

PA 16452

UNIVERZITET U BEOGRADU

Biološki fakultet

ID=18352073  
UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET  
1997. 11. 12.

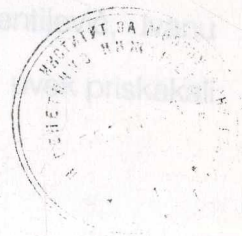
**PRENATALNA DIJAGNOSTIKA CISTIČNE  
FIBROZE PRIMENOM METODA  
REKOMBINANTNE DNK**



Doktorski rad

Dragica Radojković

Beograd, 1997



Ovaj rad uradjen je u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetički inženjerstvo, i plod je višegodišnje saradnje sa više medicinskih ustanova.

Želim da se zahvalim svima koji su doprineli izradi ovog doktorskog rada.

Prof. dr. Ani Savić, mentoru, koja je neposredno rukovodila izradom ovog rada, zahvaljujem na poverenju, prijateljskoj podršci i dragocenim savetima tokom izrade ove teze. Prof.dr. Ana Savić me je tokom svih ovih godina usmeravala i podsticala na povezivanje i uspostavljanje ravnoteže između fundamentalnih i primenjenih istraživanja, što je neophodan preduslov za uspešnu primenu savremenih metoda u molekularnoj dijagnostici.

Posebnu zahvalnost dugujem Prof.dr. Branimiru Garzičiću "tati" humane citogenetike u nas, koji me je usmerio na istraživanje i rad u ovoj oblasti.. Njegova nepresušna energija i vizionarski duh, bili su jedna od pokretačkih snaga u mom radu.

Dr. Zoranu Sretenoviću, koji me je zainteresovao za prenatalnu dijagnostiku naslednih bolesti se posebno zahvaljujem na višegodišnjoj saradnji i zaraznoj pozitivnoj energiji. Njegova deviza "ništa nije nemoguće", bila je od neprocenjive pomoći u rešavanju problema i teškoća u toku izrade ove teze.

Najtoplije se zahvaljujem mojoj kolegini i prijatelju Branki Dabović, mojoj "učiteljici" u oblasti molekularne genetike. Naši počeci na "CF" će mi uvek ostati u lepoj uspomeni.

Jeleni Kušić, mojoj mladoj kolegini, zahvaljujem se na nesebičnoj pomoći u toku eksperimentalnog rada i tehničke obrade ove teze.

Zahvaljujem se mojim prijateljima i kolegama Ivoni Aksentijević, Ivanu Brukneru, Mensuru Dlakiću i Kristini Kovačini, koji su iz "belog sveta" uvek priskakali u pomoć kad "zagusti".

Zahvaljujem se kolegama dr. Dragani Stefanović, dr. Vesni Maksimović, Snežani Kojić, mr. Milošu Vujancu, mr Vesni Todorović, Dejanu Ristiću, mr. Svetlani Radović, Jeleni Brkljačić i Jeleni Teodorović, na atmosferi drugarstva i razumevanja. Ta atmosfera mi je pomogla da savladam teškoće i održim "positive thinking" stav u toku izrade ove teze.

105 (325 members) high risk families were screened for the presence of mutated CFTR gene. The purpose of this study was to detect families informative for diagnostics of cystic fibrosis in further pregnancies. Both direct mutation analysis (for the presence of  $\Delta F508$ , G542X, G551D and R553X) and indirect molecular genetic analysis for the presence of mutated CFTR gene (RFLPs) were performed. These data gave us too, the frequency of certain mutations in Yugoslav population which is necessary initial step for planning the population genetic screening program.

Among analyzed families, 49.5% were fully informative, 32.4% partly informative, and 18.1% noninformative for direct detection of the most common  $\Delta F508$  mutation. The rest of the families were analyzed by RFLPs, and 82.9% were fully informative for RFLPs analysis in the next pregnancies.

In studied families, at a known risk for cystic fibrosis, having at least one affected child, the frequency of  $\Delta F508$  was 67.2%, G542X 6.4%, G551D 0.6%, while R553X was not detected. Cumulative frequency of these mutations (73.4%) is not enough for establishing the population screening program for mutations within CFTR gene in Yugoslav population.

As a final result of our study, we propose a proper approach in prenatal diagnosis and genetic counseling in cystic fibrosis in high risk families. The first step is the screening for the  $\Delta F508$ . For informative families, prenatal diagnosis in the next pregnancy is recommended. In families partly informative or noninformative for the presence of the  $\Delta F508$ , RFLPs analysis should be performed. In families informative for RFLPs analysis, the prenatal diagnosis using this method is recommended in the next pregnancies. In noninformative families, the molecular enzyme testing in the amniotic fluid is the recommended method of prenatal diagnosis of cystic fibrosis.

Key words

Cystic fibrosis, prenatal diagnosis, mutation analysis

## ABSTRACT

Cystic fibrosis is one of the most common autosomal recessive diseases (from 1 in 2000 to 1:4000 live births gives rise to an affected child). Affected persons are homozygous for the mutated CFTR gene. Regarding the severity of this disease, and a high risk (1:4) of couples heterozygous for the mutated gene to have an affected child, it is essential to perform prenatal diagnostics.

In this study, 105 (325 members) high risk families were screened for the presence of mutated CFTR gene. The purpose of this study was to detect families informative for diagnostics of cystic fibrosis in further pregnancies. Both direct mutation analysis (for the presence of  $\Delta F508$ , G542X, G551D and R553X) and indirect molecular genetic analysis for the presence of mutated CFTR gene (RFLPs) were performed. These data gave us too, the frequency of certain mutations in Yugoslav population which is necessary initial step for planning the population genetic screening program.

Among analyzed families, 49.5% were fully informative, 32.4% partly informative, and 18.1% noninformative for direct detection of the most common  $\Delta F508$  mutation. The rest of the families were analyzed by RFLPs, and 82.9% were fully informative for RFLPs analysis in the next pregnancies.

In studied families, at a known risk for cystic fibrosis, having at least one affected child, the frequency of  $\Delta F508$  was 67.2%, G542X 6.4%, G551D 0.6%, while R553X was not detected. Cumulative frequency of these mutations (73.4%) is not enough for establishing the population screening program for mutations within CFTR gene in Yugoslav population.

As a final result of our study, we propose a proper approach in prenatal diagnosis and genetic counseling in cystic fibrosis in high risk families. The first step is the screening for the  $\Delta F508$ . For informative families, prenatal diagnosis in the next pregnancy is recommended. In families partly informative or noninformative for the presence of the  $\Delta F508$ , RFLPs analysis should be performed. In families informative for RFLPs analysis, the prenatal diagnosis using this method is recommended in the next pregnancies. In noninformative families, the microvillar enzyme testing in the amniotic fluid is the recommended method of prenatal diagnosis of cystic fibrosis.

### Key words

Cystic fibrosis, prenatal diagnosis, mutation analysis

## APSTRAKT

## SADRŽAJ

Cistična fibroza je najčešće autozomno recesivno oboljenje, koje se u populaciji belaca javlja sa učestalošću od 1:2000 do 1:4000 novorodjenčadi. Oboljevaju osobe kod kojih je mutirani CFTR gen prisutan u homozigotnom stanju. S obzirom na težinu ove bolesti, kao i visok rizik za radjanje obolelog deteta (1:4) kod roditelja koji su heterozigotni nosioci mutiranog gena, prenatalna dijagnostika je od ključnog značaja.

U okviru ovog istraživanja analizirano je 105 visokorizičnih porodica, sa ukupno 325 članova. Cilj analiza bio je utrdjivanje informativnosti ovih porodica za dijagnostiku cistične fibroze u narednoj trudnoći. Sprovedjena je analiza na prisustvo mutacija u CFTR genu ( $\Delta F508$ , G542X, G551D, i R553X) bilo direktno, bilo na osnovu polimorfizama dužina restrikcionih fragmenata (RFLP). Ovi podaci su poslužili i za odredjivanje učestalosti odredjenih mutacija u našoj populaciji, što je neophodna priprema za genetičko skrinoвање.

Od analiziranih porodica 49,5% je bilo informativno, 32,4% poluinformativno, a 18,1% neinformativno za direktnu mutacionu analizu na prisustvo najčešće, deltaF508 mutacije. Od porodica neinformativnih za direktnu mutacionu analizu, 82,9% je bilo potpuno informativno za RFLP analizu. Od analiziranih porodica, 1/3 se javila na prenatalnu dijagnozu u narednoj trudnoći.

U ispitivanoj populaciji porodica sa rizikom za radjanje deteta sa cističnom fibrozom, sa barem jednim rodjenim obolelim detetom, utrdjeno je da je deltaF508 mutacija zastupljena sa frekvencijom od 67,2%, G542X sa 6,4%, G551D sa 0,6%, dok mutacija R553X nije detektovana. Zbirna učestalost ovih mutacija (73,4%) nije dovoljna za populaciono skrinoвање na mutacije u CFTR genu, u našoj populaciji.

Na osnovu sprovedenih istraživanja predlaže se pristup u prenatalnoj dijagnozi i genetičkom savetovanju rizičnih porodica, koji uključuje skrining rizičnih porodica na prisustvo  $\Delta F508$  mutacije. Za informativne porodice, preporučuje se prenatalna dijagnoza direktnom detekcijom ove mutacije u narednoj trudnoći. U neinformativnim ili poluinformativnim porodicama sprovodi se RFLP analiza, i porodicama za koje se utrdi sa su informativne preporučuje se prenatalna dijagnoza RFLP analizom u narednoj trudnoći, dok se za neinformativne porodice preporučuje prenatalna dijagnostika ove bolesti odredjivanjem nivoa mikrovilarnih enzima u amnionskoj tečnosti.

Ključne reči: cistična fibroza, prenatalna dijagnoza, mutaciona analiza

## SADRŽAJ

1.0.	Uvod	1
1.1.	Cistična fibroza	1
1.2.	Lokalizacija i identifikacija gena za cističnu fibrozu	3
1.2.1.	Struktura gena za CFTR	5
1.2.2.	CFTR protein	6
1.2.3.	Mutacije u okviru CFTR gena	9
1.2.4.	Tipovi mutacija u CFTR genu	12
1.2.5.	Korelacija genotip-fenotip i klinička slika cistične fibroze	16
1.3.	Molekularna dijagnostika naslednih bolesti	19
1.3.1.	Indirektna metoda genetičke analize	23
1.3.2.	Direktna metoda prisustva mutiranog CFTR gena	26
1.3.3.	Prenatalna molekularna dijagnostika cistične fibroze	28
1.4.	Genetičko skrining	32
2.0	Cilj	35
3.0	Materijal i metode	36
3.1.	Biološki materijal	36
3.2.	Oligonukleotidne probe korišćene u hibridizaciji	37
3.3.	Rastvori korišćeni u radu	37
3.4.1.	Izolovanje genomske DNK iz humanih limfocita periferne krvi	38
3.4.2.	Izolovanje DNK iz kulture ćelija amnionske tečnosti	39
3.4.3.	Izolovanje DNK iz ćelija amnionske tečnosti	39
3.4.4.	Izolovanje DNK iz nevijabilnih ćelija supernatanta kulture amnionskih ćelija	40
3.4.5.	Izolovanje DNK iz ćelija horionskih resica	40
3.5.	Restrikcione digestije DNK	41

3.6.	Razdvajanje fragmenata DNK elektroforezom	41
3.6.1.	Elektroforeza u agaroznom gelu	41
3.6.2.	Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu	42
3.7.	Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)	42
3.8.	Obeležavanje oligonukleotidne probe radioaktivnim izotopom	46
3.9.	Hibridizacija metodom dot blot	46
4.0.	Rezultati	49
4.1.	Analiza mutacija u okviru CFTR gena	49
4.1.1.	Analiza prisustva $\Delta F508$ mutacije	49
4.1.2.	Analiza prisustva mutacija G551D i R553X	54
4.1.3.	Analiza prisustva G542X mutacije	57
4.2.	Indirektna detekcija prisustva mutiranog CFTR gena	60
4.2.1.	Analiza polimorfizama DNK u blizini CFTR gena	60
4.2.2.	Analiza polimorfizama regiona KM19	61
4.2.3.	Analiza polimorfizama regiona E 2.6	62
4.2.4.	Analiza polimorfizama regiona E 4.1	64
4.2.5.	Analiza polimorfizama E 3.1 regiona	65
4.2.6.	Analiza polimorfizama regiona J.311	66
4.3.	Prenatalna dijagnostika cistične fibroze	68
4.3.1.	Direktna prenatalna dijagnostika cistične fibroze analizom prisustva $\Delta F508$ mutacije	69
4.3.2.	Indirektna prenatalna dijagnostika cistične fibroze	72
5.0	Diskusija	76
5.1.	Učestalost $\Delta F508$ mutacije i genetički skrining	76
5.2.	Problemi prenatalne dijagnostike	79
5.3.	Genetičko savetovanje rizičnih porodica	84

## Cistična fibroza

Cistična fibroza je najčešće nasledno oboljenje u populaciji belaca koje se često završava smrtim ishodom. Javlja se sa učestalošću od 1 na 2000 do 1:4000, makar varira medju različitim populacijama. Tako je u populaciji Nemačke 1:3300, Španje 1:3500, Švedske 1:7700, a za našu populaciju nije poznata. Učestalost nosilaca mutiranog gena, u opštoj populaciji iznosi od 1:23 do 1:32. Učestalost cistične fibroze medju drugim rasama je značajno niža (Boat, T.F. i Welsh M.J. 1969).

Cistična fibroza se nasledjuje autozomno recesivno. (Roditelji, nosioci mutiranog gena, imaju u svakoj trudnoći rizik od 1:4, za rođenje deteta obolelog od cistične fibroze, kao i rizik od 1:2, za rođenje deteta koje će biti asimptomatski nosilac mutiranog gena (Sl. 1).

Cistična fibroza je po prvi put klinički opisana tridesetih godina ovog veka (Fanconi G. i sarad., 1933; Andersen D.H., 1939) kao sindrom koji uključuje fibrozu pankreasa, i bronhiodizije. Kasnije je pokazano da je cistična fibroza oboljenje egzokrinih žlezda, sa poremećajim u sekretu mukusa, pa je uveden termin mukovickioza (Farber S., 1945).



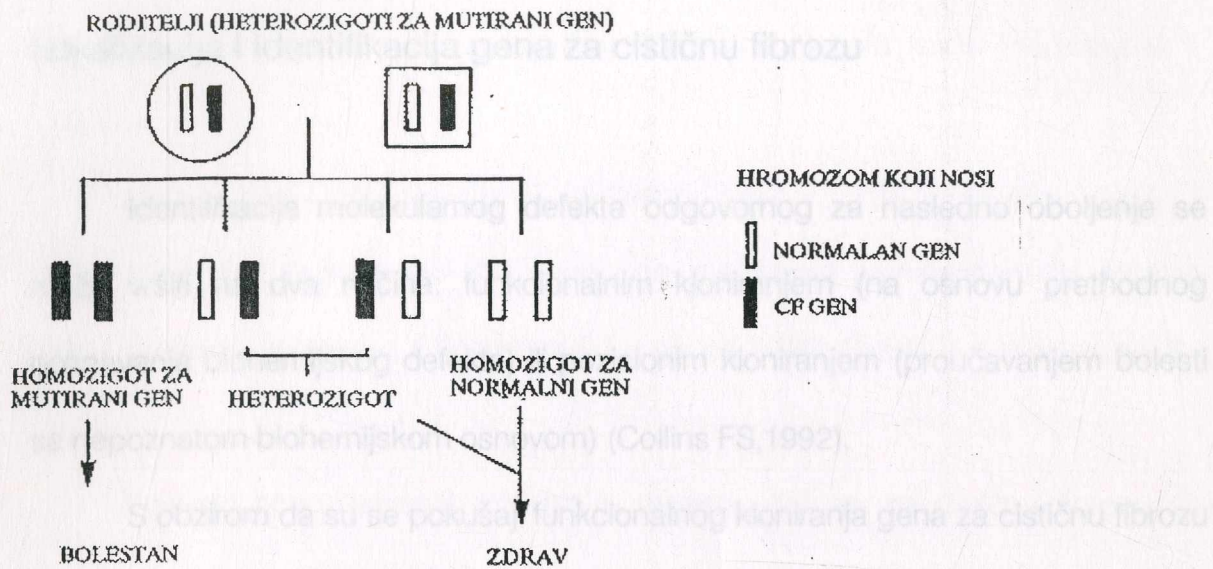
## UVOD

### Cistična fibroza

Cistična fibroza je najčešće nasledno oboljenje u populaciji belaca koje se često završava smrtnim ishodom. Javlja se sa učestalošću od 1 na 2000 do 1:4000, mada varira među različitim populacijama. Tako je u populaciji Nemačke 1 :3300, Španije 1:3500, Švedske 1 :7700, a za našu populaciju nije poznata. Učestalost nosilaca mutiranog gena, u opštoj populaciji iznosi od 1:23 do 1:32. Učestalost cistične fibroze među drugim rasama je značajno niža (Boat, T.F. i Welsh MJ, 1989).

Cistična fibroza se nasledjuje autozomno recesivno, tj. roditelji, nosioci mutiranog gena, imaju u svakoj trudnoći rizik od 1:4, za rođanje deteta obolelog od cistične fibroze, kao i rizik od 1:2, za rođanje deteta koje će biti asimptomatski nosilac mutiranog gena (Sl. 1).

Cistična fibroza je po prvi put klinički opisana tridesetih godina ovoga veka, (Fanconi G. i sarad., 1936; Andersen DH., 1938) kao sindrom koji uključuje fibrozu pankreasa, i bronhoektazije. Kasnije je pokazano da je cistična fibroza oboljenje egzokrinih žlezda, sa poremećajem u sekreciji mukusa, pa je uveden termin mukovikidoza (Farber S., 1945).



Slika1. Nasledjivanje cistične fibroze

Pored poremećaja na plućima i pankreasu, zapaženo je da se u znoju ovih pacijenata javlja povišeni nivo natrijum hlorida ( Di Sant'Agnese PA. i sarad., 1953 ) što je iskorišćeno kao test za dijagnostiku cistične fibroze (Gibson LE. i Cooke RE.,1959). Odredjivanje elektrolita pilokarpinskim znojnim testom, je još uvek osnovni dijagnostički test za cističnu fibrozu. Većina obolelih od cistične fibroze ima vrednosti žojnog testa između 60 i 125 nmol/l ( Goodchild MC.,i Dodge JA.,1985).

Početak osamdesetih, zapažanja Quintona ( Quintone PM.,1983) da je u obolelih od cistične fibroze poremećen transport hlorida u kanalima znojnih žlezda i Knowelsa i sarad. (Knowels MR. i sarad.,1983) o poremećenom transportu hlorida u epitelijalnim ćelijama disajnih puteva, ukazali su na poremećaj u transportu elektrolita kroz membranu epitelijalnih ćelija kao mogući patofiziološki mehanizam u cističnoj fibrozi.

## Lokalizacija i identifikacija gena za cističnu fibrozu

Identifikacija molekularnog defekta odgovornog za nasledno oboljenje se može vršiti na dva načina: funkcionalnim kloniranjem (na osnovu prethodnog poznavanja biohemijskog defekta) ili pozicionim kloniranjem (proučavanjem bolesti sa nepoznatom biohemijskom osnovom) (Collins FS, 1992).

S obzirom da su se pokušaji funkcionalnog kloniranja gena za cističnu fibrozu pokazali kao bezuspešni, poziciono kloniranje je predstavljalo atraktivan pristup, kada je uveden koncept polimorfnih DNK markera (Bostein D. i sarad., 1980). Da bi se sprovedla genetička analiza vezanosti genskih lokusa neophodno je skupiti veliki broj familija u kojima se određena bolest nasledjuje. Genetičkom analizom vezanosti genskih lokusa, gen se može mapirati u određeni region hromozoma (Ott J., 1986; Orkin SH., 1987).

Visoka učestalost cistične fibroze je omogućila prikupljanje dovoljnog broja nuklearnih porodica za analizu vezanosti genskih lokusa. Potraga je počela 1980. godine i trebalo je punih pet godina (u tom periodu je isključeno oko 40% humanog genoma u pogledu prisustva gena za cističnu fibrozu) (Tsui LC. i sarad., 1985), dok nije otkriven prvi genetički marker PON (paraooksonaza), za koji je procenjeno da je udaljen oko 10cM od lokusa za cističnu fibrozu (Eidberg H. i sarad., 1985). Iste godine Tsui je opisao genetičku vezanost između lokusa za cističnu fibrozu i DNK markera DOCRI-917, udaljenog oko 15cM. Za ovaj marker je kasnije utvrđeno da se nalazi na hromozomu 7 (Knowlton RG. i sarad., 1985). Skoro istovremeno otkrivena su još dva DNK markera, MET (White R. i sarad., 1985) i D7S8 (J311) (Wainwright BJ. i

sarad.,1985 ) u blizini lokusa za cističnu fibrozu na dugom kraku hromozoma 7 (7q31).

Izolovanjem DNK omedjene markerima MET i D7S8 u regionu 7q31, i analiziranjem tog regiona fizičkim i genetičkim metodama, konstruisana je detaljna fizička mapa tog regiona ( Scambler PJ. i sarad.,1986; Estivill X. i Williamson R., 1987 ).

Neki od novootkrivenih markera u regionu lokusa za cističnu fibrozu su pokazivali nenasumičnu alelsku vezanost (linkage disequilibrium). Tako se određeni alel nasledjivao češće sa bolešću nego što bi se to očekivalo u odnosu na frekvencu nasledjivanja na normalnom hromozomu. Ova neravnotežna vezanost alela utvrđena je za markere na lokusima: D7S23 i D7S399 ( XV-2c, C.S7, KM19 i MP6d-9) (Estivill X. i sarad., 1987). Utvrđeno je da je CF mutacija udružena sa određenim haplotipom u više od 84% slučajeva, i da je taj haplotip prisutan samo u 16% normalnih hromozoma (Estivill X. i sarad., 1987; Rommens JM. i sarad.,1989). Ovi podaci su ukazivali na genetičku homogenost u cističnoj fibrozi.

Neravnotežna vezanost i blizina novih markera lokusu za cističnu fibrozu omogućila je genetičku analizu, sa velikim stepenom pouzdanosti, u porodicama u kojima je indeks slučaj (obolelo dete) dostupan za analizu, (Beaudet AL. i sarad.,1989).

Otkriveni markeri su suzili region za analizu sa približno 1500 kb (izmedju MET i J.311) na oko 300 kb (izmedju MP6d-9 i G-2(D7S410) (Estivill X i sarad., 1989 ; Ramsay M. i sarad.,1990 ). Analizom sekvenci iz ovog regiona hromozoma 7 Tsui i Riordan u Kanadi i Collins u SAD sa saradnicima, identifikovali su nekoliko gena

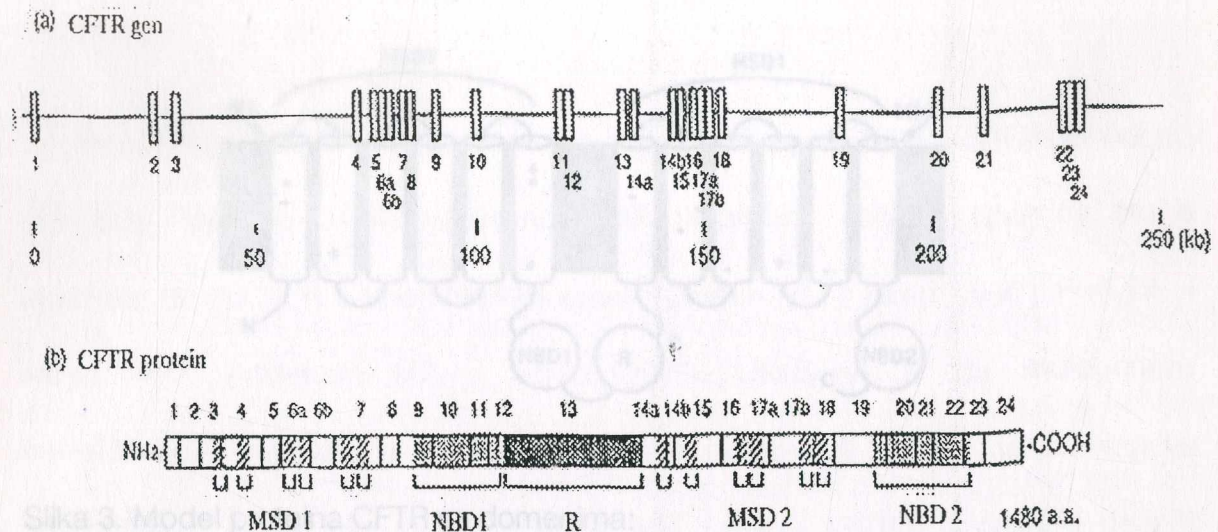
(Kerem BS. i sarad., 1989 ; Riordan JR. i sarad.,1989 ; Rommens JM. i sarad.,1989).

Za jedan od njih se pokazalo, po otkriću  $\Delta F508$  mutacije u DNK obolelih od cistične fibroze, da predstavlja gen odgovoran za ovu bolest (Rommens JM. i sarad.1989; Kerem BS. i sarad,1989). Proizvod ovog gena označen je kao transmembranski regulator provodljivosti u cističnoj fibrozi (CFTR - Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator )( Rommens JM. i sarad., 1989 ).

## Struktura gena za CFTR

Gen CFTR se sastoji od 27 egzona i prostire se na oko 230 kb genomske DNK ( Sl. 2a). Informaciona RNK prepisana sa ovog regiona, veličine oko 6,5 kb identifikovana je u različitim tkivima koja su oštećena u cističnoj fibrozi, uključujući pluća, pankreas, znojne žlezde, jetru, nazalne polipe, pljuvačne žlezde i debelo crevo.( Kerem BS. i sarad.,1989, ; Riordan JR. i sarad.,1989 ).

U okviru CFTR gena otkriveno je više inicijacionih mesta transkripcije, što je verovatno odraz odsustva TATA sekvence u promotorskom regionu. Prvi podaci (Riordan JR. i sarad.,1989) ukazivali su da transkripcija započinje sa mesta +1 u cDNK sekvenci, koje se nalazi 121 bp uzvodno od inicijacionog kodona ATG; kasnija istraživanja su pokazala da postoji i dodatna inicijacija transkripcije na mestima +60, +70 i +100 ( Koh J. i sarad.,1993 ).



Slika 3. Model CFTR proteina. MSD: transmembranski domen; NBD: nukleotid vezivni domen; R: regulatorni domen;  $\Delta$ : mesta glikozilacije.

Slika 2. CFTR gen i CFTR protein

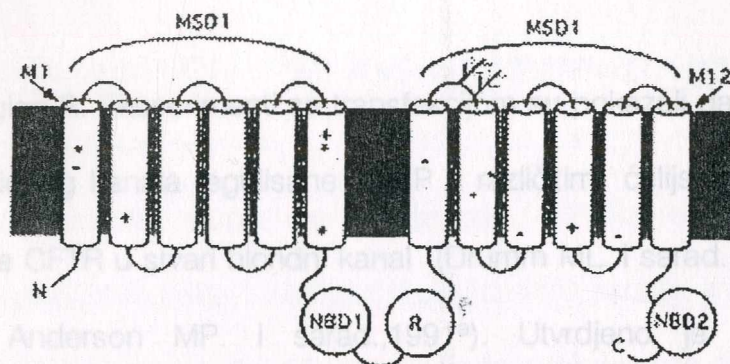
U pojedinim tkivima i ćelijskim linijama, korišćenjem metode RT-PCR otkriveni su primarni transkripti kojima nedostaju egzoni 4, 9, 12 i deo egzona 13. Takodje su medju zdravim osobama uočene razlike u količini transkripata kojima nedostaje egzon 9 (Chu CS. i sarad.,1993), dok je na hromozomima koji nose mutaciju ova varijacija manje izražena. Postoje dokazi da efikasnost obrade egzona 9 u cis poziciji sa mutacijom R117H može da utiče na težinu bolesti (Kerem BS. i Kerem E.,1996).

Zatim sledi drugi NBD region. Regulatorni region sadrži aminokiseline koje su potencijalni mesta fosforilacije protein kinazama A i C (PKA i PKC) (Kerem J.R.)

CFTR protein

verovatno je glikozilovani transmembranski protein (Kerem BS. i Kerem E.,1996).

Gen CFTR kodira protein od 1480 aminokiselina, molekulske mase 170 000 Da (Sl. 2). NBD regioni CFTR proteina su slični onima kod P-glikoproteina, iako ovaj ne poseduje



Slika 3. Model proteina CFTR sa domenima:

MSD: transmembranski domeni

NBD: nukleotid vezivni domen

R: regulatorni domen

mesta glikozilacije

Na osnovu redosleda aminokiselina pretpostavljena je terciarna struktura proteina (Sl. 3), slična transporterskim proteinima zavisnim od ATP prvo opisanim (Sl. 3), slična transporterskim proteinima zavisnim od ATP prvo opisanim (Sl. 3), slična transporterskim proteinima zavisnim od ATP prvo opisanim (Sl. 3). Domen R ima izgled inhibitori efekat na kanalnu funkciju kada je kod prokariota, a kasnije i kod eukariota, kao što su MDR (multidrug resistance), ili CQR (hlorokinon rezistencija) ili STE6 (kod kvasca) (Hyde SC. i sarad.,1990). CFTR ima dva transmembranska ( MSD ) domena, razdvojena vezivnim regionom za ATP (NBD tj. nukleotid vezivni domen) i hidrofилnom regulatornom subjedinicom (R)(Sl. 3). Zatim sledi drugi NBD region. Regulatorni region sadrži aminokiseline , koje su potencijalna mesta fosforilacije protein kinazama A i C ( PKA i PKC ) (Riordan JR. i sarad.,1989 ). Domen R i dva NBD domena nalaze se u citosolu. Na površini ćelije verovatno leže glikozilovani asparaginski ostaci izmedju M7 i M8 ( Sl. 3).

Na osnovu podataka za druge membranske proteine, pretpostavlja se da je CFTR uključen u transport supstanci kroz membranu. Transmembranski i NBD regioni CFTR proteina su slični onima kod P-glikoproteina, iako ovaj ne poseduje



regulatorni region R. Eksperimenti sa transfekcijom su pokazali da CFTR dovodi do aktivnosti hloridnog kanala regulisane cAMP u različitim ćelijskim tipovima, što je ukazivalo da je CFTR u stvari hloridni kanal (Drumm ML. i sarad.,1990 ; Rich DP. i sarad.,1990; Anderson MP. i sarad.,1991<sup>a</sup>). Utvrđeno je da mutageneza naelektrisanih ostataka u transmembranskim domenima CFTR menja njegovu propustljivost za različite jone (Anderson MP. i sarad.,1991<sup>b</sup>), a delecija dela R domena dovodi do propustljivosti hloridnog kanala (Rich DP. i sarad., 1990 ). Ovi nalazi objašnjavaju elektrofiziološka zapažanja, koja ukazuju da je osnovni defekt u cističnoj fibrozi u regulaciji propustljivosti za hloridne jone u sekretornim epitelijalnim ćelijama. CFTR je hloridni kanal koji se direktno aktivira protein kinazom zavisnom od cAMP. Postoji nekoliko serinskih ostataka u R domenu koji se fosforilišu po aktivaciji PKA. Domen R ima izgleda inhibitorni efekat na kanalnu funkciju kada je nefosforilisan (Rich DP. i sarad., 1990). Fosforilacija CFTR samo sa PKA nije dovoljna za ponovno uspostavljanje funkcije, i potrebno je dodati ATP (Anderson MP. i sarad.,1991<sup>b</sup>) (Sl.4).

CFTR se predominantno eksprimira u epitelijalnim ćelijama, kako u zdravih osoba, tako i u epitelu pacijenata obolelih od cistične fibroze (Riordan JR. i sarad., 1989 ). Nadjen je u ćelijama izvodnih kanala pankreasa, pljuvačnih žlezda, creva, pluća ( submukozne žlezde ekspimiraju više CFTR nego epitelijalne ćelije disajnih puteva ), testisa i endometrijuma (Trezise AE. i Buchwald M.,1991). CFTR je takodje detektovan u epitelu disajnih puteva fetusa (McCray PBJ. i sarad.,1992). Primenom metode RT-PCR otkriveni su CFTR transkripti u limfocitima, monocitima, neutrofilima



i fibroblastima, iako je biološki i klinički značaj ove ekspresije u tim ćelijama nejasan (Yoshimura K i sarad, 1991).

Imunocitohemijske studije su lokalizovale CFTR u apikalnom regionu polarizovanih epitelijalnih ćelija, uključujući i pankreasne kanale, kripte tankog creva, kanale znojnih žlezda, epitel disajnih puteva (gde submukozne žlezde sadrže više CFTR od površinskog epitela), epitelijalne ćelijske linije koje luče CI i bubrežne tubule (Crawford I. i sarad., 1991).

Interesantno je da epitelijalne ćelije koje oblažu disajne puteve ekspimiraju malo CFTR (Engelhardt JF. i sarad., 1992), što navodi na zaključak da je relativno mali broj CFTR molekula dovoljan za transepitelijalni transport hloridnih jona.

Analiza mikrosatelitskih haplotipova (Morris N i sarad., 1995) je pokazala da Mutacije u okviru CFTR gena

od 52 000 godina i proširila duž Evrope. Tom  
brzo je doprinela neka selektivna prednost ove mutacije ili alela blisko  
veza

Tokom 7 godina od izolovanja CFTR gena otkriveno je preko 700 mutacija u njegovoj sekvenci. Od tog broja se smatra da oko 620 čine patološke mutacije, dok preostale predstavljaju benigne varijacije u sekvenci (CF Genetic Analysis Consortium Newsletter 68, 1996). Brzo nagomilavanje podataka o mutacijama je delom zasluga postojanja Konzorcijuma za genetičku analizu cistične fibroze (CF Genetic Analysis Consortium). Ovaj konzorcijum čini oko 100 laboratorija iz celog sveta, čiji je cilj proučavanje mutacija u okviru CFTR gena, analiza njihove učestalosti i distribucije kliničkih implikacija. U narednim godinama se očekuje otkrivanje novih mutacija, s obzirom da u izvesnim populacijama još uvek nije otkriveno 10-20% mutantnih alela.

Najčešća mutacija u okviru CFTR gena je delecija 3 bazna para koja uklanja fenilalanin na poziciji 508 u desetom egzonu CFTR gena i označena je kao  $\Delta F508$  mutacija (Kerem BS., i sarad.,1989). Prisutna je na oko 70% hromozoma koji nose mutirani CFTR gen. Medju različitim populacijama postoje značajne razlike u zastupljenosti  $\Delta F508$  mutacije (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium 1990). U Evropi postoji jasan gradijent relativne učestalosti  $\Delta F508$  mutacije, sa pikovima na severozapadu (88% u Danskoj i delovima Engleske) i niskim vrednostima na jugoistoku (30% u Turskoj i Izraelu). Pretpostavlja se da je širenje ove mutacije praćeno migracijom stanovništva sa Srednjeg istoka ka severozapadu Evrope.

Analiza mikrosatelitskih haplotipova (Morrall N. i sarad.,1995) je pokazala da se  $\Delta F508$  mutacija javila pre više od 52 000 godina i proširila duž Evrope. Tom širenju verovatno je doprinela neka selektivna prednost ove mutacije ili alela blisko vezanih za lokus za cističnu fibrozu (Bertranpetit J. i Calafell F.,1996).

U okviru CFTR gena identifikovani su različiti drugi tipovi mutacija. Oko 50% čine zamene aminokiselina. Ostatak čine mutacije koje dovode do stop signala u kodirajućem delu, pomeranja okvira čitanja ili do promene obrade primarnog transkripta (Kerem BS. i Kerem E., 1996). Opisane su i dve delecije - jedna velika, koja ne menja okvir čitanja, i jedna složena u kojoj su deletirani egzoni 4 do 7 i 11 do 18, dok su egzoni 8 i 10 intaktni. Nisu opisane mutacije u okviru promotora (CF Genetic Analysis Consortium Newsletter 68, 1996). Kao što se i očekivalo većina mutacija je nadjena medju osobama koje za pretke imaju belce, ali postoje i mutacije jedinstvene za populacije koje ne potiču od belaca.

naziv	promenana nivou aminokiselina	promena na nivou nukleotida	egzon	učestalost (%)
$\Delta F508$	del Phe	3-bp(1652-4)	10	~ 70,0
G542X	Gly→Stop	G→T(1756)	11	2,3
G551D	Gly→Asp	G→A(1784)	11	2,6
W1282X	Trp→Arg	G→A (3978)	20	1,4
N1303K	Asn→His	A→C (4039)	21	1,2
R553X	Arg→Stop	C→T(1789)	11	0,9
621+1G→T	splice	G→T(621+1)	int4	0,9
1717-1G→A	splice	G→A(1717-1)	int10	0,8

Tabela 1. Mutacije u CFTR genu čija je zastupljenost u populaciji belaca veća od 0,5%

Do danas je ispitano više od 35 000 mutiranih hromozoma, i utvrđeno je da, u opštoj populaciji, oko 70% nosi  $\Delta F508$ . Relativne frekvence drugih mutacija variraju medju različitim populacijama, i većina njih je vrlo retka. Medju do sada otkrivenim mutacijama u okviru CFTR gena, samo 8 je zastupljeno u populaciji belaca sa učestalošću većom od 0,5% ( $\Delta F508$ , G542X, G551D, W1282X, N1303K, R553X, 621 + 1G-T i 1771-1G-A) (Tabela 1), i još oko 25 dodatnih na po više od 10 hromozoma ( Kerem BS. i sarad,1989 ; Kerem BS. i sarad 1990; Cutting GR. i sarad.,1990; Vidauid M. i sarad.,1990; Osborne L. i sarad.,1991; Zelenski J. i sarad.,1991). Mnoge mutacije su opisane samo jednom. Medjutim, u izvesnim populacijama, neke od mutacija poput: A455E, G542X, G551D, R553X, W1282X, N1303K i 621+1G-T, mogu da čine i do 10% CF mutacija.( Tsui LC., 1992 ).

Raspodela mutacija u različitim delovima CFTR gena nije nasumična, već postoje "vruća mesta". Jedno od takvih "vrućih mesta" je egzon 11, koji odgovara



NBD1 domenu CFTR proteina, sa najmanje 11 različitih promena u sekvenci u okviru 5 kodona. Ove promene uključuju i 4 različite promene sekvence kodona AGT za serin na poziciji 549 u egzonu 11. Ekvivalentna pozicija na NBD2 nema tako visoku gustinu mutacija (Cutting GR. i sarad., 1990). Takodje, nekoliko mutacija u okviru egzona 11 su relativno česte u većini populacija. U egzonima 6b, 16, 17a i 24 do sada nisu otkrivene mutacije (CF Genetic Analysis Consortium Newsletter 68, 1996).

Postoje i primeri koji pokazuju da dve nezavisne mutacije mogu da koegzistiraju na istom hromozomu. Na istom hromozomu sa  $\Delta F508$  mutacijom, opisana je dodatna mutacija R553Q za koju se smatra da ima atenuirajući efekat na bolest (Dork T. i sarad., 1991).

## Tipovi mutacija u CFTR genu

Rezultati mnogobrojnih *in vitro* eksperimenata su doveli do pretpostavke da različite mutacije izazivaju različite poremećaje, kako u strukturi, tako i u funkciji hloridnog kanala. Welsh i Smith (Welsh MJ. i Smith AE., 1993) su predložili 4 mehanizma kojima mutacije remete funkciju CFTR proteina (Sl.4):

poremećaj u sintezi proteina (klasa I)

poremećaj u obradi proteina (klasa II)

poremećaj u regulaciji hloridnog kanala (klasa III)

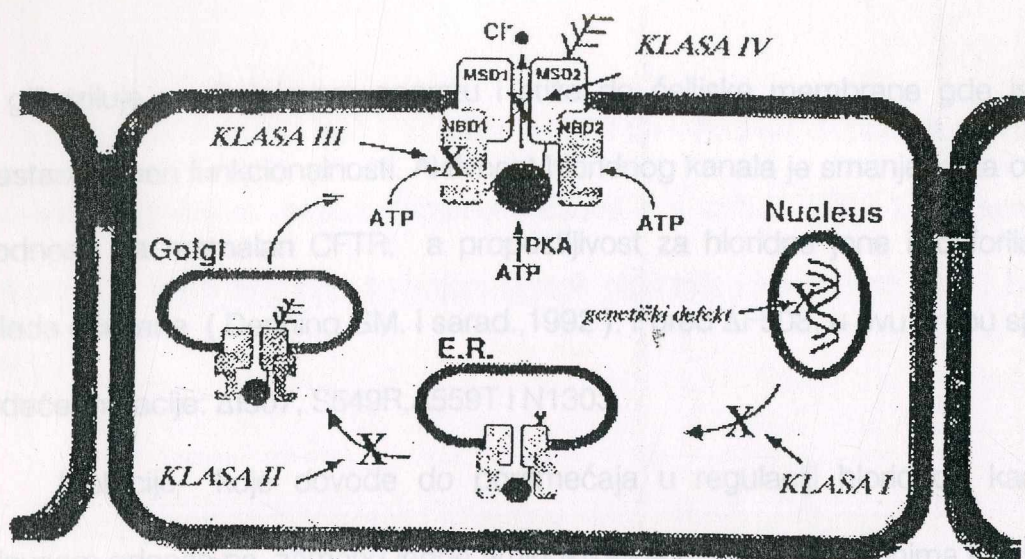
poremećaj u provodljivosti hloridnog kanala (klasa IV)

Nedavno je uvedena i peta klasa mutacija koje dovode do sniženog nivoa CFTR iRNK ili CFTR proteina ( Kerem BS. i Kerem E., 1996).

klasa I	klasa II	klasa III	klasa IV	klasa V
G542X	ΔF508	G551D	R117H	3849+10kbC→T
621+1G→T	N1303K		R334W	5T
3905 ins T	S549R		R347P	1811+1,6kb A→G
R553X				

Tabela 2. Funkcionalna klasifikacija mutacija u CFTR genu

U grupu mutacija koje dovode do poremećaja u sintezi proteina, spadaju one koje dovode do stop signala u kodirajućem delu, pomeranja okvira čitanja ili promene obrade primarnog transkripta. Gen CFTR koji nosi neku od ovih mutacija nije u stanju da sintetiše protein odgovarajuće dužine. Sintetisani proteini su uglavnom nestabilni, brzo se degraduju ili su samo delimično funkcionalni. Kao posledica ovih mutacija očekuje se gubitak funkcije hloridnog kanala u epitelijalnim ćelijama. U ove mutacije spadaju : G542X, 3905insT i 621+ 1G-T.



Slika 4. Biosinteza i funkcija CFTR proteina u epitelijalnoj ćeliji

Nekoliko mutacija klase II, uključujući i  $\Delta F508$  mutaciju, dovode do pogrešne lokalizacije CFTR proteina. Mutirani protein se ne transportuje do apikalne ćelijske membrane već ostaje zarobljen u endoplazmatičnom retikulumu ( Cheng SH. i sarad., 1990 ). Verovatno kontrola kvaliteta ne propušta protein koji ne zauzima pravilnu konformaciju i označava ga za razgradnju (Ward CL, i sarad., 1995). Pretpostavlja se da je nemogućnost CFTR mutanata da dovrše svoj biosintetski put praćena stepenom njegove glikozilacije. U ćelijama koje sintetišu rekombinantni protein,  $\Delta F508$  mutanti ne mogu da dostignu kompletno glikozilovanu formu, a mutirani CFTR ne može da se identifikuje u apikalnoj membrani. Mutirani CFTR sa  $\Delta F508$  je na sličan način pogrešno lokalizovan u epitelijalnim ćelijama disajnih puteva, kanala znojnih žlezda i submukoznih žlezda. Iako je CFTR pogrešno lokalizovan u ćelijama koje se uzgajaju na  $+ 37^{\circ}\text{C}$ , kada se temperatura kultivacije snizi na  $23^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$ , mutirani protein napušta endoplazmatični retikulum, potpuno

se glikoziluje u Golgiovom aparatu i stiže do ćelijske membrane gde ispoljava izvestan stepen funkcionalnosti. Aktivnost hloridnog kanala je smanjena za oko 30% u odnosu na normalan CFTR, a propustljivost za hloridne jone i fosforilacija su izgleda očuvane ( Denning GM. i sarad.,1992 ). Pored  $\Delta F508$ , u ovu grupu spadaju i sledeće mutacije:  $\Delta I507$ , S549R,A559T i N1303.

Mutacije koje dovode do poremećaja u regulaciji hloridnog kanala se uglavnom odnose na zamenu jedne aminokiseline drugom u egzonima koji kodiraju domene NBD1 i NBD2 ključnim za vezivanje ATP. S obzirom da intracelularni ATP reguliše otvaranje hloridnog kanala, mutacije u ovim domenima CFTR mogu da promene funkciju hloridnog kanala.

Kod nekih mutanata (poput G551D) funkcija kanala je donekle očuvana, kod nekih (S525P) je ATP manje potentan stimulator, a kod nekih (G551S, G1244E i G1349D) je smanjena apsolutna aktivnost hloridnog kanala (Drumm ML. i sarad., 1991).

Funkcija CFTR proteina je takodje regulisana fosforilacijom regulatornog (R) domena. Dosad je otkriveno nekoliko mutacija u egzonu 13, tipa zamene jedne aminokiseline drugom, ali još uvek nije utvrđeno kako one utiču na funkciju hloridnog kanala. Jedna od pretpostavki je da je konformacija R domena, zahvaljujući naelektrisanim ostacima, donekle fleksibilna, tako da mutacije u okviru ovog domena nemaju tako težak fenotip (Welsh MJ. i Smith AE. 1993).

Mutacije koje dovode do poremećaja u provodljivosti hloridnog kanala su otkrivene u transmembranskim domenima, za koje se pretpostavlja da formiraju poru kroz koju prolaze hloridni joni. Otkriveno je nekoliko mutacija koje dovode do zamene jedne

aminokiseline drugom, kao i tri mutacije ( R117H, R334W i R347P) koje dovode do zamene arginina u MSD1 domenu ( Estivill X i sarad., 1995 ). Za sve opisane mutante je karakterističan smanjeni protok hloridnih jona (Welsh MJ. i Smith AE., 1993).

### Korelacija genotip-fenotip i klinička slika cistične fibroze

Izgleda da je osnovni patofiziološki mehanizam koji dovodi do različitih manifestacija ove bolesti poremećaj funkcije egzokrinih žlezda. Javlja se opstrukcija pluća viskoznim mukusom, što vodi hroničnim plućnim infekcijama. Oštećenja pluća nastaju usled rekurentnih bakterijskih infekcija, i dovode do fatalnog ishoda u većine ovih pacijenata. Pluća obolelih od cistične fibroze imaju tendenciju ka kolonizaciji patogenima *P. aeruginosa* i *S.aureus* ( Deretić V. i sarad.1991 ). U oko 85% obolelih od cistične fibroze oštećena je funkcija egzokrinog pankreasa tj. prisutan je nedostatak pankreasnih enzima što sprečava normalnu razgradnju hranljivih materija u digestivnom traktu i ovi pacijenti su označeni kao pankreasno insuficijentni (PI) ( Corey M. i sarad., 1984). Insuficijencija pankreasa dovodi do slabog napredovanja i neuhranjenosti. U 5-10% novorodjenčadi sa cističnom fibrozom prisutan je mekonijalni ileus, oblik intestinalne opstrukcije (Collins FS., 1992). Preostalih 15% ima očuvanu funkciju pankreasa i označeni su kao pankreasno suficijentni (PS). U okviru kliničkih manifestacija bolesti, javljaju se i neplodnost, poremećaj funkcije jetre i šećerna bolest ( Levine SB. i sarad., 1982).



Cistična fibroza se odlikuje visokom varijabilnošću kliničke slike. Pacijenti se dijagnostikuju u različitom uzrastu, sa različitim stepenom oštećenja organa. Iako se većina obolelih od cistične fibroze otkriva u prvoj godini života sa tipičnom plućnom bolešću i oštećenom funkcijom pankreasa, poslednjih godina sve je veći broj pacijenata koji se otkrivaju u odraslom životnom dobu i sa atipičnom kliničkom slikom. Premda je progresivna plućna bolest najčešći uzrok smrtnog ishoda u okvru CF, zapaža se da su mutacije I i II klase uglavnom teže i njene pojave, tako i progresije. Varijabilnost se zapaža i u pogledu neplodnosti. Većina muškaraca obolelih od cistične fibroze je neplodna usled kongenitalnog odsustva vas deferensa. Međutim, nedavno su opisani i slučajevi fertilnih muškaraca obolelih od cistične fibroze (Highsmith WE. i sarad., 1994). Kao što je navedeno, zapaža se varijabilnost i u pogledu oštećenja funkcije pankreasa. Nekoliko studija (The CF Genotype-Phenotype Consortium, 1993.; Santis G i Osborne L., 1990) je potvrdilo da jedina jasna korelacija genotip-fenotip može da se postavi u pogledu stepena očuvanosti funkcije pankreasa. U okviru porodica sa većim brojem članova obolelih od cistične fibroze, zapaža se sličan stepen oštećenja funkcije pankreasa (Corey M. i sarad., 1989) što ukazuje da genetički faktori utiču na to. Kerem i saradnici (Kerem BS. i saradnici, 1990) su pokazali da su homozigoti za  $\Delta F508$  mutaciju skoro uvek pankreasno insuficijentni, dok 28%  $\Delta F508$ -ne $\Delta F508$  "mešanih" heterozigota i 64% pacijenata koji ne nose  $\Delta F508$  mutaciju ima očuvanu funkciju pankreasa. Isti autori su takodje ukazali da jedna "blaga" mutacija verovatno dominira nad "teškom" mutacijom, tako da je potrebno prisustvo dve "teške" mutacije da bi se ispoljila insuficijencija pankreasa (Kerem BS.

i sarad., 1989). Ovu hipotezu potkrepljuju podaci da veliki broj pacijenata sa očuvanom funkcijom pankreasa ima genotip R117H/ $\Delta$ F508 (The CF Genotype-Phenotype Consortium, 1993). Danas je opšte prihvaćena klasifikacija na "teške" i "blage" mutacije (Kristidis P. i sarad., 1992) (Tab. 3).

Ukoliko se napravi korelacija sa funkcionalnom klasifikacijom mutacija u okviru CFTR gena zapaža se da su mutacije I i II klase uglavnom tzv. "teške" mutacije tj., mutacije udružene sa insuficijencijom pankreasa, što ne iznenadjuje, s obzirom da one dovode do pogrešne lokalizacije CFTR proteina u ćeliji. Većina mutacija III klase (npr. G551D) spada u teške mutacije (Cutting GR. i sarad., 1990), ali su opisani i slučajevi sa očuvanom funkcijom pankreasa (npr., G551S, Strong TV. i sarad., 1991).

"teške" mutacije	"blage" mutacije	mutacije koje daju varijabilnu kliničku sliku
1078del T	R117H	G85E
$\Delta$ F508	A455E	R334W
17717-G $\rightarrow$ A	3849 + 10kb C $\rightarrow$ A	5T
G542X		
G551D		
R553X		
621 + 1G $\rightarrow$ A		
W1282X		
N1303K		
1811 + 1,6kb A $\rightarrow$ G		
1677del TA		

Tabela 3. Klasifikacija mutacija u odnosu na težinu kliničke slike

Mutacije klase IV, (poput R117H), spadaju u "blage " mutacije (Dean M. i sarad., 1990).

U pacijenata homozigota za  $\Delta F508$  uočava se teža klinička slika, bolest se ranije javlja, nivo hlorida u znoju je visok i sreće se insuficijencija pankreasa (Kerem E. i sarad., 1990). Medjutim, plućne manifestacije bolesti su izrazito varijabilne i nije utvrđena korelacija sa određenim genotipom (The CF Genotype-Phenotype Consortium, 1993). Nije utvrđena korelacija između prisustva određenih mutacija i pojave mekonijalnog ileusa (Kerem E., Corey M., 1990).

## Molekularna dijagnostika naslednih bolesti

Iako se za postojanje naslednih bolesti zna duže od jednog veka, molekularne metode za otkrivanje poremećaja koji leže u njihovoj osnovi su počele da se razvijaju u protekle dve decenije.

Genetička analiza naslednih bolesti se može vršiti na tri nivoa:

1) Primenom biohemijskih metoda koje detektuju izmenjene metabolite ili kvantifikuju nedostatak enzimske aktivnosti. Ovim putem se zasada može otkriti više od 40 naslednih bolesti.

2) Primenom citogenetskih metoda kojima se može otkriva više od 60 naslednih bolesti. Razvoj metoda molekularne biologije, što se posebno odnosi na FISH (fluorescentna in situ hibridizacija) proširio je citogenetsku dijagnostiku i na interfazno jedro.

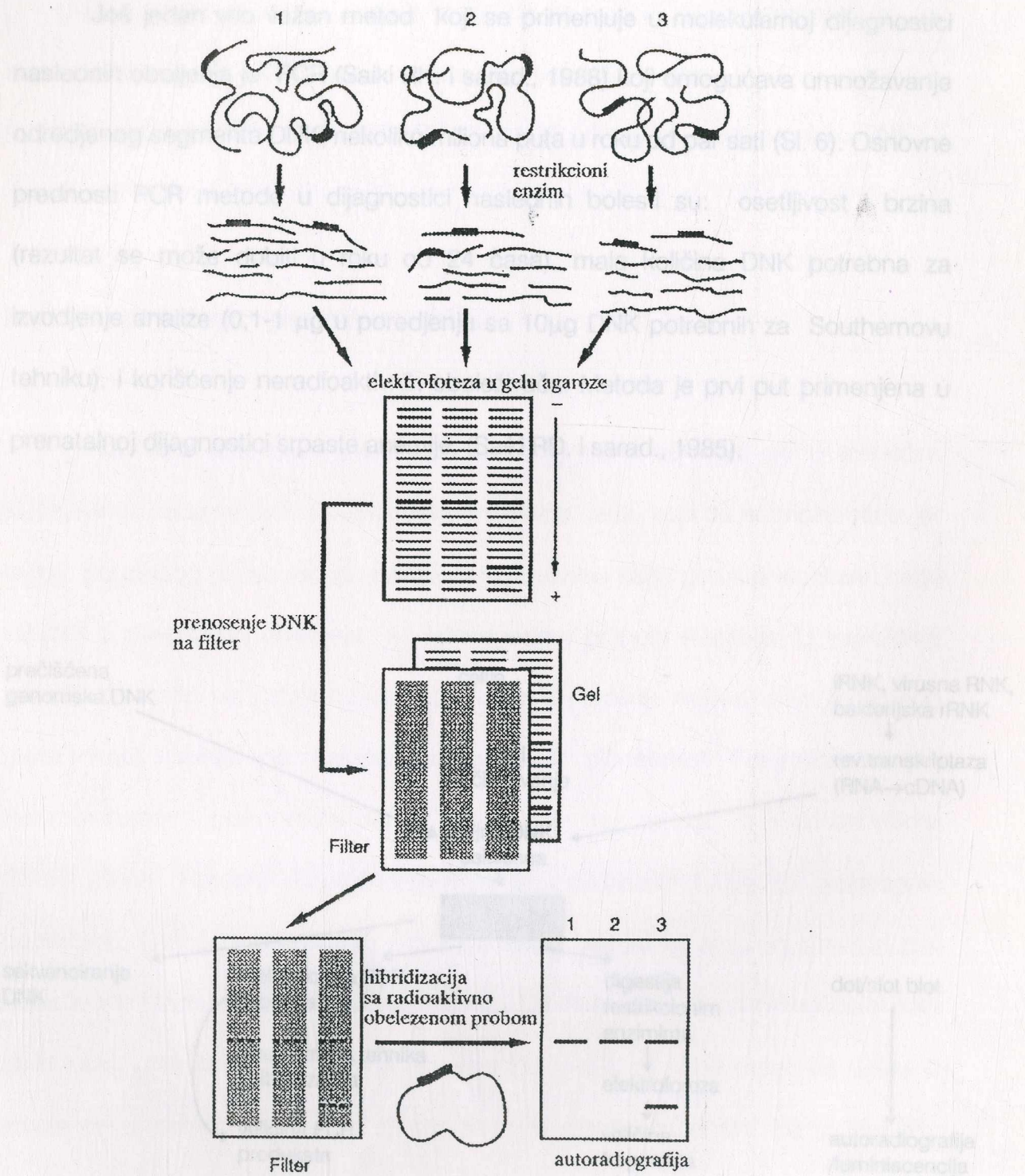
3) Analizom naslednjih bolesti na nivou gena. Broj naslednjih bolesti koje se mogu otkriti primenom molekularno genetskih metoda je znatno veći u odnosu na prethodno navedene metode i vrlo brzo se povećava (Yates JRW, 1996).

Metode za otkrivanje specifičnih defekata u okviru gena razvile su se iz metoda molekularne biologije koje se primenjuju u osnovnim istraživanjima: izolovanje i prečišćavanje genomske DNK, upotreba restrikcionih enzima, elektroforetske tehnike, hibridizacija nukleinskih kiselina, reakcija lančanog umnožavanja DNK - PCR (Polymerase Chain Reaction).

Od navedenih metoda, upotreba restrikcionih enzima i hibridizacije nukleinskih kiselina objedinjene su u jednoj od najviše korišćenih tehnika molekularne genetike - Southernovoj tehnici (Southern EM., 1975), šematski predstavljenoj na Slici 5. Kao izvor DNK koriste se sve ćelije koje poseduju jedro, a to su najčešće limfociti periferne krvi, odnosno, ćelije horionskih resica i amnionske tečnosti u prenatalnoj dijagnostici naslednjih bolesti. Za gene koji su klonirani, postoje probe specifične za gen, a za gene koji još nisu klonirani koriste se takozvane anonimne genske probe tj. probe u blizini gena koji nas interesuje. Genske probe se koriste u direktnoj analizi mutacija ili praćenju nasleđivanja mutiranog gena u rizičnim porodicama.

Slika 5. Southernova tehnika

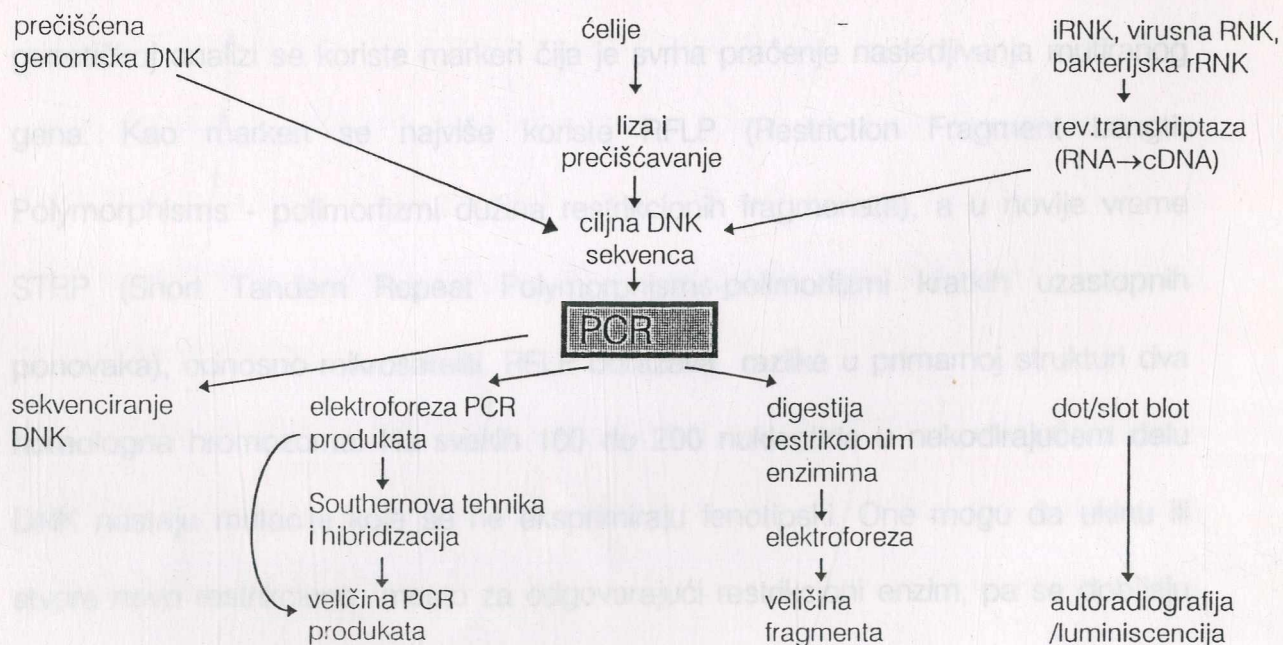
# GENOMSKA DNK



Slika 5. Primenjena PCR metodom

Slika 5. Southernova tehnika

Još jedan vrlo važan metod koji se primenjuje u molekularnoj dijagnostici naslednih oboljenja je PCR (Saiki RK. i sarad., 1988) koji omogućava umnožavanje određenog segmenta DNK, nekoliko miliona puta u roku od par sati (Sl. 6). Osnovne prednosti PCR metode u dijagnostici naslednih bolesti su: osetljivost i brzina (rezultat se može dobiti u roku od 24 časa), mala količina DNK potrebna za izvodjenje analize (0,1-1  $\mu\text{g}$  u poredjenju sa 10 $\mu\text{g}$  DNK potrebnih za Southernovu tehniku), i korišćenje neradioaktivnih obeleživača. Metoda je prvi put primenjena u prenatalnoj dijagnostici srpaste anemije, (Saiki RD. i sarad., 1985).



Slika 6. Primena PCR metode

Molekularno-genetske metode mogu da se podeliti na direktne metode, za koje je osnovni uslov poznavanje specifičnog defekta na nivou DNK, i indirektne metode, za čiju primenu nije neophodno poznavati prirodu promene na nivou DNK.

### Indirektna metoda genetičke analize

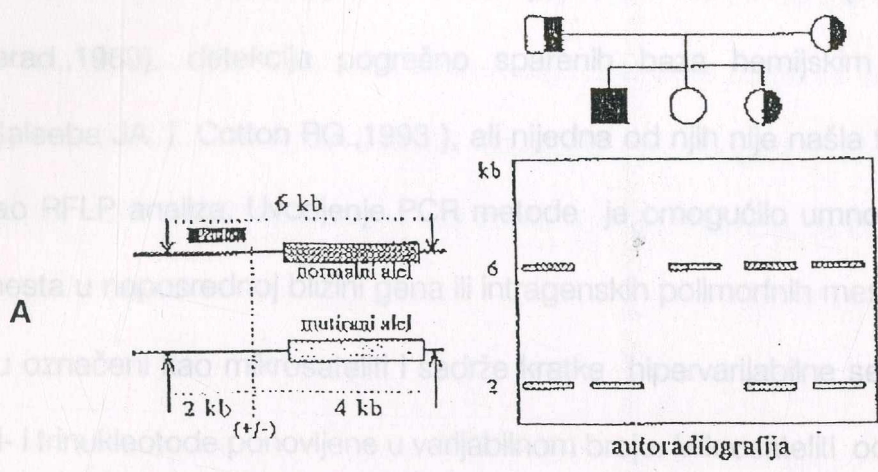
Indirektna detekcija prisustva mutiranog gena sprovodi se u sledećim slučajevima: kada se radi o velikoj deleciji u okviru gena koja se ne može otkriti jer nema pogodnog restriktionog enzima, u slučajevima kada gen nije kloniran i kada se radi o dijagnostici oboljenja sa heterogenom grupom mutacija. U indirektnoj genetičkoj analizi se koriste markeri čija je svrha praćenje nasledjivanja mutiranog gena. Kao markeri se najviše koriste RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms - polimorfizmi dužina restriktionih fragmenata), a u novije vreme STRP (Short Tandem Repeat Polymorphisms-polimorfizmi kratkih uzastopnih ponovaka), odnosno mikrosateliti. RFLP odražava razlike u primarnoj strukturi dva homologna hromozoma. Na svakih 100 do 200 nukleotida u nekodirajućem delu DNK nastaju mutacije koje se ne eksprimiraju fenotipski. One mogu da ukinu ili stvore novo restriktiono mesto za odgovarajući restriktioni enzim, pa se dobijaju fragmenti različitih dužina (Jeffreys AJ, 1979; Ewens WJ, 1981). Ovi fragmenti se mogu detektovati genskom probom primenom Southernove tehnike ili, u novije vreme, primenom metode PCR. Umesto otkrivanja specifičnog molekularnog defekta u okviru gena, ovim metodom se detektuju polimorfna restriktiona mesta u

neposrednoj blizini mutacije. Opšte uzevši, prisustvo ili odsustvo restrikcionog mesta je signal za prisustvo ili odsustvo mutacije. Za razliku od direktne detekcije mutiranog gena neophodan uslov za indirektnu detekciju mutiranog gena je uzorak DNK indeks slučaja, oba roditelja, a u nekim slučajevima i šireg porodičnog stabla, da bi se utvrdilo sa kojom dužinom fragmenta DNK se mutirani gen nasledjuje u datoj porodici. Važno je naglasiti da se RFLP analiza može koristiti samo u skriningu rizičnih porodica, tj porodica sa već jednim detetom obolelim od nasledne bolesti, ali ne i u populacionom skriningu na nasledne bolesti. Obrazac traka koji se dobija na autoradiografiji označava se kao "informativan" odnosno "neinformativan" (Sl. 7A). Obrazac RFLP alela je informativan ukoliko je karakterističan za prisustvo naslednog oboljenja u porodici. Osnovne prednosti RFLP analize su sledeće: osetljivost i preciznost, nije potrebna precizna lokalizacija promene na nivou DNK i nema potrebe za uzorcima specifičnih tkiva u kojima se eksprimira ispitivani gen. Nedostaci su u tome što su potrebni uzorci DNK svih članova porodice u kojoj se prati nasledjivanje oboljenja, mogućnost rekombinacije, kao i duže vreme potrebno za izvodjenje analize.

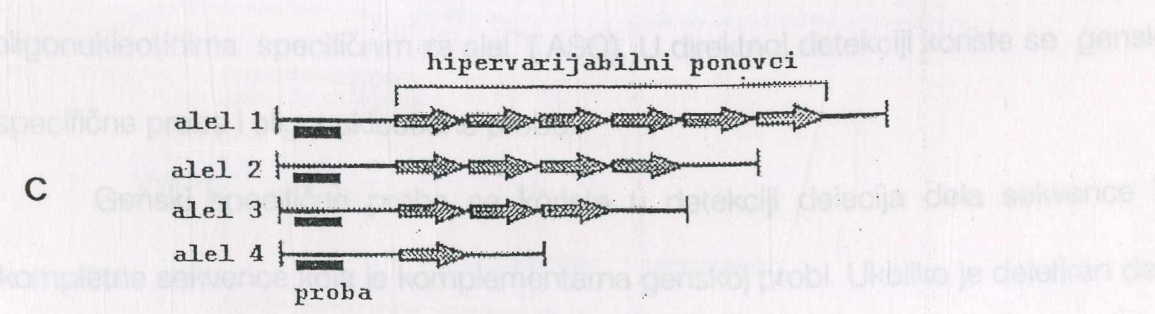
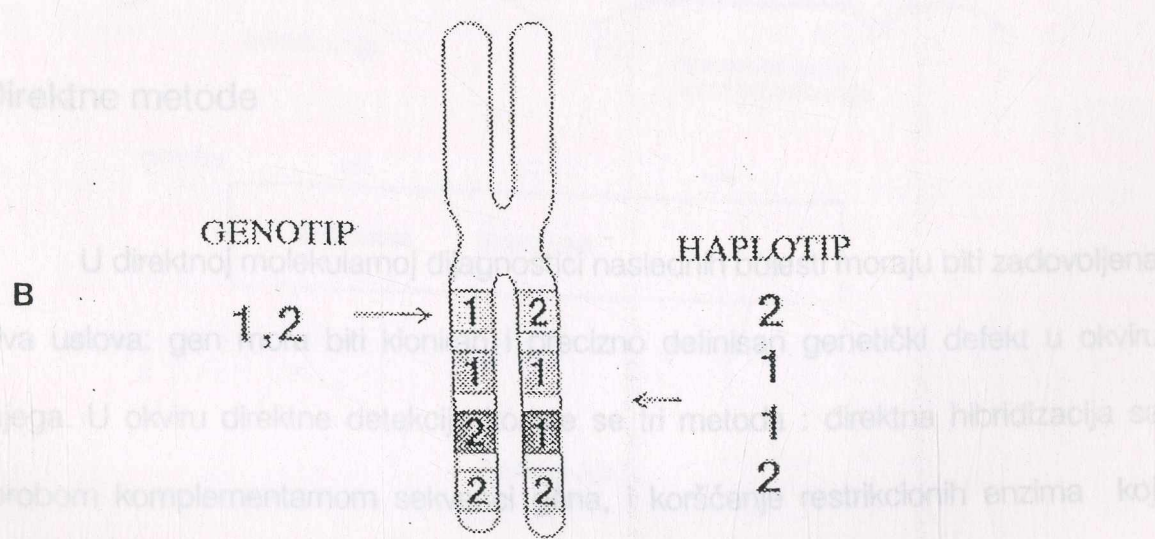
Kada se govori o indirektnim metodama (pre svega RFLP analizi) potrebno je definisati termine haplotip i genotip. Haplotip se odnosi na skup dva ili više alela više različitih gena na jednom hromozomu, dok genotip predstavlja kombinaciju dva alela na istom genskom lokusu u homolognom paru hromozoma (Slika 7B). Primenom haplotipova moguće je pratiti nasledjivanje bolesti, a da se tačno ne zna njena priroda. U toku poslednjih godina razvijeno je više indirektnih metoda za detekciju mutacija: elektroforeza u denaturišućem gradijentu (DGGE) (Gray MR.,



1992), trikomacerni polimorfizam jednolančane DNK (SSCP) (Orta M. i sarad. 1993), detekcija pogrešno spajanih nukleotidnih agensina (COT) (Salas JA, Cotton RG, 1993), ali nijedna od njih nije našla tako široku primenu kao RFLP analiza. RFLP metoda je omogućila umnogomanje polimorfni mesta u hipocentru gena ili in genjskih polimorfni mesta. Ovi regioni DNK su označeni kao hipervarijabilni ponovci. Hipervarijabilni segmenti koji sačinjavaju hipervarijabilni ponovci odgovaraju RFLP, jer definišu alele koji mogu da se prate kao haplotipovi u porodičnom stablu (Sl. 7C).



Direkne metode



Slika 7. Indirektna detekcija prisustva mutiranog gena

- A: RFLP analiza
- B: haplotip i genotip
- C: hipervarijabilni ponovci: RFLP analiza

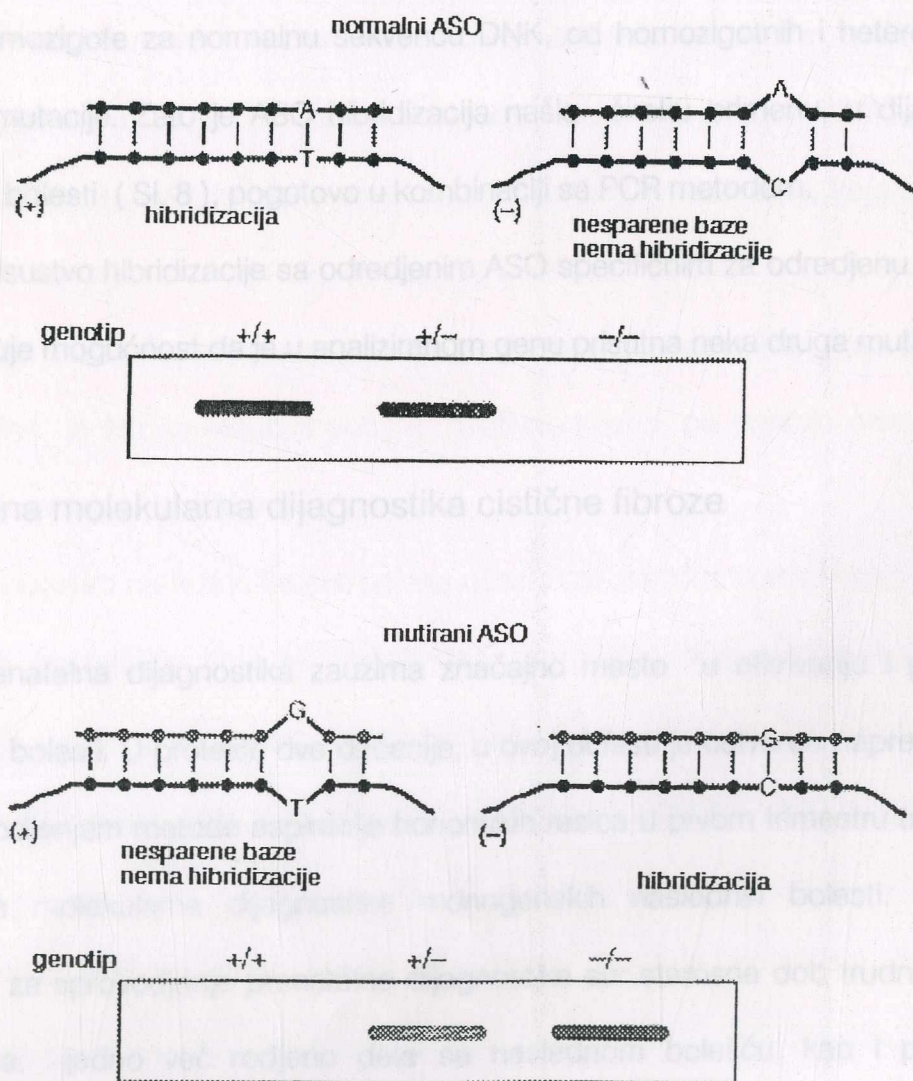
1992), konformacioni polimorfizam jednolančane DNK (SSCP) (Orita M. i sarad.,1989), detekcija pogrešno sparenih baza hemijskim agensima (CCM) (Saleeba JA. i Cotton RG.,1993 ), ali nijedna od njih nije našla tako široku primenu kao RFLP analiza. Uvodjenje PCR metode je omogućilo umnožavanje polimorfniha mesta u neposrednoj blizini gena ili intragenjskih polimorfniha mesta. Ovi regioni DNK su označeni kao mikrosateliti i sadrže kratke hipervarijabilne segmente koji sadrže di- i trinukleotide ponovljene u varijabilnom broju. Mikrosateliti odgovaraju RFLP, jer definišu alele koji mogu da se prate kao haplotipovi u porodičnom stablu (Sl 7C).

## Direktne metode

U direktnoj molekularnoj dijagnostici naslednih bolesti moraju biti zadovoljena dva uslova: gen mora biti kloniran i precizno definisan genetički defekt u okviru njega. U okviru direktne detekcije koriste se tri metoda : direktna hibridizacija sa probom komplementarnom sekvenci gena, i korišćenje restrikcionih enzima koji seku ili ne seku molekule DNK na mestu mutacije i korišćenje hibridizacije sa oligonukleotidima specifičnim za alel (ASO). U direktnoj detekciji koriste se genski specifične probe i oligonukleotidne probe.

Genski specifične probe se koriste u detekciji delecija dela sekvence ili kompletne sekvence koja je komplementarna genskoj probi. Ukoliko je deletiran deo DNK, proba će hibridizovati ili sa fragmentom DNK čija se dužina razlikuje od fragmenta hromozoma koji ne nosi mutaciju, ili ukoliko se radi o deleciji celokupne sekvence, neće uopšte hibridizovati. U slučajevima kada mutacija stvara ili ukida

restrikciono mesto, po obradi odgovarajućim restrikcionim enzimom dobiće se fragment različite dužine od kontrolnog. Ove vrste mutacija se uglavnom otkrivaju primenom Southernove tehnike. Medjutim, u mnogim slučajevima, pogotovo u dijagnostici, PCR metoda sve više zamenjuje Southernovu tehniku.



Slika 8. Primena oligonukleotidnih proba (ASO) u direktnoj detekciji mutacija

Oligonukleotidne probe su hemijski sintetisani oligonukleotid (14-30 nukleotida), znatno kraći od kloniranih DNK proba. Oligonukleotidna proba, ima sekvencu koja odgovara ili normalnom ili mutiranom delu gena (ASO - Allele Specific Oligonucleotide). Zbog male dužine, ASO stvara postojane hibride samo sa potpuno komplementarnom sekvencom, čime se otkrivaju tačkaste mutacije ili male insercije i delecije (Kidd VJ. i sarad.,1983). ASO hibridizacija može precizno da razluči homozigote za normalnu sekvencu DNK, od homozigotnih i heterozigotnih nosilaca mutacije. Zato je ASO hibridizacija našla široku primenu, u dijagnostici naslednih bolesti (Sl. 8), pogotovo u kombinaciji sa PCR metodom.

Odsustvo hibridizacije sa određenim ASO specifičnim za određenu mutaciju ne isključuje mogućnost da je u analiziranom genu prisutna neka druga mutacija.

## Prenatalna molekularna dijagnostika cistične fibroze

Prenatalna dijagnostika zauzima značajno mesto u otkrivanju i prevenciji naslednih bolesti. U protekle dve decenije, u ovoj oblasti je ostvaren napredak, pre svega uvođenjem metode aspiracije horionskih resica u prvom trimestru trudnoće i primenom molekularne dijagnostike monogenih naslednih bolesti. Osnovne indikacije za sprovođenje prenatalne dijagnostike su: starosna dob trudnice iznad 35 godina, jedno već rodjeno dete sa naslednom bolešću, kao i porodično opterećenje porodice (porodična anamneza monogenog oboljenja ili ako je jedan od roditelja nosilac balansirane hromozomske translokacije) (HM Kingston, 1989). Kriterijumi za prenatalnu dijagnozu su: visok genetički rizik, težina nasledne bolesti i

nemogućnost njenog izlečenja, pouzdan prenatalni test i prihvatljivost prekida trudnoće.

Prenatalna dijagnoza primenom metoda molekularne genetike, može se sprovoditi u prvom i drugom trimestru trudnoće, a u novije vreme postoji i mogućnost preimplantacione dijagnostike, kao i dijagnostike u fetalnim ćelijama prisutnim u perifernoj krvi trudnice (Bianchi D.W. i sarad.,1990). Aspiracijom horionskih resica, pod kontrolom ultrazvuka, dobijaju se fetalne ćelije u prvom trimestru, u periodu od 8.-12. nedelje trudnoće (Maxwell D. i sarad. 1986). Jedna od najšire korišćenih metoda prenatalne dijagnostike je amniocenteza, koja se izvodi u drugom trimestru u periodu 16.-18. nedelje trudnoće. Metod je vrlo pouzdan, a rizik od prekida trudnoće usled intervencije zanemarljiv (Leschot NJ., i sarad., 1985). Nedostatak je što se rezultati dobijaju relativno kasno, pa postoje određeni rizici ukoliko je potrebno izvršiti prekid trudnoće.

S obzirom na težinu bolesti i njenu učestalost, cistična fibroza spada u grupu naslednih bolesti za koje je neophodna prenatalna dijagnostika i rutinski se primenjuje u parova sa rizikom 1:4 za radjanje deteta obolelog od cistične fibroze, bilo kao indirektna bilo kao direktna mutaciona analiza. Da bi se postigla maksimalna sigurnost mutacione analize, potrebno je izvršiti analizu kako indeks slučaja, tako i oba roditelja. Pored uobičajenih metoda prenatalne dijagnoze u prvom i drugom trimestru trudnoće, danas postoji i mogućnost preimplantacione dijagnostike (Liu J., i sarad., 1993).

Kada je tridesetih i četrdesetih godina ovog veka definisana cistična fibroza i otkrivena nasledna priroda ove bolesti, jedini način kontrole rizika za radjanje deteta

obolelog od cistične fibroze, bilo je uzdržavanje od reprodukcije. Prekretnicu na polju prenatalne dijagnostike ove bolesti predstavljala je primenena metode određivanja nivoa mikrovilarnih enzima u amnionskoj tečnosti ( Brock DJH, 1985 ).

Od 1985 godine, kada je gen za cističnu fibrozu lociran na hromozomu 7, počinje da se primenjuje indirektna metoda detekcije prisustva mutiranog gena. Prva prenatalna dijagnoza cistične fibroze, u prvom trimestru trudnoće, primenom indirektna genetičke analize, uradjena je korišćenjem polimorfnih markera J311, metD i metH,( Farral M., i sarad., 1986). Saznanja da postoji i vezanost mutacije sa određenim haplotipom ( Estevill X., i sarad.,1989) pružila je mogućnost prenatalne dijagnostike u rizičnim porodicama. Naime utvrđeno je da je haplotip B prisutan na 86,5% hromozoma koji nose mutaciju (Tab 4 ). Ubrzo ovaj pristup počinje rutinski da se primenjuje u prenatalnoj dijagnostici cistične fibroze (Super M. i sarad., 1987) u porodicama sa rizikom 1:4 za radjanje deteta sa ovom bolešću.

HAPLOTIP	XV-2c	KM-19	CF hromozomi		normalni hromozomi	
			SAD		Evropa	
			(%)	(%)	(%)	(%)
A	1	1	6,7	5,1	29,6	28,9
B	1	2	86,5	84,7	14,0	16,4
C	2	1	2,8	6,8	44,0	44,0
D	2	2	4,0	4,0	12,4	10,7

Tabela 4. Udruženost haplotipova sa prisustvom mutacije u CFTR genu

Primena PCR metode u prenatalnoj dijagnozi, za markere u neposrednoj blizini lokusa za cističnu fibrozu uvedena je 1988 (Feldman GL. i sarad., 1988; Williams C, i sarad., 1988 ). Vrlo važan napredak u prenatalnoj dijagnostici cistične fibroze, bilo je kloniranje CFTR gena i otkriće  $\Delta F508$  mutacije, kao najčešće mutacije u cističnoj fibrozi. Ovo otkriće je pogotovo od značaja u genetskom savetovanju rizičnih porodica u kojima indeks slučaj nije dostupan za analizu a u kojima je sada bilo moguće primeniti direktnu mutacionu analizu. Takodje je utvrđeno da je B haplotip prisutan na 96% hromozoma koji nose  $\Delta F508$  mutaciju i na 54% hromozoma koji nose neku od drugih mutacija u okviru CFTR gena (Lemna WK., i Feldman GL., 1990).

Danas se u prenatalnoj dijagnostici cistične fibroze uglavnom primenjuje DNK analiza, a određivanje nivoa mikrovilarnih enzima u amnionskoj tečnosti u slučajevima kad se analiza DNK pokaže kao neinformativna. Rizičnim porodicama danas stoji na raspolaganju više reproduktivnih mogućnosti u planiranju potomstva: prenatalna dijagnoza sa mogućnošću prekida trudnoće u slučaju nepovoljnog rezultata, veštačko oplodjenje, preimplantaciona dijagnostika ( Liu J. i sarad., 1993).

Za one populacije u kojima je još uvek 35% CF mutacija u okviru CFTR gena nepoznato (region Mediterana i istočnoevropske zemlje), više od 50% parova nije potpuno informativno za mutacionu analizu (12% je potpuno neinformativno, a 45% semi informativno). U ovim slučajevima, moguće je primeniti indirektnu genetičku analizu, korišćenjem markera u neposrednoj blizini CFTR gena (Estevill X., i sarad. 1989). U novije vreme uvedeni su intrageniski mikrosatelitski markeri (Morrall N. i sarad., 1993) koji povećavaju informativnost porodica. Kombinovanu direktnu i

indirektnu genetičku analizu treba koristiti sve dok se ne identifikuju sve mutacije u okviru CFTR gena. Haplotipovi koji se dobijaju indirektnom genetičkom analizom predstavljaju koristan okvir za direktnu detekciju mutacija, jer omogućavaju ekonomičniji pristup direktnoj mutacionoj analizi.

## Genetičko skriningovanje

Svrha skrining programa je kako dijagnostika naslednih bolesti, tako i otkrivanje parova sa rizikom da imaju potomstvo obolelo od nasledne bolesti. Otkrivanje nosilaca mutiranog gena u porodicama i populacijama sa rizikom za rođanje obolelog deteta je važna komponenta prevencije naslednih bolesti.

Otkrivanje rizičnih parova, nekim od postojećih pristupa, ili pak njihovom kombinacijom povećava njihove reproduktivne opcije (promena partnera, prenatalna dijagnoza, in vitro fertilizacija sa donorskom jajnom ćelijom i preimplantaciona dijagnostika). Krajnji cilj genetičkog skrininga je smanjenje učestalosti naslednih bolesti u pojedinim populacijama (Thompson MW, i sarad., 1991).

Osnovni zahtevi koje skrining testovi treba da zadovolje jesu : osetljivost (da bi se izbegli lažno negativni rezultati) i specifičnost (da bi se izbegli lažno pozitivni rezultati). Da bi bio primenljiv na širokoj skali, test mora da bude pouzdan, jednostavan i ekonomski opravdan. U okviru skrininga na nasledne bolesti moguća su dva pristupa. Jedan se odnosi na ispitivanje porodica u kojima se određena nasledna bolest javlja i to se označava kao skrining rizičnih porodica. Druga vrsta skrininga se odnosi na populacioni genetički skrining, a to je skrining populacije na



osobe sa genotipom za koji se zna da je udružen sa određenom naslednom bolešću ili predispozicijom za nju.

S obzirom na učestalost cistične fibroze, težinu bolesti, visoku frekvenciju nosilaca mutiranog gena, kao i da je CFTR gen kloniran i utvrđene najčešće mutacije u okviru njega, cistična fibroza je bolest koja je najjači kandidat za populacioni skrining. Otkrivanje mutacija u okviru CFTR gena pruža mogućnost za direktnu genetičku analizu cistične fibroze i poboljšava prenatalnu dijagnozu i otkrivanje nosilaca mutiranog gena.

Iako je  $\Delta F508$  mutacija vrlo česta, u kombinaciji sa još tri najčešće mutacije, nivo detekcije mutiranog gena iznosi 85%, tj. to omogućava detekciju 72% rizičnih parova. Veliki broj sporadičnih mutacija u okviru CFTR gena (preko 600) predstavlja argument protiv populacionog skrininga.

U zemljama u kojima  $\Delta F508$  i druge mutacije (G551D, N1303K, R553X, G542X) čine 85-90% CF hromozoma, genetička analiza omogućava otkrivanje većine nosilaca. Nosilac mutiranog gena je najčešće zdrava osoba, koja nosi mutirani gen odgovoran za nasledno oboljenje u heterozigotnom stanju. Već su u toku pilotske studije u Kanadi, Holandiji, SAD i Velikoj Britaniji, sa ciljem da se identifikuju rizični parovi i da im se zatim ponudi mogućnost prenatalne dijagnoze (Caskey CT, Kaback MD, Beaudet, 1990; Beaudet A., O'Brien WE., 1992; Super M, Schwarz MJ., 1994; Livingstone J, Axton RA, 1994, ; Brock DJH, 1996). Međutim, većina populacija je daleko od ovakvih skrining programa, pogotovo zemlje u regionu Mediterana, gde je još 30% mutacija u okviru CFTR gena nepoznato. Još uvek se nije došlo do jedinstvenog skrining programa koji bi bio široko prihvaćen. Pilotska ispitivanja

određivanja nivoa imunoreaktivnog tripsinogena su dale dosta lažno pozitivnih rezultata (0,2 do 2% ) ( Dodge JA, 1988), što unosi nemir u porodice i zahteva višestruko ponavljanje analiza i znojnog testa.

Otkrivanje CFTR gena je dalo mogućnost direktne genetičke analize, bar u izvesnim populacijama. U Južnoj Australiji se od 1989. do 1993. sprovodio program neonatalnog skrininga na CF određivanjem nivoa imunoreaktivnog tripsinogena na osnovnog rođanja obolelog deteta u rizicnim porodicama postavili smo sledeće uzorcima filter papira iz skrininga za fenilketonuriju (PKU), a zatim direktnom genetičkom analizom na prisustvo  $\Delta F508$ ,  $\Delta I506$ , G551D, G542X i R553 u uzorcima u kojima je koncentracija imunoreaktivnog tripsinogena veća od 1%, i u sve novorodjenčadi sa mekonijalnim ileusom i porodičnom anamnezom cistične fibroze (Ranieri E., Lewis BD., 1994 ). Frekvencija nosilaca mutacija u CFTR genu, medju neonatusima sa povišenim vrednostima imunoreaktivnog tripsinogena je iznosila 1:15,5 , što je više nego u opštoj populaciji (1:30). U Evropi se takodje sprovode pilotske studije vezane za neonatalni skrining (Dagorn J.C., Iovanna D.J., 1995 ). S obzirom da u našoj populaciji, zasada još uvek nema podataka, o učestalosti cistične fibroze i zastupljenosti pojedinih mutacija u CFTR genu, tek treba utvrditi da li je racionalno sprovoditi skrining na cističnu fibrozu.

## MATERIJAL I METODE

### CILJ

#### Biološki materijal

S obzirom na učestalost cistične fibroze, težinu ove bolesti, kao i visok rizik ponovnog radjanja obolelog deteta u rizičnim porodicama, postavili smo sledeće ciljeve:

- 1) Utvrđivanje zastupljenosti mutacija :  $\Delta F508$  , G542X, G551D i R553X u našoj populaciji
- 2) Utvrđivanje porodica koje su informativne za direktnu mutacionu analizu u narednoj trudnoći
- 3) Utvrđivanje porodica informativnih za indirektnu detekciju prisustva mutiranog CFTR gena
- 4) Utvrđivanje opravdanosti sprovođenja populacionog skrininga na cističnu fibrozu u našoj populaciji
- 5) Predlaganje optimalnog pristupa u skrinovanju i prenatalnoj dijagnostici cistične fibroze u porodicama sa visokim rizikom za ovu bolest.

## MATERIJAL I METODE

### Biološki materijal

DNK koja je korišćena u direktnoj i indirektnoj analizi prisustva mutiranog CFTR gena izolovana je iz pune krvi pacijenata obolelih od cistične fibroze i njihovih roditelja.

Prenatalna dijagnoza je vršena na fetalnoj DNK izolovanoj iz ćelija horionskih resica dobijenih biopsijom u 8. -12. nedelji trudnoće ili iz ćelija amnionske tečnosti dobijenih amniocentezom u 16.-18. nedelji trudnoće. Materijal za prenatalnu dijagnozu je uziman pod kontrolom ultrazvuka, u Centru za planiranje porodice i humanu reprodukciju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta, Ginekološko-akušerskoj klinici Kliničkog centra u Beogradu i Ginekološkom odeljenju KBC "Dragisa Mišević". DNK iz ćelija amnionske tečnosti je izolovana ili odmah po uzimanju uzorka, ili su ćelije gajene u kulturi u periodu od 2-3 nedelje.

## Oligonukleotidne probe korišćene u hibridizaciji

oligonukleotidna proba	nukleotidna sekvenca
G542	5'ACCTTCTCCAGGAACT 3'
G542X	5'ACCTTCTCAAAGAACT 3'

## Rastvori korišćeni u radu

Za restrikcione digestije enzimima Hinc II i Msp I korišćen je komercijalni digestioni pufer B firme Promega, za enzim Mbol pufer C, za enzim PstI pufer H, za enzim TaqI enzim E., a za enzim XbaI pufer D. Sastav pufera je prikazan u Tabeli 5.

Tabela 5. Sastav pufera korišćenih u restrikcionim digestijama

pufer	pH	Tris-HCl (mM)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	NaCl (mM)	DTT (mM)
B	7,5	6	6	50	1
C	7,9	10	10	50	1
D	7,9	6	6	150	1
E	7,5	6	6	100	1
H	7,5	90	10	50	-

Kao puferi za elektroforeze korišćeni su tris-acetatni pufer-TAE (pravljen kao 50xTAE pufer sastava 2M Tris, 0,05M EDTA, pH 8, koji se podešava glacijalnom sirćetnom kiselinom) i Tris-boratni pufer-TBE (pravljen kao 10xTBE pufer sastava: 1M Tris, 0,83 M borna kiselina, 0,01M EDTA).

### Izolovanje genomske DNK iz humanih limfocita periferne krvi

U 300  $\mu$ l periferne krvi (uzete sa 0,38% Na citratom, kao antikoagulantom) dodaje se 600  $\mu$ l prethodno zagrejanog litičkog pufera (8%CTAB, 1,5M NaCl, 100 mMTris-Cl, pH 8,5, 50mM EDTA, pH 8) i smeša se inkubira 15 minuta na 68 °C. Po dodavanju jedne zapremine hloroforma, smeša se blago promućka i centrifugira 10 minuta na 12000 obr/min. Gornja faza, koja sadrži DNK, se pipetiranjem prenosi u novu epruvetu, dodaje se 5%CTAB/0,1M NaCl u finalnoj koncentraciji 0,1% i jedna zapremina vode. Posle blagog mućkanja sakuplja je talog CTAB-DNK centrifugiranjem na 12000 obr/min u trajanju od 10 minuta. Oslobadjanje od CTAB vrši se resuspendovanjem taloga u 300  $\mu$ l 1,2 M NaCl, dodavanjem 2,5 zapremine apsolutnog etanola i centrifugiranjem na 12000 obr/min u trajanju od 10 minuta

modifikacija metoda Del Sal G. i sarad., 1989 ). Talog DNK ispira se 70% etanolom i centrifugira se na 12000 obr/min u trajanju od 5 minuta. Talog se osuši u vakuum centrifugi i rastvori u 20  $\mu$ l dejonizovane vode.

### Izolovanje DNK iz kulture ćelija amnionske tečnosti

Ćelije amnionske tečnosti su kultivisane u trajanju od dve do tri nedelje, u zavisnosti od vremena potrebnog da se dobrije monosloj. Zatim su ćelije skidane tripsinom, koji se potom neutrališe podlogom sa fetalnim serumom. Suspenzija ćelija je odmah korisćena za izolovanje DNK ili zamrzavana na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Suspenzija ćelija je zatim centrifugirana na 10000 obr/min i ispirana podlogom bez seruma. Talog je resuspendovan u 600  $\mu$ l litičkog pufera (4% CTAB, 1M NaCl, 50mM Tris, pH 8,5, 25mM EDTA, pH 8) i dalji postupak je isti kao u izolovanju DNK iz limfocita periferne krvi (modifikacija metoda Del Sal G. i sarad., 1989 ).

### Izolovanje DNK iz ćelija amnionske tečnosti

Amnionska tečnost (20 ml) dobijena amniocentezom u 16.-18. nedelji trudnoće, centrifugirana je na 400 obr/min u trajanju od 10 minuta. Talog je dva puta ispran podlogom, bez seruma, a zatim resuspendovan u 600  $\mu$ l litičkog pufera (4% CTAB, 1M NaCl, 50mM Tris, pH 8,5, 25mM EDTA, pH 8). Dalji postupak je isti kao u

metodi za izolovanje DNK iz limfocita periferne krvi (modifikacija metoda Del Sal G. i sarad., 1989).

## Izolovanje DNK iz nevijabilnih ćelija supernatanta kulture amnionskih ćelija

Za izolovanje DNK iz nevijabilnih ćelija supernatanta sedmodnevnih ćelijskih kultura amnionske tečnosti, korišćena je modifikovana metoda za amnionske ćelije, (Kušić J. i sarad., 1996). Sakupljen je supernatant ćelijske kulture, sedmog dana po zasadjanju amnionskih ćelija. Nakon taloženja ćelija centrifugiranjem na 10 000 obr/min, ćelije su dva puta isprane podlogom bez seruma. Talog je resuspendovan u 600 µl litičkog pufera (4% CTAB, 1M NaCl, 50mM Tris, pH 8,5, 25mM EDTA, pH 8 (4% CTAB, 1M NaCl, 50mM Tris, pH 8,5, 25mM EDTA, pH 8). Dalji postupak je bio isti kao u izolovanju DNK iz limfocita periferne krvi.

## Izolovanje DNK iz ćelija horionskih resica

Tkivo horionskih resica dobrieno aspiracijom u 8. -12. nedelji trudnoće, ispirano je dva puta u podlozi bez seruma, proveravano pod invertnim mikroskopom, i pažljivo odvajane horionske resice. Izdvojene horionske resice su macerirane, dodavan im je 1ml prethodno zagrejanog litičkog pufera (4%CTAB, 1M NaCl, 50 mM, pH 8,5, 25 mM EDTA. pH 8) i inkubirane su 15 minuta na 68 °C uz povremeno mućkanje. Posle hloroformske ekstrakcije, vrši se obrada RNK-azom



(50 ng/ml) u trajanju od 15 min na temperaturi od 65 °C. Dalji postupak je isti kao pri izolovanju DNK iz limfocita periferne krvi (modifikacija metoda Del Sal G. i sarad., 1989).

## Restrikcione digestije DNK

DNK, izolovana po prethodno opisanim metodama i umnožena reakcijom lančanog umnožavanja uz upotrebu odgovarajućih graničnika, sečena je restrikcionim enzimima u odgovarajućim puferima (pregled korišćenih enzima i pufera dat je u Tabeli 5). Produkti reakcije lančanog umnožavanja (bez prethodnog prečišćavanja) sečeni su sa 20 jedinica enzima/ $\mu$ g DNK u trajanju od 3 časa.

## Razdvajanje fragmenata DNK elektroforezom

### Elektroforeza u agaroznom gelu

Za odredjivanje prinosa DNK korišćeni su 1% agarozni gelovi, dimenzija 10x10x0,5cm. Elektroforeza je tekla u 1xTAE puferu pri gradijentu voltaže od 4-7 V/cm.

Za proveru prinosa reakcije lančanog umnožavanja, kao i RFLP analizu proizvoda ove reakcije, korišćeni su horizontalni 2% agarozni gelovi, dimenzija 10x10x0,5cm, u 1xTAE puferu, pri gradijentu voltaže od 4-7 V/cm.

Po završetku elektroforeze, DNK je bojena polaganjem gela u 1xTAE/0,5µg/ml etidijumbromida. Gelovi su osvetljavani svetlošću talasne dužine 266 nm i slikani filmom marke Fomopan osetljivosti 21 din, sa otvorom blende 1,8 i ekspozicijom od 1 sekunde.

## Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

U analizi produkata dobijenih lančanom reakcijom umnožavanja, na prisustvo ΔF508 mutacije, korišćena je 10% nedenaturišuća poliakrilamidna elektroforeza, na vertikalnim pločama dimenzija 16 cm x 14 cm x 0,75mm. Za 25 ml 10% poliakrilamidnog gela potrebno je 8,325 ml 30% akrilamidnog rastvora ( 29% akrilamida i 1%NN metileñ bisakrilamida u vodi), 13,65 ml vode, 2,5 ml 10xTBE, 0,525 ml 3% vodenog rastvora amonijumpersulfata i 7,5µl TEMED. Elektroforeza je vršena u 1xTBE puferu, pri voltaži od 6,3 V/cm prvi sat vremena, a zatim pri 18,7 V/cm naredna tri sata. Gel je bojen u 1xTBE/0,5µg/ml etidijumbromida. Dalji postupak je bio isti kao kod agaroznih gelova.

## Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)

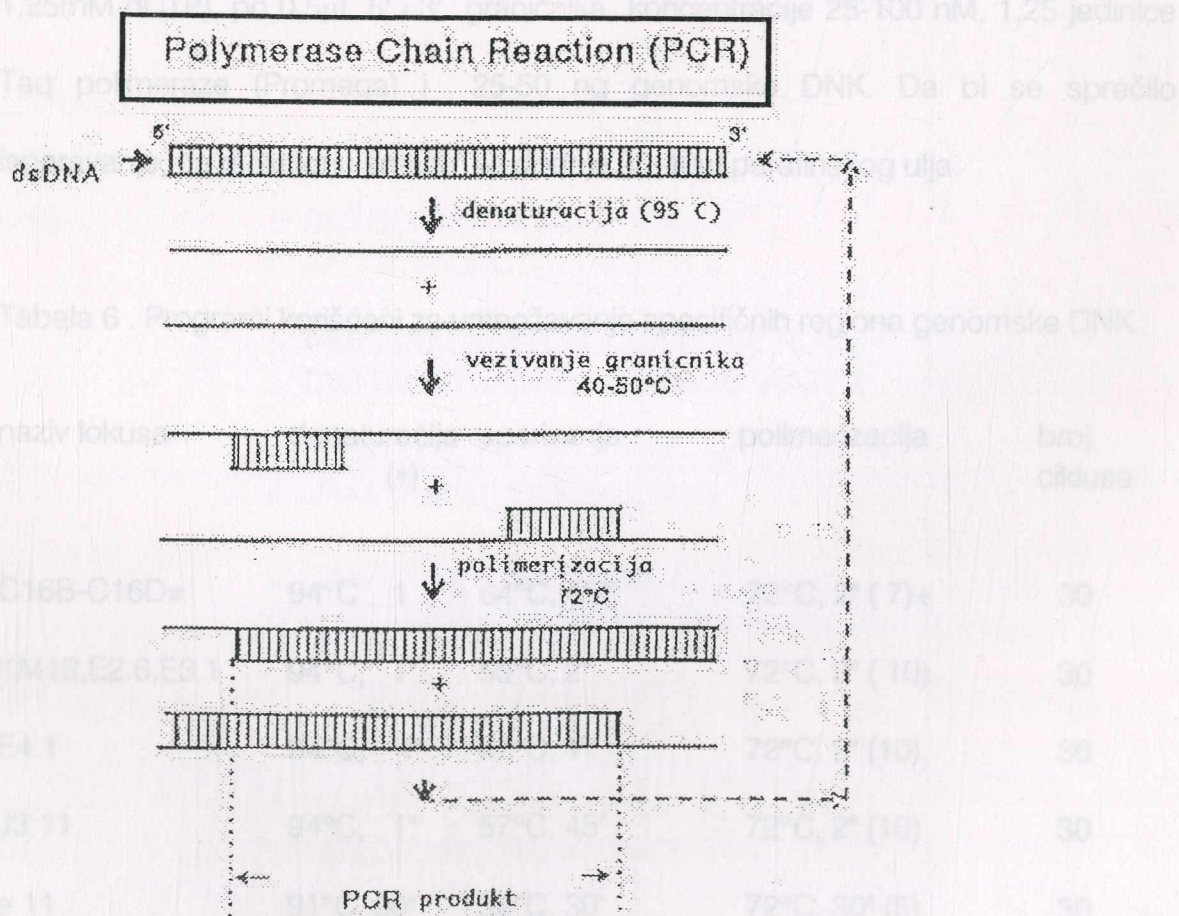
Reakcijom lančanog umnožavanja, PCR moguće je umnožiti fragment poznatog redosleda nukleotida  $10^6$ - $10^8$  puta. Graničnici (prajmeri) dužine 16-25 nukleotida vezuju se za suprotne lance denaturisane DNK, i služe kao mesta od kojih počinje polimerizacija. Ovi graničnici istovremeno omedjuju sintetisani fragment

DNK, tako da se kao produkt reakcije dobija fragment unapred definisane dužine.

Reakcija se sastoji od 25 do 40 ciklusa od kojih svaki ima tri koraka:

- 1) denaturacija DNK na 91-94 °C
- 2) sparivanje graničnika sa komplementarnim nizovima matrične DNK, na temperaturi koja varira od 37°C do 72°C, zavisno od sekvence graničnika
- 3) polimerizacija na 72°C.

Šematski prikaz PCR reakcije dat je na slici 9.



Slika 9. Šematski prikaz reakcije lančanog umnožavanja DNK (PCR)

Trajanje ovih koraka varira od 30 sekundi do 5 minuta, i razlikuje se u različitim reakcijama umnožavanja (Tab.6). Izolovanje DNK polimeraze iz *Thermus aquaticus*; Taq polimeraze, stabilne i na visokim temperaturama ( i do 95°C), omogućilo je ponavljanje i automatizaciju ovog procesa ( Saiki i sarad., 1988).

Reakcija lančanog umnožavanja specifičnih regiona genomske DNK teče u zapremini od 50µl, u ependorf epruvetama zapremine 500µl. Reakciona smeša sadrži: 5µl 10x reakcionog pufera (100 mM TrisCl, pH 8,3, 500mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% želatin), 8µl smeše dNTP ( 1,25mM dATP, 1,25 dTTP, 1,25mM dGTP, 1,25mM dCTP), po 0,5µl 5' i 3' graničnika koncentracije 25-100 nM, 1,25 jedinice Taq polimeraze (Promega) i 25-50 ng genomske DNK. Da bi se sprečilo isparavanje, na reakcionu smešu se dodaje 30-40µl parafinskog ulja.

Tabela 6 . Programi korišćeni za umnožavanje specifičnih regiona genomske DNK

naziv lokusa	denaturacija	sparivanje	polimerizacija	broj ciklusa
	(*)			
C16B-C16D $\neq$	94°C, 1"	64°C, 45" <sup>m</sup>	72°C, 2" ( 7)+	30
KM19,E2.6,E3.1	94°C, 1"	55°C, 2"	72°C, 3" ( 10)	30
E4.1	94°C, 1"	47°C, 1"	72°C, 2" (10)	30
J3.11	94°C, 1"	57°C, 45"	72°C, 2" (10)	30
e 11	91°C, 30"	55°C, 30"	72°C, 30" (5)	30

$\neq$  C16B-C16D označava region dužine 94 do 97 bp oko najčešće mutacije ( $\Delta$ F508), u egzonu 10 CFTR gena

+ U zagradama su napisana vremena umnožavanja u poslednjem ciklusu

\* U svakom od programa postoji i ciklus početne denaturacije na 94°C u trajanju od 5 minuta

Reakcija amplifikacije se odvijala u Hybaid Intelligent Heating Block. Za umnožavanje svakog od specifičnih fragmenata upisivan je program sa predloženim brojem ciklusa, temperaturama i vremenskim intervalima denaturacije, sparivanja i umnožavanja. Korišćeni programi umnožavanja i nazivi odredjenih regiona DNK dati su u Tabeli 6, a odgovarajući graničnici u Tabeli 7.

Tabela 7. Graničnici korišćeni u reakcijama lančanog umnožavanja DNK

naziv lokusa	5' i 3' graničnici
KM19	5' GCTGCATCATATAAGTTGCC 3' 5' AAGGCTACACTGTTAATTTT 3'
E.41	5' AATGCAACAATTCACCCAATTGCTCA 3' 5' GGTTAGGTCAGAGAACAAGCAAATT 3'
E.26	5 GTGATCCAGTTTGCTCTCCA 3 5 GGAATCACTCTTCCTGATAT 3
E.31	5' CAATGTGATTGGTGAAACTA 3' 5' CTTCTCCTCCTAGACACCTGCAT 3'
J.311	5' GTTGTTC AAGTCACTGC 3' 5' CCACTGATACTGTGAGAC 3'
11i-5 11i-3	5' CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGT 3' 5' GCACAGATTCTGAGTAACCATAAT 3'
C16B C16D	5' GTTTTCTGGATTATGCCTGGGCAC 3' 5' GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC 3'

## Obeležavanje oligonukleotidne probe radioaktivnim izotopom

Obeležavanje oligonukleotidnih proba je vršeno fosforilacijom njihovih 5' krajeva, pri čemu su korišćeni  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$  specifičnog aktiviteta 3000 Ci/mmol (Amesham), i T4 Polinukleotid Kinaza (USB). Reakciona smeša zapremine 50 $\mu\text{l}$  je sadržavala 50 ng DNK probe i 1 $\mu\text{mol}$   $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ , 5 $\mu\text{l}$  10x koncentrovanog reakcionog pufera (500mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM  $\text{MgCl}_2$  i 100 mM 2-merkaptoetanol) (USB) i 6U T4 Polinukleotid kinaze. Reakcija obeležavanja se odvijala 30 min na temperaturi od 37°C, nakon čega je zaustavljena dodavanjem 2  $\mu\text{l}$  0,5M EDTA. Obeležena proba je bez daljeg prečišćavanja dodavana u hibridizacioni pufer (Maniatis, 1982).

## Hibridizacija metodom dot blot

Priprema najlonskih membrana vršena je po dot blot metodi (Anderson M.L.M i Young B.D., 1985). Uzorci DNK dobijeni umnožavanjem egzona 11 CFTR gena u volumenu od 15  $\mu\text{l}$  su denaturisani jednakim volumenom 0,4 M NaOH/25 mM EDTA i kuvanjem na 95 °C u trajanju od 10 minuta. Zatim su uzorci nanošeni u vidu tačaka na najlonsku membranu koja je prethodno potapana u denaturacioni rastvor (0,5 M NaOH i 1,5 M NaCl).

Zatim je membrana potapana u 50 mM NaPi, pH 6,5, u trajanju od 20 minuta, radi neutralizacije. Prosušena membrana je stavljana između dva 3MM papira i sušena dva sata na 80 °C. Posle pečenja, najlonske membrane su ozračivane UV - lampom, svetlošću talasne dužine 254 nm i snage 30 W sa rastojanja od 50 cm, u trajanju od 1 minuta. Ovim postupkom DNK se kovalentno vezuje za membranu.

Najlonske membrane sa DNK hibridizovane su sa radioaktivno obreženi probama po proceduri Herman-a (Herman B. i sarad , 1986 ).

Membrane sa DNK potapane su kratko u vodu, zatim su stavljane u kesice u koje je sipano 20 - 30 ml hibridizacionog pufera ( 0,5 M NaPi, 7%SDS, 1mM EDTA) i inkubirane su 15 min na 68 °C. Zatim je pufer zamenjivan istom količinom novog. Radioaktivno obeležena proba je denaturisana u 0,5M NaOH i dodavana u koncentraciji  $1,5 \times 10^6$  cpm / ml hibridizacionog rastvora. Hibridizacija je vršena 10 do 16 časova na 68 °C, uz blago mućkanje. Pranje membrane puferom za pranje (0,04M NaPi, 1% SDS) koji je prethodno zagrejan na 68 °C, vršeno je 3 puta po 5 min. Poslednje pranje, na 68 °C, trajalo je 30 - 60 min uz lagano mućkanje, sve dok radioaktivnost pufera ne bi opala na nivo fona. Membrane su sušene na sobnoj temperaturi, pakovane u kesice i stavljane sa filmom za autoradiografiju ( Kodak X-omat ) na - 70°C, na ekspoziciju preko noći ili u trajanju od nekoliko dana.

## REZULTATI

### Analiza mutacija u okviru CFTR gena

U cilju utvrdjivanja učestalosti mutacija ( $\Delta F508$ , G542X, G551D i R553X) u populaciji obolelih od cistične fibroze u Jugoslaviji, analizirane su porodice sa najmanje jednim detetom obolelim od cistične fibroze, kao i porodice sa porodičnom anamnezom ove bolesti. Analizirano je 105 porodica sa ukupno 325 članova, od kojih je 96 porodica bilo nuklearnog tipa, a u 9 porodica je analizirano još jedno, zdravo dete. Dijagnoza cistične fibroze je postavljena u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije i na Dečjoj klinici Kliničkog Centra Univerziteta u Beogradu, na osnovu kliničkog nalaza i rezultata znojnog testa (nivo hlorida u znoju veći od 60 mM).

Utvrđivana je informativnost ovih porodica za direktnu molekularnu dijagnostiku cistične fibroze u narednoj trudnoći. Ukoliko su porodice bile neinformativne za direktnu mutacionu analizu pristupalo se indirektnoj detekciji prisustva mutiranog gena u konkretnim porodicama, primenom analize polimorfizama DNK u neposrednoj blizini CFTR gena.

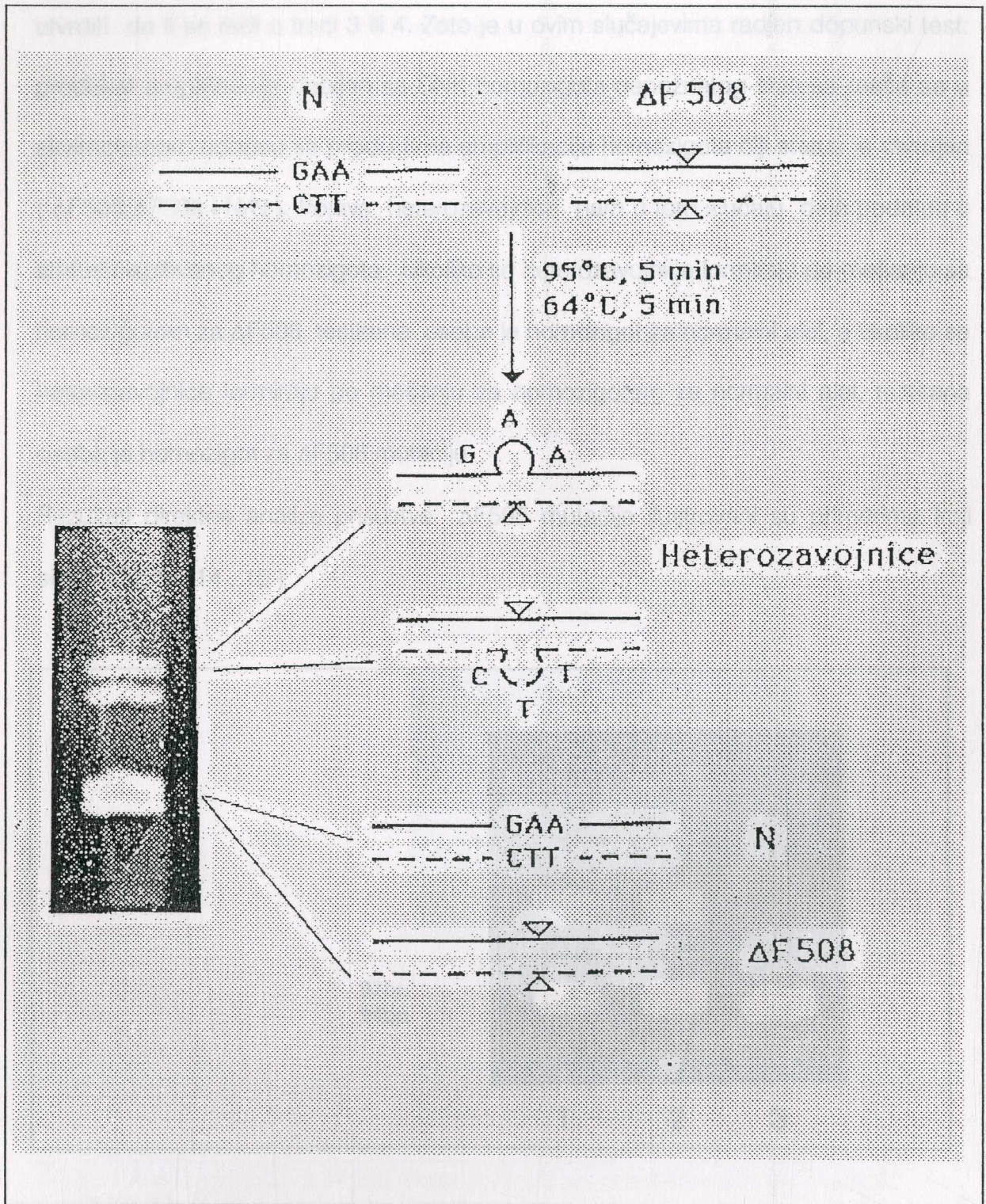


## Analiza mutacija u okviru CFTR gena

### Analiza prisustva $\Delta F508$ mutacije

Analiza prisustva ove najčešće mutacije u okviru CFTR gena vršena je pomoću reakcije lančane polimerizacije. Region koji obuhvata 97 bp oko  $\Delta F508$  mutacije omeđen je graničnicima C16B i C16D ( Tab.7 ), a umnožavanje je vršeno pod uslovima datim u Tabeli 6 u poglavlju Materijal i metod. Dobijeni produkti amplifikacije su zatim denaturisani na  $94^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 5 min i omogućeno je ponovno sparivanje komplementarnih lanaca tokom 5 min na  $64^{\circ}\text{C}$  i tokom 2-3 sata na sobnoj temperaturi.

Na Slici 10 prikazani su mogući proizvodi reakcije. U heterozigotnih nosilaca mutacije  $\Delta F508$ , osim sparivanja potpuno komplementarnih lanaca, poreklom sa istog hromozoma, dolazi i do sparivanja lanaca sa homolognih hromozoma, koji se medju sobom razlikuju za 3 nukleotida od potpuno sparenih. Ovako formirane heterozavojnice pokazuju različitu pokretljivost i mogu se detektovati elektroforezom u 10% akrilamidnom gelu, kao dve sprije trake ( trake 1 i 2 ). Produkti koji se dobijaju sa DNK homozigota za  $\Delta F508$  mutaciju i homozigota a normalni alel razlikuju se po dužini za 3bp. Homozigoti formiraju samo po jednu traku i to  $\Delta F508/\Delta F508$  od 94 bp (traka 4) a homozigoti za normalni alel (N/N) od 97 bp (traka 3). Zbog male razlike, ovakvim slučajevima, teško je sa sigurnošću



Slika 13. Analiza prisustva  $\Delta F508$  mutacije u slučaju normalne porodice

Slika 10. Princip analize  $\Delta F508$  mutacije

1 i 2 : heterozavojnice

3: 97 bp ( $\Delta F508/\Delta F508$ )

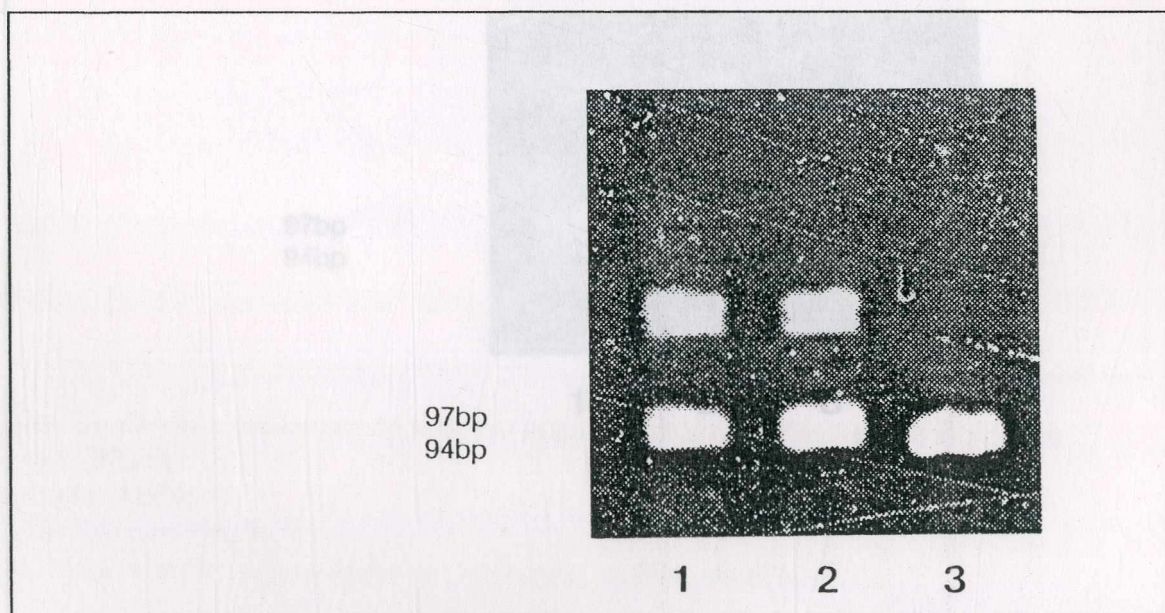
4: 94 bp (N/N)

5a i 5b označavaju položaj heterozavojnica

U prvom slučaju (Sl. 13) oba roditelja su heterozigotni nosioci  $\Delta F508$  mutacije, dok

utvrditi da li se radi o traci 3 ili 4. Zato je u ovim slučajevima radjen dopunski test: produkt amplifikacije dobijen sa DNK homozigota nepoznatog statusa meša se u ekvimolarnom odnosu sa produktima amplifikacije homozigota čiji status je utvrdjen ( $\Delta F508/\Delta F508$  i N/N). Pojava heterozavojnica nam u tom slučaju daje podatak o statusu ispitivanog homozigota. Ukoliko se heterozavojnice formiraju po mešanju sa homozigotom za  $\Delta F508$ , testirana osoba je homozigot za normalni alel, a ukoliko se heterozavojnice formiraju po mešanju sa homozigotom za normalni alel, testirana osoba je homozigot za  $\Delta F508$  mutaciju.

Rezultati direktne analize prisustva  $\Delta F508$  mutacije ilustrovani su primerima koji slede (Sl. 13, 14, 15).



Slika 14 Analiza prisustva  $\Delta F508$  mutacije u slučaju polinkomitivnog porođka

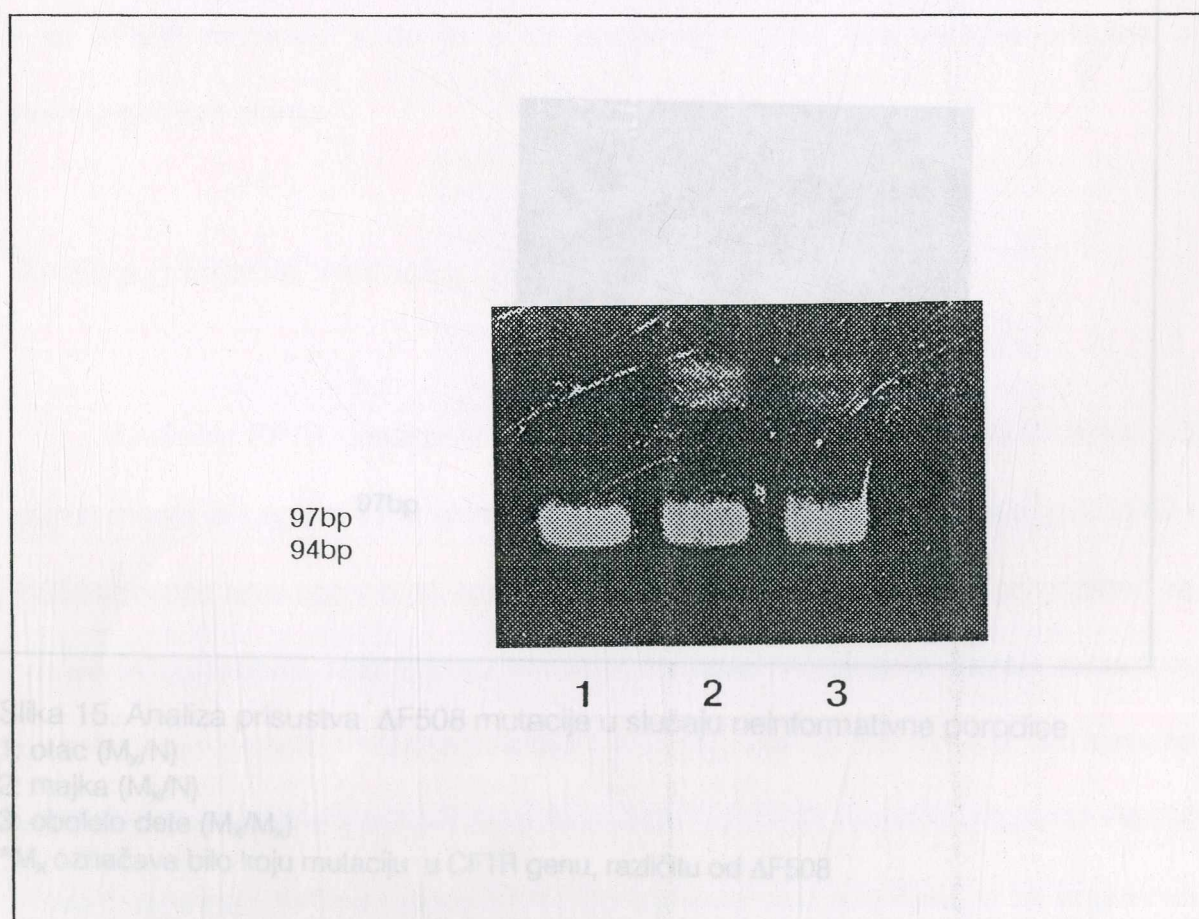
Slika 13. Analiza prisustva  $\Delta F508$  mutacije u slučaju informativne porodice

- 1: otac ( $\Delta F508/N$ )
- 2: majka ( $\Delta F508/N$ )
- 3: obolelo dete ( $\Delta F508/\Delta F508$ )

Sa H je označen položaj heterozavojnica

U prvom slučaju (Sl. 13), oba roditelja su heterozigotni nosioci  $\Delta F508$  mutacije, dok je bolesno dete homozigot za  $\Delta F508$  mutaciju. Porodice ovog tipa su informativne za  $\Delta F508$  mutaciju, tako da se u slučaju naredne trudnoće direktnom mutacionom analizom na prisustvo ove mutacije može postaviti prenatalna dijagnoza.

Drugi primer se odnosi na porodicu koja je poluinformativna za prisustvo  $\Delta F508$  mutacije (Sl.14). U ovom slučaju majka je heterozigotni nosilac  $\Delta F508$  mutacije, dok otac ne nosi ovu mutaciju. Direktnom mutacionom analizom na prisustvo  $\Delta F508$  mutacije, za obolelo dete se dobija slika heterozigotnog nosioca



Slika 14 Analiza prisustva  $\Delta F508$  mutacije u slučaju poluinformativne porodice

1: otac ( $M_x/N$ )

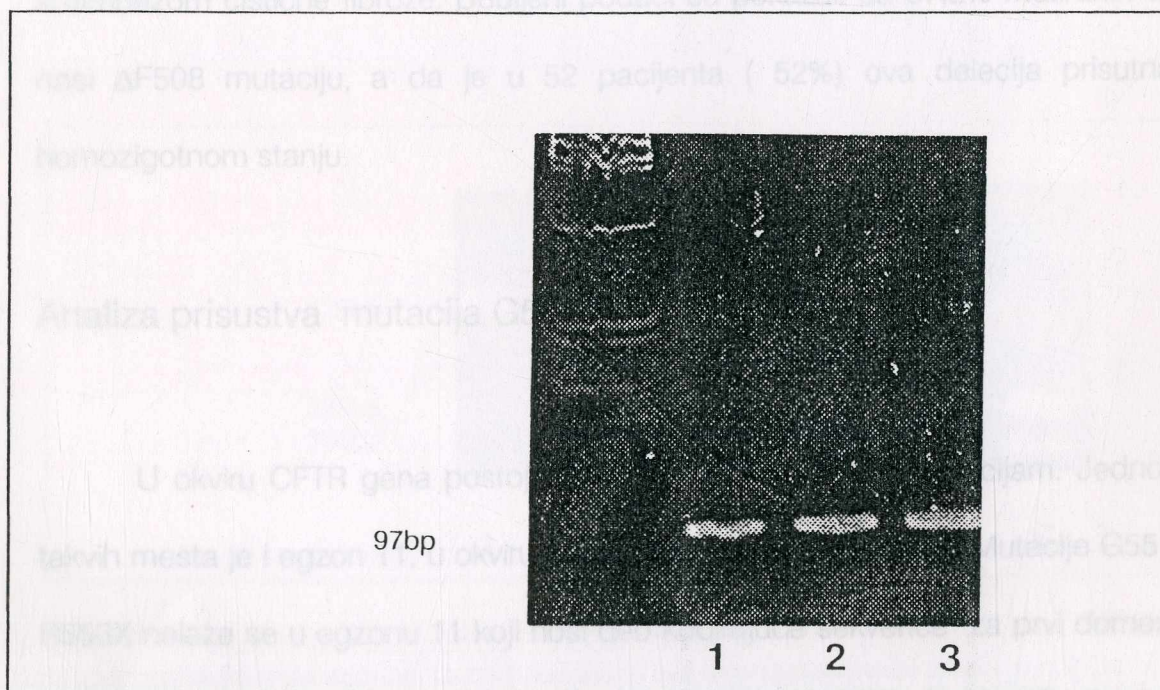
2: majka ( $\Delta F508/N$ )

3: obolelo dete ( $\Delta F508/M_x$ )

\* $M_x$  označava bilo koju mutaciju u CFTR genu, različitu od  $\Delta F508$

$\Delta F508$  mutacije. Znači, dete obolelo od cistične fibroze na jednom hromozomu nosi  $\Delta F508$  mutaciju nasledjenu od majke, a na drugom neku drugu mutaciju u okviru CFTR gena, nasledjenu od oca. U ovom slučaju nije moguće napraviti razliku između heterozigotnog nosioca  $\Delta F508$  mutacije i obolelog deteta ("mešovitog" homozigota za cističnu fibrozu), pa se ne može raditi prenatalna dijagnostika u narednoj trudnoći direktnom mutacionom analizom na prisustvo  $\Delta F508$  mutacije.

Treći primer se odnosi na porodicu koja nije informativna za  $\Delta F508$  mutaciju



Slika 15. Analiza prisustva  $\Delta F508$  mutacije u slučaju neinformativne porodice

1: otac ( $M_x/N$ )

2: majka ( $M_x/N$ )

3: obolelo dete ( $M_x/M_x$ )

\* $M_x$  označava bilo koju mutaciju u CFTR genu, različitu od  $\Delta F508$

(Sl. 15), što znači da su roditelji heterozigotni nosioci nekih drugih mutacija ( $M_x$ ) u okviru CFTR gena. Obolelo dete, u slučaju da su oba roditelja heterozigotni nosioci iste mutacije, je homozigot za tu mutaciju, a u slučaju da su roditelji heterozigotni

nosioci različitih mutacija, "mešoviti" homozigot. U ovom slučaju direktnom mutacionom analizom na prisustvo  $\Delta F508$  mutacije, nije moguće napraviti razliku između heterozigotnih nosilaca mutiranog gena, homozigota za lokus za cističnu fibrozu, i homozigota za normalni alel. Ovakav tip porodice je potpuno neinformativan za direktnu analizu na prisustvo  $\Delta F508$  mutacije u narednoj trudnoći.

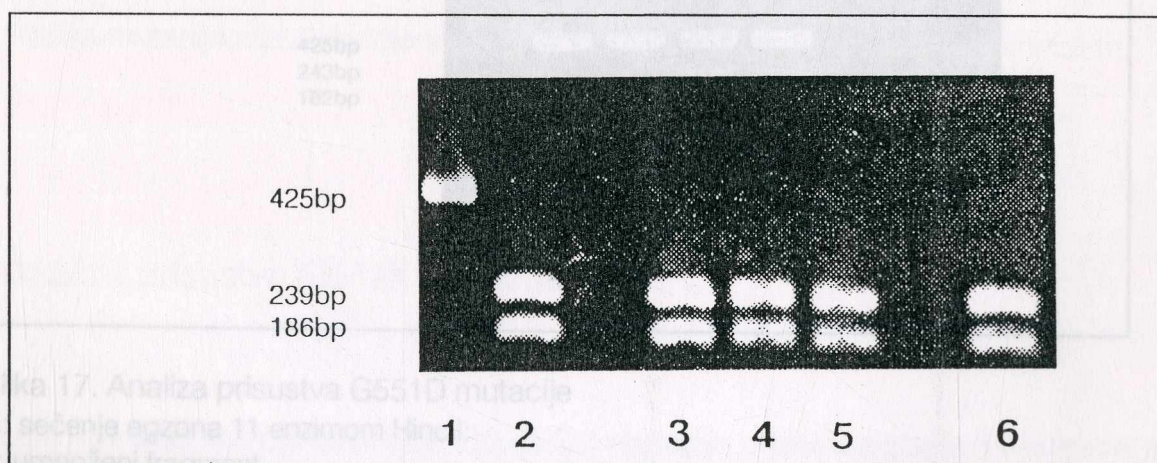
Prisustvo  $\Delta F508$  mutacije ispitivano je u svih 99 pacijenata obolelih od cistične fibroze i članova njihovih porodica, kao i u 4 porodice sa porodičnom anamnezom cistične fibroze. Dobijeni podaci su pokazali da 67,2% mutiranih alela nosi  $\Delta F508$  mutaciju, a da je u 52 pacijenta ( 52%) ova delecija prisutna u homozigotnom stanju.

### Analiza prisustva mutacija G551D i R553X

U okviru CFTR gena postoje "vruća" mesta podložna mutacijam. Jedno od takvih mesta je i egzon 11, u okviru koga je opisano 16 mutacija. Mutacije G551D i R553X nalaze se u egzonu 11 koji nosi deo kodirajuće sekvence za prvi domen za vezivanje nukleotida. Kod G551D mutacije, tačkasta mutacija je nastala zamenu guanine na poziciji 1784 adeninom (  $G_{1784} \rightarrow A$  ), što dovodi do zamene asparaginske kiseline glicinom na položaju 551 u CFTR proteinu. Mutacija R553X dovodi zamenu  $C \rightarrow T$  na poziciji 1789, što uzrokuje promenu kodona za arginin na položaju 553 u stop kodon. Mutacija G551D spada u mutacije koje dovode do poremećaja u regulaciji hloridnog kanala (klasa III ), a R553X u mutacije koje dovode

do poremećaja u sintezi proteina (klasa I). Obe mutacije spadaju u tzv. "teške" mutacije tj. dovode do teškog oblika cistične fibroze.

Region koji obuhvata jedanaesti egzon, definisan je graničnicima datim u Tabeli 7 i umnožava se pod uslovima navedenim u Tabeli 6. Kao produkt amplifikacije dobija se fragment veličine 425 bp koji se analizira sečenjem enzimom Hinc II (Kerem BS. i sarad., 1990). Prisustvo bilo koje od ove dve mutacije (G551D ili R553X) dovodi do izostanka mesta koje prepoznaje restrikcioni enzim HincII, koje je inače normalno prisutno u ovoj sekvenci, i do pojave heterozigotne slike po digestiji.

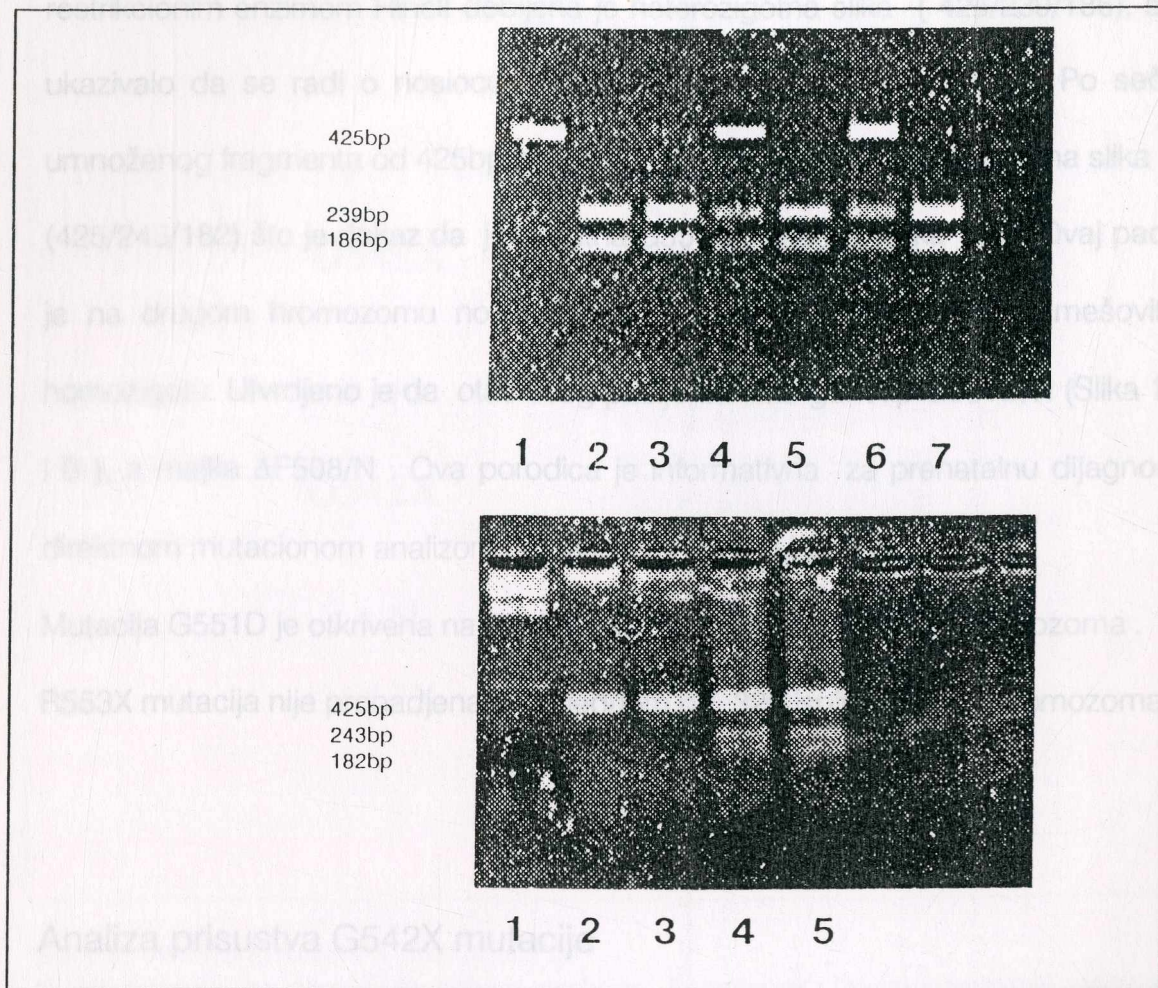


Slika 16. Analiza prisustva G551D i R553X mutacija

Produkt umnožavanja egzona 11 (1) i njegovog sečenja restrikcionim enzimom HincII (2-6)

Da li se radi o G551D ili o R553X mutaciji može se utvrditi sečenjem istog produkta amplifikacije enzimom MboI. Ovaj enzim seče fragmente koji nose mutaciju G551D, ali ne i fragmente sa mutacijom R553X ili normalne sekvence DNK.

Prisustvo G551D i R553X mutacija ispitivano je na DNK pacijenata obolelih od cistične fibroze, kod kojih bar jedan hromozom nije nosio  $\Delta F508$  mutaciju. Na Slici 16 su prikazani rezultati analiziranih pacijenata koji nisu nosili ni jednu od ove dve



Slika 17. Analiza prisustva G551D mutacije

A: sečenje egzona 11 enzimom HincII:

1: umnoženi fragment

2,3,5,7: pacijenti koji ne nose G551D ili R553X mutaciju

4: otac

5: obolelo dete

B: sečenje egzona 11 enzimom MboI

1: standard ( $\lambda$ /NindIII)

2,3: umnožavani uzorak

4: otac

5: obolelo dete

mutacije. Na Slici 17 je prikazan slučaj jedinog pacijenta za koga je utvrđeno da je nosilac mutacije G551D. Po sečenju umnoženog regiona egzona 11 (425 bp)



restrikcionim enzimom HincII dobijena je heterozigotna slika ( 425/239/186), što je ukazivalo da se radi o nosiocu G551D ili R553X mutacije (Sl.17A). Po sečenju umnoženog fragmenta od 425bp enzimom Mbol dobijena je heterozigotna slika (425/243/182) što je dokaz da je prisutna G551D mutacija (Slika 17B). Ovaj pacijent je na drugom hromozomu nosio  $\Delta F508$  mutaciju, tj radilo se o "mešovitom" homozigotu. Utvrđeno je da otac ovog pacijenta ima genotip G551D/N (Slika 17, A i B ), a majka  $\Delta F508/N$  . Ova porodica je informativna za prenatalnu dijagnostiku direktnom mutacionom analizom na prisustvo G551D i  $\Delta F508$  mutacije.

Mutacija G551D je otkrivena na 2 od 326 ( 0,61 %) analiziranih CF hromozoma .

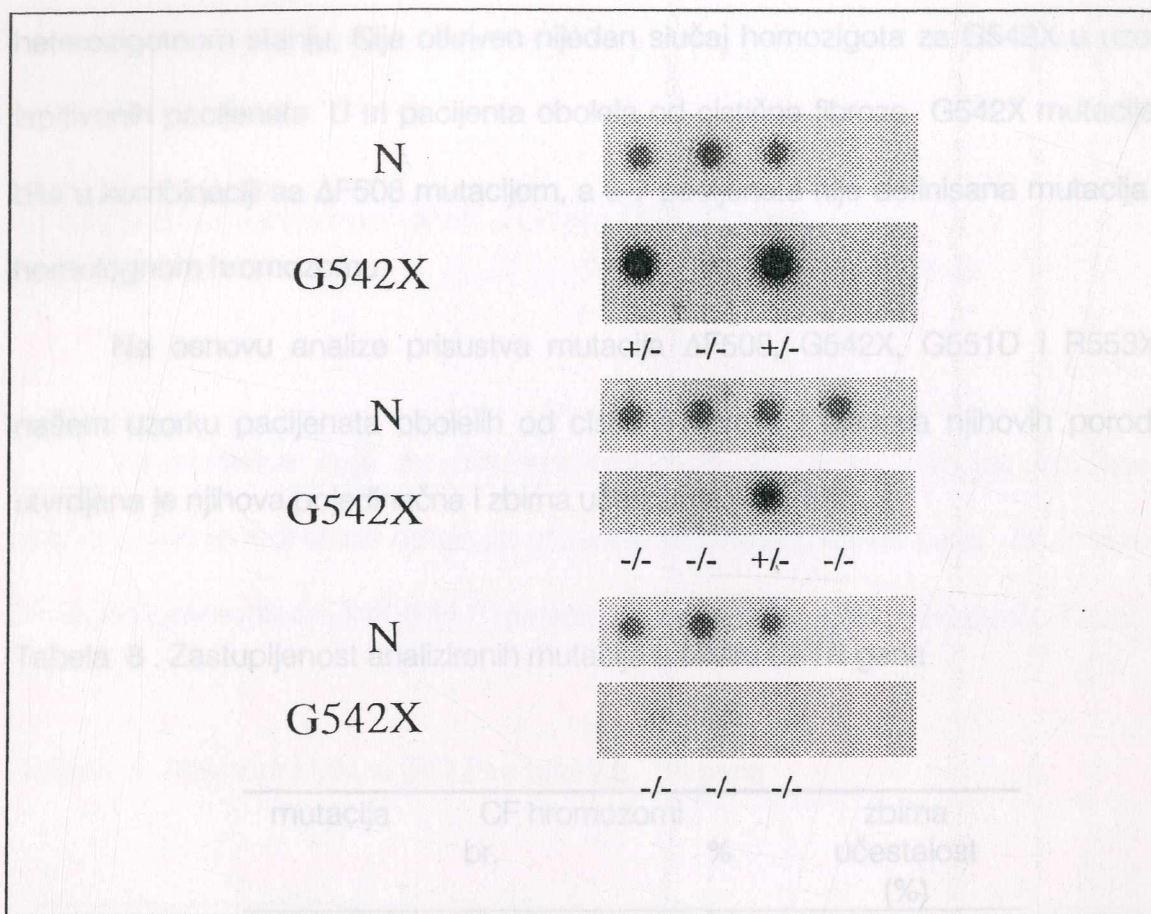
R553X mutacija nije pronađena ni na jednom od 326 ispitivanih CF hromozoma.

### Analiza prisustva G542X mutacije

Pored već opisanih G551D i R553X mutacija, u okviru egzona 11 opisana je i G542X mutacija, gde je guanin na poziciji 1756 zamenjen timinom (  $G_{1756} \rightarrow T$  ), što uzrokuje promenu kodona za glicin na položaju 542 ( Kerem BS. i sarad.,1990 ). Mutacija G542X spada u mutacije koje dovode do poremećaja u sintezi proteina (klasa I), i povezana je sa teškom kliničkom slikom cistične fibroze.

Prisustvo G542X mutacije , određivano je umnožavanjem regiona egzona 11, definisanog graničnicima (Tab 7), pri čemu se dobija fragment veličine 425 bp.

Prisustvo mutacije u tom fragmentu određuje se hibridizacijom kako sa



Slika 18. Analiza prisustva G542X mutacije

N: hibridizacija sa oligonukleotidnom probom komplementarnom normalnoj sekvenci u okviru egzona 11 CFTR gena

G542X: hibridizacija sa oligonukleotidnom probom komplementarnom sekvenci koja sadrži mutaciju.

+/-: heterozigot za G542X mutaciju

-/-: homozigot za normalnu sekvencu.

oligonukleotidnom probom koja je komplementarna normalnoj sekvenci, tako i sa oligonukleotidnom probom koja je komplementarna mutiranoj sekvenci. Na Slici 18 su prikazani rezultati analize prisustva G542X mutacije ASO hibridizacijom metodom dot blota.

Analiza prisustva G542X mutacije vršena je na DNK pacijenata obolelih od cistične fibroze, od kojih bar jedan hromozom nije nosio  $\Delta F508$  mutaciju. Prisustvo ove mutacije je utvrđeno na 21 od analiziranih 326 CF hromozoma, (6,44 %), i to u

heterozigotnom stanju. Nije otkriven nijedan slučaj homozigota za G542X u uzorku ispitivanih pacijenata. U tri pacijenta obolela od cistične fibroze G542X mutacija je bila u kombinaciji sa  $\Delta F508$  mutacijom, a u 7 pacijenata nije definisana mutacija na homolognom hromozomu.

Na osnovu analize prisustva mutacija  $\Delta F508$ , G542X, G551D i R553X u našem uzorku pacijenata obolelih od cistične fibroze i članova njihovih porodica utvrđena je njihova pojedinačna i zbirna učestalost.

Tabela 8 . Zastupljenost analiziranih mutacija u okviru CFTR gena

mutacija	CF hromozomi br.	%	zbirna učestalost (%)
$\Delta F508$	252/375	67,2	67,2
G542X	21/326	6,4	72,8
G551D	2/326	0,6	73,4
R553X	0/325	0	73,4

Od ukupno analizirana 375 hromozoma, mutacija  $\Delta F508$  mutacija je bila prisutna u 67,2%, a od ukupno analizirana 326 hromozoma, mutacija G542X je otkrivena u 6,4%, a mutacija G551D u 0,6%, dok mutacija R553X nije identifikovana ni na jednom od 325 analiziranih hromozoma. Ovi podaci daju zbirnu učestalost navedenih mutacija, od 73,4% (Tab. 8).

## Indirektna detekcija prisustva mutiranog CFTR gena

### Analiza polimorfizama DNK u blizini CFTR gena

Za porodice koje su bile neinformativne za direktnu mutacionu analizu primenjavana je indirektna detekcija prisustva mutiranog CFTR gena. Za analizu su korišćeni polimorfizmi DNK (RFLP markeri) u blizini CFTR gena, navedeni u Tabeli 9.

Tabela 9 Polimorfni lokusi (RFLP) u blizini CFTR gena

lokus	udaljenost od CFTR gena (kb)	enzim	veličina umnoženog fragmenta (bp)	
			a	b
KM19	225	PstI	950	(650+300)
E 2.6	195	MspI	650	(490+160)
E 4.1	135	MspI	377	(204+173)
E 3.1	100	XbaI	860	(610+250)
J 3.11	850	PstI	380	(230+150)

\* a) veličina umnoženog fragmenta

b) moguće veličine fragmenata dobijenih sečenjem odgovarajućim restrikcionim enzimom

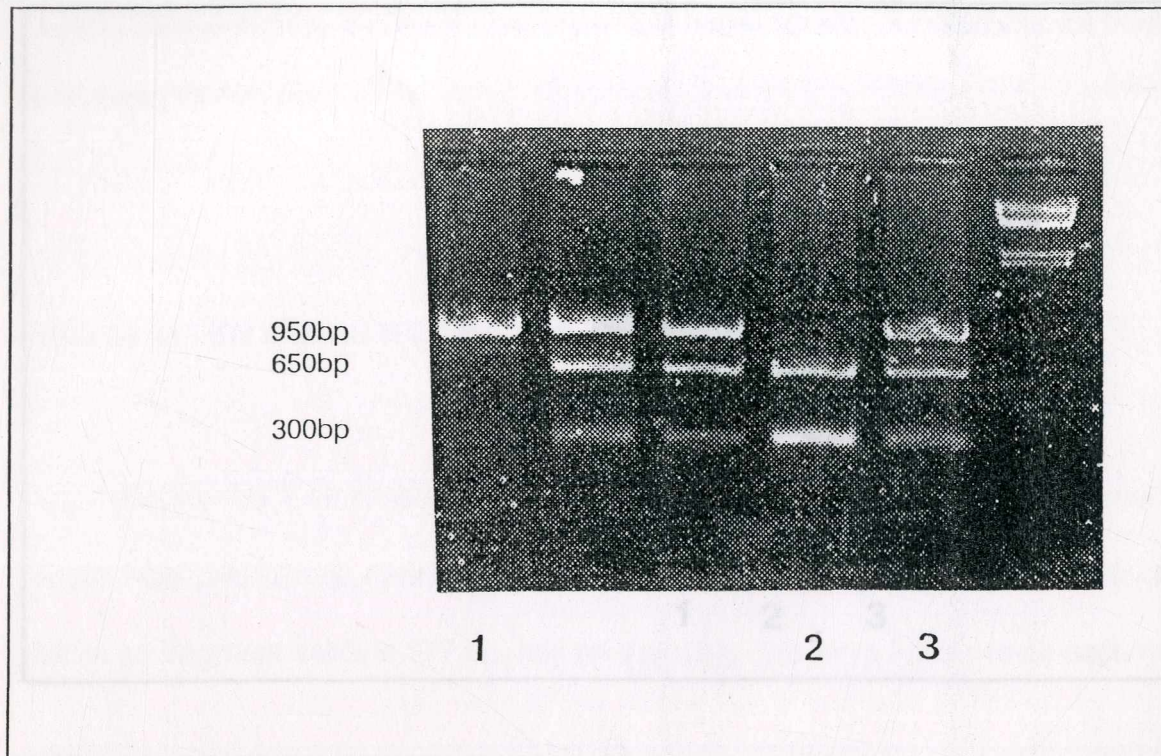
Ovi regioni su umnožavani PCR metodom, korišćenjem graničnika čije su sekvence date u Tabeli 7 u poglavlju Materijal i metod. U Tabeli 9 su takodje navedene i veličine fragmenata DNK dobijenih umnožavanjem, kao i veličine mogućih

produkata digestije odgovarajućim restrikcionim enzimom. Ovi regioni se nalaze u neposrednoj blizini CFTR gena ( Tab. 9 ), što ih čini izuzetno pouzdanim genskim markerima za indirektno praćenje nasljedjivanja mutiranog gena u rizičnim porodicama.

### Analiza polimorfizma regiona KM19

Umnožavan je region veličine 950 bp oko polimorfnog mesta koje prepoznaje enzim PstI u regionu KM19 u genomskoj DNK pacijenata obolelih od cistične fibroze i njihovih roditelja, a u nekim slučajevima i u klinički zdrave braće i sestara. Po 100-200 ng dobijenog PCR produkta obradjivano je restrikcionim enzimom PstI. Rezultati dobijeni analizom jedne od 53 testirane porodice prikazani su na Slici 19. Po umnožavanju KM19 regiona genomске DNK oca i sečenju dobijenog produkta enzimom PstI, dobijen je samo osnovni fragment veličine 950 bp. Ovaj rezultat pokazuje da je otac homozigotan za duži fragment ( genotip 1/1 ), tj. da ni jedan od očevih hromozoma 7, u okviru regiona KM19, nema očuvano restrikciono mesto koje prepoznaje enzim PstI. Po umnožavanju KM19 regiona majke i po sečenju dobijenog produkta enzimom PstI, dobijeni su fragmenti veličine 650 i 300 bp, što ukazuje da je restrikciono mesto za enzim PstI očuvano na oba hromozoma majke, tj. da je majka homozigotna za kraći fragment ( genotip 2/2).

Segment DNK, veličine 950 bp, koji obuhvata polimorfno mesto koje prepoznaje enzim PstI u regionu E 2.6, umnožavan je u genomskoj DNK



Slika 19. Analiza polimorfizma KM19/PstI

1: otac

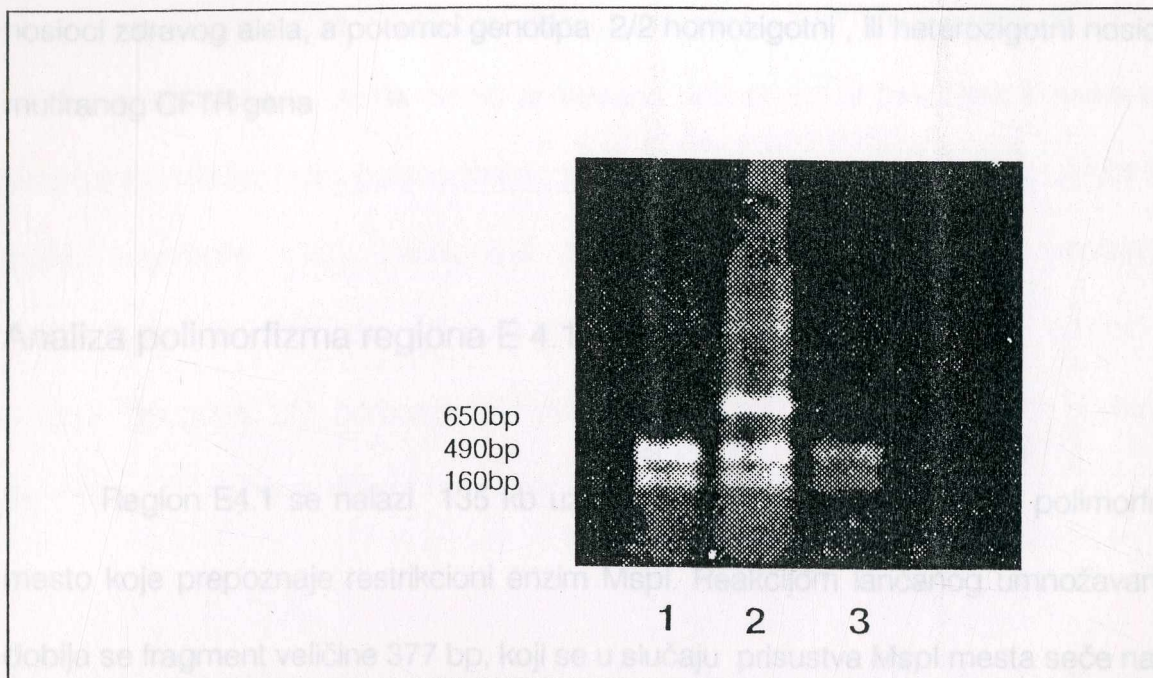
2: majka,

3: obolelo dete

Analizom obolelog deteta utvrđeno je da je obolelo dete heterozigotno za KM19/PstI polimorfizam (950/650/300), tj da ima genotip 1/2. Iz ovih rezultata se može zaključiti da konkretna porodica nije informativna za ispitivani polimorfizam, jer će svi potomci (CF/CF, CF/N i N/N) biti istog genotipa (1/2).

### Analiza polimorfizma regiona E 2.6

Segment DNK, veličine 650 bp, koji obuhvata polimorfno mesto koje prepoznaje enzim MspI u regionu E 2.6, umnožavan je u genomskoj DNK



Slika 20 . Analiza polimorfizma E2.6/Mspl

- 1: majka
- 2: otac
- 3: dete obolelo od cistične fibroze

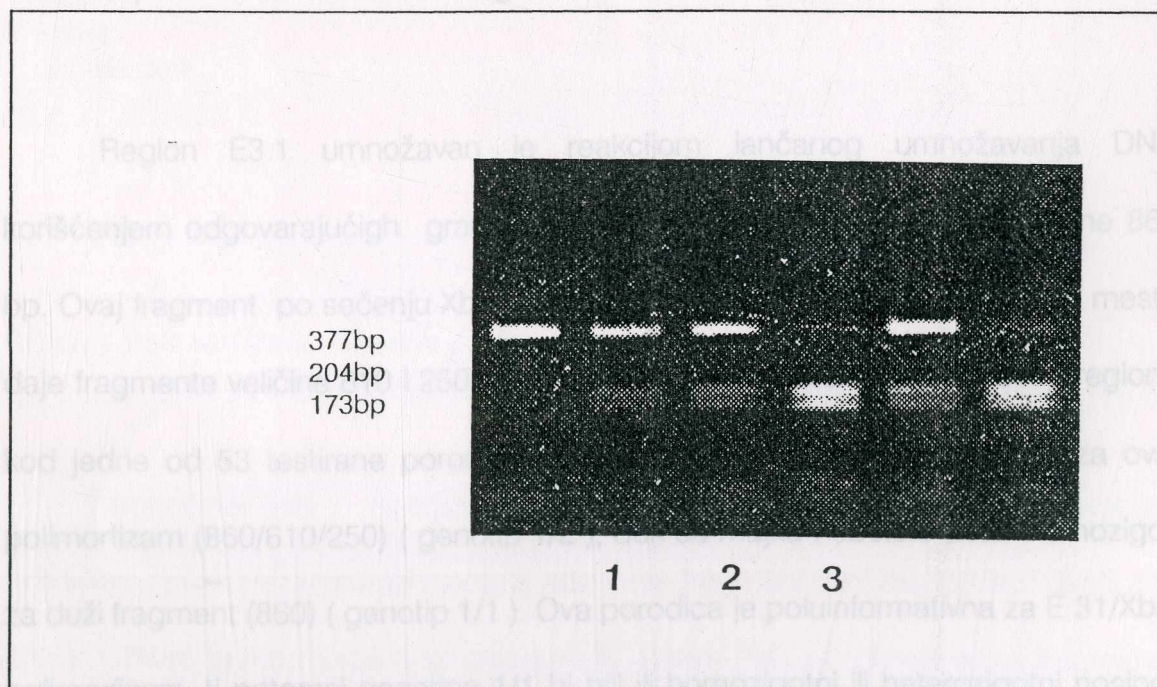
pacijenata obolelih od cistične fibroze i njihovih roditelja. Sekvence graničnika i uslovi reakcije lančanog umnožavanja DNK dati su u poglavlju Materijal i metode. Rezultati analize ovog polimorfizma prikazani su na primeru jedne od 53 ispitivanih porodica (Sl. 20).

Po umnožavanju regiona E 2.6 genomske DNK sva tri člana rizične porodice, i obradom restrikcioniim enzimom Mspl, utvrđeno je da su majka i obolelo dete homozigoti za kraći fragment ( genotip 2/2 ), dok je otac heterozigot za ovaj polimorfizam ( genotip 1/2). Ispitivana porodica je poluinformativna za ispitivani polimorfizam, tj. na osnovu ovih rezultata može se predvideti da će potomci genotipa 1/2 biti ili heterozigotni nosioci mutiranog CFTR gena ili homozigotni

nosioci zdravog alela, a potomci genotipa 2/2 homozigotni, ili heterozigotni nosioci mutiranog CFTR gena.

### Analiza polimorfizma regiona E 4.1

Region E4.1 se nalazi 135 kb uzvodno od CFTR gena i sadrži polimorfno mesto koje prepoznaje restrikcioni enzim MspI. Reakcijom lančanog umnožavanja dobija se fragment veličine 377 bp, koji se u slučaju prisustva MspI mesta seče na



Slika 21. Analiza polimorfizma E4.1/ MspI

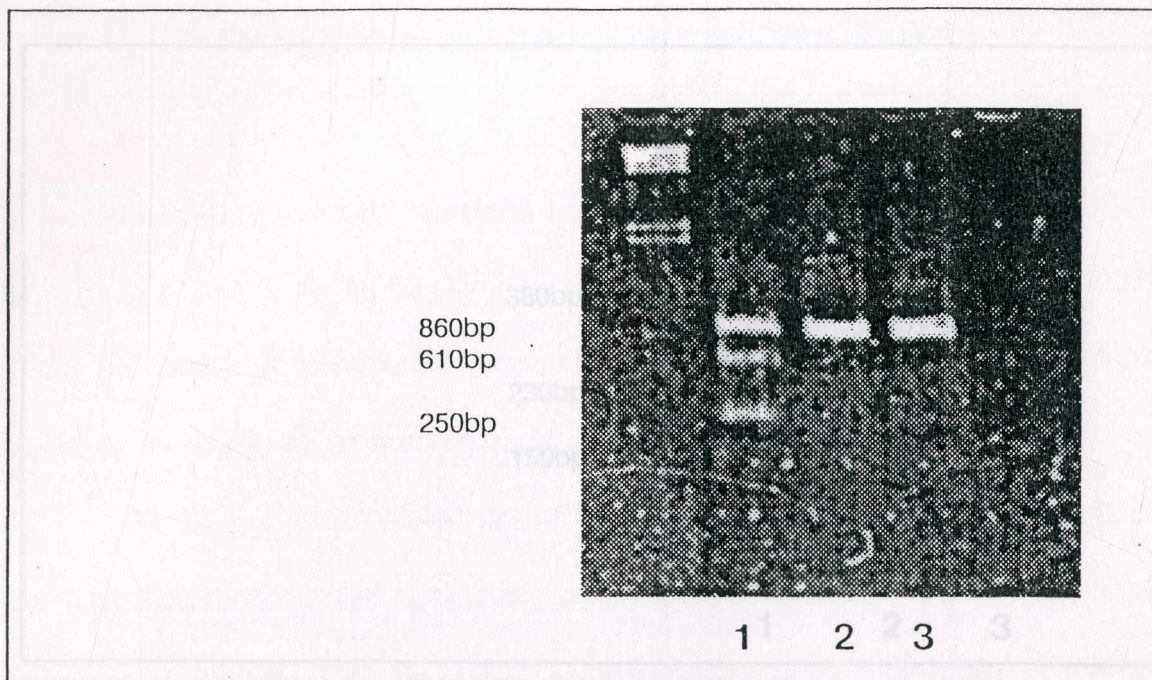
- 1: otac (1/2)
- 2: majka (1/2)
- 3: obolelo dete



fragmente veličine 204 i 173 bp. Rezultati analize E.41/Mspl polimorfizma su ilustrovani na primeru jedne od 53 analizirane porodice ( SI 21). Otac i majka su heterozigotni za ispitivani polimorfizam (genotip 1/2 ), a obolelo dete je homozigot za kraće fragmente (2/2). Analizirana porodica je informativna za analizirani polimorfizam, što znači da će potomci genotipa 1/2 biti heterozigotni nosioci a potomci genotipa 2/2, homozigotni nosioci mutiranog CFTR gena, dok će potomci genotipa 1/1 biti homozigotni za normalan alel.

### Analiza polimorfizama E3.1 regiona

Region E3.1 umnožavan je reakcijom lančanog umnožavanja DNK korišćenjem odgovarajućih graničnika, pri čemu se dobija fragment veličine 860 bp. Ovaj fragment po sečenju Xbal enzimom, ukoliko je prisutno restrikciono mesto daje fragmente veličine 610 i 250 bp. Na Slici 22 je prikazana analiza ovog regiona kod jedne od 53 testirane porodice. Utvrđeno je da je otac heterozigot za ovaj polimorfizam (860/610/250) ( genotip 1/2 ), dok su majka i obolelo dete homozigoti za duži fragment (860) ( genotip 1/1 ). Ova porodica je poluinformativna za E 31/Xbal polimorfizam, tj potomci genotipa 1/1 bi bili ili homozigotni ili heterozigotni nosioci, dok bi potomci genotipa 1/2 bili heterozigotni nosioci mutiranog CFTR gena.

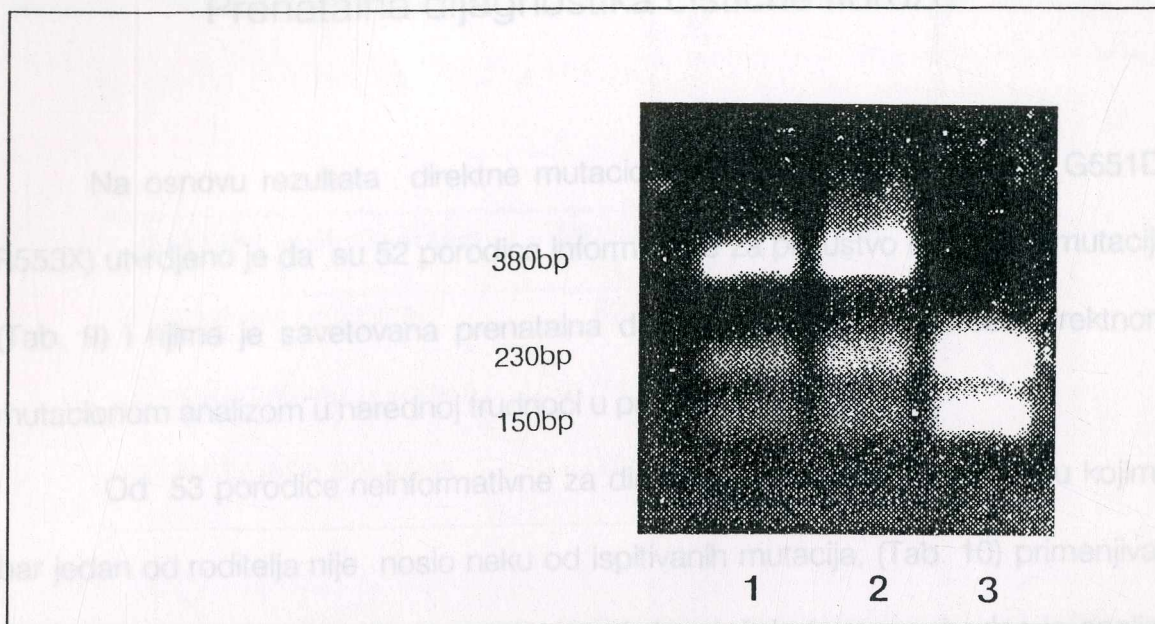


Slika 22, Analiza polimorfizma E3.1/XbaI

- 1: otac,
- 2: majka,
- 3: obolelo dete

### Analiza polimorfizma regiona J.311

Umnožavanjem specifičnog fragmenta regiona J.311, pod uslovima opisanim u poglavlju Materijal i metod, dobija se fragment veličine 380 bp. Ukoliko je prisutno restrikcionno mesto koje prepoznaje enzim PstI, po obradi ovog fragmenta sa PstI dobiće se fragmenti veličine 230 bp i 150 bp. Analiza ovog polimorfizma ilustrovana je primerom informativne porodice, na Slici 23.



Slika Analiza polimorfizma J311/PstI

- 1: otac
- 2: majka
- 3: obolelo dete

Za roditelje je utvrđeno da su heterozigoti za ispitivani polimorfizam ( genotip 1/2 ), dok je obolelo dete homozigotno za prisustvo mesta koje prepoznaje enzim PstI (genotip 2/2 ). Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da se u ovoj porodici, mutirani CFTR gen nasledjuje vezano za kraći alel ovog polimorfizma, što se može koristiti za prenatalnu dijagnozu u narednoj trudnoći.

## Tabela 10. Prenatalna dijagnostika cistične fibroze mutacije za prenatalnu dijagnostiku cistične fibroze

Na osnovu rezultata direktne mutacione analize ( $\Delta F508$ , G542X, G551D, R553X) utvrđeno je da su 52 porodice informativne za prisustvo ispitivanih mutacija (Tab. 9) i njima je savetovana prenatalna dijagnostika cistične fibroze direktnom mutacionom analizom u narednoj trudnoći u prvom trimestru.

Od 53 porodice neinformativne za direktnu mutacionu analizu, tj. u kojima bar jedan od roditelja nije nosio neku od ispitivanih mutacija, (Tab. 10) primenjivan je indirektan metod genetičke analize. U ovakvim slučajevima neophodna je analiza DNK obolelog deteta. Prvi zadatak u takvoj analizi je nalaženje polimorfizma za koji je konkretna porodica informativna. Ukoliko se utvrdi polimorfizam za koji je porodica informativna, savetuje se prenatalna dijagnoza u narednoj trudnoći u prvom trimestru.

Ukoliko se trudnica javi u drugom trimestru trudnoće, ili se radi o trudnoći sa velikim rizikom da dodje do prekida pri aspiraciji horionskih resica, sprovodi se amniocenteza. Od informativnih porodica, bilo za direktnu ili indirektnu molekularnu dijagnostiku cistične fibroze, 32 (34.4%) se opredelilo za prenatalnu dijagnostiku u narednoj trudnoći, s tim što se 6 porodica javilo na prenatalnu dijagnostiku 2 puta, a 1 porodica tri puta.

Prenatalne dijagnoze cistične fibroze, bilo direktnom mutacionom analizom, na prisustvo  $\Delta F508$  mutacije. Prenatalna dijagnoza je postavljena u 25 rizične porodice, pri čemu se 6 porodica javilo na prenatalnu dijagnostiku u dve trudnoće

Tabela 10. Podaci o informativnosti porodica na prisustvo  $\Delta F508$  mutacije za prenatalnu dijagnostiku cistične fibroze

informativnost za $\Delta F508$	broj/ukupan broj	%
informativne porodice	52/105	49,5
poluinformativne porodice	34/105	32,4
neinformativne porodice	19/105	18,1

bilo indirektnom genetičkom analizom, radjene su u 40 slučajeva. Dijagnoze su postavljene na osnovu analize DNK izolovane iz ćelija amnijske tečnosti u 5 slučajeva, kulture amnijskih ćelija u 15, i ćelija horionskih resica u 20 slučajeva.

#### Direktna prenatalna dijagnostika cistične fibroze analizom prisustva $\Delta F508$ mutacije

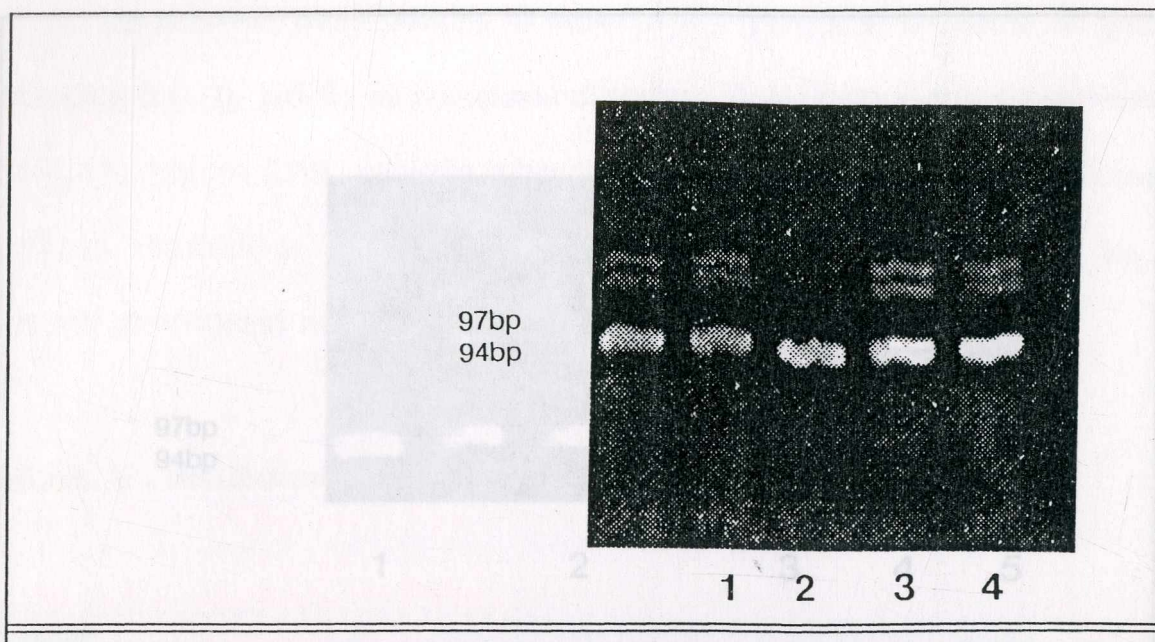
Analizom 101 porodice sa već jednim detetom sa cističnom fibrozom i 4 porodice sa porodičnom anamnezom cistične fibroze u kojima indeks slučaj nije bio dostupan za analizu DNK, utvrđeno je da su 52 porodice ( 49.5 %) informativne (Tab.10) za prenatalnu dijagnostiku cistične fibroze direktnom mutacionom analizom na prisustvo  $\Delta F508$  mutacije. Prenatalna dijagnoza je postavljena u 25 rizične porodice, pri čemu se 6 porodica javilo na prenatalnu dijagnostiku u dve trudnoće.

Tabela 11 . Rezultati prenatalne dijagnoze cistične fibroze analizom prisustva  $\Delta F508$  mutacije

uzorak	$\Delta F508/\Delta F508$	$\Delta F508/N$	N/N
horionske resice	5	10	3
amnionska tečnost	2	1	2
kultura ćelija amnionske tečnosti	1	4	3

Direktna analiza prisustva  $\Delta F508$  mutacije je vršena na fetalnoj DNK izolovanoj iz ćelija horionskih resica u 18 slučajeva, pri čemu je u 5 utvrđeno da se radi o homozigotnom nosiocu ove mutacije, u 10 slučajeva fetus je bio heterozigotni nosilac mutacije, a u 3 slučaja homozigotan za normalni alel. Prisustvo  $\Delta F508$  mutacije je utvrđivano i u 13 uzoraka amnionske tečnosti. Rezultati direktne analize prisustva  $\Delta F508$  mutacije su otkrili da je fetus homozigot za  $\Delta F508$  mutaciju u 3 slučajeva, heterozigotni nosilac  $\Delta F508$  mutacije u 5 slučajeva, a homozigot za normalan alel u 5 slučajeva ( Tab.11).

Na Slikama 24 i 25 prikazana su dva slučaja prenatalne dijagnostike direktnom mutacionom analizom na prisustvo  $\Delta F508$  mutacije. U prvom slučaju ( Slika 24 ) radi se o porodici sa već jednim rođenim detetom obolelim od cistične fibroze koja je analiziranu u pogledu informativnosti na prisustvo  $\Delta F508$  mutacije. Utvrđeno je da je porodica informativna na prisustvo ove mutacije i savetovana je prenatalna doijagnostika u narednoj trudnoći. U narednoj trudnoći uradjena je aspiracija



Slika 24. Prenatalna dijagnostika cistične fibroze direktnom mutacionom analizom na prisustvo  $\Delta F508$  mutacije.

1: fetus ( $\Delta F508/N$ )

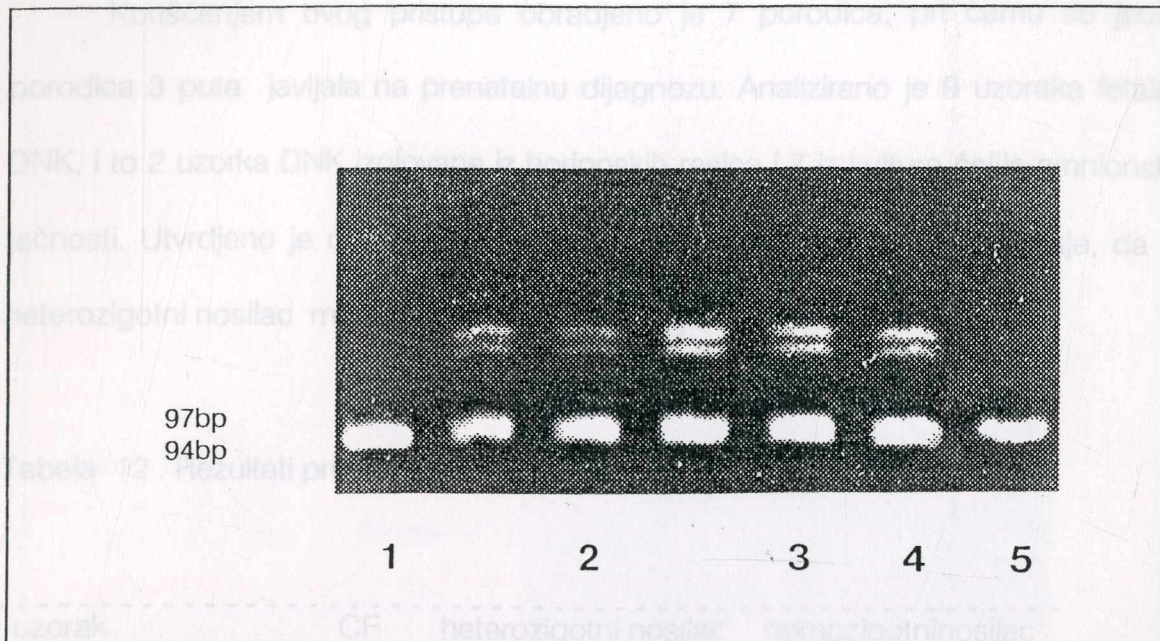
2: obolelo dete ( $\Delta F508/\Delta F508$ )

3: otac ( $\Delta F508/N$ )

4: majka ( $\Delta F508/N$ )

horionskih resica i izvršena analiza na prisustvo  $\Delta F508$  mutacije na uzorku fetalne  $\Delta NK$ . Utvrđeno je da fetus heterozigotni nosilac mutacije kao i roditelji.

Drugi primer ( Sl 25 ) se odnosi na porodicu u kojoj je postojao anamnestički podatak o cističnoj fibrozi, ali obolelo dete nije bilo dostupno za analizu. Ova porodica je imala još jedno dete bez kliničkih znakova bolesti, a majka je već bila u 15. nedelji trudnoće. Stoga je ova porodica analizirana na prisustvio  $\Delta F508$  mutacije i utvrđeno je da su roditelji heterozigoti za ovu mutaciju, a dete bez kliničkih znakova bolesti , homozigot za normalni alel. Izvršena je amniocenteza, i analizom fetalne  $\Delta NK$  utvrđeno da je fetus homozigot za  $\Delta F508$  mutaciju, što je kasnije potvrđeno i na abortiranom materijalu.



Slika 25. Prenatalna dijagnostika cistične fibroze direktnom mutacionom analizom na prisustvo  $\Delta F508$  mutacije

1. fetus ( $\Delta F508/\Delta F508$ )
2. fetus + N/N (umnožena  $\Delta NK$  fetusa pomešana sa umnoženom  $\Delta NK$  homozigota za normalni alel)
3. otac ( $\Delta F508/N$ )
4. majka ( $\Delta F508/N$ )
5. zdravo dete (N/N)

#### Indirektna prenatalna dijagnostika cistične fibroze

Od 53 porodice neinformativne za direktnu mutacionu analizu u narednoj trudnoći, 34 (82,9%) bilo informativno, a 7 (17,1 %) neinformativno za indirektnu genetičku analizu. Ovim porodicama, informativnim za jedan ili više  $\Delta NK$  polimorfizama u neposrednoj blizini CFTR gena, savetovana je prenatalna dijagnostika cistične fibroze indirektnom metodom.

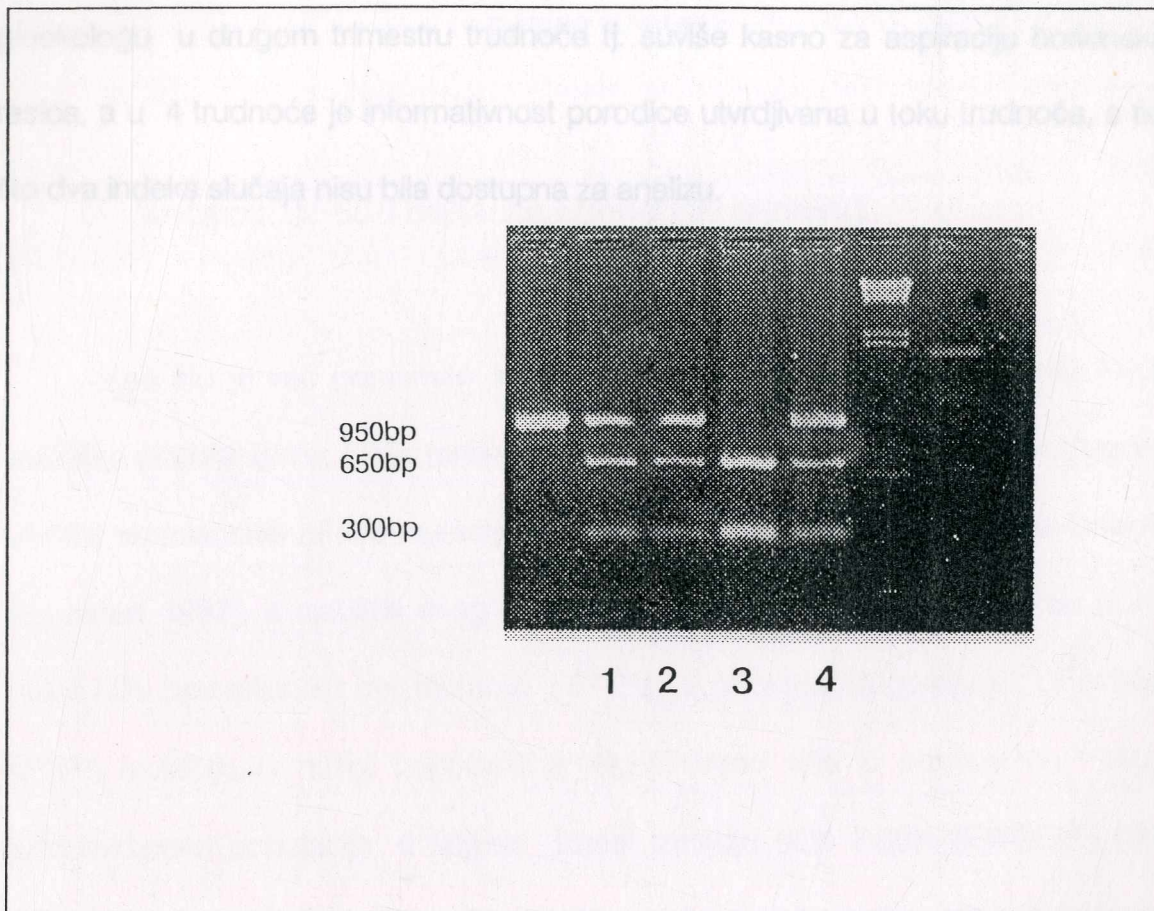


Korišćenjem ovog pristupa obradjeno je 7 porodica, pri čemu se jedna porodica 3 puta javljala na prenatalnu dijagnozu. Analizirano je 9 uzoraka fetalne DNK, i to 2 uzorka DNK izolovane iz horionskih resica i 7 iz kulture ćelija amnionske tečnosti. Utvrđeno je da je fetus oboleo od cistične fibroze u 2 slučaja, da je heterozigotni nosilac mutiranog gena u 7 slučajeva (Tab. 12).

Tabela 12 . Rezultati prenatalne dijagnostike cistične fibroze RFLP analizom

uzorak	CF	heterozigotni nosilac mutacije	homozigotni nosilac normalnog alela
horionske resice	-	2	-
amnionska tečnost	-	-	-
kultura ćelija amnionske tečnosti	2	5	-

Indirektni pristup u prenatalnoj dijagnostici cistične fibroze je ilustrovan primerom prikazanim na Slici 26. Na Slici 26 je primer porodice informativne za polimorfizam KM19/PstI. Roditelji su heterozigotni za navedeni polimorfizam (1/2), a obolelo dete homozigot za kraći alel (2/2), što je utvrđeno analizom informativnosti porodice, i savetovana je prenatalna dijagnostika u narednoj trudnoći indirektnom detekcijom prisustva mutiranog gena. Analiza fetalne DNK je pokazala da je fetus heterozigot za polimorfizam KM19/PstI, tj, da se na agaroznom gelu dobija isti raspored traka kao i kod roditelja (1/2), što znači da je fetus heterozigotni nosilac mutiranog CFTR gena.



Slika 26 Prenatalna dijagnostika cistične fibroze analizom polimorfizma KM19/PstI

1. otac (1/2)
2. majka(1/2)
3. obolelo dete (2/2)
4. fetus (1/2)

U okviru porodica u kojima je radjena prenatalna dijagnostika cistične fibroze, 6 porodica je imalo i dodatni rizik zbog godina trudnice (preko 35), pa je bilo indikovano raditi i amniocentezu u , a u jednom slučaju je postojao i dvostruki rizik jer je trudnica bila nosilac balansirane translokacije. U svim slučajevima u kojima je utvrđeno da je fetus oboleo od cistične fibroze bračni parovi su se odlučili na prekid trudnoće. U 10 slučajeva, radjena je amniocenteza jer su se trudnice javile

ginekologu u drugom trimestru trudnoće tj. suviše kasno za aspiraciju horionskih resica, a u 4 trudnoće je informativnost porodice utvrđivana u toku trudnoće, s tim što dva indeks slučaja nisu bila dostupna za analizu.

Kao što je već pomenuto, učestalost mutacija u CFTR genu, varira među različitim populacijama. Naša ranija istraživanja, sprovedena na 176 CF hromozoma utvrdila su prisustvo  $\Delta F508$  mutacije na oko 70% CF hromozoma (Brukner-Đabović B. i sarad., 1992), a rezultati ovog istraživanja na 376 CF hromozoma su utvrdili nešto nižu zastupljenost ove mutacije (67.2%) u populaciji Jugoslavije. Učestalost  $\Delta F508$  mutacije u našoj populaciji je signifikantno viša u odnosu na druge južneevropske populacije, u kojima iznosi između 50% i 60% (EWGCFG, 1990; Simova L i sarad., 1990), ali je još ivek niža u odnosu na zemlje centralne i severne Evrope u kojima iznosi od 70% do 83% (Estevill X., 1993).

Mutacija koja je druga po zastupljenosti u našoj populaciji je G542X. U našim ranijim istraživanjima na manjem uzorku od 30 CF hromozoma utvrđena je njena zastupljenost od 4% (Brukner-Đabović B. i sarad., 1992), a u ovom istraživanju analizom 326 hromozoma utvrđena je zastupljenost ove mutacije od 6.4%. Učestalost mutacije G542X u našoj populaciji je najbliža učestalosti ove mutacije u populaciji južne Italije od 5.7% (Castaldi G. i sarad., 1996), znatno veća u odnosu na učestalost u opštoj populaciji koja se kreće od 2.3% do 3.2% (Kerem SS. i sarad., 1990; Tsui LC., 1992), a niža u odnosu na vrednosti dobijene za populaciju Španije od 8.8% (Castals T. i sarad., 1993).

## DISKUSIJA

### Učestalost $\Delta F508$ mutacije i genetički skrining

Kao što je već pomenuto, učestalost mutacija u CFTR genu, varira medju različitim populacijama. Naša ranija istraživanja, sprovedena na 176 CF hromozoma utvrdila su prisustvo  $\Delta F508$  mutacije na oko 70% CF hromozoma (Brukner-Dabović B., i sarad., 1992), a rezultati ovog istraživanja na 375 CF hromozoma su utvrdili nešto nižu zastupljenost ove mutacije (67,2%) u populaciji Jugoslavije. Učestalost  $\Delta F508$  mutacije u našoj populaciji je signifikantno viša u odnosu na druge južnoevropske populacije, u kojima iznosi izmedju 50% i 60% (EWGCFG, 1990; Simova L i sarad., 1990), ali je još uvek niža u odnosu na zemlje centralne i severne Evrope u kojima iznosi od 70% do 88% (Estevill X., 1993).

Mutacija koja je druga po zastupljenosti u našoj populaciji je G542X. U našim ranijim istraživanjima na manjem uzorku od 30 CF hromozoma utvrdjena je njena zastupljenost od 4% (Brukner-Dabović B. i sarad., 1992), a u ovom istraživanju analizom 326 hromozoma utvrdjena je zastupljenost ove mutacije od 6,4%. Učestalost mutacije G542X u našoj populaciji je najpribližnija učestalosti ove mutacije u populaciji južne Italije od 5,7% (Castaldo G. i sarad., 1996), značajno veća u odnosu na učestalost u opštoj populaciji koja se kreće od 2,3% do 3,2% (Kerem BS. i sarad., 1990; Tsui LC., 1992), a niža u odnosu na vrednosti dobijene za populaciju Španije od 8,8% (Cassals T. i sarad., 1993).

Mutacija G551D je identifikovana sa učestalošću od 0,61% u našoj populaciji što je niže nego u opštoj populaciji ( 2,6% - 2,9%) (Cutting GR. i sarad.,1990; Tsui LC., 1992), a viša u odnosu na populaciju severoistočne Italije (0,44%) (Bonizzato,A. i sarad., 1995) i Španije (0,5%) (Estivill X., 1993).

Mutacija R553X, koja je u opštoj populaciji prisutna sa učestalošću od 0,9%-1.6% (Cutting GR i sarad,1990; Tsui LC.,1992), nije otkrivena u uzorku obuhvaćenim našim istraživanjem.

Zbirna učestalost ispitivanih mutacija u našoj populaciji iznosi 73,4%. U zemljama u kojima  $\Delta F508$  mutacija i druge mutacije, poput G551D, N1303K, R553X i G542X čine 85-90% CF hromozoma, genetički skrining na ove mutacije otkriva većinu nosilaca. Medjutim, u populacijama u kojima je još uvek nepoznato oko 35% mutacija (region Mediterana i istočna Evropa), više od 50% porodica nije informativno, oko 45% porodica je semiinformativno, a oko 12 % neinformativno za mutacionu analizu (Estivill X. 1993; Tsui LC., 1994). U populaciji obuhvaćenoj našim istraživanjem, 49,5% porodica je bilo informativno za  $\Delta F508$  mutaciju, 33% semiinformativno, a 18,1% neinformativno za najčešću mutaciju u okviru CFTR gena. Ovi podaci ukazuju da je i u našoj populaciji potrebno identifikovati nepoznate mutacije, jer zbirna zastupljenost ispitivanih mutacija od 73,4% nije dovoljna da bi se sprovodio populacioni skrining. Stoga bi bilo racionalno, u prvom koraku, skrinovati našu populaciju na prisustvo preostale 4 najčešće mutacije (  $\Delta I507$ , W1282X, 1717-1 (GtoA) i N1303K) korišćenjem komercijalnih kitova (Innogenetics, Johnson&Johnson) koji su se nedavno pojavili na tržištu.

U drugom koraku, ukoliko zbirna zastupljenost ovih mutacija nije veća od 90%, za mutacije koje ostanu neidentifikovane, treba primeniti neki od metoda za indirektnu detekciju prisustva mutacija u pojedinačnim egzonima (DGGE, SSCP, CCM), a za egzone u kojima se otkrije prisustvo mutacija, sekvenciranje da bi se one okarakterisale.

Između ostalog, postavlja se pitanje koji broj mutacija treba rutinski testirati pri analizi rizičnih porodica. U SAD najveći broj laboratorija testira 10-30 mutacija, korišćenjem PCR metodologije u kombinaciji sa ASO hibridizacijom. Za svaku populaciju je potrebno prvo utvrditi relativnu učestalost pojedinih mutacija, a zatim analizirati maksimalan broj mutacija bez velikih dodatnih troškova. U SAD se analizom 20-30 mutacija otkriva oko 87% CF hromozoma udruženih sa klasičnim fenotipom. Rezultati naših istraživanja pokazuju da je sa dijagnostičkog i ekonomskog stanovišta u našoj populaciji, dok se daljom analizom ne otkrije preostalih 27,6% nepoznatih mutacija, opravdano u rizičnim porodicama vršiti skrining na  $\Delta F508$  mutaciju, s obzirom na njenu učestalost.

U pogledu skrininga na G542X mutaciju, koja je druga po učestalosti u našoj populaciji, mišljenja smo da je korišćenje metoda indirektno detekcije mutacija u okviru CFTR gena, metoda izbora u odnosu na direktnu detekciju G542X mutacije. Ovom stavu ide u prilog i podatak da je 82,9% analiziranih porodica bilo informativno za indirektnu genetičku analizu. Podaci koji se odnose na populaciju severne Italije, gde je potrebno direktno detektovati 22 mutacije da bi se otkrilo 90,2% CF hromozoma (Bonizzato i sarad., 1995), takodje ukazuju da populacioni skrining na nosioce mutiranog CFTR gena u ovom delu Evrope ne bi bio ekonomičan.

Preporuka je da populacioni skrining na nosioce mutiranog CFTR gena ne treba preduzimati dok ne bude otkriveno 95% mutacija, kada bi bilo moguće otkriti 90% rizičnih parova ( Workshop on Population Screening for CF gene, 1990 ).

### Problemi prenatalne dijagnostike

U najvećem broju slučajeva dijagnoza cistične fibroze se postavlja na osnovu kliničkog nalaza i rezultata znojnog testa. Pacijente sa dijagnozom cistične fibroze treba analizirati primenom molekularno-genetskih metoda iz više razloga. Kao prvo, da bi se utvrdila informativnost porodice za prenatalnu dijagnostiku cistične fibroze u narednoj trudnoći. Genotipizacija pruža mogućnost prognoze bolesti u pogledu funkcije pankreasa, kao i analize braće i sestara obolelog deteta tj. otkrivanje nosilaca mutiranog gena. U pogledu genotip/fenotip korelacije za 4 mutacije obuhvaćene našim istraživanjem ( $\Delta F508$ , G542X, G551D i R553X), zasad nisu utvrđene značajne medjusobne razlike u pogledu funkcije pankreasa, bez obzira da li se radilo o homozigotima ili mešovitim heterozigotima za ispitivane mutacije (The CF genotype -Phenotype Consortium, 1993). Jedino je uočena negativna korelacija između prisustva G551D mutacije i mekonijalnog ileusa, kao i to da se u pacijenata koji nose ovu mutaciju insuficijencija pankreasa javlja u kasnijem životnom dobu (Hamosh A. i sarad., 1992). Opšte uzevši, prognostičko i prenatalno savetovanje porodica u kojima je rodjeno dete sa bilo kojom kombinacijom ispitivanih mutacija se svodi na to da im treba predočiti da će se insuficijencija pankreasa verovatno

javiti u ranom životnom dobu, dok se prognoze u pogledu funkcije pluća, zbog velike varijabilnosti u kliničkoj slici ne mogu davati.

U izvesnim slučajevima mutaciona analiza se može koristiti i za postavljanje dijagnoze cistične fibroze, kada nije moguće izvesti znojni test, pogotovo kod novorodjenčadi, i kada se sumnja na cističnu fibrozu, ali se na osnovu kliničkog nalaza i rezultata znojnog testa ne može sa sigurnošću tvrditi da se radi o ovoj bolesti. Ukoliko se u takvim slučajevima identifikuju mutacije na oba hromozoma, može se postaviti dijagnoza cistične fibroze. Medjutim, ukoliko se patološka promena otkrije samo na jednom homozomu, ovakav nalaz ne isključuje da se možda radi o cističnoj fibrozi, tj da drugi hromozom nosi neku za sada neidentifikovanu mutaciju.

U našim istraživanjima imali smo slučaj porodice sa nejasnom dijagnozom cistične fibroze. Dete je imalo granični nalaz znojnog testa, ali nije bilo drugih znakova bolesti. Mutaciona analiza na  $\Delta F508$ , G542X, G551D i R553X mutaciju otkrila je da su dete i otac heterozigotni nosioci G542X mutacije. Iako u majke nije detektovano prisustvo testiranih mutacija, to ne isključuje mogućnost da ona nosi neku još neidentifikovanu "blagu" mutaciju koju je prenela na dete. Analiza polimorfizama DNK (KM19/PstI, E41/MspI, E31/XbaI, E26/MspI i J311/PstI) u ovoj porodici, nije otkrila prisustvo visoko rizičnog haplotipa, ali to takodje ne isključuje dijagnozu cistične fibroze. Ono što je važno naglasiti, jeste da se ovoj porodici može savetovati amniocenteza u narednoj trudnoći u cilju određivanja nivoa mikrovilarnih enzima, pošto se ona tretira kao neinformativna za molekularnogenetsku analizu. U



ovom slučaju, detetu takodje treba savetovati testiranje partnera kada bude došlo u reproduktivni period i planiralo svoju porodicu.

Još uvek nema podataka koji procenat porodica se odlučuje za prenatalnu dijagnozu u rizičnim populacijama, i u kom procentu se parovi odlučuju na prekid trudnoće ukoliko se utvrdi da je fetus oboleo od cistične fibroze. Jedino postoji podatak da se vrlo mali broj parova odlučuje na prekid trudnoće ukoliko se utvrdi da je fetus heterozigotni nosilac jedne mutacije. U našem uzorku, svi parovi kod kojih se utvrdilo da je fetus oboleo od cistične fibroze su se odlučili za prekid trudnoće. Takodje smo zapazili, premda naš uzorak nije veliki, da se parovi kod kojih je radjena prenatalna dijagnoza ponovo javljaju u narednim trudnoćama. Samo oko trećina rizičnih porodica se javi za prenatalnu dijagnostiku (32 porodice od 105 analiziranih). Da li je to rezultat toga što se rizične porodice retko odlučuju na sledeću trudnoću i pored mogućnosti prenatalne dijagnostike, ili nedovoljne informisanosti o mogućnostima prenatalne dijagnostike cistične fibroze nismo bili u mogućnosti da utvrdimo. Baš iz tog razloga je potrebno voditi registre rizičnih porodica, i povremeno slati obaveštenja o mogućnostima prenatalne dijagnostike cistične fibroze u narednoj trudnoći, sa naglaskom da je rizik za radjanje obolelog deteta u svakoj trudnoći isti i da iznosi 1:4. Takodje ih treba podsećati da se braća i sestre obolelog deteta, za koje je utvrdjeno da su heterozigotni nosioci mutacije obavezno jave radi testiranja partnera, kad budu planirali svoju porodicu.

U prenatalnoj dijagnostici cistične fibroze u rizičnim porodicama, najidealnije je planirati trudnoću kada su svi relevantni članovi porodice testirani i kada je utvrdjena informativnost porodice. Time se smanjuje napetost u porodici i trudnica

manje izlaže stresu. Međutim, u praksi se često dešava da se molekularna analiza porodice vrši u toku trudnoće. Ukoliko je DNK indeks slučaja dostupna za analizu, postoji realna šansa da porodica bude informativna bilo za direktnu, bilo za indirektnu genetičku analizu. U našem uzorku, 49,5% porodica bilo je informativno za direktnu mutacionu analizu, a 82,9% porodica je bilo informativno za RFLP analizu. Ali, ako se radi o paru kod koga postoji samo anamnestički podatak o cističnoj fibrozi, ukoliko mutaciona analiza ne pokaže da su oboje nosioci testiranih mutacija, ili se utvrdi da je samo jedan partner nosilac, ne može se sprovesti prenatalna molekularna dijagnostika jer se ne može predvideti status fetusa.

U indirektnoj genetičkoj analizi neophodan uslov je analiza uzorka DNK obolelog deteta, što u praksi nije uvek slučaj. Čak i kada je DNK indeks slučaja dostupna za analizu, porodica je informativna samo ukoliko su roditelji heterozigoti, a obolelo dete homozigot za testirani polimorfizam DNK.

Jedan od osnovnih problema u prenatalnoj dijagnostici naslednih bolesti metodama rekombinantne DNK je uzimanje i dobijanje DNK uzorka. Zahtevi za količinom i kvalitetom DNK se razlikuju u zavisnosti od tehnika koje se primenjuju u daljoj analizi. Za analizu i Southernovom tehnikom, potrebne su veće količine horionskih resica i amnionske tečnosti, a izolovana DNK mora biti dobrog kvaliteta. U našim prvim istraživanjima utrdjivanja informativnosti porodica za RFLP analizu različitim DNK markerima, primenom Southernove tehnike, bile su potrebne znatno veće količine DNK (30 $\mu$ g -50 $\mu$ g) dobijene iz 10 ml krvi, dobrog kvaliteta, (Brukner-Dabović B. i sarad., 1989). Problem količine DNK za analizu, naročito dolazi do izražaja u prenatalnoj dijagnozi, kada se fetalna DNK izoluje iz horionskih resica,

odakle je prinos daleko manji ( $0,7\mu\text{g}/\text{mg}$  tkiva) (Old JM.,1986 ). Iz navedenih razloga, tehnika po Southernu se sve više zamenjuje PCR tehnikom, za čiju primenu su potrebne daleko manje količine DNK (  $0,1 - 1 \mu\text{g}$ ), tako da nam je sada za ove analize potrebno  $0,5 \text{ ml}$  krvi, a količina horionskih resica nije više kritična (Radojković D. i sarad., 1996 ).

U prenatalnoj dijagnostici cistične fibroze i drugih monogenских oboljenja, potencijalno vrlo vredan materijal za izolovanje DNK, u slučajevima kada indeks slučaj nije dostupan za analizu, su uzorci krvi na filter papiru iz skrininga na fenilketonuriju i kongenitalni hipotireoidizam (Radojković D. i sarad., 1994 ).

Vrlo važan problem o kome treba voditi računa u prenatalnoj dijagnostici jeste mogućnost kontaminacije uzoraka amnionske tečnosti i horionskih resica majčinom krvlju ili tkivom, ili nekom stranom DNK. Problem kontaminacije majčiniм ćelijama se može izbeći preciznim odvajanjem horionskih resica od tkiva decidue, i izbegavanjem kultivisanja horionskih resica jer u kulturi horionskih resica može doći do nadržavanja maternalnih ćelija. U slučaju amniocenteze, kontaminacija se smanjuje višestrukim ispiranjem taloga amniocita pri centrifugiranju amnionske tečnosti.

U poslednje vreme se intenzivno radi na neinvazivnim metodama izolovanja DNK iz fetalnih ćelija, prisutnih u perifernoј cirkulaciji trudnice (Cheung MC. i sarad.,1996), što će eliminisati neke od ovih problema, ali verovatno otvoriti i neke nove. Vrlo važan element u prenatalnoj dijagnostici cistične fibroze je vreme potrebno za dobijanje rezultata. Idealan metod u tom smislu bi bio onaj koji bi predstavljao kombinaciju dobijanja fetalnih ćelija neinvazivnom metodom, što ranije

u trudnoći, izolovanja fetalne DNK u što kraćem roku, i primene brzog i pouzdanog dijagnostičkog postupka. Međutim, ukoliko je potrebno vršiti i citogenetsku analizu usled rizika za hromozomsku aberaciju, obavlja se amniocenteza u 16.-18. nedelji trudnoće, a ćelije amnionske tečnosti kultivišu 2-3 nedelje. Korišćenjem nevijabilnih ćelija prisutnih u supernatantu kulture ćelija amnionske tečnosti, posle 7 dana kultivacije, kao izvora DNK za PCR, moguće je skratiti vreme za dobijanje rezultata prenatalne dijagnoze cistične fibroze sa 2-3 nedelje na 7 dana ( Kušić J. i sarad. 1996).

## Genetičko savetovanje rizičnih porodica

Otkrivanje nosilaca mutiranog gena u porodicama i populacijama sa rizikom za radjanje obolelog deteta je važna komponenta prevencije naslednih bolesti. Kod autozomno recesivnih bolesti, nosilac mutiranog gena je najčešće zdrava osoba koja nosi mutirani gen odgovoran za nasledno oboljenje u heterozigotnom stanju.

Većina dece obolele od cistične fibroze se radja u familijama sa negativnom porodičnom anamnezom ove bolesti. Učestalost radjanja dece sa cističnom fibrozom može se smanjiti jedino skrining programima pre začeća ili u ranoj trudnoći, a zatim sledi prenatalna dijagnostika i, ukoliko se utvrdi da je fetus oboleo, predlaže se prekid trudnoće.

Kod nas se, genetičkom savetovaštvu, u pogledu planiranja narednih trudnoća, uglavnom obraćaju porodice sa najmanje jednim obolelim detetom.

Takvim porodicama koje imaju rizik od 1:4 za radjanje deteta sa cističnom fibrozom, potrebno je pružiti pravovremeni i adekvatan genetički savet, i to pre začeća, ukoliko je to moguće. Potrebno je izvršiti genetičku analizu oba roditelja i indeks slučaja, da bi se utvrdilo da li je porodica informativna. Potom je potrebno obaviti razgovor sa parom i predočiti reproduktivne mogućnosti: saznanje da i naredna trudnoća nosi rizik od 1:4 za radjanje deteta sa cističnom fibrozom, usvajanje deteta, veštačko oplodjenje od strane donora i mogućnost prenatalne dijagnoze. Za porodice neinformativne kako za direktnu mutacionu analizu, tako i za indirektnu genetičku analizu, postoji mogućnost određivanja mikrovilarnih enzima u amnionskoj tečnosti.

Enzimski testovi su usled male pouzdanosti i relativno kasnog dobijanja rezultata, obeshrabivali rizične parove u pogledu planiranja trudnoće ili izvođenja prenatalne dijagnoze, ukoliko je trudnoća već u toku (Dodge JA, 1988). U našem uzorku ispitivanih porodica, 45,9% je bilo informativno za direktnu mutacionu analizu, 82,9% za indirektnu genetičku analizu, a 17,1% nije bilo informativno za molekularnu dijagnostiku cistične fibroze. Informativnim porodicama, preporučena je molekularna dijagnostika cistične fibroze i to u prvom trimestru trudnoće. Ovakav pristup smanjuje anksioznost trudnice, jer se dijagnostika sprovodi između 8. i 12. nedelje trudnoće, pa je u slučaju nepovoljnog rezultata moguće ranije prekinuti trudnoću.

U pacijenata obuhvaćenih našim istraživanjem, zapaža se da se pacijenti koji su se jednom odlučili za prenatalnu dijagnozu, za ovu mogućnost odlučuju i u narednim trudnoćama, i to bez obzira na ishod analize. Šest porodica se dva puta javilo za prenatalnu dijagnozu, pri čemu je utvrđeno da je fetus oboleo u tri slučaja.

Jedna porodica se čak tri puta javljala na prenatalnu dijagnozu, pri čemu je u dve uzastopne trudnoće utvrđeno da je fetus homozigotni nosilac  $\Delta F508$  mutacije, a u trećoj trudnoći je utvrđeno da je fetus heterozigotni nosilac ove mutacije i rodjeno je zdravo dete. Naravno, s obzirom da se radi o malom uzorku ne mogu se izvoditi zaključci o statističkoj značajnosti ovog zapažanja.

U našem uzorku porodica sa rizikom za rođanje deteta obolelog od cistične fibroze, u 18 slučajeva (45%)j rođena je prenatalna dijagnoza u porodicama u kojima je prethodno dete bilo hospitalizovano usled teškog oblika bolesti koja se završila smrtnim ishodom. Informativnost porodica je utvrđivana za vreme boravka obolelog deteta u bolnici. U svega dva slučaja, porodica nije bila zainteresovana za testiranje još jednog zdravog deteta u cilju utvrđivanja statusa nosioca mutacije. Ovim istraživanjem nisu obuhvaćeni parovi sa nejasnom porodičnom anamnezom cistične fibroze, kod kojih obolelo dete nije bilo dostupno za analizu, ali se zapaža da broj ovakvih parova nije zanemarljiv. Postavlja se pitanje da li u takvim slučajevima treba vršiti skrining na mutacije u CFTR genu i na koje mutacije treba vršiti skrining. U svakom slučaju pravilan pristup u genetičkom savetovanju ovih parova mora uključiti tesnu saradnju sa kliničkim lekarima.

U slučajevima kombinovanog ili višestrukog rizika, mora se vrlo oprezno, uz konsultaciju sa ginekologom koji vodi trudnoću, citogenetičarom i bračnim parom, doneti odluka o metodi prenatalne dijagnostike, da bi se dobio što pouzdaniji rezultat, u što kraćem vremenskom roku i uz što manji rizik po trudnicu i fetus.

Kadgod je potrebno izvršiti i prenatalnu citogenetsku analizu, zbog godina starosti trudnice ili povećanog rizika za rođanje deteta sa hromozomskom

aberracijom, ili se trudnica javi ginekologu posle 12. nedelje trudnoće, vrši se amniocenteza. Šest trudnica obuhvaćenih našim istraživanjem je bilo starosne dobi preko 35 godina, a u jednom slučaju trudnica je bila nosilac balansirane translokacije. Ova trudnica se dva puta javljala na prenatalnu dijagnostiku.

Prvi put je radjena aspiracija horionskih resica i utvrđeno je da je fetus heterozigot za  $\Delta F508$  mutaciju, a u drugoj trudnoći je radjena amniocenteza i utvrđeno je da je fetus homozigotni nosilac normalnog alela. Tako su u ovoj rizičnoj porodici rodjena dva zdrava deteta.

Pored svih medicinskih razloga, vrlo je važna i psihološka strana prenatalne dijagnostike. Rizični parovi su uvek zainteresovani da što ranije dobiju informaciju o statusu fetusa i najčešće se opredeljuju za aspiraciju horionskih resica, koja i sa stanovišta molekularnogenetske dijagnostike predstavlja metod izbora.

S obzirom na eksplozivan razvoj metoda molekularne genetike i njene primene u dijagnostici naslednih bolesti, uloga genetičkog savetovanja rizičnih porodica će u budućnosti biti sve veća. Medjutim, uporedo sa ovim napretkom javljaju se i mnogobrojni psihološki, sociološki, etički i pravni problemi. Jedan od takvih problema je i taj što oba roditelja nisu uvek nosioci mutiranog gena, ili zbog neočinstva, ili zbog uniparetalne dizomije (Ledbetter DH. i Engel E., 1995). S druge strane, uočene su značajne varijacije u težini kliničke slike cistične fibroze, a korelacija genotip-fenotip, zasad može da se postavi samo za ograničeni broj mutacija u CFTR genu. Sve ove činjenice, kao i to da istraživanja na polju farmakološke (Boucher RC, 1996) i genske terapije (Featherstone C., 1996) ove

bolesti napreduju krupnim koracima, moraju se uzeti u obzir pri genetičkom savetovanju rizičnih porodica.

1) U populaciji porodica sa rizikom za rođanje deteta sa cističnom fibrozom sa barem jednim rođenim obolelim detetom, utvrđena je sledeća frekvencija analiziranih mutacija.

ΔF 508: 67.2%

G542X: 6.4%

G551D: 0.6%

R553X: 0.0%

2) U našoj populaciji se, za sada ne preporučuje populacioni skrining na nosioce mutiranog CFTR gena.

3) Utvrđeno je da je 49.5% porodica informativno, 32.4% semainformativno, a 18.1% neinformativno za direktnu mutacionu analizu na prisustvo ΔF 508 mutacije.

4) Utvrđeno je da je 60% porodica neinformativnih za direktnu mutacionu analizu, 32.8% bilo potpuno informativno za RFLP analizu.

4) Od analiziranih porodica, 1/3 se nije na preporučeno dijagnostičko u istraživačkim centrima.



## ZAKLJUČCI

1) U populaciji porodica sa rizikom za rođanje deteta sa cističnom fibrozom sa barem jednim rođenim obolelim detetom, utvrđena je sledeća frekvencija analiziranih mutacija:

$\Delta F 508$  : 67.2%

G542X: 6.4%

G551D: 0.6%

R553X: 0,0%

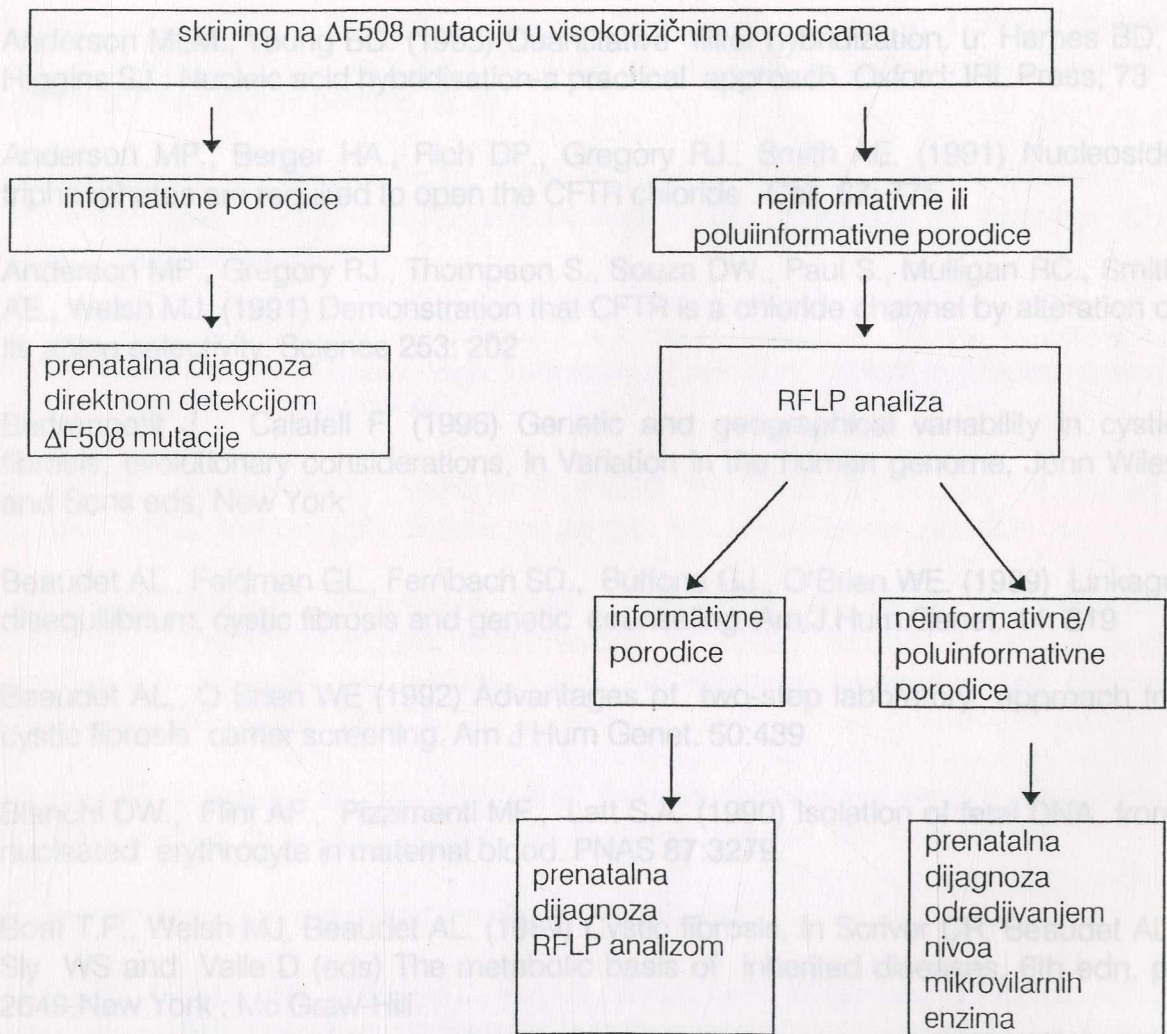
2) U našoj populaciji se, za sada ne preporučuje populacioni skrining na nosioce mutiranog CFTR gena

3) Utvrđeno je da je 49,5% porodica informativno, 32,4% semiinformativno, a 18,1% neinformativno za direktnu mutacionu analizu na prisustvo  $\Delta F 508$  mutacije

4) Utvrđeno je da je od porodica neinformativnih za direktnu mutacionu analizu, 82,9% bilo potpuno informativno za RFLP analizu

4) Od analiziranih porodica otprilike 1/3 se javila na prenatalnu dijagnozu u narednoj trudnoći

5) U testiranju rizičnih porodica predlaže se sledeći pristup u prenatalnoj dijagnozi cistične fibroze



## LITERATURA

Andersen DH. (1938) Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. A clinical and pathological study. *Am.J.Dis.Childhood* 56: 344

Anderson MLM., Young BD. (1985) Quantitative filter hybridization. u: Hames BD. i Higgins SJ.: *Nucleic acid hybridisation-a practical approach*. Oxford: IRL Press, 73

Anderson MP., Berger HA., Rich DP., Gregory RJ., Smith AE. (1991) Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride . *Cell* 67: 775

Anderson MP., Gregory RJ., Thompson S., Souza DW., Paul S., Mulligan RC., Smith AE., Welsh MJ. (1991) Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253: 202

Bertranpetit J., Calafell F. (1996) Genetic and geographical variability in cystic fibrosis: evolutionary considerations, in *Variation in the human genome*, John Wiley and Sons eds, New York

Beaudet AL., Feldman GL., Fernbach SD., Buffone GJ., O'Brien WE. (1989) Linkage disequilibrium, cystic fibrosis and genetic counseling. *Am.J.Hum.Genet.* 44: 319

Beaudet AL., O'Brien WE (1992) Advantages of two-step laboratory approach for cystic fibrosis carrier screening. *Am J Hum Genet.* 50:439

Bianchi DW., Flint AF., Pizzimenti MF., Latt S.A. (1990) Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocyte in maternal blood. *PNAS* 87:3279

Boat T.F., Welsh MJ, Beaudet AL, (1989) Cystic fibrosis, In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D (eds) *The metabolic basis of inherited diseases*, 6th edn, p. 2649, New York : Mc Graw-Hill

Bonizzato A., Bisceglia L., Nicolis MCE., Bombier C., Castellani GB., Zelate L., Mastella G., Cabrini G., Gasparini P., Pignatti PF. (1995) Analysis of the complete coding region of the CFTR gene in cohort of CF patients from North-Eastern Italy: identification of 90% of the mutations. *Hum Genet.* 95:397

Bostein D. , White RL, Skolnick M., Davis RW. (1980) Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am.J.Hum.Gen.* 32: 314

Boucher RC. (1996) Current status of CF gene therapy. *TIG* 12:81

Corey M., Dunn P., Moore D., Furgalska M., Levison H. (1989) Familial concordance of pancreatic function in cystic fibrosis. *J Pediatr* 116: 274

- Brock DJH (1985) A comparative study of microvillary enzyme activation in the prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Prenat Diagn.* 5:129
- Brock DJH (1996) Prenatal screening for cystic fibrosis: 5 years' experience reviewed. *Lancet* 347:148
- Brokner Dabović B., Radojković D., Savić J., Sretenović Z., Savić A. (1989) Primena metode analize DNK pomoću genskih proba u prenatalnoj i postnatalnoj dijagnozi cistične fibroze. *Jugosl.pediatr.* 32:16
- Brokner Dabović B., Radojković D., Minić P., Savić J., Savić A. (1992) Frequency of the  $\Delta F508$  deletion and G551D, R553X and G542X mutations in Yugoslav CF patients. *Hum Genet* 88: 699
- Casals T., Nunes V., Palacio A., Gimnez J., Gaona A., Ibanez N., Morral N., Estivill X. (1993) Cystic fibrosis in Spain: High frequency of mutation G542X in Mediterranean coastal areas. *Hum Genet* 91: 66
- Caskey CT., Kaback MD., Beaudet AL (1990) The American Society of Human Genetics statement on cystic fibrosis screening. *Am J Hum Genet.* 46:393
- Castaldo G., Rippa E., Sebastio G., Raia V., Ercolini P., de Ritis G., Salvatore D., Salvatore F. (1996) Molecular epidemiology of cystic fibrosis mutations and haplotypes in southern Italy evaluated with an improved semiautomated robotic procedure. *J Med Genet* 33: 475
- Cheung MC, Goldberg JD., Kan YW (1996) Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood, *Nat Gen* 14:264
- CF Genetic Analysis Consortium Newsletter (1996) #68
- Cheng SH., Gregory RJ., Marshall J., Paul S., Souza DW., White GA., O'Riordan CR., Smith AE. (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63: 8
- Chu CS., Trapnell BC., Curristin S., Cutting GR., Crystal RG. (1993) Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nature Genet* 3: 151
- Collins FS. (1992) Positional cloning: Let's not call it reverse genetics anymore. *Nature Genetics* 1: 3.
- Collins FS.(1992) Cystic Fibrosis: Molecular Biology and Therapeutic Implications, *Science*, 256: 774
- Corey M., Durie P., Moore D., Fortner GG., Levison H. (1989) Familial concordance of pancreatic function in cystic fibrosis. *J Pediatr* 115: 274

Corey M., Gaskin K., Durie P., Levison H., Forstner GG. (1984) Improved prognosis in CF patients with normal fat absorption pancreas, J Pediatr Gastroenterol Nutr 3 supl 1: S99

Crawford I., Maloney PC., Zeitlin PL., Guggino WB., Hyde SC., Turley H. Gatter KC., Harris A., Higgins CF. (1991) Immunocytochemical localization of cystic fibrosis gene product CFTR. Proc Natl Acad Sci USA 88: 9262

Cutting GR., Kasch LM., Rosenstein BJ., Yielenski J., Tsui L-C., Antonarakis SE., Kazazian HH Jr. (1991) A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide binding fold of cystic fibrosis conductance regulator protein. Nature 346: 366

Dagorn JC., Iovanna DJ., Sarles J., Ferec C., (1995) Neonatal Screening of CF with PAP test. ECCACF Newsletter 2: 2

Dörk T., Wulbrand U., Richter T., Neumann T., Wolfes H., Wulf B., Maab G., Tümmler B. (1991) Cystic fibrosis with three mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. Hum Genet 87: 441

Dean M., Whitw M., Amos J., Gerrard B., Steward C., Khaw K-T., Leppert M. (1990) Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. Cell 61: 863

Denning GM., Anderson MP., Amara J., Marshall J., Smith AE., Welsh MJ. (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. Nature 358: 761

Deretić V., Mohr CD., Martin DW. (1991) Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: signal transduction and histone-like elements in the regulation of bacterial virulence. Mol. Microbiol. 5: 1557-1583

Di Sant'Agnese PA., Darling GA, Shea E. (1953) Abnormal electrolyte composition of sweat in Cystic Fibrosis of the pancreas. Pediatrics 12: 549

Drumm ML., Pope HA., Cliff WH., Rommens JM., Marvin SA., Tsui L-C., Collins FS., Frizzell RA., Wilson JM. (1990) Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. Cell 62: 1227

Del Sal G., Manfioletti G., Schneider C. (1989) The CTAB-DNA precipitation method: Common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. BioTechniques 7: 514

Dodge JA. Implications of the new genetics for screening for cystic fibrosis. Lancet ii:672 (1988)

- Eiberg H., Mohr J., Schmiegelow K., Nielsen LS., Williamson R. (1985) Linkage relationships of paraoxonase (PON) with other markers: Indication of PON-cystic fibrosis syntenry. *Clin Genet* 28: 265
- Engelhardt JF., Yankaskas JR., Ernst SA., Yang Y., Marion CR., Boucher RC., Wilson JM. (1992) Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat Genet* 2: 240
- Estivill X., Williamson R. (1987) A rapid method to identify cosmids containing rare restriction sites. *Nucleic Acids Res.* 15: 1415
- Estivill X., Farral I M. Scambler PJ., Bell GM., Hawley KMF., Lench NJ., Bates GP., Kruyer HC., Frederick PA., Stanier P., Watson EK, Williamson R., Wainwright J. (1987) A candidate for the cystic fibrosis locus isolated by selection for metilatin free islands. *Nature* 326: 840
- Estivill X., McLean C., Nunes V., Casals T., Gallano P., Scambler P., Williamson R. (1989) Isolation of new DNA marker in linkage disequilibrium with cystic fibrosis, situated between J3.11 (D7S8) and IRP. *Am J Hum Genet* 44: 704
- Estivill X. (1993) Molecular genetic of cystic fibrosis in *The new genetics*, Baillieres Clinical Pediatrics. Young ID. ed., Bailliere Tindall, London, Sydney, Toronto, 1
- European Working Group on CF Genetics (EWGCFG) (1990) Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. *Hum Genet* 85: 436
- Ewens WJ., Spielman RS., Harris H., (1981) Estimation of genetic variations on the DNA level from restriction endonuclease data. *PNAS* 78:3742
- Fanconi G., Uehlinger E., Knauer C. (1936) Das coleiakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiectasien. *Wein.Med.Wochenschr.* 86:753
- Farber S. (1945) Some organic disturbances in early life. *J.Michigan Med.Soc.* 44: 587
- Farral M., Rodeck CH., Stanier P., Lissens W., Watson E., Law HY., Warren R., Super M., Scambler P., Wainwright B., Williamson R. (1986) First trimester prenatal diagnosis of cystic fibrosis with linked DNA probes. *Lancet* 1: 1402
- Featherstone C. (1996) Old hopes and new horizons for treating cystic fibrosis. *Lancet* 347:1544
- Feldman GL., Williamson R., Beaudet AL., O'Brien WE. (1988) Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by DNA amplification for detection of KM-19 polymorphism. *Lancet* i: 102

Gibson LE., iCooke RE. (1959) A test for concentration of electrolytes in Cystic Fibrosis of the pancreas utilising pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23: 545

Goodchild MC., Dodge JA .(1985) Cystic Fibrosis Manual of Diagnosis and Management. 2nd Ed. Balliere Tindall Press, Eastbourne

Gray MR. (1992) Detection of DNA sequence polymorphisms in human genomic DNA by using denaturing gradient gel blots. *Am J Hum Genet.* 50:331

Hamosh A., King TM., Rosenstein BJ., Corey M., Levison H., Durie P., Tsui LOC., McIntosh L., Keston M., Brock DJH., Macek M Jr., Zemikova D., Krasnicanova H., Vavrova V., Macek M Sr., Golder N., Schwarz MJ., Super M., Watson EK., Williams C., Bush A., O'Mahoney SM., Humphries P., DeArce MA., Reis A., Bürger J., Stuhmann M., Schmidtke J., Wulbrand U., Dörk T., Tümmler b., Cutting GR. (1992) Cystic fibrosis patents bearing both the common missence mutation Gly→Asp at codon 551 and delta F508 mutation are clinically indistinguishable from delta F508 homozygotes, except for disreased risk of meconium ileus. *Am J Hum Genet* 51: 245

Herrman B., Bućan M., Mains PE., Frischauf AM., Silver LM., Lehrach H (1986) Genetic analysis of the proximal portion of the mouse t complex: evidence for second inversion within t haplotypes. *Cell* 44:469

Highsmith WE., Lournareli H., Burch MS., Zhou Y., Olsen JC., Boat TE., Spock A., Gorvoy JD., Quittell L., Friedman KJ., Silverman LM., Boucher RC., Knowlws MR. (1994) A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal swsweat chloride concentrations . *N.Engl J Med* 331: 974

Hyide SC., Emsley P., Hartshorn MJ., Mimmack MM., Gileadi U., Pearce SR., Gallagher MP., Gill Dr., Hubbard RE., Higgins CF. (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346: 362

Jeffreys AJ.(1979) DNA sequence variants in  $G_{\gamma}$ ,  $A_{\gamma}\delta$  - and  $\beta$ - globin genes of man. *Cell* 18:1

Kerem B., Rommens JM., Buchanan JA., Markiewicz D., Cox TK., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L-C. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* 245: 1073

Kerem E., Corey M., Kerem B., Rommens JM., Markiewicz D., Levison H., Tsui L-C., Durie P. (1990) The relationship between genotype and phenotype in cystic fibrosis- Analysis of the most common mutation ( $\Delta F508$ ). *N Eng J Med* 323: 1517

Kerem B., Kerem E. (1996) The molecular basis for disease variability in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 4:65

- Knowels MR., Stutts MJ., Spock A., Fischer N., Gatzky JT, Boucher RC.(1983) Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* 221: 1067
- Kidd VJ., Wallace RB., Itakura K. (1983) 21 antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in gene. *Nature* 304:230
- Kingston HM.(1989) DNA analysis in genetic disorders *BMJ* 299:170
- Knowlton RG, Cohen -Haguenauer O., Cong NV., Frezal J., Brown VA, Barker D., Braman JC., Schumm JW. Tsui LC Buchwald M., Donis-Keller H. (1985) A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7, *Nature* 318: 380
- Koh J., Sferra TJ., Collins FS. (1993) Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: Chromatin context and tissue-specificity. *J Biol Chem* 268: 15912
- Kristidis P., Bozon D., Corey M., Markiewicz D., Rommens J. Tsui L-C., Durie P. (1992) Genetic determinants of exocrine pancreatic function. *Am J Hum Genet* 50: 1178
- Kušić -J., Radojković D., Savić A. (1996) PCR on nonviable cells in prenatal diagnosis of monogenic diseases, *BJCL* 3:115
- Ledbetter DH., Engel E. (1995) Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis (1995) *Hum Mol Genet* 4:1757
- Lemna WK., Felman GL., Kerem BS. (1990) Mutation analysis for heterozygote detection and the prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 322:291
- Leschot NJ., Verjaal M., Treffers PE. (1985) Risk of midtrimester amniocentesis: assesment in 3000 pregnancies . *Br J Obstet Gynaecol.* 92:804
- Levine SB, Stern RC. (1982) Sexual function in cystic fibrosis, *Chest* 81: 422
- Livingstone J., Axton RA., Gilfillan A., Mennie M., Compton M., Liston WA., Calder AA., Gordon AJ., Brock DJH. (1994) Antenatal screening for cystic fibrosis: a trial of the couple model. *BMJ* 308:1459
- Liu J., Lissens W., Devroey P., Van Steirteghem A., Liebaers I (1993) Polymerase chain reaction analysis of the cystic fibrosis delta F508 mutation in human blastomeres following oocyte injection of a single sperm from carrier. *Prenat Diagn* 13.: 873



- Maniatis T., Fritsch EF., Sambrook J. (1982) Molecular cloning ( A laboratory manual), Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Maxwell D., Lilford L., Czupkowsk B., Heaton D. (1986) Transabdominal chorionic villus sampling. *Lancet* i:123.
- McCray PBJ., Wohlford-Lenane CL., Snyder JM. (1992) Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in human fetal lung tissue by in situ hybridization *J Cil Invest* 90: 619
- Morral N., Nunes V., Casals T., Chillon M., Gimenez J., Bertranpetit J., Estivill X. (1993) Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Mol Gen* 2: 1015
- Morral N., Bertranpetit J., Estivill X., Nunes V., Casals T., Gimenez J., Ries A., Varon-Mateeva R., Macek M Jr., Kalaydjewa L., Angelicheva D., Dancheva R., Romeo G., Russu MP., Garnerone S., Restagno G., Ferrari M., Magnani C., Clausters M., Desgeorges M., Schwartz M., Dallapiccola B., Novelli G., Ferec C., de Arce M., Nemeti M., Kere J., Anvert M., Dahl N., Kadasi L. (1995) The origin of the major cystic fibrosis mutation ( $\Delta F508$ ) in European populations. *Nature Genet* 7: 169
- Motulsky AG. (1994) Predictive genetic diagnosis. *Am. J.Hum.Genet.* 55:603
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *PNAS* 86: 2766
- Orkin SH. (1987) Reverse genetics and human disease, *Cell* 47: 845
- Osborne L., Knight R., Santis G., Hodson M. (1991) A mutation in the second nucleotide binding fold of the cystic fibrosis gene. *Am J Hum Genet* 48:608
- Ott J. (1986) A short guide to linkage analysis. In Davies KE (ed) *Human Genetic Diseases. A practical approach*, 19-27, Oxford, Washinton DC: IRL Press
- Pier GB., Grout M., Zaidi TS., Olsen JC., Johnson LG., Yankaskas JR., Goldberg JB. (1996) Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections, *Science* 271: 64
- Quintone PM. (1983) Chloride impermeability in Cystic Fibrosis. *Nature* 301:421
- Radojković D., Čvorkov-Dražić M., Savić A.(1994) Uzorci za skrining na fenilketonuriju kao izvor DNK u dijagnostici monogeniskih oboljenja. *Jugoslav.Med.Biochem* 13: 258

Radojković D., Sretenović Z., Dabović B., Savić J., Minić P., Savić A. (1996) Prenatal diagnosis of cystic fibrosis in Yugoslavia. *ECCACF Newsletter* 3:5

Ramsey M., Wainwright B.J., Farrall M., Estivill X., Sutherland H., Ho M-F., Davies R., Halford S., Tata F., Wicking C., Lench N., Bauer I., Ferec C., Farndon P., Kruyer H., Stainer P., Williamson R., Scambler P.J. (1990) A new polymorphic locus, D7S411, isolated by cloning from preparative pulsed-field gel is close to the mutation causing cystic fibrosis. *Genomics* 6: 39

Ranieri E., Lewis B.D., Gerace R.L., Ryall R.G., Morris C.P., Nelson P.V., Carey W.F., Robertson E.F. (1994) Neonatal screening strategy for cystic fibrosis using immunoreactive trypsinogen and direct gene analysis: four years' experience *BMJ* 308: 1469

Rich D.P., Anderson M.P., Gregory R.J., Cheng S.H., Paul S., Jefferson D.M., McCann J.D., Klinger K.W., Smith A.E., Welsh M.J. (1990) Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 347: 358

Riordan Jr., Rommens J.M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Y., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J-L., Drumm M.L., Iannuzzi M.C., Collins F.S., Tsui L-C. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066

Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan J.R., Tsui L.C., Collins F.S. (1989) Identification of cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping, *Science* 245: 1059

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science* 239: 487

Saleeba J.A., Cotton R.G. (1993) Chemical cleavage of mismatch to detect mutations. *Methods in Enzymology* 217:286

Santis G., Osborne L., Knight R.A., Hodson M.E., (1990) Independent genetic determinants of pancreatic and pulmonary status in cystic fibrosis. *Lancet* 336:1081

Scambler P.J., Wainwright B.J., Watson E., Bates G., Bell G., Williamson R., Farrall M. (1986) Isolation of further anonymous informative DNA sequence from chromosome seven closely linked to cystic fibrosis. *Nucleic Acids Res* 14: 1951

Simova L., Williams C., Efremov GD., Gordova-Muratovska A., Sušić S., Watson EK., Williamson R. (1990)  $\Delta F508$  frequency and associated haplotypes near cystic fibrosis locus in the Yugoslav population. *Hum.Genet.* 85:432

Southern EM. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98:503

Strong TV., Smith LS., Turpin SV., Cole JL., Hon CT., Markiewicz D., Petty TL., Craig MW., Rosenow EC., Tsui L-C., Iannuzzi MC., Knowles MR., Collins FS. (1991) Cystic fibrosis gene mutation in two sisters with mild disease and normal sweat electrolyte levels. *N Engl J Med* 325: 1630

Super M., Ivanson A., Schwarcz M., Giles L., Elles R., Read AP. (1987) Clinic experience of prenatal diagnosis of cystic fibrosis by use linked DNA probes. *Lancet* ii:782

Super M., Schwarz MJ., Malone G., Roberts T., Haworth A., Dermody G. (1994) Active cascade testing for carriers of cystic fibrosis gene. *BMJ* 308: 1462

The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (1994): Population variation of common cystic fibrosis mutation. *Hum Mutat* 4: 167

The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium (1993) Correlation between Genotype and Phenotype in Patients with Cystic Fibrosis. *N.Engl.J.Med.* 329:1308

The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (1990) Worldwide survey of the delta F508 mutation- Report from the Cystic Fibrosis Genetics Analysis Consortium. *Am J Hum Genet* 47: 354

Trezise AE., Buchwald M. (1991) In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 353: 434

Tsui LC., Buchwald M., Barker D., Braman JC., Knowlton R., Schrumm JW., Eiberg H., Mohr J., Kennedy D., Plavic N.(1985) Cystic fibrosis locus defined by genetically linked polymorphic DNA marker, *Science* 230: 1054

Tsui LC. (1992) Mutations and sequence variations detected in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene: a report from the cystic fibrosis genetic analysis consortium, *Human Mutation* 1: 197

Wainwright BJ. Scambler PJ., Schmidtke J., Watson EA, Law HY, Farrell M., Cooke HJ, Eiberg H., Williamson R. (1985) Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7 cen-q22, *Nature* 318: 384

Welsh MJ., Smith AE. (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73: 1251

Ward CL., Omura S., Kopito RR. (1995) Degradation of CFTR by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. Cell 83:121

White R., Woodward S., Leppert M., O'Connell P.O, Hoff M., Herbst F., Lalouel FM., Dean M., Vande Woude G. (1985) A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. Nature 318: 382

Williams C., Williamson R., Coutelle C., Loeffler F., Smith J., Iverson A. (1988) Same-day first-trimester antenatal diagnosis for cystic fibrosis by gene amplification Lancet i:103

Workshop on Population Screening for the Cystic Fibrosis Gene: Statement from the NIH Workshop on population screening for the cystic fibrosis gene (1990) N Engl J Med 323:70

Yates JRW, (1996) Medical genetics, BMJ 312:1021

Yochimura K., Nakamura H., Trapnell BC., Chu CS., Dalemans W., Pavirani A., Lecocq JP., Crystal RG. (1991) Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. Nucleic Acids Res 19: 5417

Zielenski J., Bozon D., Kerem B., Markiewicz D., Rommens SM., Tsui LC., (1991) Identification of mutations in exons 1 through 8 of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. Genomics 10:229



