og þyngd beggja var í meðallagi við fæðingu og fram að uppskurði. Stuttu seinna fór að bera á endurteknunum öndunarfæraeinkennum: Prálátum hósta, kvefi og eyrnabólgu. Annar tvíburinn fékk lungnabólgu sem meðhöndluð var með sýklalyfjum. Jafnframt fór að bera á óeðlilegum hægðum og minnkuðum vaxtarhraða. Við sex mánaða aldur voru þeir lagðir inn á Barnaspítala Hringins til frekari rannsóknar. Lengd beggja tvíburanna var þá innan við 10. hundraðshlutamark lengdardreifingar og þyngd innan við þriðja hundraðshlutamark þyngdardreifingar í þessum aldurshópi. Endurtekin svitapróf sýndu natríumgildi um og yfir 90 mmól/l hjá báðum börnum (viðmiðunargildi fyrir sex mánaða börn er 30 mmól/l). Fita í saur mældist hjá báðum tvíburum (4+) og engin trypsínvirkni fannst í magaskoli. Aðrar rannsóknir sýndu ekkert markvert.

Þriðji sjúklingurinn er tveggja og hálfis árs gamalt barn. Við 10 mánaða aldur var það rannsakað vegna vanþrifa. Barnið hafði væg öndunarfæraeinkenni og fituríkar hægðir.

Rannsóknir sýndu litla trypsín- og chymotrypsínvirkni sem benti til vanstarfsemi á briskirtli. Endurtekin svitapróf sýndu natríumgildi á bilinu 68–78 mmól/l. Vöxtur sjúklings hefur síðan verið í meðallagi. Af og til síðan hafa greinst öndunarfærasýkingar (klasakokkasýkingar (*Staphylococcae-*)).

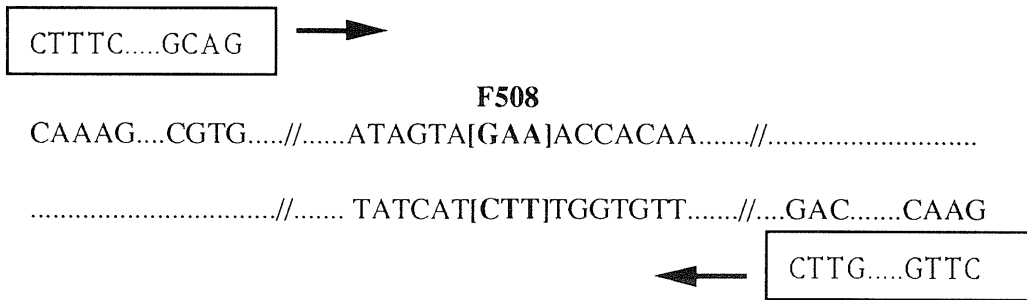
Kjarnsýra var einangruð úr hvítum blóðkornum sjúklinganna þriggja og nánustu ættingja þeirra með stöðluðum aðferðum og fjölfölduð með keðjumögnun (polymerase chain reaction) (mynd 1) með 0,5 U *Taq* polymerase í 50 μ l lausn sem innihélt 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8,3 við 25°C), og 200 μ M dNTP. Basaröð þreifara var 5'-GTTTTCTGGATTATGCCTGGCAC og 5'-GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC (8). Keðjumögnun fór fram við upphafshitastig 94°C í 2,5 mín, 58°C í 0,5 mín, 72°C í 0,5 mín. Síðan tók við 91°C í 0,5 mín og 35 endurtekin skref við 58°C og 72°C í 0,5 mín hvert skref. Að lokum var sýnið haft í 10 mín við 72°C og kælt að 4°C. Afurð keðjumögnunar var rafdregin (350 V) í fjórar klukkustundir í 10% acrylamide geli (19:1 acrylamide: bis-acrylamide, 10% ammonium persulfat og temed), sem litað var með ethidium bromide. Afurð sem inniheldur stökkbreytinguna er 94 basapör (bp) að stærð samanborið við 97 bp við eðlilegar aðstæður (8).

Niðurstöður

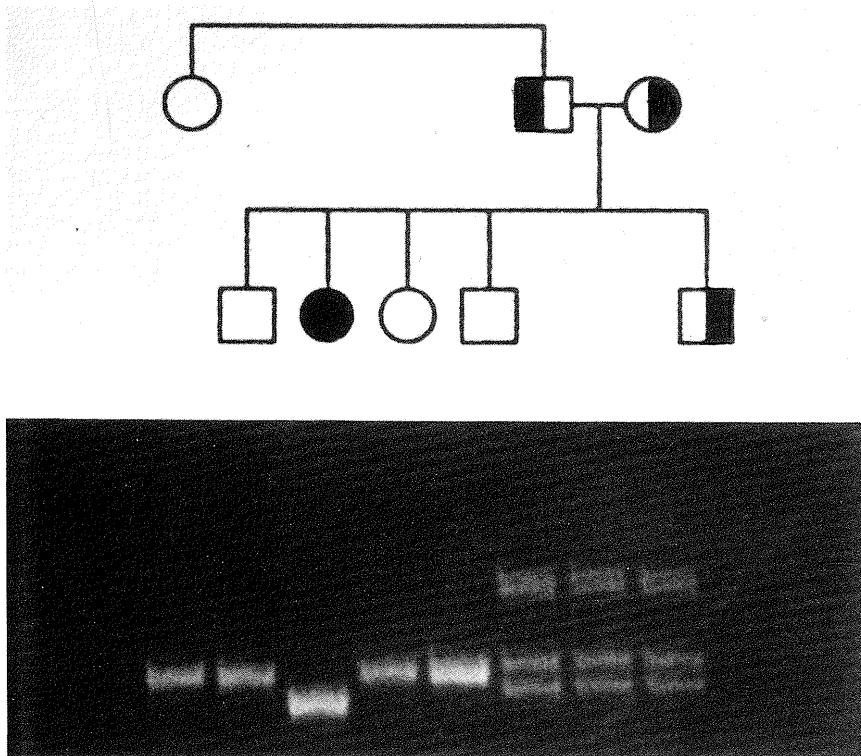
Keðjumögnun á kjarnsýrum frá sjúklingunum þremur og ættingjum þeirra leiddi í ljós að sjúklingarnir höfðu eingöngu 94 bp afurð. Þeir eru því arfhreinir (homozygous) og gen þeirra hafa stökkbreytinguna ($\Delta F508$) á báðum litningum (mynd 2). Foreldrar þeirra höfðu bæði 94 og 97 bp afurð og eru arfblendnir (heterozygous), það er hafa eðlilegt afbrigði gensins á öðrum litningi númer 7 og stökkbreytinguna á hinum.

Umræða

Cystic fibrosis hefur löngum verið talinn sjaldgæfur sjúkdómur á Íslandi en engar opinberar tölur eru til um arfberatíðni sjúkdómsins. Fyrirspurnir okkar benda til að algengi cystic fibrosis hérlandis sé svipað og í Svíþjóð og að tveir til þrjár af hverjum 100 Íslendingum séu einkennalausir arfberar. Hér er í fyrsta sinn lýst stökkbreytingum í erfðaeftni íslenskra einstaklinga sem hafa sjúkdómseinkenni cystic



Mynd 1. *Keðjumögnun á erfðaeftni*: Kjarnsýrur eru einangraðar úr frumum. Við keðjumögnun eru notaðir tveir þreifarar sem eru spegilmyndir basaraðanna sitt hvoru megin við svæðið sem á að fjölfalda og skoða. Í upphafsskrefi keðjumögnunar aðskiljast hinir tvöföldu þræðir kjarnsýrunnar við hátt hitastig (94°C). Þreifarnir bindast við spegilmynd sína á kjarnsýruþræðinum og hinn hitastöðugi hvati (*Taq polymerase*) tengist svæðinu og spinnur nýjan þræð í stefnu svæðisins sem á að magna. Þetta er endurtekið um það bil þrjátíu sinnum og við það fjölfaldast svæðið á milli þreifaranna milljónfalt (2ⁿ: n= fjöldi skrefa). Sýnd er basaröðin umhverfis stökkbreytinguna ΔF508 og basaröð þreifaranna (í boxum) sem voru notaðir. Þrjá basa vantar í gen einstaklinga með stökkbreytinguna F508 og myndast þá styttri þræður (94 bp) sem hægt er að aðskilja frá eðlilegum genaþræði (97 bp) við rafdrátt.



Mynd 2. *Niðurstöður keðjumögnunar á geni einstaklings með cystic fibrosis og ættingjum hans*: Sá sjúki er arfhreinn og hefur eingöngu 94 bp afurð. Þrjú systkini hans og föðursystir hafa eingöngu 97 bp afurð og eru eðlileg. Foreldrar hans og eitt systkini eru arfblendin og hafa afurðir af stærð 94 bp og 97 bp.

fibrosis. Í öllum tilfellum var um að ræða unga- börn sem þrífust illa og voru lögð inn á spítala til rannsóknar vegna vannæringar, fitu í hægð- um og öndunarfaræinkenna. Cystic fibrosis er einn af nokkrum mögulegum sjúkdómum sem þessi lýsing getur átt við. Ör þróun erfðavís- anda hefur leitt til þess að greining cystic fibro- sis er nú fljótleg og örugg. Keðjumögnun á erfðaefni og greining stökkbreytinga hefur að mestu leyst eldri aðferðir, svo sem svitapróf, af hólmi. Rannsóknir erlendis sýna að algengasta stökkbreyting cystic fibrosis er $\Delta F508$ (1,6) og er tíðni hennar hæst á norðlægum slóðum (6). Börnin þrjú sem hér voru rannsökuð höfðu þessa stökkbreytingu. Þetta gefur vísbendingu um að hún geti verið með algengari stökk- breytingum á Íslandi en útilokar ekki að aðrar gerðir finnist hér einnig.

Þekking á gerð stökkbreytinga í þjóðfélag- inu og tíðni þeirra er mikilvæg og auðveldar störf þeirra sem vinna með sjúklingum og fjöl- skyldum þeirra. Upplýsingar um gerð stökk- breytinganna er hægt að öðlast með greiningu á sýnum úr sjúkum einstaklingum og tíðni þeirra er hægt að meta með rannsóknum á handahófskenndu úrtaki úr þjóðfélaginu. Þessar upplýsingar nýtast til dæmis við mat á líkum þess að ættingjar hins sjúka eignist líka börn með cystic fibrosis og er grundvöllur þess að hægt sé að greina sjúkdóminn á fósturstigi. Hafa skal í huga að foreldrar barna með ókyn- bundinn víkjandi erfðasjúkdóm eru ávallt arf- berar. Að jafnaði eru því 25% líkur á að næsta barn þeirra fæðist einnig með cystic fibrosis. Systkini foreldranna hafa 50% líkur á að vera arfberar og systkini hinna sjúku eru arfberar í tveimur þriðju tilfella.

Rannsóknir á flutningi cystic fibrosis gensins inn í slímhimnufrumur eru hafnar. Tilraunir hafa sýnt að hægt er að ferja heilbrigt og starf- hæft cystic fibrosis gen úr mönnum yfir í dýr með slíkan genagalla (9). Einnig hefur verið sýnt fram á að við rannsóknaraðstæður (*in vit- ro*) er hægt að nota „bæklaðar“ eða „umbreytt-

ar“ veirur til þess að ferja heilbrigt gen yfir í lungnafrumur manna með cystic fibrosis erfða- galla og koma á eðlilegri framleiðslu á afurð gensins (10). Líklegt þykir að slíkur flutningur verði hornsteinn meðferðar á þessum sjúk- dómi í framtíðinni. Þekking á umfangi þessa vandamáls hérlendis er því nauðsynlegur und- irbúningur þess, að hægt verði að nýta slíkar nýjungar þegar þær koma fram á sjónarsviðið.

HEIMILDIR

1. Shrimpton AE, McIntosh I, Brock DJH. The incidence of different cystic fibrosis mutations in the Scottish population: effects on prenatal diagnosis. *J Med Genet* 1991; 28: 317–21.
2. Boat TF, Welsh MJ, Beaudet AL. Cystic fibrosis. In: Scriver CL, Beaudet AL, Sly S, Valle D, eds. *Metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1989: 2649–80.
3. Nielsen OH, Thomsen BL, Green A, Andersen PK, Hauge M, Schiøtz PO. Cystic fibrosis in Denmark 1945–1985. An analysis of incidence, mortality and influence of centralized treatment on survival. *Acta Paediatr Scand* 1988; 77: 836–41.
4. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066–73.
5. Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson D M. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis epithelial cells. *Nature* 1990; 347: 358–63.
6. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. World- wide survey of the $\Delta F508$ mutation. Report from the cystic fibrosis genetic analysis consortium. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 354–9.
7. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1986; 51: 263–73.
8. Scheffer H, Verlind E, Penninga D, Te Meerman G, Ten Kate L, Buys C. Rapid screening for $\Delta F508$ deletion in cystic fibrosis. *Lancet* 1989; ii: 1345–6.
9. Whitsett JA, Dey CR, Stripp BR, Wikenheiser KA, Clark JC, Wert SE. Human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator directed to respiratory epithelial cells of transgenic mice. *Nature genetics* 1992; 2: 13–20.
10. Engelhardt JF, Yang Y, Stratford-Perricaudet LD, Allen ED, Kozarsky K, Perricaudet M. Direct gene transfer of human CFTR into human bronchial epithelia of xenografts with E1-deleted adenoviruses. *Nature Genetics* 1993; 4: 27–34.