

A CISZTIKUS FIBRÓZIS LEGGYAKORIBB MUTÁCIÓINAK VIZSGÁLATA ÉS
ENNEK DIAGNOSZTIKAI FELHASZNÁLÁSA

Doktori disszertáció

Készítette: Németh Krisztina biológus

Témavezető: Dr. Fekete György egyetemi tanár

Készült: A Semmelweis Orvostudományi Egyetem

II.sz. Gyermekklinika

Molekuláris Genetikai Laboratóriumában

Budapest, 1993.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom Dr. Schuler Dezső professzor úrnak, a SOTE II. számú Gyermekklinika igazgatójának, hogy lehetőséget biztosított doktori dolgozatom elkészítésére;

Dr. fekete György professzor úrnak, hogy az irányításával létrehozott molekuláris genetikai laboratóriumban végig figyelemmel kísérte munkámat, eredményeimet.

Köszönöm Dr. Váradi Andrásnak a sok türelmet, jóindulatot, az elméleti és gyakorlati munkában nyújtott önzetlen segítséget és iránymutatást.

Ezúton fejezem ki köszönetemet Jankóné Kiss Eszternek áldozatkész segítőkészségéért, amit a laboratóriumi munkák elvégzésekor tanúsított;

Holics Klára és Ujhelyi Rita doktornőknak, akik a betegek gondozását végzik, a betegek körében kifejtett tájékoztató munkájukért, amelynek eredményeképpen el tudtam kezdeni vizsgálataimat.

TARTALOMJEGYZÉK

A dolgozatban használt rövidítések	3. oldal
1. Bevezetés	5. oldal
2. A cisztikus fibrózis – irodalmi áttekintés	8. oldal
2.1. A betegségről általában	8. oldal
2.2. A CFTR gén	10. oldal
2.3. A mutációk	14. oldal
3. Célkitűzés	22. oldal
4. Anyagok és módszerek	24. oldal
4.1. Anyagok	24. oldal
4.1.1. A DNS izolálás reagensei	24. oldal
4.1.2. A polimeráz láncreakcióhoz használt anyagok	26. oldal
4.1.3. Az oligonukleotid primerek jelöléséhez használt anyagok	27. oldal
4.1.4. Az elektroforézis oldatai	28. oldal
4.1.5. Restrikciós enzimek	29. oldal
4.2. Módszerek	31. oldal
4.2.1. DNS izolálás teljes vérből	31. oldal
4.2.2. DNS izolálás chorionboholyból	32. oldal
4.2.3. Az oligonukleotid primerek radioaktív végjelölése	32. oldal
4.2.4. PCR DNS-ből	33. oldal
4.2.5. PCR vércseppből / Guthrie szűrőpapírra beszárított vérből	33. oldal
4.2.6. Direkt PCR chorionboholyból	34. oldal
4.2.7. Restrikciós emésztés	34. oldal
4.2.8. Agaróz gél elektroforézis	34. oldal
4.2.9. Poliakrilamid gél elektroforézis	35. oldal
4.2.10. Autoradiográfia	35. oldal

4.3. A vizsgált családok	37. oldal
5. Az elvégzett vizsgálatok	39. oldal
5.1. $\Delta F508$ mutáció vizsgálata	39. oldal
5.2. Praenatalis diagnosztikai vizsgálatok	45. oldal
5.3. G542X, G551D, R553X és N1303K mutációk vizsgálata	47. oldal
6. Vizsgálati eredmények	55. oldal
6.1. $\Delta F508$ mutáció	55. oldal
6.2. Praenatalis diagnosztika	64. oldal
6.3. G542X, G551D, R553X és N1303K mutációk	70. oldal
7. Megbeszélés	72. oldal
Irodalom	77. oldal

A DOLGOZATBAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK

ADP	: adenzin–difoszfát
AMP	: adenzin–monofoszfát
APS	: ammónium–peroxi–szulfát
AR	: autoszomális recesszív
Asn	: aszparagin
ATP	: adenzin–trifoszfát
bp	: bázispár
cAMP	: ciklikus AMP
CF	: cisztikus fibrózis
CFTR	: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CVS	: chorionboholy minta
dATP	: dezoxirboadenozin–trifoszfát
dNTP	: dezoxiribonukleotid–trifoszfát
DNS	: dezoxiribonukleinsav
DTT	: dithiothreitol
F	: forward
Glu	: glutaminsav
Gly	: glicin
Ile	: izoleucin
kb	: kilobázis
Lys	: lizin
mRNS, mRNA	: messenger RNS
NBF	: Nucleotid Binding Fold
nd	: nem azonosított mutáció
PCR	: polimeráz láncreakció

PKA	: proteín kináz
PNK	: polinukleotid kináz
R	: reverse
TM	: transzmembrán domén
Phe	: fenilalanin
RFLP	: restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
RNS	: ribonukleinsav
Val	: valin
UV	: ultraibolya fény

1. BEVEZETÉS

A molekuláris genetika napjaink egyik legdinamikusabban fejlődő tudományága. Egyre tökéletesebb módszerei mind több lehetőséget adnak arra, hogy az eleinte még csak tapasztalati úton megismert öröklődési szabályok anyagi alapját, a DNS-t megismerjük. A növényi- és az állatgenetikában a fejlődés üteme gyorsabb, a tudomány már túllépett a pusztá megismerésen, és belépett a beavatkozás korszakába. Ennek célja kettős. Részben az ismeretek bővítése az öröklődésről és annak anyagi megvalósítójáról, részben pedig az ismereteknek a gyakorlatban való hasznosítása: a kutatás előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező háziállatok és haszonnövények előállítására felé irányul.

Az ember esetében azonban sokkal bonyolultabb a helyzet. A humán DNS állomány rendkívüli mérete, összetettsége teszi nehezebbé annak részletes megismerését. A teljes humán genom felépítésében mintegy három milliárd bázispár vesz részt, amelyek 100 000 gént alkotnak. Már az egyes gének kromoszomális lokalizációjának meghatározása is nehéz feladat, de azok azonosítása, bázissorrendjük meghatározása, az esetleges mutációk felfedezése csak a legmodernebb molekuláris genetikai módszerek használatával lehetséges. Már évekkel ezelőtt elindult egy világméretű kutatási program, amely a "Human Genom Project" nevet viseli. Ennek, a világ legjobb kutatóit tömörítő együttműködésnek a célja éppen az emberi DNS állomány megismerése, a teljes humán genom bázisszekvenciájának meghatározása.

Korunkban egyre több betegség okaként vagy legalábbis a betegségre hajlamosító tényezőként ismernek fel az örökítőanyagban, a DNS-ben lévő eltéréseket, mutációkat. Becslések alapján minden 100 újszülöttből 3 valamilyen

örökletes rendellenességgel jön a világra (Papp,1986). A monogénis öröklődésű veleszületett betegségeket összesíti egy kétévenként megjelenő kiadvány, McKusick katalógusa, amelynek legutóbbi kiadása már körülbelül 5000 különböző genetikai ártalmat sorol fel, és ad tájékoztatást az egyes betegségekért felelős DNS szakaszok kromoszomális lokalizációjáról, az adott betegség klinikai tüneteiről, öröklésmenetének módjáról, valamint, ha már létezik, a mutáns gén DNS szintű kimutatásának módjáról (McKusick,1991).

A genetikai betegségek többsége ma még nem gyógyítható. Ugyan egyre nagyobb erővel folynak a különböző in vitro kísérletek a mutáns génszakaszok DNS szintű korrekciójára, de ez a módszer még inkább a jövőé. Reménykedhetünk abban, hogy minél hamarabb véglegesen megoldódik a genetikai betegséggel születettek gyógyításának, tehát a DNS szintű gyógy módnak a problémája, de ma még a cél elsősorban a súlyos betegek megszületésének megelőzése. Bizonyos betegségek esetén ugyan tüneti kezeléssel csökkenthető a betegség súlyossága, más esetekben viszont még erre sincs mód, vagy legfeljebb csak átmeneti javulás érhető el a beteg állapotában. Ezek a betegek súlyos fizikai, lelki és anyagi terheket rónak mind a családra, mind a társadalomra. A molekuláris genetika módszereit felhasználó klinikai genetika célja az öröklődő betegségek felismerése már a magzati élet első heteiben, ezáltal lehetővé téve, hogy csökkenjen a megszülető betegek száma. Ha egy öröklődő betegség kialakulásáért felelős gén kromoszomális lokalizációja még nem ismert, illetve nincs beállított módszer a mutáns gén valamilyen direkt vagy indirekt vizsgálatára, csak a klasszikus mendeli öröklődésment alapján lehet következtetni a családon belüli ismétlődés kockázatára. A modern molekuláris genetikai vizsgálómódszerek, amelyek magában a DNS-ben keresik a diagnosztika lehetőségét, lehetővé teszik, hogy

ennél sokkal pontosabb, az egyes esetekben informatívabb tájékoztatást kapjon a család a további gyermekvállalás lehetőségeiről. A betegségek döntő többségében a népességi szintű szűrés anyagi és elvi okokból nem oldható meg, ezért csak azoknak a családoknak a vizsgálatára kerülhet sor, amelyekben már született beteg gyermek. Természetesen a betegség örökletes volta miatt éppen ezek a családok a legveszélyeztetettebbek, így az ő esetükben van leginkább szükség az újabb gyermek vállalása esetén a praenatalis diagnosztikai vizsgálat elvégzésére, illetve arra, hogy megállapítsuk, hogy a családtagok közül ki hordozza a mutációt.

Laboratóriumunk 1989-ben kezdte meg a cisztikus fibrózisban szenvedő betegek és családtagjaik DNS mintájából a $\Delta F508$ mutáció kimutatását. 1992 óta újabb négy mutáció, a G542X, a G551D, az R553X és az N1303K mutációk vizsgálatával bővültek lehetőségeink a cisztikus fibrózis minél tökéletesebb DNS szintű diagnosztikájának megvalósítására.

2. A CISZTIKUS FIBRÓZIS–IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A BETEGSÉGRŐL ÁLTALÁBAN

A cisztikus fibrózis (CF) vagy mucoviscidosis az egyik leggyakoribb öröklődő betegség. Ma még csak tünetileg kezelhető. A DNS szintű gyógymódok, az úgynevezett génszűrés eljárással járnak, bár nagy erővel folynak a kísérletek a betegség teljes gyógyítására. In vitro kísérletek már biztató eredményeket mutatnak ebben az irányban. Tökéletes gyógyulást csak a génterápia segítségével remélhetünk. Ennek hiányában csak a klinikai tünetek enyhítése valósítható meg. A klinikai ellátás színvonala az utóbbi években rohamosan emelkedik hazánkban is, de sajnos a leggondosabb kezelés ellenére sem túl biztatóak a betegek életkilátásai. A betegeknek csak viszonylag kis része éli meg a fiatal felnőttkort, többségüket már gyermekkorban elveszítjük. Életük folyamán állandó orvosi felügyeletet, folyamatos gyógyszeres kezelést, fizioterápiás foglalkozásokat igényelnek.

A betegség oka a külső elválasztású mirigyek működésének zavara. Az általuk termelt váladék viszkozitása ugyanis nem a normálisnak megfelelő, hanem annál jelentősen nagyobb. Ezért a mirigyek kivezető csöveiben nyákdugaszok keletkeznek, a váladék kiürülése nem tökéletes, pangás alakul ki. Ez pedig a mirigyekben szöveti károsodást idéz elő, cisztaképződést, majd kötőszövetfeszaporodást, fibrózist okoz. Ezek az elváltozások legsúlyosabb formában a hasnyálmirigyben és a tüdőben jelentkeznek és alkotják a klasszikus tünetegyüttest. Gyakori tünet ezenkívül az újszülöttkori meconium ileus is. A tüdőben kialakuló pangó váladék bakteriális fertőzések, elsősorban

Pseudomonas fajokkal való fertőzések melegegága. Az emésztőrendszer érintettsége is igen gyakori. A betegek 85%-ában jelentkeznek a tünetek, amelyek elsődleges oka a hasnyálmirigy csökkent működése, de a máj kóros elváltozása sem ritka. A felnőttkort megélő férfiak a vas deferens elzáródása miatt szinte mind sterilek (Kaplan és mtsai.,1968). A nők esetében is előfordul meddőség, de sokkal ritkábban, sőt a javuló kezelés hatására egyre több beteg éri meg a felnőttkort, megházasodik és gyermeket szül (Cohen és mtsai.,1980). A beteg anyák gyermekei 1–2%-os gyakorisággal lesznek szintén betegek (Cohen és mtsai.,1980).

A cisztikus fibrózt elsőként Fanconi különítette el a coeliakiától 1936-ban (Fanconi és mtsai.,1936), majd 1938-ban Andersen részletes kórbonctani és kórszövetteni leírást is adott a betegségről (Andersen,1938). Ő vezette be a "hasnyálmirigy cisztás fibrózisa" elnevezést és kimutatta a betegség alapjául szolgáló okként a betegekben a hasnyálmirigy exokrin funkciójának nagymértékű csökkenését. A klinikai diagnosztika irányát DiSant'Agnese adta meg 1953-ban, amikor felfedezte, hogy a mucoviscidosisos betegek verejtéke kóros összetételű, klorid ion tartalma jelentősen magasabb a normálnál (DiSant'Agnese és mtsai.,1953). Ez a sejtek iontranszportjának hibás voltára utal, amelyet a későbbi vizsgálatok is igazoltak. Ez a megfigyelés lett a későbbi standard diagnosztika, a "verejtékteszt" alapja.

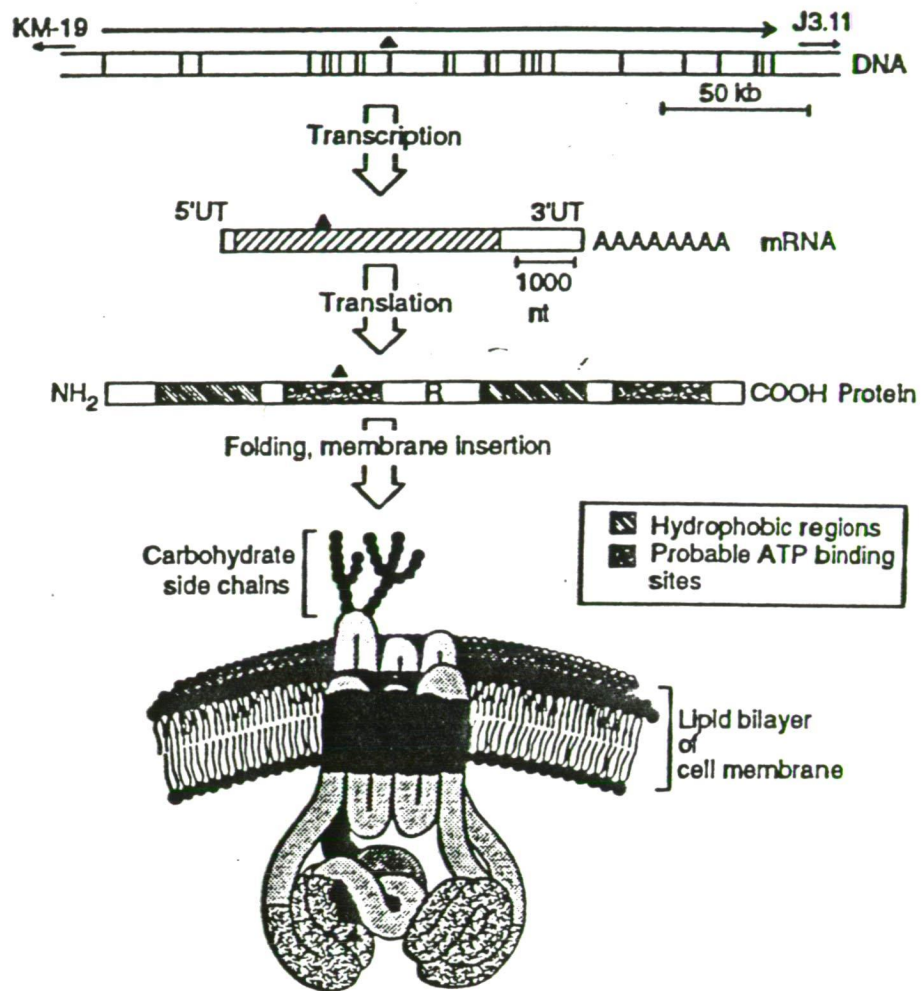
1940 óta ismert, hogy a cisztikus fibrózis autoszomális recesszív módon (AR) öröklődő betegség. Öröklésmenetéből következően mindkét nemből azonos gyakorisággal fordul elő. A betegség klinikai tüneteinek megjelenéséhez a homozigóta állapot szükséges. A heterozigóták nem betegek, de hordozzák a hibás gént, és utódaiknak 50%-os eséllyel adják azt tovább. Az ázsiai és afrikai

populációkban nagyon ritka (Kulczycki és mtsai.,1974), de a kaukázusi népcsoportban az egyik leggyakoribb öröklődő betegség (Lemna és mtsai.,1990). Európában a génhordozók gyakorisága átlagosan 1/25, vagyis minden 625. házasságból születhet 25%-os valószínűséggel beteg gyermek. Így az átlagos újszülöttkori prevalancia 1/2500 (Heely,1983). Ettől az értéktől természetesen vannak eltérések a különböző népcsoportokban, így például Észak-Írországból 1/1700, míg Svédországból 1/7700 (Boat és mtsai.,1989), Finnországból pedig mindössze 1/26500 (Kere és mtsai.,1989).

2.2. A CFTR GÉN

1985 fordulópont volt a cisztikus fibrózis genetikai vizsgálatában. Génjét ekkor sikerült a hetes kromoszóma hosszú karjának 31-es régiójában (7q31) lokalizálni (Wainwright és mtsai.,1985). Ez azonban csak az első lépés volt a betegség létrejöttének megértésében. Négy évvel később, 1989-ben egy talán még nagyobb jelentőségű felfedezés-sorozat adta meg az alapot a CF gén-szintű diagnosztikájához: a gén azonosítása (Riordan és mtsai.,1989), megszekvenálása (Rommens és mtsai.,1989), valamint a leggyakoribb mutáció, a $\Delta F508$ mutáció felismerése (Kerem és mtsai.,1989). A CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gén több mint 250 kb nagyságú, a róla szintetizálódó messenger RNS azonban csak 6,5 kb. A gén 27 exont tartalmaz. Az átíródó fehérjetermék a CFTR fehérje, amelyet 1480 aminosav épít fel (1. ábra). A sejtmembránon keresztül zajló aktív transzportban résztvevő fehérjék közé tartozik. Ezek a fehérjék összetételüket tekintve meglehetősen konzervatívak, megtalálhatók a baktériumokban ugyanúgy, mint a Drosophila vagy az emlősök sejtjeiben. ATP-áz hatásúak, az aktív transzport energiaszükségletét az ATP

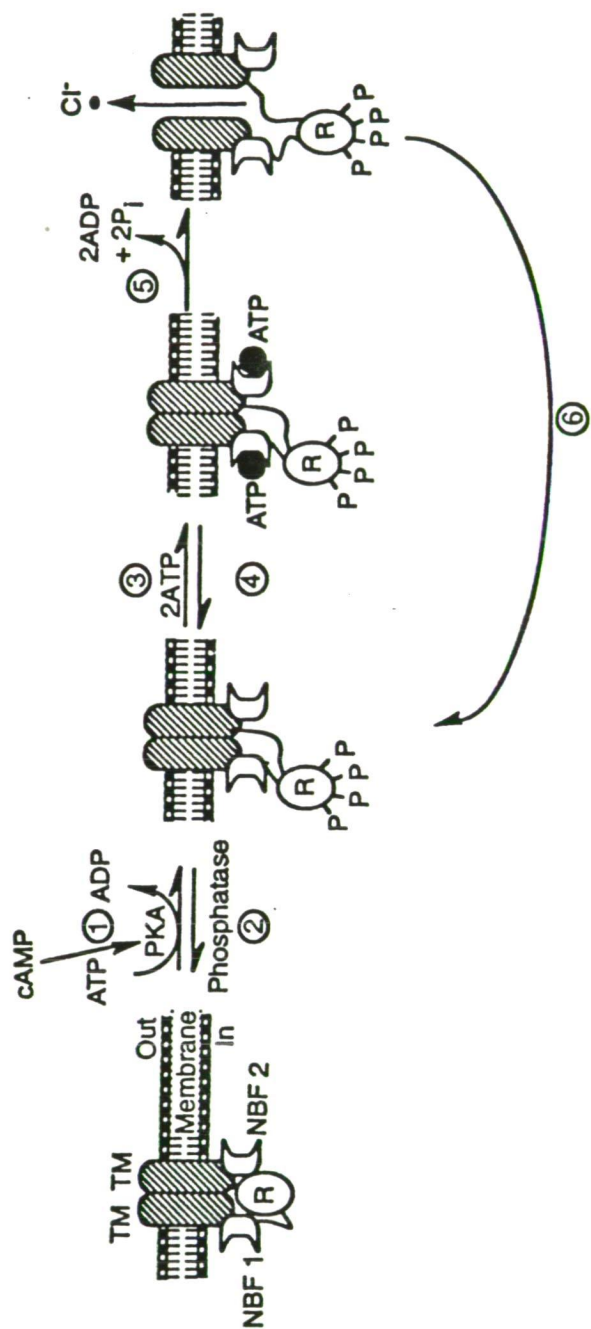
makroerg kötéseinek bontásával fedezik. A gén klónozása óta eltelt időszakban működésére és szerkezetére vonatkozóan számos új információ került birtokunkba. Szerkezete alapján a sejtmembránban lévő integráns fehérje. Az epitelialis sejtek apikális membránjában helyezkedik el. Két hidrofób transzmembrán doménnel rendelkezik. Ezek között foglal helyet egy központi, szabályozó szerepet betöltő domén (R domén). A fehérjemolekula két ATP kötőhelyet tartalmaz. A CFTR gén és fehérje szerkezetét a 3. ábra mutatja. Funkciója szerint a fehérje maga a klorid ion csatorna. A kísérletek azt bizonyítják, hogy a csatorna működése összefügg az R domén négy, szerinben gazdag régiója foszforilációjának fokával. A foszforilációt egy cAMP dependens protein kináz enzim végzi. Ha ez a folyamat megfelelően végbement, bekövetkezik a két molekula ATP kapcsolódása a két nukleotid kötőhelyhez. Ez olyan konformációváltozást idéz elő a fehérje szerkezetében, amelynek hatására az ion csatorna megnyílik és ez a klorid ionok szabad áramlását teszi lehetővé az elektrokémiai gradiensnek megfelelően (Collins, 1992). A CFTR fehérje működésének feltételezett mechanizmusa a 2. ábrán látható. A négy, szerinben gazdag régió közül egy működése még elegendő a funkció fenntartásához, de mind a négy működésképtelensége esetén az ion csatorna elveszti funkcionáló képességét. Hasonlóan, az R doménban bekövetkezett parciális deléció olyan konformációváltozást idéz elő a fehérjemolekulában, amelynek hatására a csatorna nem tud záródni, így a klorid ionok áramlása szabályozatlanná válik. Ez vezet a verejték magas klorid ion koncentrációjához, amely mérhető és diagnosztikus értékű. Amennyiben mindkét hetes kromoszómán bekövetkezik a gén mutációja, a betegség manifesztálódik, a klinikai tünetek megjelennek. Az eddig felismert mutációk száma már 300 fölött van (CF Genetic Analysis Consortium, 1993). Az egyes mutációk nem egyenlő arányban fordulnak elő a betegekben. Előfordulási arányuk népcsoportonként is változik.



1. ábra

A CFTR fehérje térbeli szerkezete, és elhelyezkedése a membránban

(Collins, 1992)



2. ábra

A CFTR fehérje működése (Collins, 1992)

2.3. A MUTÁCIÓK

A CFTR génben a legutóbbi adatok szerint már 300 fölött van az azonosított mutációk száma (CF Genetic Analysis Consortium, 1993)). Ezek megoszlását az egyes exonokon, intronokon, illetve a CFTR fehérjén az 1. táblázat és a 3. ábra mutatja. Közülük a leggyakoribb a $\Delta F508$ mutáció, amely a gén 10-es exonjában helyezkedik el. Típusát tekintve három bázispárra kiterjedő deléció, amely a CFTR fehérje 508. aminosavhelyén egy fenilalanin aminosav kiesését okozza. A normál és a hibás DNS szekvenciát, valamint az általuk kódolt aminosavakat a 4. ábra mutatja. A korábbi vizsgálatok eredményei arra utaltak, hogy a deléció éppen a CFTR fehérje első ATP kötőhelyét érintve az ATP kapcsolódásának meggátlásával okozza a klorid ioncsatorna működésképtelenségét. Collins vizsgálatai szerint viszont a működés hiányát a fehérjének a deléció következtében kialakuló konformációváltozása okozza (Collins, 1992). Ennek következtében az ioncsatorna elveszti nyitó-záró funkcióját, és a klorid ion transzportja emiatt válik szabályozatlanná. Más vizsgálatok azonban arra engednek következtetni, hogy a betegség kialakulásának elsődleges oka nem ez, hiszen kimutatták, hogy a CFTR fehérje normál működésének 30%-a elegendő az egészséges fenotípus kialakulásához (Dalemans és mtsai., 1991). A $\Delta F508$ mutációt hordozó CFTR génről átíródó fehérje erre képes. A betegség kialakulásának valódi oka az, hogy ezek a mutáns fehérjemolekulák nem képesek leválni az endoplazmatikus retikulumról és bejutni a Golgi komplexbe, amelynek segítségével eljuthatnának a sejtmembránhoz. Vagyis a működésképtelenség nem elsősorban a $\Delta F508$ mutáció okozta konformációváltozás, hanem az, hogy ezek a fehérjemolekulák hiányoznak a sejtmembránból (Denning és mtsai., 1992; Kartner és mtsai., 1992; Teem és mtsai., 1993).

A $\Delta F508$ mutáció a CF kromoszómák mintegy 70%-ában van jelen. Ettől az átlagtól azonban vannak eltérések (European Working Group on Cystic Fibrosis Genetics, 1990; CF Genetic Analysis Consortium, 1990). Európában észak–déli irányban csökken az előfordulási gyakorisága a CF betegek között. Így a legnagyobb gyakorisági adatot Dániából (88%) (Schwartz M. és mtsai., 1990), legkisebbet Törökországból (30%) (Hundrieser és mtsai., 1990) közölték. Jelen dolgozatban összefoglalt adatok azt a célt szolgálják, hogy népességi szintű következtetést vonhassunk le a $\Delta F508$ mutáció előfordulási gyakoriságáról a magyar populációban, mivel eddig megfelelően nagy számú vizsgálat a magyar CF betegek között nem történt (Németi és mtsai., 1991; Fekete és mtsai., 1992).

A fennmaradó mintegy 30%-on osztozik a maradék rendkívül nagy számú mutáció, amelyek a CF gén legkülönbözőbb helyein találhatók. Közöttük a mutációk változatos típusai ismerhetők fel (3. ábra): deléciók, inszerciók, nonsense mutációk, missense mutációk, frame-shift mutációk, splice mutációk. Az 1. táblázat adataiból látható, hogy a 3. 4. 7. 10. 11. 13. 15. 17b. 19. és a 20. exonban tíznél több mutáció található, a többiekben ennél kevesebb. A legtöbb mutációt eddig a 13. exonban azonosították.

A $\Delta F508$ mutáción kívül két olyan mutációt azonosítottak eddig, amelyek zárt közösségekben viszonylag nagyobb gyakoriságúak:

A W1282X mutáció a 20. exonban helyezkedik el. A CF gén 3978. nukleotidjánál bekövetkezett G→A csere következtében stop kód alakul ki. A CFTR fehérje 1282. aminosavhelyén ezért egy triptofán beépülése helyett befejeződik a transzláció. Így a létrejött fehérje mérete a normálisnál jóval kisebb, ennek következtében működésképtelen. Ez a mutáció az Ashkenazi zsidók $\Delta F508$

mutációt nem hordozó CF kromoszómái között 77%-os gyakorisággal fordul elő (Shoshani és mtsai.,1991).

Az R1162X mutáció a 19. exonban található. A W1282X mutációhoz hasonlóan nonsense mutáció, amely a CF gén 3616. nukleotidjánál egy C→T csere következménye. Emiatt a CFTR fehérje 1162. aminosavhelyén befejeződik a fehérjelánc építése. Ennek a mutációnak a gyakorisága az olasz CF betegek $\Delta F508$ mutációt nem hordozó kromoszómái között 12% (Gasparini és mtsai.,1991).

A nagyszámú többi mutáció gyakorisága ettől messze elmarad. Jó részüket eddig még csak egyetlen esetben azonosították, de vannak olyanok, amelyek 1–5%-os gyakoriságúak.

Ez utóbbiak közé tartozik három, 11-es exonbeli mutáció is, a G542X, a G551D, az R553X mutáció, valamint a 21-es exon N1303K mutációja.

A G542X mutáció stopmutáció a kódolt fehérje 542. aminosav pozíciójában. Oka a CFTR gén 1756. nukleotidjában történt G→T csere (10/a.ábra). Gyakorisága a $\Delta F508$ mutációt nem hordozó CF kromoszómák között 3,4% (Kerem és mtsai.,1990).

A G551D mutáció esetében a CFTR gén 1784. nukleotidjában G→A csere történt (10/a.ábra). Ez a fehérjetermékben az 551. aminosavhelyén egy glicin→aszparaginsav kicserélődést idéz elő. Gyakorisága a $\Delta F508$ mutációt nem hordozó CF kromoszómák között 2,4% (Cutting és mtsai.,1990/1).

Az R553X mutáció szintén stopmutáció a CFTR fehérje 553. aminosav pozíciójában, amely a CFTR gén 1789. nukleotidjában egy C→T csere következménye (10/a.ábra). Gyakorisága a $\Delta F508$ mutációt nem hordozó CF kromoszómák között 1,3% (Cutting és mtsai.,1990/1; Cutting és mtsai.,1990/2).

Az N1303K mutáció C→G szubsztitúció a CFTR gén 4041. nukleotidjában (10/b.ábra), amely a fehérjetermékben a 1303. aminosavhelyen egy aszparagin→lizin cserét okoz. Gyakorisága a $\Delta F508$ mutációt nem hordozó CF kromoszómák között 1,8% (Osborne és mtsai., 1991).

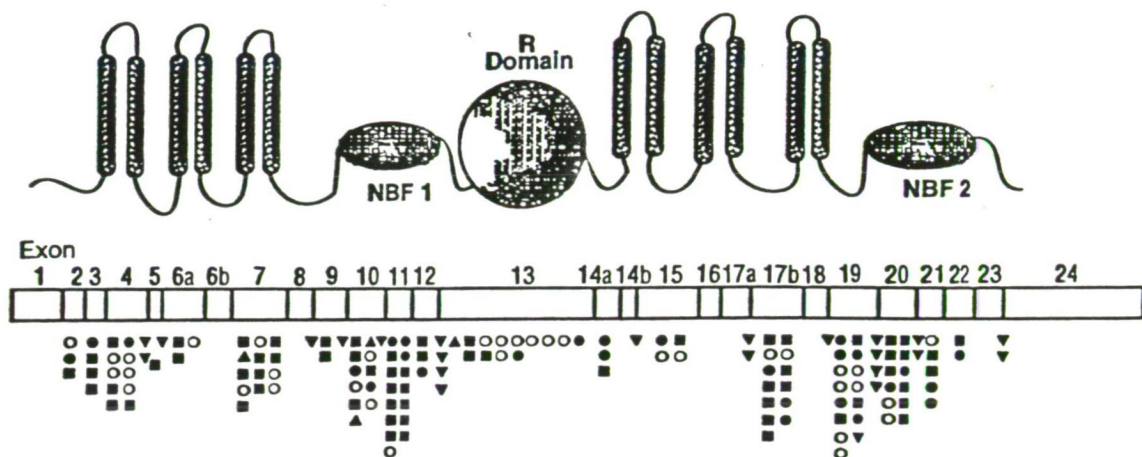


Fig. 2. Spectrum of mutations responsible for CF. The location and nature of CF mutations identified by the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium are indicated below a schematic of the CFTR protein. (▲) In-frame deletion; (■) missense mutation; (●) nonsense mutation; (○) frame-shift mutation; and (▼) splicing mutation.

3. ábra

A CFTR gén és fehérje szerkezete

A gyakoribb CF mutációk elhelyezkedése és típusa a CF génben és a CFTR
fehérjén (Collins, 1992)

exon	intron	azonosított mutációk száma
1		3
	1	1
2		6
	2	1
3		14
	3	5
4		22
	4	3
5		6
	5	1
6a		7
	6a	2
6b		2
7		23
8		1
	8	2
9		4
	9	1
10		15
	10	2
11		18
	11	2
12		10
	12	6

13		30
	13	1
14a		7
	14b	2
15		12
16		3
17a		1
	17a	3
17b		24
18		1
	18	3
19		16
	19	5
20		16
	20	3
21		7
22		5
	23	2
24		1

+ egy azonosított komplex delécio, amely a 4–7 és a 11–18 exonokat érinti.

1. táblázat

A CFTR gén különböző exonjain és intronjain azonosított mutációk száma

amino sav sorszáma a génben	503	504	505	506	507	508	509	510
kódolt aminosav	Lys	Glu	Asn	Ile	Ile	Phe	Gly	Val
normál DNS szekvencia	AAA	GAA	AAT	ATC	ATC	<u>TTT</u>	GGT	GTT
mutáció	AAA	GAA	AAT	ATC	AT	T	GGT	GTT
$\Delta F508$ DNS szekvencia	AAA	GAA	AAT	ATC	ATT	GGT	GTT	
kódolt aminosav	Lys	Glu	Asn	Ile	Ile	Gly	Val	

4. ábra

A $\Delta F508$ mutáció hatása a CFTR fehérje aminosav összetételére

3. CÉLKITŰZÉS

A. A magyarországi CF betegek között még nem készült olyan esetszámú felmérés a cisztikus fibrózis leggyakoribb mutációjának, a $\Delta F508$ mutációnak előfordulási gyakoriságáról, amely alapján megállapítható lett volna gyakorisága a magyar populációban. Vizsgálataim elsődleges célja megfelelően nagy számú vizsgálat elvégzése után ennek az adatnak a meghatározása.

B. További négy gyakoribb mutáció vizsgálatát is célul tűztém ki mindazokon a DNS mintákon, amelyek nem, vagy csak heterozigóta formában hordozták a $\Delta F508$ mutációt. Ezzel a vizsgálattal azt kívántam megállapítani, hogy a közlemények alapján a $\Delta F508$ mutáció után Közép–Európában leggyakoribb mutációk között levő, általam vizsgált négy mutáció közül melyik az, amelyik a magyar populációban számottevő gyakorisággal van jelen, illetve van-e közöttük olyan, amelyik szignifikánsan nagyobb gyakorisággal fordul elő a magyar populációban, mint más népeknél.

C. Enyhe klinikai tünetekkel rendelkező, kétséges diagnózisú betegek esetében a mutáció analízis döntő lehet a diagnózis felállításában abban az esetben, ha a betegben azonosítani lehet valamelyik CF mutációt (mutációkat). Ezek a vizsgálati eredmények képet adhatnak a különböző genotípusokhoz tartozó fenotípusokról a megjelenő klinikai tünetek megfigyelésével. Ez a jövőben lehetőséget adhat a mutáció ismeretében a betegség súlyosságának prognosztizálására.

D. Saját esetek elemzésével kívánom bemutatni, hogy a mutáció kimutatás segítségével mely családoknál végezhető prae-natalis diagnosztikai vizsgálat, és mely esetekben nem várható eredmény ettől a vizsgálattól.

E. Disszertációmmal érzékeltetni szeretném a legkorszerűbb genetikai módszerek bevezetésének fontosságát a klinikai diagnosztikába, amelynek segítségével mind az egyének (családok), mind a társadalom számára súlyos terhet jelentő, ma még gyógyíthatatlan betegségekben szenvedők születési aránya, az elvégzett prae-natalis diagnosztikai vizsgálat eredménye alapján, a magzati élet 10–12. hetéig elvégzett szelektív abortusszal (orvosi javaslatra, de a szülők saját döntése alapján) csökkenthető.



4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. ANYAGOK

4.1.1. A DNS izolálás reagensjei

- 0,155 M NH_4Cl (Reanal)
8,3 g NH_4Cl desztillált vízben oldva, végtérfogat 1000 ml
- 0,170 M Tris pH 7,65 (Fluka)
2,06 g Tris-(hidroxi-metil)-amino-metán 80 ml desztillált vízben oldva, cc. sósavval történő pH beállítás után desztillált vízzel 100 ml-re kiegészítve
- 1,0 M Tris pH 8,0 (Fluka)
121,14 g Tris-(hidroxi-metil)-amino-metán 800 ml desztillált vízben oldva, cc. sósavval történő pH beállítás után desztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítve
- 500 mM EDTA pH 8,0 (Reanal)
186,1 g Dinátrium-etilén-diamin-tetraacetát 800 ml desztillált vízben oldva, cc. sósavval történő pH beállítás után desztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítve
- 0,85 % NaCl (Fluka)
8,5 g NaCl desztillált vízben oldva, végtérfogat 1000 ml

- 5,0 M NaCl (Fluka)
292,2 g NaCl desztillált vízben oldva, végtérfogat 1000 ml
- 10% SDS (Merck)
10 g Nátrium–dodecil–szulfát desztillált vízben oldva, végtérfogat 100 ml
- Fenol (Fluka)
- Kloroform : izo–amil alkohol 24 : 1 (Reanal)
480 ml kloroform és 20 ml izo–amil alkohol elegye
- 4,0 M NH₄ acetát (Reanal)
30,84 g ammónium acetát desztillált vízben oldva, végtérfogat 100 ml
- 96 % etanol (Reanal)
- TE puffer

10 mM	Tris	pH 8,0
1 mM	EDTA	pH 8,0
- High TE puffer

40 mM	Tris	pH 8,0
10 mM	EDTA	pH 8,0
- 20 mg / ml Proteináz K (Merck)
100 mg Proteináz K 5 ml desztillált vízben oldva

- Lízis puffer teljes vérből való DNS izoláláshoz

100 mM	Tris	pH 8,0
40 mM	EDTA	pH 8,0
0,2 %	SDS	
1,0 M	NaCl	

- NTE (STE) (Sambrook és mtsai., 1989)

10 mM	Tris	pH 8,0
100 mM	NaCl	
1 mM	EDTA	pH 8,0

- Lízis puffer chorionboholy direkt PCR-hez (Scott és mtsai., 1990)

2,0 M	NaCl
0,1 M	NaOH
0,5 %	SDS

4.1.2. A polimeráz láncreakcióhoz használt anyagok

- Taq polimeráz, 5 u / μ l (Promega)

- 10x PCR puffer (Taq polimeráz tartozéka)

500 mM	KCl	
100 mM	Tris	pH 9,0
1 %	Triton X-100	

- 25 mM $MgCl_2$ (Taq polimeráz tartozéka)

- Oligonukleotid primerek (Szegedi Biológiai Központ)

ΔF508 mutációhoz:

5'GTTTCCTGGATTATGCCTG F

5'GTTGGCATGCTTGATGAC R

G542X, G551D, R553X mutációkhoz:

5'TTG CAGAGAAAGACAATATAGTTCCT F

5'GCACAGATTCTGAGTCACCAATAATC R

N1303K mutációhoz:

5'AATGTT CACAAGGGACTCCA F

5'CACTCCACTGTT CATAGGGATCCAG R

- Deoxiribonukleotidok (Perkin Elmer Cetus)

dATP 10 mM

dGTP 10 mM

dCTP 10 mM

dTTP 10 mM

4.1.3. Az oligonukleotid primerek jelöléséhez használt anyagok

- Adenozin-5-(γ ^{32}P)-trifoszfát (Izinta)
moláris aktivitás 13 TBq / mmól
- T₄ Polinukleotid kináz, 10 u / μl (Amersham)

- Polinukleotid kináz 10x puffer (Sambrook és mtsai., 1989)

500 mM	Tris	pH 7,6
100 mM	MgCl ₂	
50 mM	DTT	(Fluka)
1 mM	spermidin	(Fluka)
1 mM	EDTA	

4.1.4. Az elektroforézis oldatai

- 10x TBE puffer (Sambrook és mtsai., 1989)

0,89 M	Tris	
0,89 M	Bórsav	(Fluka)
4,0 mM	EDTA	

- 5 mg / ml Etidium–bromid (Merck)

0,1 g Etidium–bromid 20 ml desztillált vízben oldva. Tárolás fénytől védve +4°C-on.

- 6x Loadig puffer agaróz gélhez (Sambrook, 1989)

0,25 %	Bróm–fenolkék	(Reanal)
15%	Ficoll 400	(Pharmacia)

- 4 %-os agaróz gél

2 g Pharmacia agaróz + 2 g NuSieve low melting agaróz / 100 ml
1x TBE puffer; főzés kuktában 20 percig

- Loading puffer poliakrilamid szekvenáló gélhez

95 %	Formamid	(Sigma)
20 mM	EDTA	
0,05 %	Bróm-fenolkék	
0,05 %	Xilén-cianol	(Sigma)
- Fixáló oldat poliakrilamid gélhez

10 %	Etanol	
10 %	Ecetsav	(Reanal)
- 6 %-os polakrilamid gél

12,5 ml	40 %-os akrilamid – bisz-akrilamid oldat	(Stratagene)
	(38 g akrilamid + 2 g bisz-akrilamid desztillált vízben oldva, végtérfogat 100 ml)	
6,0 ml	10x TBE	
33,6 g	Urea	(Stratagene)
50,0 µl	TEMED	(Stratagene)
600 µl	Ammónium-peroxi-szulfát	(Stratagene)
	(0,1 g APS 900 µl desztillált vízben oldva)	

4.1.5. Restrikciós enzimek (Biolabs)

- BstN I 10 u / µl

10x puffer	500 mM	NaCl	
	100 mM	Tris	pH 7,9
	100 mM	MgCl ₂	

	10 mM	DTT	
• Hinc II	10 u / μ l		
10x puffer	1000 mM	NaCl	
	500 mM	Tris	pH 7,9
	100 mM	MgCl ₂	
	10 mM	DTT	
• Sau3A I	4 u / μ l		
10x puffer	1000 mM	NaCl	
	100 mM	Bis-Tris-Propán	pH 7,0
	100 mM	MgCl ₂	
	10 mM	DTT	

4.2. MÓDSZEREK

4.2.1. DNS izolálás teljes vérből

(Madisen és mtsai., 1987)

A vért 3,3 %-os Na-citrátot tartalmazó csőbe vesszük. 4 ml alvadásgátlóhoz 16 ml vért veszünk. Ezután ötszörös térfogatú, 0,155 M NH_4Cl / 0,170 M Tris 9 / 1 arányú elegyével mossuk a sejteket. Ennek hatására a vörösvérsejtek hemolizálnak. Centrifugálás után a felülúszót elöntve a csapadékot szuszpendáljuk 45 ml 0,85 %-os NaCl oldatban. Ismételt centrifugálás és a felülúszó leszívása után tesszük rá a csapadékra a 4ml high TE puffert, majd az 5 ml Tris / EDTA / SDS / NaCl tartalmú lízis puffert, és jól összekeverjük. Ebben az oldatban legalább egy éjszakát állva megtörténik a fehérvérsejtek lízise, a DNS az oldatba kerül. Másnap azonos mennyiségű fenolt rétegzünk a csőben lévő oldatra. Fél órán keresztül óvatosan forgatva a csöveket a szétesett véralkotók maradványai átmennek a fenolos fázisba, a DNS pedig a vizes fázisban marad. Centrifugálás után a felső vizes fázist tiszta csőbe óvatosan átszívjuk, majd legalább egyszer (szükség esetén többször is) megismételjük a fenolozást. Utoljára kloroform : izo-amilalkohol elegyét rétegezzük a vizes fázisra. A fenolos kezeléshez hasonlóan járunk el. A vizes felső fázist ismét új csőbe átszívjuk, majd a teljes térfogat 1/10 részének megfelelő mennyiségű 4 M ammónium-acetát oldatot adunk hozzá. Összekeverés után 2,5-szeres mennyiségű -20°C -os 96 %-os etanolt adagolunk az oldathoz, amely a DNS-t kicsapja. A kicsapódott DNS-t, pipettával, vagy üvegbottal kiszedve az alkoholból, Eppendorf csőben 70 %-os alkohollal átmoszuk, majd szárítjuk. Száradás után TE oldatban visszaoldjuk és ebben az állapotban -20°C -on tároljuk.

4.2.2. DNS izolálás chorionboholyból (Scott és mtsai.,1990)

A chorionboholy mintavételeket részben az Orvostovábbképző Egyetem Nőgyógyászatán, részben pedig a SOTE I. sz. Nőgyógyászati Klinikáján végezték. A CVS minták tisztaságának ellenőrzése mikroszkóp alatt közvetlenül a mintavétel után történt. A chorionboholy minták fiziológiás sóoldatba helyezve kerültek laboratóriumunkba. A DNS izolálást a mintavétel napján elkezdtem, amelynek menete a következő:

A chorionboholy mintát 250 μ l NTE-ben mossuk. Centrifugálás és a felülúszó leszívása után a csapadékhoz 500 μ l NTE-t, majd 50 μ l 10 %-os SDS-t adunk. Összekeverés után 10 min-ra 65°C-os vízfürdőbe helyezzük. Ezután 5 μ l 20 mg/ml-es Proteináz K enzimdátot adunk a reakcióelegyhez és az egészet 3 órára 55°C-ra tesszük, vagy egy éjszakán át 37°C-os vízfürdőben inkubáljuk. Másnap azonos mennyiségű fenollal összerázzuk, centrifugáljuk 3 000 fordulatszámon 3 min-ig, majd a felső vizes fázist, amely a DNS-t tartalmazza, új csőbe átszívjuk. A fenolozást ismételjük még egyszer. Ezután kloroform : izo-amilalkohollal tisztítjuk a DNS-t a fenolozáshoz hasonlóan. Végül 50 μ l 4 M ammónium-acetát hozzáadása után 1 ml -20°C-os alkohollal kicsapjuk a DNS-t. Ezután 4.2.1. szerint járunk el.

4.2.3. Az oligonukleotid primerek radioaktív végjelölése

(Sambrook és mtsai.,1989)

Az 5' vég jelölését a standard technikát követve végezzük.

A 15 μ l végtérfogatú reakcióelegy – amely 10 PCR reakcióhoz elegendő – összetétele a következő: 1 μ g jelölendő oligonukleotid primer, 1,5 μ l 10x PNK

puffer, 2 MBq Adenozin-5-($\gamma^{32}\text{P}$)-trifoszfát, 10 egység PNK. A végtérfogatot desztillált vízzel állítjuk be. A reakcióelegyet 1–2 órán keresztül 37°C-on inkubáljuk, majd az enzimet forralással inaktiváljuk.

4.2.4. PCR DNS-ből

Az 50 μl (ΔF508 mutáció vizsgálata esetén 25 μl) végtérfogatú reakcióelegyet tartalmaz: 100–400 ng genomiális DNS-t, 0,2 μg – 0,2 μg -ot mindkét oligonukleotid primerből (F, R) (ΔF508 mutáció vizsgálata esetén az egyik oligonukleotidból 0,1 μg radioaktívan jelölt formában – ld. 4.2.3.), a végtérfogat 1/10 részének megfelelő mennyiségű 10x PCR puffert, 2,5 mM MgCl_2 -t (ΔF508 mutáció vizsgálata esetén 1,5 mM-t), 200–200 μM -t mind a négy dezoxiribonukleotidból (ΔF508 mutáció vizsgálata esetén 100 μM -t) és 2 egység Taq polimerázt (ΔF508 mutáció vizsgálata esetén 1 egységet). 35 amplifikációs ciklust hajtunk végre. Denaturálás 93°C 60 sec; annealálás ΔF508 mutáció vizsgálata esetén 59°C 60 sec, a négy pontmutáció esetén 57°C 60 sec; láncszabítás 72°C 120 sec.

A polimeráz láncreakció mechanizmusának sémája az 5. ábrán látható.

4.2.5. PCR vércseppből / Guthrie szűrőpapírra beszárított vérből

(Mercier és mtsai., 1990)

A reakcióelegyet összetétele megegyezik a 4.2.4-ben leírtakkal. A genomiális DNS helyett 2 μl , desztillált vízzel négyszeresére hígított, alvadésgátlótól mentes teljes vért, vagy 1 mm^2 , beszárított vércseppet tartalmazó, Guthrie szűrőpapír darabot

teszünk a reakcióelegybe. Az enzim hozzáadása előtt a mintákat a következő hőkezelésnek vetjük alá: 95°C 3 min, 55°C 3 min. Ezt a kezelést háromszor ismételjük, majd a Taq polimeráz hozzáadása után 4.2.4. szerint járunk el.

4.2.6. Direkt PCR chorionboholyból (Scott és mtsai., 1990)

A chorionboholy mintát kétszer mossuk 250 µl NTE-ben. Centrifugáljuk, a felülúszót leszívjuk, majd 20 µl lízis puffert adunk a csapadékhoz. 2 min-ra 100°C-os vízfürdőbe helyezzük. Ezután 10 min-ig centrifugáljuk 12 000 fordulatszámon, majd a felülúszót desztillált vízzel 10x hígítjuk és a 4.2.4-nek megfelelő reakcióelegybe a genomiális DNS helyett ennek 2 µl-ét tesszük.

4.2.7. Restrikciós emésztés

Az 50 µl térfogatú PCR termékből 10 µl-t emésztünk 5 egység restrikciós enzimmal. A négy különböző mutáció kimutatására használt restrikciós enzimek a következők: BstN I → G542X, N1303K; Hinc II → R553X; Sau3A I → G551D. A BstN I enzimmal 60°C-on emésztünk, a Hinc II és a Sau3A I enzimekkel 37°C-on emésztjük a mintákat 3 órán keresztül.

4.2.8. Agaróz gél elektroforézis (Sambrook és mtsai., 1989)

A radioaktívan nem jelölt, 4.2.7. szerint restrikciós endonukleázzal hasított PCR termékeket 4 %-os agaróz gélen választjuk el 100 V feszültség mellett 3 órán

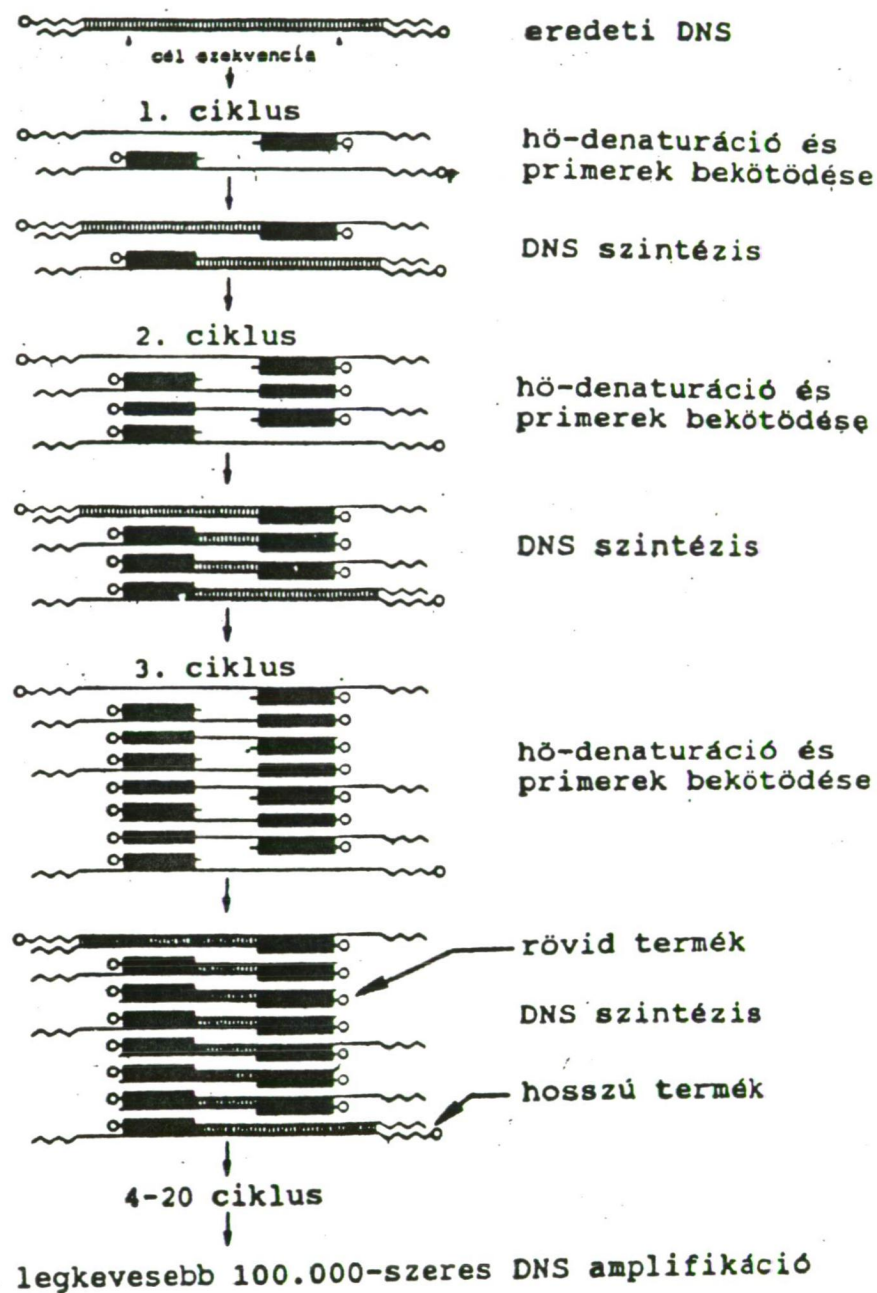
keresztül. A DNS sávokat etidium–bromidos festéssel tesszük láthatóvá, majd a gél UV fénnel átvilágítva lefényképezzük.

4.2.9. Poliakrilamid gél elektroforézis

A radioaktívan jelölt PCR termékeket 6 %-os szekvenáló poliakrilamid gélen futtatjuk. A 25 μ l végtérfogatú PCR termékéből 1 μ l aliquotot adunk 4 μ l loading pufferhez. A gélre felvitt mennyiség 0,5–1 μ l. 40 Watt teljesítmény, 1200 V feszültség mellett 55°C-on 1,5 órán át futtatjuk. Ezután a gél a fixálóoldatban 15 min–ig áztatjuk, majd szárítjuk.

4.2.10. Autoradiográfia

A 4.2.9. alapján futtatott, megszáritott poliakrilamid gélrtöntgenkazettába tesszük egy röntgenfilmmel együtt. Az exponálás időtartama az izotóp aktivitásától függ. Szükség esetén RTG erősítő fóliával –70°C-on erősíthetők a radioaktív jelek. A DNS sávok a film előhívásával tehetők láthatóvá.



5. ábra

A polimeráz láncreakció mechanizmusának ábrázolása (Perl és mtsa., 1990)

4.3. A VIZSGÁLT CSALÁDOK

Munkám során 271 család vette igénybe a cisztikus fibrózis mutációs vizsgálatot. Közülük 16 családban a beteg gyermek a jelentkezés időpontjában már nem élt, így tőle származó vérminta / DNS minta nem állt a rendelkezésemre. Ezekben az esetekben nyilvánul meg a közvetlen mutációelemzés előnye az indirekt RFLP vizsgálattal szemben, amely a mutációk azonosítása előtti időszakban az egyetlen lehetőség volt a mutációk meglétének vagy hiányának igazolására. Azonban ezen vizsgálat elvégzésének alapfeltétele a beteg és a szülők DNS mintájának megléte, hiszen információt kizárólag ennek a három mintának az összehasonlítása adhat. A közvetlen mutációelemzésnek az a jelentős előnye, hogy a mutációs vizsgálat a beteg DNS / vérmintája nélkül is elvégezhető, hiszen a beteg gyermek az öröklődés szabályainak megfelelően a szülőktől kapott mutációkat hordozza. Ha tehát a szülők mutációi azonosíthatók, a már meglévő egészséges testvér vizsgálata, illetve szükség szerint praenatalis diagnosztikai vizsgálat is végezhető. Az elvégzett 15 praenatalis vizsgálat közül hatot ilyen családoknál végeztem.

10 olyan család jelentkezett vizsgálatra, ahol kettő, sőt egy esetben három beteg gyermek is volt a családban. A testvérek természetesen ugyanazokat a mutációkat hordozták.

A további családokban 1–1 beteg gyermek él. Életkori és nembeli megoszlásukat a 2. táblázat tartalmazza. Látható, hogy az életévek növekedésével fokozatosan csökken a betegek száma, ami a betegség rossz prognózisára utal.

0-5 év		6-10 év		11-15 év		16-20 év		21-25 év		26-30 év		41-45 év	
110		62		46		29		10		6		3	
fiú	lány	fiú	lány	fiú	lány	fiú	lány	fiú	lány	fiú	lány	fiú	lány
65	45	37	25	27	19	16	13	4	6	2	4	2	1

2. táblázat

A vizsgált CF betegek kor és nem szerinti megoszlása

5. AZ ELVÉGZETT VIZSGÁLATOK

5.1. $\Delta F508$ MUTÁCIÓ VIZSGÁLATA

Laboratóriumunk 1989 óta foglalkozik a cisztikus fibrózis leggyakoribb mutációjának, a $\Delta F508$ mutációnak a vizsgálatával. Az azóta eltelt időszakban 266 beteg vizsgálatát végeztem el. A vér illetve DNS mintákat mindig a teljes családtól összegyűjtöttem, de az első lépésben csak a beteg vizsgálata történt meg.

Azokban az esetekben, ahol a beteg homozigóta vagy heterozigóta formában hordozta a $\Delta F508$ mutációt, mindig elvégeztem az egészséges testvér, illetve testvérek vizsgálatát is abból a célból, hogy megállapítsam, hordozzák-e a mutációt, vagy sem. 61 ilyen vizsgálat történt. Közülük 36-an voltak homozigóta, 25-en pedig heterozigóta beteg testvérei. Ennek a vizsgálatnak nagy jelentősége van, hiszen tudjuk, hogy Magyarországon is minden 25. ember hordozza a CF valamelyik mutációját (Heely és mtsai.,1983). Ez az arány a betegek egészséges testvérei között természetesen jóval nagyobb, így a beteg gyermek születésének kockázata az ő leendő családjukban magasabb az átlagosnál. Azok a testvérek, akiknél a hordozóság megállapítható, felnőve, családalapítás előtt, leendő párjukkal ismét igénybe vehetik a genetikai tanácsadást és a mutáció analízist. Amennyiben kiderül, hogy a leendő társ szintén hordozza valamelyik CF mutációt, praenatalis vizsgálat elvégzését kérhetik. Ezzel az ő családjukban már az első beteg gyermek megszületése is megakadályozható. Vizsgálataim során négy leendő férj és két új feleség vizsgálatát végeztem el. Közülük egyik esetben sem találtam $\Delta F508$ mutációt az új családtagokban.

A szülők vizsgálatára csak abban az esetben került sor, amikor a beteg gyermek heterozigóta vagy homozigóta formában hordozta a $\Delta F508$ mutációt, és a szülők jelezték, hogy a közeljövőben újabb gyermeket szeretnének. Így összesen 41 szülőpár, azaz 82 szülő vizsgálatát végeztem el.

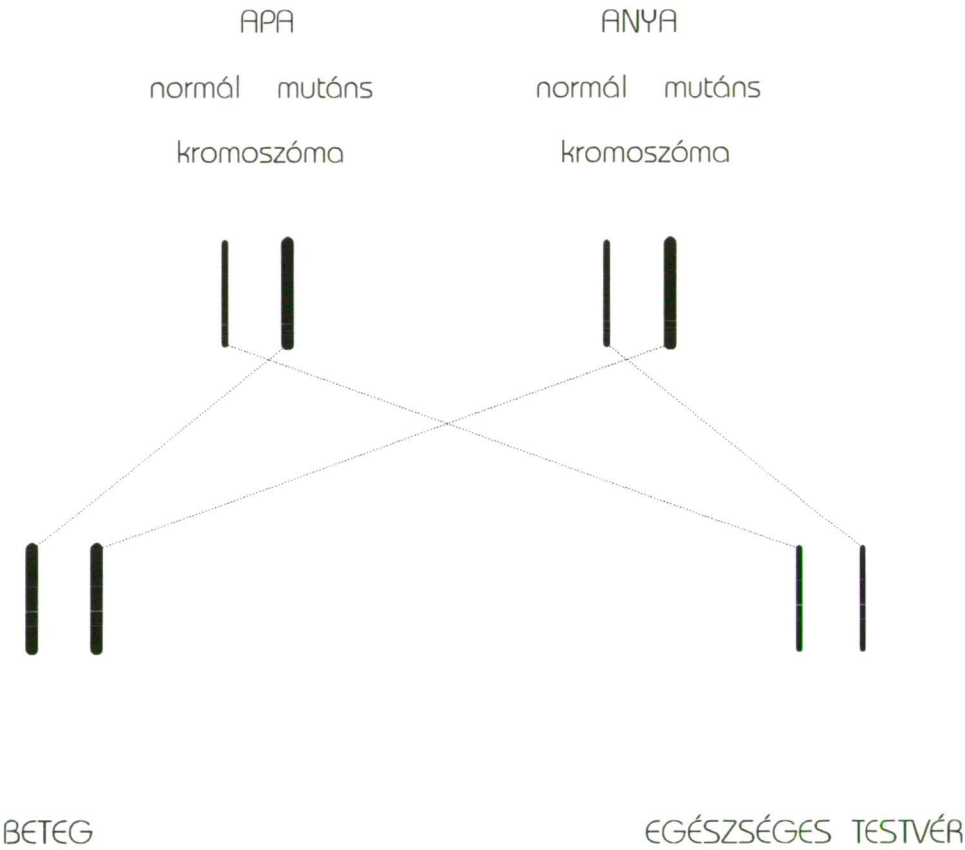
Saját kérésre 15 esetben elvégeztem másodfokú rokonok (nagybácsi, unokahúg, unokatestvér) vizsgálatát is, szintén a hordozói státusz megállapítása céljából.

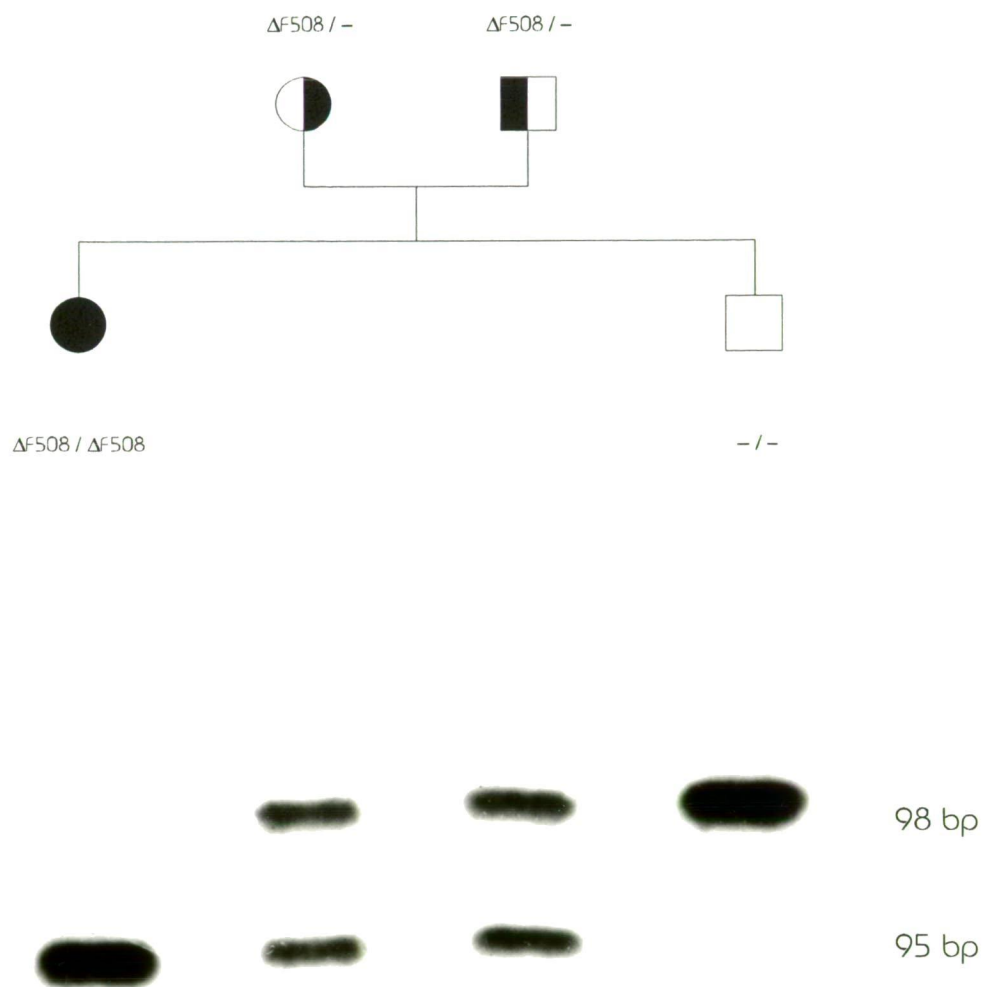
Értékezésemben tehát összesen 430 személy mutáció vizsgálatának eredményét ismertetem.

A betegek diagnózisát a klinikai tünetek, valamint a verejtékteszt (sweat test) eredménye alapján osztályoztam. Biztos diagnózisúnak tekintettem azokat a betegeket, akiknek súlyos tüdő- és / vagy emésztőrendszeri tünetek voltak, és legalább két kóros verejtékvizsgálati eredményük volt. A 266 beteg közül 214 tartozott ebbe a csoportba. A többiek vagy csak egészen enyhe klinikai tüneteket mutattak, vagy a verejtéktesztjük eredménye volt a határértéken. Diagnózisuk ennek megfelelően bizonytalan, hiszen lehetséges, hogy olyan CF mutációkat hordoznak, amelyek ilyen enyhe klinikai tünetekkel járnak, de az is elképzelhető, hogy hasonló fenotípus kialakulását okozó, de más okból kialakuló betegségben szenvednek.

A mutációelemzés során a polimeráz láncreakciót ^{32}P izotóppal jelölt oligonukleotid primerek jelenlétében végeztem. Mivel meglehetősen kis kiterjedésű (3 bázispár) deléciót kell kimutatni, legegységesebben poliakrilamid szekvenáló gélen választhatók szét a deléciót hordozó 95 bázispár hosszúságú, valamint az azt nem hordozó 98 bázispár hosszúságú PCR termékek. Az így módon elválasztott DNS sávok ezután autoradiográfiával tehetők láthatóvá egy röntgen filmen. Egy négytagú család így készült mutáció kimutatásának eredményéről

készített fénykép a családfával a 6. ábrán látható. Baloldalt látható a $\Delta F508$ mutációra homozigóta beteg, középen a két heterozigóta szülő, jobboldalt pedig az egészséges testvér, aki egyáltalán nem hordozza a $\Delta F508$ mutációt. Az allélkombinációkat az alábbi ábra mutatja.





6. ábra
A $\Delta F508$ mutáció kimutatása

A $\Delta F508$ mutáció kimutatására elvégzett vizsgálatok számát a 3. táblázat tartalmazza. A megvizsgált 266 betegből 214-nek volt biztos a diagnózisa. A vizsgálatba bevont 41 szülőpár közül került ki az a 13 család, akiknél prae-natalis diagnosztikai vizsgálat történt. A testvérek nagyobb része $\Delta F508$ mutációt homozigóta formában hordozó beteg testvére volt, de elvégeztem azoknak a testvéreknek a vizsgálatát is, ahol a beteg csak heterozigóta formában hordozta a $\Delta F508$ mutációt. Az ő esetükben a $\Delta F508$ mutáció kimutatása bizonyította a CF hordozásának tényét, a $\Delta F508$ mutáció kizárása azonban nem jelentette azt, hogy nem hordozók. Beteg testvérük ugyanis biztosan hordozott még egy – egyelőre azonosítatlan – CF mutációt, amelyet az egészséges testvér 50%-os valószínűséggel hordozhat. Azokban az esetekben is elvégeztem az egészséges testvér $\Delta F508$ mutációs vizsgálatát, ha a beteg heterozigóta formában hordozta ugyan a $\Delta F508$ mutációt, de a másik mutációját is sikerült azonosítani a vizsgált másik négy mutáció valamelyikének. Ez esetben a testvér hordozósága egyértelműen megállapítható vagy kizárható mindkét mutációra irányuló vizsgálattal.

Az elvégzett $\Delta F508$ mutációs vizsgálatok száma				
430				
beteg biztos bizonytalan diagnózis		szülő	testvér	egyéb rokon
266 214 52		82	61	21

3. táblázat

5.2. PRAENATALIS DIAGNOSZTIKAI VIZSGÁLATOK

A cisztikus fibrózis praenatalis diagnosztikájában a DNS mutáció analízis bevezetése előtt kezdetben még csak a mendeli öröklődés szabályai szerint megállapított 25%-os kockázat megadása volt lehetséges, ha a szülőknek már született egy beteg gyermeke. Később lehetővé vált a terhesség második trimeszterében (16–18. gesztációs hét) vett magzatvízből a mikrovilláris membránenzimek aktivitásának mérése biokémiai módszerekkel. Ezt a módszert az ultrahang vizsgálat egészítette ki, amellyel a meconium ileus képe már magzati korban felismerhető. Ezek a vizsgálatok azonban csak a terhesség 20. hete körül adnak eredményt, és a hibaszázalékuk is meglehetősen magas a DNS diagnosztikai módszerekhez képest.

A DNS diagnosztikai módszerek első lépcsőfoka a magzatvízből származó magzati sejtekből izolált DNS mintán elvégzett RFLP analízis bevezetése volt.

A chorionboholy mintavétel a 80-as évek közepe óta vált klinikai gyakorlattá. A CVS-ből extrahált DNS eleinte a magzatvízsejtekhez hasonlóan a haplotípus analízis céljára szolgált. A gén azonosítása és a mutációk felfedezése után pedig elkezdődhetett a legkorszerűbb, leggyorsabb és egyben a legbiztonságosabb technika, a polimeráz láncreakció segítségével végrehajtott közvetlen mutáció elemzés bevezetése a klinikai diagnosztikába.

A praenatalis diagnosztikai vizsgálatokban új távlatokat nyit az a közlemény (Handyside és mtsai., 1992), amely szerint megszületett az első olyan gyermek, aki mesterséges megtermékenyítéssel fogant, majd a sejtosztódás nyolc sejtes fázisában az embrió egyetlen sejtjéből végeztek PCR technika segítségével a DNS-ből CF mutáció kimutatására irányuló vizsgálatot. Miután mutációt nem detektáltak, sikeresen ültették be az anya méhében. Normális lefolyású terhesség után jött világra az egészséges kislány.

A $\Delta F508$ mutáció kimutását 15 esetben alkalmaztam magzati korban történő diagnosztikai célra. A mutáció kimutatást chorionboholy mintából izolált DNS-ből, illetve közvetlenül – megfelelő kezelés után – a CVS mintából végeztem. A CVS mintavétel legkedvezőbb a terhesség 10–12. hete között. A vizsgálat 3–4 napot vesz igénybe. Így optimális esetben a terhesség betöltött 12. hetéig a leendő szülők megtudhatják a magzat vizsgálati eredményét. Azután annak ismeretében dönthetnek arról, hogy vállalják-e továbbra is a terhességet, vagy egészségügyi okból meg kívánják szakíttatni. A CVS vizsgálatának hatalmas előnye a korábban kizárólagosan alkalmazott, amniocenteziséből származó magzatvízsejtek vizsgálatával szemben éppen az, hogy míg a CVS mintavétel a terhesség 10–12. hete körül végezhető, addig a magzatvíz nyerésének kedvező időpontja a 16–18. hét, így a vizsgálat eredménye is hetekkel később lesz csak ismertté a szülők előtt. A terhesség későbbi időpontjában elvégzett terhességmegszakítás pedig az anyára nézve nagyobb veszélyekkel jár.

A vizsgálatot minden esetben párhuzamosan végeztem a CVS-ből származó DNS-ből, és közvetlenül a CVS mintából. A PCR elegy összetétele megegyezett a perifériás vérből izolált DNS-ből végzett PCR elegy összetételével. Mind a DNS, mind a CVS közvetlen vizsgálatakor két párhuzamos PCR elegyet állítottam össze, így egy magzati vizsgálat során négy párhuzamos elemzés történt.

Itt jegyzem meg, hogy milyen nagy jelentősége van a chorionboholy minta nagyon alapos és gondos megtisztításának a mintavétel után. Ha ugyanis a nem megfelelő elkülönítés következtében anyai sejtek kerülnek a chorion magzati eredetű sejtjei közé, és a polimeráz láncreakció az azokból származó DNS-t is amplifikálja, az téves eredmény megállapításához vezethet.

5.3. G542X, G551D, R553X, N1303K MUTÁCIÓK VIZSGÁLATA

Ezeket a mutációkat azon betegek DNS mintáin vizsgáltam, akik a $\Delta F508$ mutációt egyáltalán nem, vagy csak heterozigóta formában hordozták. A kimutatás ebben az esetben is a polimeráz láncreakción alapult, de ellentétben a $\Delta F508$ mutációval, ezekben a vizsgálatokban nem került sor a PCR termék radioaktív jelölésére. A PCR termék 296 bp méretű volt a 11-es, és 300 bp a 21-es exon esetében. Minden esetben tartalmazott legalább egy restrikciós hasítóhelyet, amelyet vagy a mutáció alakított ki (G551D), vagy ellenkezőleg, éppen eltüntette azt (G542X, N1303K, R553X). A G542X mutáció esetében a PCR termék tartalmazott ezen kívül egy BstN I restrikciós hasítóhelyet, amely független volt a mutáció jelenlététől, tehát minden esetben megtalálható volt. Eredményeképpen a minták emésztése során megjelent egy állandó, 101 bp méretű fragment. A mutáció kimutatására szolgáló restrikciós hasítóhelyet magával a polimeráz láncreakcióhoz használt oligonukleotid primerrel "vittem be" a DNS-be (helyspecifikus mutagenézis) (Haliassos és mtsai., 1989), és a mutáció jelenléte ezt a hasítóhelyet szüntette meg. Az egyes mutációk kimutatásához használt restrikciós endonukleázokat a 4. táblázat tartalmazza.

EXON	MUTÁCIÓ	RESTRIKCIÓS ENZIM	PCR TERMÉK MÉRETE (bp)	KELETKEZŐ FRAGMENTUMOK MÉRETE(bp)
11	G542X	BstN I	296	195+101
	nincs mutáció	BstN I	296	173+22+101
11	G551D	Sau3A I	296	241+55
	nincs mutáció	Sau3A I	296	296
11	R553X	Hinc II	296	296
	nincs mutáció	Hinc II	296	244+52
21	N1303K	BstN I	300	300
	nincs mutáció	BstN I	300	269+31

4. táblázat
A vizsgált pontmutációk

Mivel a G542X, G551D és az R553X mutációk a 11-es exonban egymáshoz igen közel helyezkednek el (10/a. ábra), kimutatásuk közös PCR-ből lehetséges. Az 50µl végtérfogatú PCR terméket háromfelé osztva a három különböző restrikciós enzimmal emésztettem, majd a fragmentumokat 4%-os agaróz gélen választottam el. Az N1303K mutáció a 21-es exonban helyezkedik el (10/b. ábra). Kimutatása egy újabb PCR reakció után történő restrikciós emésztéssel a másik három mutációhoz hasonlóan történik.

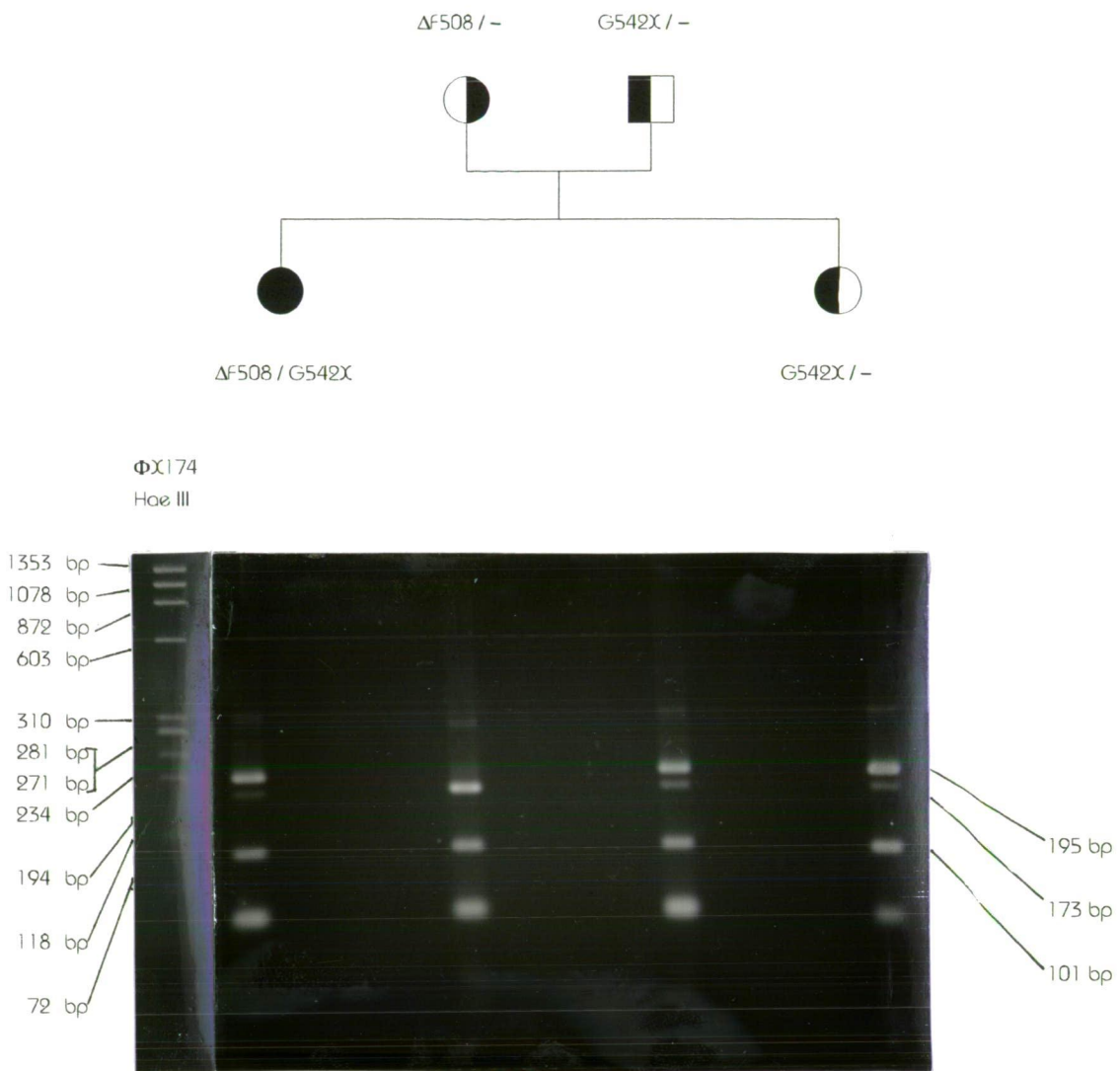
A 7. 8. 9. ábrákon a G542X, az R553X és az N1303K mutációk kimutatása látható saját vizsgálataim során betegeken és azok családtagjain.

A G542X mutáció kimutatását egy olyan család vizsgálati eredményével szemléltetem, ahol három családtag is hordozza a G542X mutációt: a beteg, az apa és az egészséges testvér. A beteg ezen kívül az anyától kapott $\Delta F508$ mutációt is hordozza. Az egészséges testvér ezt nem örökölte, ezért ő csak hordozó, de maga nem beteg.

Az R553X mutáció kimutatását egy hattagú, négy gyermekes család vizsgálati eredménye mutatja. Látható, hogy a betegen kívül a mutációt a három egészséges testvér közül kettő is hordozza, amelyet mindannyian az anyától örököltek. Az apa a $\Delta F508$ mutációt hordozza, amelyet csak a beteg örökölt, a harmadik egészséges testvér nem.

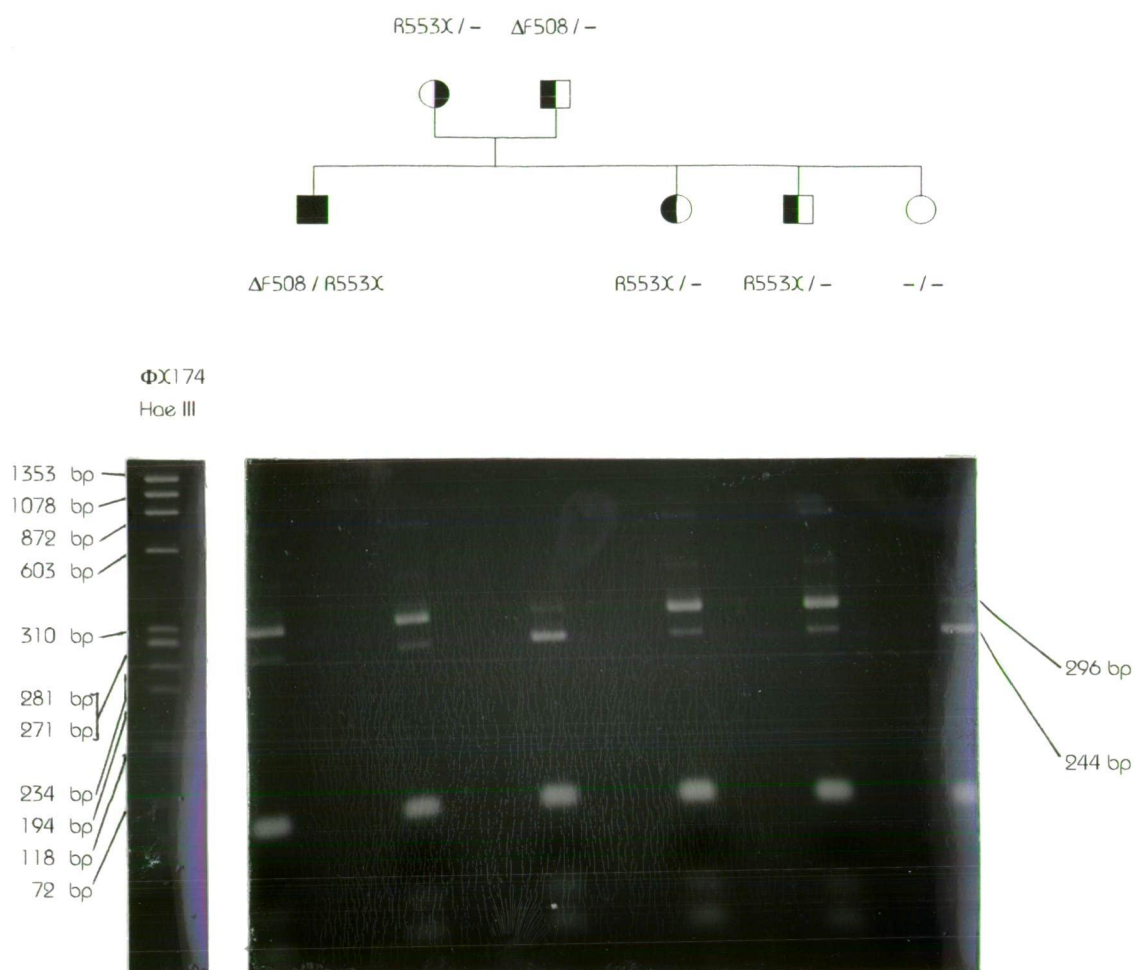
Az N1303K mutáció kimutatása egy háromtagú család vizsgálatából látható. Az anyja hordozza az N1303K mutációt, az apából ebben az esetben is a $\Delta F508$ mutáció mutatható ki.





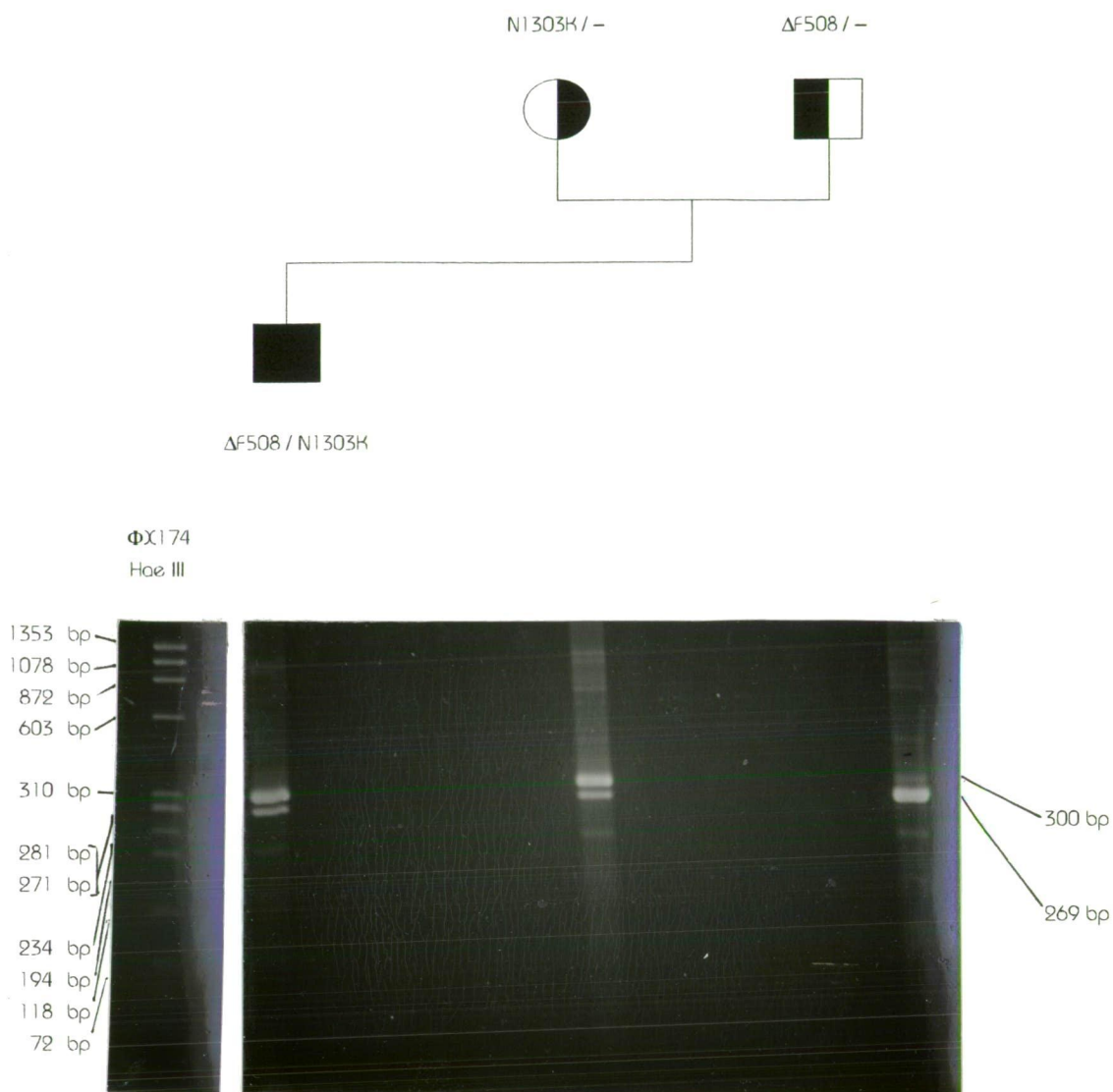
7. ábra

$G542X$ mutációt hordozó beteg és családtagjainak mutációs vizsgálata



8. ábra

R553X mutációt hordozó beteg és családtagjainak mutációs vizsgálata



9. ábra

N1303K mutációt hordozó beteg és családtagjainak mutációs vizsgálata

G542X

DNS szekvencia ... TT GCA GAG AAA GAC AAT ATA GTT CTT GGA GAA GGT

mutációk ... IGA ...

primer F TT GCA GAG AAA GAC AAT ATA GTT CCI

G551D R553X

DNS szekvencia GGA ATC ACA CGT AGT GGA GGT CAA CGA GCA AGA ...

mutációk ... GAT ... IGA ...

10/a. ábra

A G542X, G551D, R553X mutációk elhelyezkedése a 11-es exonban

N1303K

DNS szekvencia ... GGA ACA TTT AGA AAA AAC TTG GAT CCC TAT GAA ...

mutáció ... AAG ...

10/b. ábra

Az N1303K mutáció elhelyezkedése a 21-es exonban

Munkám során mindazon betegek (klinikailag biztos és bizonytalan diagnózisúak is) vizsgálatát elvégeztem, akik egyáltalán nem, vagy csak heterozigóta formában hordozták a $\Delta F508$ mutációt. Azokban az esetekben, ahol a beteg DNS mintájában valamelyik mutációt megtaláltam, lehetőség szerint elvégeztem a szülők, illetve a testvér(ek) vizsgálatát is a hordozói státusz megállapítása céljából. Mivel a családtagok nem minden esetben voltak elérhetőek, illetve nem kívántak részt venni a vizsgálatban, a kiterjesztett családvizsgálat nem mindig történt meg.

6. VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK

6.1. $\Delta F508$ MUTÁCIÓ

Az 5. táblázat adatai szerint a 214 biztos diagnózisú betegből 89 hordozta a $\Delta F508$ mutációt homozigóta formában. Ez a leggyakrabban előforduló, és egyben a homozigóta állapotban legsúlyosabb klinikai tünetekkel járó mutáció. A 44, a $\Delta F508$ mutációt heterozigóta formában hordozó beteg egy része szintén súlyosan beteg, másik részükben azonban a betegség sokkal enyhébb formában nyilvánul meg, de a diagnózis azért kétségtelen. Feltehetően az azonosítatlan másik mutáció különbözősége okozza ezt a jelentős eltérést. Ugyanez mondható el a $\Delta F508$ mutációt egyáltalán nem hordozó 81 betegről is. A klinikai tünetek súlyossága meglehetősen különböző az egyes esetekben, amely feltehetőleg összefügg a hordozott mutációk típusával. Az 52 bizonytalan diagnózisú beteg közül hatban lehetett a $\Delta F508$ mutációt heterozigóta formában azonosítani, a többi 46 beteg esetében ez a vizsgálat nem vezetett eredményre. Ez azonban nem zárja ki annak lehetőségét, hogy ezek a betegek valóban CF betegek, csak rendkívül enyhe klinikai tüneteket okozó mutációkat hordoznak.

A $\Delta F508$ mutációt homozigóta formában hordozó betegek szüleiben egyetlen eset kivételével sikerült azonosítani heterozigóta formában a mutációt. Ebben az egy esetben kétféle magyarázat lehetséges. Az egyik az, hogy az anyától örökölt $\Delta F508$ mutáció mellé szerencsétlen módon a beteg másik hetes kromoszómáján új $\Delta F508$ mutáció keletkezett. A másik lehetőség az, hogy nem a biológiai apát vizsgáltam.

A $\Delta F508$ mutációt homozigóta formában hordozó betegek egészséges testvérei között a mendeli öröklődés szabályai szerint a hordozók : nem hordozók aránya 2 : 1. Vizsgálataim szerint ez az arány 22 : 14. Ez az érték megközelítőleg megfelel az elméleti megoszlásnak. A $\Delta F508$ mutációt heterozigóta formában hordozó betegek testvérei között az előző megfontolás alapján a $\Delta F508$ mutáció hordozásának illetve nem hordozásának az aránya elméleti érték szerint 1 : 2. Az általam vizsgált testvérek körében ez az adat 9 : 16. (6.táblázat)

A megvizsgált betegek száma					
266					
biztos diagnózisú			bizonytalan diagnózisú		
214			52		
$\frac{\Delta F508}{\Delta F508}$	$\frac{\Delta F508}{nd}$	$\frac{nd}{nd}$	$\frac{\Delta F508}{\Delta F508}$	$\frac{\Delta F508}{nd}$	$\frac{nd}{nd}$
89	44	81	–	6	46

5. táblázat
 $\Delta F508$ mutáció vizsgálata betegekből

A megvizsgált testvérek száma			
61			
Δ F508 / Δ F508 beteg testvére		Δ F508 / nd beteg testvére	
36		25	
hordozó	nem hordozó	hordozó	nem hordozó
22	14	9	16

6. táblázat

Δ F508 mutáció vizsgálata a betegek egészséges testvéreiben

$\Delta F508$ / $\Delta F508$ betegek megvizsgált másodfokú rokonainak száma	
15	
hordozó	nem hordozó
5	10

7. táblázat

$\Delta F508$ mutáció vizsgálata a betegek másodfokú rokonaiban

A 7. táblázat adataiból látható, hogy milyen nagy jelentőségű lenne nem csak a betegek legközelebbi hozzátartozóinak vizsgálata, hanem a távolabbi rokonok ellenőrzése is a mutáció hordozásának szempontjából. Mivel a vizsgálat rendkívül költségigényes, népességi szintű szűrésre nincs mód, így az egyes családokban csak a második beteg gyermek megszületését tudjuk megakadályozni. A hordozó testvérek és távolabbi rokonok által alapított új családokban azonban ezen vizsgálat segítségével már az első betegnek sem kell megszületnie.

Az 5. táblázat adatai alapján megállapítható a $\Delta F508$ mutáció gyakorisága Magyarországon. A bizonytalan diagnózisú betegek meglehetősen nagy száma miatt egyértelmű, pontos érték megadására nem vállalkozhatok, de viszonylag szűk értékhatárok közé tudom azt szorítani. Ha csak azokat a betegeket vesszük figyelembe, akiknek a diagnózisa a klinikai tüneteik alapján biztos, valamint azokat, akik ugyan csak enyhe klinikai tünetekkel rendelkeznek, de a $\Delta F508$ mutációt heterozigóta formában hordozzák, és kiszámoljuk ezek összes CF kromoszómáira vonatkoztatva a $\Delta F508$ mutáció gyakoriságát, 52%-ot kapunk. Kiszámolva ugyanezt a gyakorisági értéket az összes beteg figyelembe véve, ez az adat 43%. (8.táblázat) Ez tehát a két határérték, amely között a CF kromoszómákra vonatkozó valódi $\Delta F508$ mutációs gyakoriság elhelyezkedik. A $\Delta F508$ mutáció a biztos diagnózisú CF betegek 63%-ában van jelen, mégpedig oly módon, hogy a $\Delta F508$ mutációt homozigóta formában hordozó betegek aránya az összes klinikailag biztos diagnózisú beteg (+ a klinikailag bizonytalan diagnózisú betegek közül azok, akik a $\Delta F508$ mutációt heterozigóta formában hordozzák) között 40%, a heterozigótáké, akik másik hetes kromoszómájukon a CF valamelyik másik mutációját hordozzák, 23%, míg azoké, akik egyáltalán nem hordozzák a $\Delta F508$ mutációt, 37%. Ugyanezeket a

gyakorisági adatokat a teljes betegszámra vonatkoztatva, a $\Delta F508$ mutációt homozigóta formában hordozók gyakorisága 33%, a heterozigótáké 19%, a $\Delta F508$ mutációt nem hordozóké pedig 48%. (9.táblázat).

Ezek az általam számított gyakorisági adatok megfelelnek közép-európai elhelyezkedésünknek, és összhangban vannak a környezetünkben elhelyezkedő népeknek a $\Delta F508$ mutáció gyakoriságára vonatkozó adataival.

A CF kromoszómák száma			
532			
biztos diagnózisú CF betegek kromoszómainak száma		bizonytalan diagnózisú CF betegek kromoszómainak száma	
428		104	
ΔF508 mutációt hordozó	ΔF508 mutációt nem hordozó	ΔF508 mutációt hordozó	ΔF508 mutációt nem hordozó
178+44	44+162	6	98
ΔF508 mutációt hordozó kromoszómák gyakorisága a biztosan CF kromoszómák között			
52%			
ΔF508 mutációt hordozó kromoszómák gyakorisága az összes beteg kromoszómái között			
43%			

8. táblázat

Az összes beteg száma				
266				
biztos diagnózisú			bizonytalan diagnózisú	
214			52	
$\frac{\Delta F508}{\Delta F508}$	$\frac{nd}{nd}$	$\frac{\Delta F508}{nd}$	$\frac{\Delta F508}{nd}$	$\frac{nd}{nd}$
89	81	44	6	46
Gyakoriságuk a biztos diagnózisú CF betegek között				
40%	37%	23%		
Gyakoriságuk az összes beteg között				
33%	48%	19%		

9. táblázat

6.2. PRAENATALIS DIAGNOSZTIKA

Az elvégzett praenatalis diagnosztikai vizsgálatok eredményét, a szülők genotípusát a 10. táblázat tartalmazza. Látható, hogy az elvégzett 15 magzati vizsgálat közül három esetben diagnosztizáltam beteg magzatot. Az egyik házaspár a vizsgálat eredménye alapján megszakított terhesség után azóta újabb terhességre vállalkozott. A második terhességben elvégzett új vizsgálat azt mutatta, hogy ebben az esetben a $\Delta F508$ mutációt nem hordozó magzat fejlődik, így a szülők nyugodtan vállalhatják ennek a gyermeknek a megszületését. A 11. és a 12. ábrákon e családban a két különböző terhességből elvégzett praenatalis diagnosztikai vizsgálat eredménye látható. A másik házaspárnál előzőleg egy korábbi terhesség során már történt praenatalis diagnosztikai vizsgálat, amelynek eredménye alapján megszületett az egészséges gyermek. A második, beteg gyermek megszületését ők sem kívánták, ezért ez a terhesség is abortusszal végződött. A harmadik családban az első gyermek néhány hónapos korában halt meg anélkül, hogy nála mutációs vizsgálat történhetett volna. Ezután született két egészséges gyermek praenatalis diagnosztikai vizsgálat nélkül. A szülők és az egészséges gyermekek vizsgálata kimutatta, hogy a meghalt gyermek feltehetőleg homozigóta formában hordozta a $\Delta F508$ mutációt. A negyedik terhesség során már kérték a praenatalis vizsgálat elvégzését, amely eredménye szerint ez a magzat ismét homozigóta formában hordozta a $\Delta F508$ mutációt, tehát beteg volt. A szülők ezt a terhességet megszakították.

A 10. táblázat utolsó két sorában látható családokban a két szülő két különböző azonosított mutációt hordoz. Közülük az egyik család $\Delta F508$, illetve G542X mutációra vonatkozó vizsgálati eredményét mutatja a 13/a. és a 13/b. ábra. A beteg gyermek genotípusa $\Delta F508$ / G542X. Az apa hordozza a $\Delta F508$,

az anyja a G542X mutációt. Az egészséges testvér heterozigóta formában hordozza a G542X mutációt. A chorionboholyból izolált magzati DNS minta vizsgálatának eredménye szerint a magzat nem hordozza egyik mutációt sem.

A 10. táblázatból látható, hogy három olyan esetben is végeztem praenatalis vizsgálatot, ahol csak az egyik szülő mutációja volt ismert, ennek ellenére a szülők igényelték a vizsgálat elvégzését. Ezekben az esetekben a vizsgálat eredménye csak részben informatív, mivel csak akkor zárható ki a magzat betegsége, ha az nem hordozza a $\Delta F508$ mutációt. Az általam vizsgált három házaspár esetében szerencsésen zárult a vizsgálat, mert a magzat egyik esetben sem hordozta a $\Delta F508$ mutációt. Ez azt jelenti, hogy a magzat attól a szülőtől, aki az ismeretlen mutációt hordozza, örökölhette azt. Jelenlegi lehetőségeink szerint ennek kimutatására nincs módunk. Mivel azonban a $\Delta F508$ mutációt nem örökölte, legfeljebb hordozó lehet a cisztikus fibrózis szempontjából. (Természetesen nem zárható ki az új mutáció kialakulásának a lehetősége sem, de ez nem növeli a kockázatot olyan mértékben, hogy az indokolná a terhesség megszakítását.) Amennyiben a magzat diagnózisa az lett volna, hogy heterozigóta formában hordozza a $\Delta F508$ mutációt, csak annyiban jutottam volna közelebb a probléma megoldásához, hogy a beteg gyermek születésének klasszikus mendeli 25%-os kockázata 50 %-ra emelkedett volna.

A 12 praenatalisan vizsgált és megtartott magzat közül eddig hét született meg. Rajtuk elvégeztem a perifériás vérből mutáció kimutatására irányuló kontroll vizsgálatot, amely minden esetben megegyezett a magzati vizsgálat eredményével.

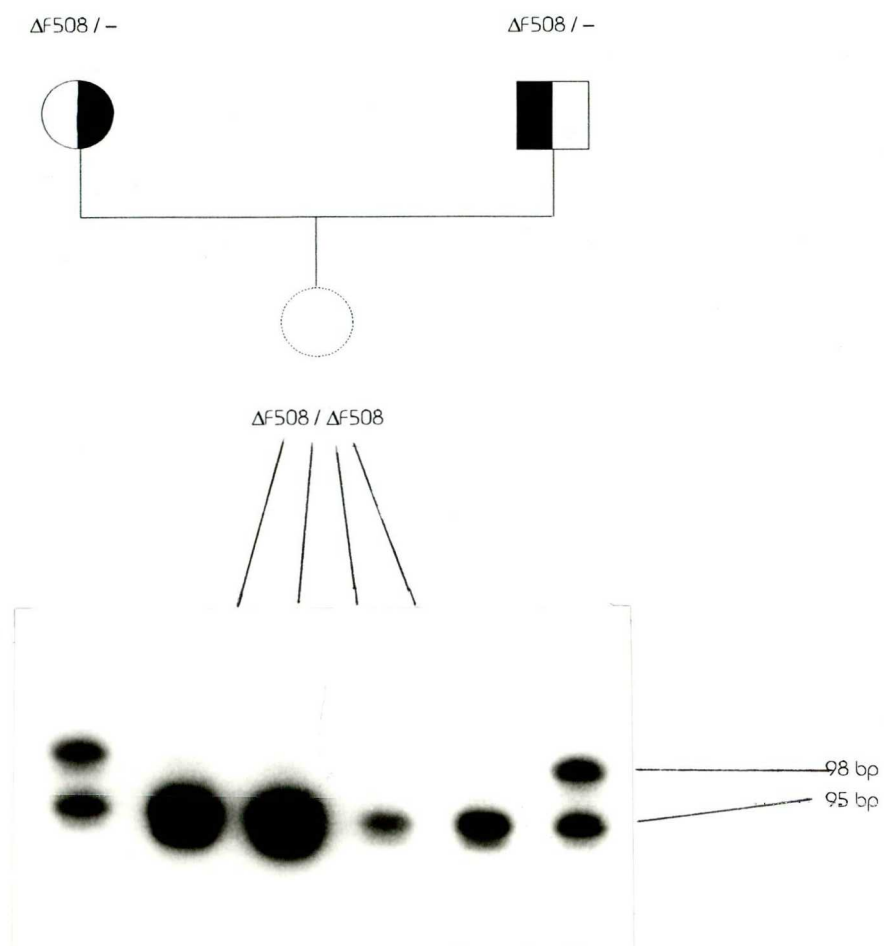
apa	anya	magzat	születés után végzett vizsg.
$\Delta F508 / -$	nd / -	$\Delta F508$ kizárva	$\Delta F508$ kizárva
$\Delta F508 / -$	$\Delta F508 / -$	- / -	- / -
nd / -	$\Delta F508 / -$	$\Delta F508$ kizárva	$\Delta F508$ kizárva
$\Delta F508 / -$	$\Delta F508 / -$	- / - $\Delta F508 / \Delta F508^{**}$	- / -
$\Delta F508 / -$	$\Delta F508 / -$	$\Delta F508 / \Delta F508^{**}$ - / -	- / -
$\Delta F508 / -$	$\Delta F508 / -$	$\Delta F508 / -$	$\Delta F508 / -$
$\Delta F508 / -$	$\Delta F508 / -$	- / -	- / -
$\Delta F508 / -$	$\Delta F508 / -$	- / -	*
$\Delta F508 / -$	nd / -	$\Delta F508$ kizárva	*
$\Delta F508 / -$	$\Delta F508 / -$	$\Delta F508 / -$	*
$\Delta F508 / -$	$\Delta F508 / -$	$\Delta F508 / \Delta F508^{**}$	
G542X / -	$\Delta F508 / -$	G542X / -	*
$\Delta F508 / -$	G542X / -	- / -	*

* még nem született meg

** megszokított terhesség

10. táblázat

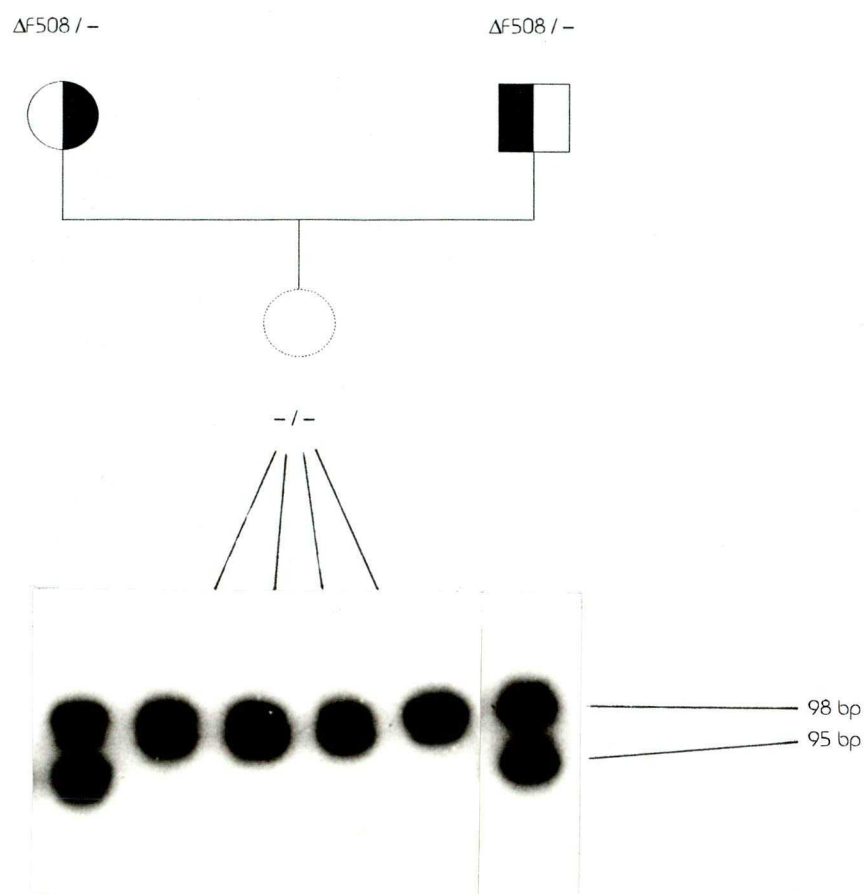
Az elvégzett praenatalis vizsgálatok



11. ábra

Praenatalis diagnosztikai vizsgálattal detektált beteg magzat

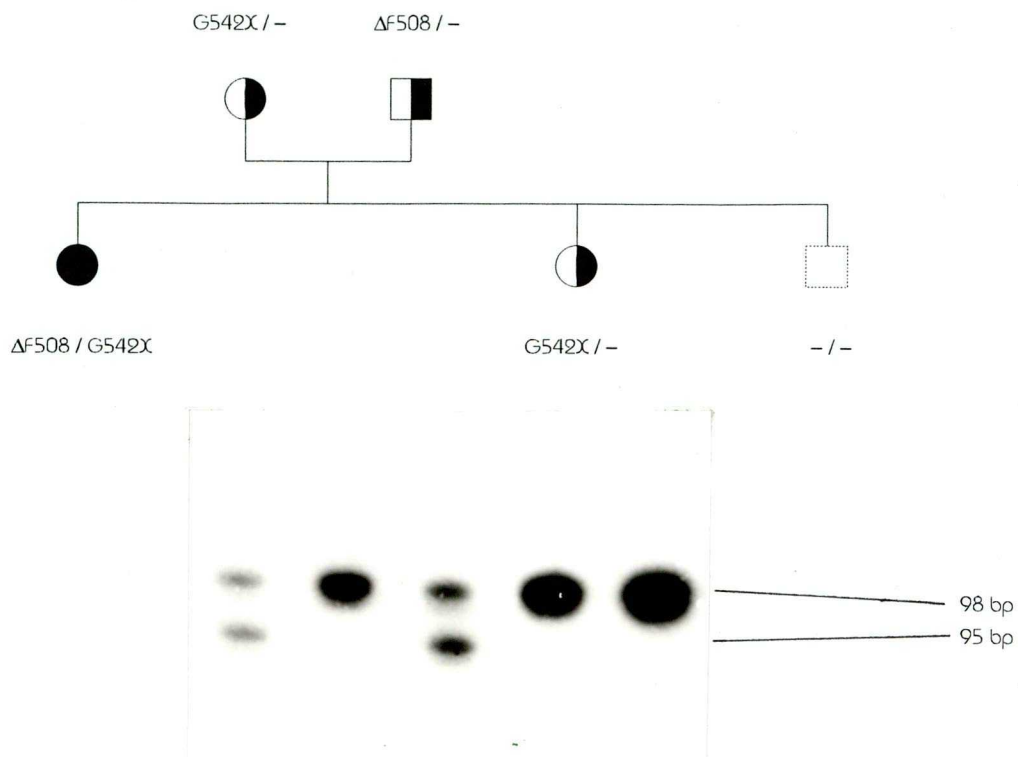
A magzat homozigóta formában hordozza a $\Delta F508$ mutációt



12. ábra

Praenatalis diagnosztikai vizsgálattal detektált egészséges magzat

A magzat nem hordozza a $\Delta F508$ mutációt



13/a. ábra

A $\Delta F508$ mutáció kimutatása



13/b. ábra

$G542X$ mutáció kimutatása



6.3. G542X, G551D, R553X, N1303K MUTÁCIÓK

Összesen 177 beteg vizsgálatát végeztem el a négy pontmutáció azonosítása céljából. 7 esetben találtam G542X mutációt, közülük 5 beteg másik mutációja $\Delta F508$ volt, a többieké továbbra is ismeretlen. A 4 azonosított R553X mutációt hordozó beteg közül 3 hordozta másik mutációként a $\Delta F508$ mutációt. Az N1303K mutációt 2 beteg hordozta. Közülük az egyik esetben azonosítottam a $\Delta F508$ mutációt másik mutációként. Az elvégzett vizsgálatok számát, az azonosított mutációkat, és az egyes mutációkat hordozó kromoszómáknak az összes, $\Delta F508$ mutációt nem hordozó CF kromoszómákra vonatkoztatott gyakoriságát mutatja be a 11. és a 12. táblázat.

Mivel ebben az esetben a teljes betegszám az összes betegre vonatkozik, tehát a bizonytalan diagnózisúakat is magában foglalja, a kiszámolt gyakorisági értékek az alsó határt jelentik, a valódi adatok ennél némileg magasabbak.

Említésre érdemes, hogy az egyik G542X mutációt heterozigóta formában olyan betegben azonosítottam, akinek a diagnózisa a klinikai tünetek alapján kétséges volt. A beteg másik mutációja továbbra is ismeretlen maradt, de a cisztikus fibrózis diagnózisát az enyhe klinikai tünetek és az azonosított mutáció együttesen már jobban megerősítik.

A pontmutációkra vizsgált betegek száma			
177			
G542X	G551D	R553X	N1303K
7	0	4	2

11. táblázat

A pontmutációkat hordozó kromoszómák gyakorisága az összes, $\Delta F508$ mutációt nem hordozó CF kromoszóma között			
G542X	G551D	R553X	N1303K
2%	–	1,1%	0,6%

12. táblázat

7. MEGBESZÉLÉS

A cisztikus fibrózist okozó leggyakoribb mutáció a $\Delta F508$ mutáció, amely néhány kivétellel minden eddig vizsgált populációban sokszorosán gyakoribb, mint bármely másik a meglehetősen nagy számú CF mutáció közül. Európai populációkban való gyakorisági vizsgálatai alapján jellegzetes, észak–déli irányú gyakoriság csökkenés figyelhető meg, melynek szélső értékeit Dániában, illetve Törökországban állapították meg (88%, 30%). Várhatóan, földrajzi helyzetünknek megfelelően, a magyarországi CF betegekben a $\Delta F508$ mutáció gyakorisága is átmenetet képez a két szélső érték között. Mindaddig azonban megfelelően nagy számú adat nem állt rendelkezésre ahhoz, hogy Magyarországon is megállapítható legyen ez a gyakorisági érték. Munkám során 266 beteg esetében végeztem el a $\Delta F508$ mutáció kimutatására szolgáló DNS vizsgálatot, és a kapott eredményekből 63%-os gyakoriságot számítottam ki a biztos diagnózisú betegekben a $\Delta F508$ mutációra nézve, mégpedig olyan megoszlásban, hogy a betegek 40%-a homozigóta formában hordozza a $\Delta F508$ mutációt, 23%-a pedig heterozigótaként. A teljes betegszámra vonatkoztatva a $\Delta F508$ mutáció gyakorisága 52% (33% + 19%). A CF kromoszómák között hasonló megfontolással 52%, illetve 43%-os gyakorisági határértékeket állapítottam meg a $\Delta F508$ mutációra vonatkozóan. Statisztikailag feltételezhető, hogy a bizonytalan diagnózisúak egy része valóban CF beteg, másik részük azonban nem az. Ennek megfelelően a valódi mutációs gyakoriság e két határérték között helyezkedik el. Ezek az adatok összhangban vannak közép-európai elhelyezkedésünkkel, és beleillenek a környező országok által közölt gyakorisági adatok közé. Ezen érték meghatározásával olyan hiányt pótoltam, amely az európai országok közül már szinte mindegyikben ismert volt,

Magyarországon azonban még nem. Eddig a saját anyagomhoz hasonló magas esetszámú vizsgálatot Magyarországról nem közöltek.

A jövő megoldásra váró feladatai közé tartozik annak a látszólagos ellentmondásnak a feloldása, hogy a 20–25 év körüli korosztályban meglehetősen magas számban vannak olyanok, akik egészen enyhe klinikai tüneteket mutatnak. A mutáció analízis ugyanakkor azt igazolta, hogy az általában legsúlyosabb klinikai képpel járó $\Delta F508$ mutációt homozigóta formában hordozzák. Talán egy másik mutáció áll a háttérben, amely valamiképpen kompenzálja a $\Delta F508$ mutáció hatását, de ez egyelőre csak elméleti feltételezés.

A négy – a közlemények alapján a $\Delta F508$ mutáció utáni leggyakoribb mutációk között levő – pontmutáció vizsgálatával megállapítottam, hogy azok gyakorisága nem tér el szignifikánsan az irodalomból megismert adatokhoz képest, vagyis gyakoriságuk nem éri el még az öt százalékot sem. Ez azt jelenti, hogy ezek között a mutációk között nincs olyan, amely a magyar populációra jellemző lenne, az átlagosnál nagyobb gyakoriságával kitűnne a környező országok közül. A vizsgálatot minden olyan CF beteg DNS mintájából elvégeztem, aki egyáltalán nem, vagy csak heterozigóta formában hordozta a $\Delta F508$ mutációt. Ez összesen 177 vizsgálatot jelent mind a négy mutációra nézve, amelyek eredményéből kiszámíthatók az egyes mutációk gyakorisági adatai a magyar populációban. A 7 azonosított G542X mutáció így 2%-os, a 4 R553X mutáció 1,1%-os, a 2 betegben kimutatott N1303K mutáció pedig 0,6%-os gyakorisági értéket jelent. G551D mutációt az általam vizsgált betegek egyikében sem sikerült azonosítani.

A mutációelemzésen alapuló praenatalis diagnosztikai vizsgálatok alapfeltétele a szülők mutációinak ismerete. Amennyiben mindkét szülő mutációja azonosított, nagy biztonsággal állapíthatjuk meg, hogy a magzat beteg vagy egészséges-e. Ha azonban az egyik szülő mutációja nem ismert, a magzati diagnosztikai vizsgálat csak részben ad informatív eredményt. Abban az esetben ugyanis, ha a magzat nem hordozza az egyik szülőben azonosított mutációt, akkor állíthatjuk, hogy nem lesz beteg, de arra vonatkozóan nem tudunk információt adni, hogy hordozója lesz-e a másik szülő mutációjának. Ha viszont a magzatban megtalálható az azonosított mutáció, akkor 50–50% eséllyel lesz a gyermek beteg, illetve egészséges hordozó. A mutáció analízis ebben az esetben nem alkalmas diagnózis felállítására a magzatra vonatkozóan. 15 esetben végeztem praenatalis diagnosztikai vizsgálatot. Két házaspár vette igénybe kétszer a magzati vizsgálat lehetőségét. Az egyik házaspár esetében az első praenatalis vizsgálat eredménye szerint a magzat homozigóta formában hordozta a $\Delta F508$ mutációt. A szülők a diagnózis ismeretében ezt a terhességet megszakították. Az újabb terhességben ismét igénybe vették a praenatalis diagnosztikai vizsgálatot, és az újabb elemzés eredménye szerint ez a magzat egyáltalán nem hordozta a $\Delta F508$ mutációt még heterozigóta formában sem. A másik házaspár első gyermeke egészségesnek bizonyult, a második terhességben azonban a $\Delta F508$ mutációt homozigóta formában hordozó beteg magzat fejlődött, akinek megszületését a szülők a vizsgálat eredménye alapján nem vállalták. Ezen kívül még egy harmadik családban találtam beteg magzatot. Ezt a terhességet a szülők szintén megszakították. A többi család mindegyikében CF szempontjából egészséges magzatot diagnosztizáltam, így a szülők ezen terhességek folytatását vállalták. Hét gyermek született meg a vizsgálatok elkezdése óta. Az elvégzett születés utáni kontroll vizsgálat eredménye minden esetben megegyezett a praenatalis diagnosztikai vizsgálat eredményével.

A betegek egészséges testvéreinek, valamint a másod-, illetve többedfokú rokonok heterozigóta szűrésének is óriási jelentősége van. A heterozigótaság tényének megállapítása esetén ugyanis az átlagos $1/2500$ születési kockázathoz képest az ő házasságukban $1/100$ a valószínűsége annak, hogy a születendő gyermek CF beteg lesz. Ha azonban annak ismeretében, hogy ő a cisztikus fibrózis egyik mutációját hordozza, leendő házastársa is igénybe veszi a mutációs vizsgálatot, ez a kockázat az esetek egy részében jelentősen csökkenthető. Ha ugyanis a leendő társban is azonosítható valamelyik CF mutáció, akkor a bekövetkező terhesség esetén praenatalis diagnosztikai vizsgálattal már az első beteg magzat is detektálható, és a szülők döntése alapján a terhesség megszakítható. Ha a leendő házastársban nem sikerül CF mutációt azonosítani, akkor is elvégezhető a magzati vizsgálat, de ilyen esetben csak részben ad informatív eredményt. Ha a magzataból kimutatható az a mutáció, amelyre a CF hordozó házastárs heterozigóta, akkor a magzat $1/50$ eséllyel lesz CF beteg. Amennyiben viszont az adott mutáció kizárható a magzataból, akkor mondhatjuk, hogy a magzat nem lesz CF beteg, de nem zárhatjuk ki a heterozigóta hordozótság lehetőségét.

A közvetlen mutáció analízis használhatóságát összehasonlítva a haplotípus analízis (RFLP vizsgálat) használhatóságával, látható, hogy azokban az esetekben, amikor a beteg vizsgálati anyaga (DNS / vérminta) már nem áll a rendelkezésünkre, a mutáció elemzés az egyetlen lehetséges vizsgálati mód. Mivel ebben az esetben közvetlenül a mutációt mutatjuk ki, a vizsgálat kivitelezéséhez elegendő a szülők DNS mintája. Az RFLP vizsgálat nem magát a mutációt mutatja ki közvetlenül, hanem a mutációnak a kapcsoltságát használja ki az egyébként normális, betegséget nem okozó, minden emberben meglévő DNS polimorfizmus egyes formáival. Ez azonban csak abban az esetben vezethet

eredményre, ha a család különböző tagjaiban ez a polimorfizmus megtalálható, és informatív. Ebből következően a vizsgálat elvégzésének alapfeltétele az, hogy a beteg és mindkét szülő DNS mintája rendelkezésre álljon, hiszen eredményt csak ezen minták párhuzamos vizsgálatának értékelése adhat. Ez a CF családoknál – sajnos – a beteg gyermek korábbi elvesztése miatt gyakran nem valósítható meg.

Ugyanakkor vizsgálataim szerint az esetek 37%-ában a betegekből egyik CF mutációt sem sikerült kimutatni. A lehetséges mutációk rendkívül nagy száma miatt teljes mutáció elemzésre nem számíthatunk, így ezeknél a betegeknél jelen lehetőségeink szerint egyetlen vizsgálati mód az indirekt haplotípus analízis marad. Hasonlóan, praenatalis diagnosztikai vizsgálat abban az esetben, amikor mindkét szülő mutációja azonosítatlan, vagy csak az egyiké, de a magzat hordozza azt, csak indirekt úton, haplotípus elemzéssel végezhető el, amennyiben a család informatív valamelyik DNS markerre, és a beteg gyermek DNS mintája elérhető.

Természetesen a cisztikus fibrózis végleges leküzdéséig, a génterápia bevezetéséig még rengeteg feladat áll előttünk. Újabb, az eddiginél gyorsabb módszerek bevezetésével még több mutáció kimutatása válik egyetlen vizsgálat végrehajtásával lehetővé (Cuppens és mtsai., 1992). Ez lehetőséget ad arra, hogy a betegek minél nagyobb részénél teljessé tegyük a mutációs diagnosztikai vizsgálatot, és ennek segítségével egyre több családnak biztosíthassuk az egészséges gyermek vállalásának megnyugtató érzését.

IRODALOM

Andersen D. H. (1938):

Cystic Fibrosis of the Pancreas and its relation to Coeliac Disease, a clinical and pathological study

A. J. Dis. Child 56: 344.

Angliani F., Camporese C., Picci L., Greggio N. A., Barbato A., Zacchello F. (1990):

Cystic fibrosis genetics in Southern Europe

Lancet 336: 379–380.

Ballabio A., Gibbs R. A., Caskey C. T. (1990):

PCR test for cystic fibrosis deletion

Nature 343: 220.

Bal J., Maciejko D., Mazurczak T. (1991):

Frequency of the cystic fibrosis mutation $\Delta F508$ in Poland

Hum. Genet. 86: 329.

Baranov V. S., Ivaschenko T. E., Gorbunova V. N. (1991):

Frequency of the $\Delta F508$ deletion in cystic fibrosis patients from the European part of the USSR

Hum. Genet. 87: 61–64.

Beaudet A. L. (1990):

Invited editorial: Carrier screening for cystic fibrosis

Am. J. Hum. Genet. 47: 603–605.

Blesecker L., Bowles-Blesecker B., Collins F. S., Kaback M., Wilfond B. (1992):

General population screening for cystic fibrosis is premature

Am J. Hum. Genet. 50: 438–439.

Boat T. F., Welsh M. J., Beaudet A. L. (1989):

Cystic fibrosis. In: The metabolic basis of inherited disease, Scriver L. C., Beaudet

A. L., Sly W. S., Valle D. Eds., 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2649–2680.

Bowling F. G., McGill J. J., Shepherd R. W., Danks D. M. (1990):

Screening for cystic fibrosis: use of $\Delta F508$ mutation

Lancet 335: 925–926.

CF Genetic Analysis Consortium (1990):

Worldwide survey of the $\Delta F508$ mutation – Report from the Cystic Fibrosis Genetic

Analysis Consortium

Am. J. Hum. Genet. 47: 354–359.

CF Genetic Analysis Consortium (1993):

Cystic fibrosis mutation data

Cohen L.F., DiSant'Agnese P. A., Friedlander J. (1980):

Cystic fibrosis and pregnancy: a national survey

Lancet ii: 842–844.

Collins F. S. (1992):

Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications

Science, 256: 774–779.

Colten H. R. (1990):

Screening for cystic fibrosis: public policy and personal choices

New Engl. J. Med. 322: 328–329.

Cuppens H., Buysse I., Baens M., Marynen P., Cassiman J.-J. (1992):

Simultaneous screening for 11 mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by multiplex amplification and reverse dot- blot

Molecular and Cellular Probes 6: 33–39.

Cutting G. R., Kasch L. M., Rosenstein B. J., Zielenski J., Tsui L.-C., Antonarakis S. E., Kazazian Jr. H. H. (1990/1):

A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein

Nature 346: 366–369.

Cutting G. R., Kasch L. M., Rosenstein B. J., Tsui L.-C., Kazazian H. H., Antonarakis S. E. (1990/2):

Two patients with cystic fibrosis, nonsense mutations in each cystic fibrosis gene, and mild pulmonary disease

New Eng. J. Med. 323: 1685–1689.

Dalemans W., Barbry P., Champigny G., Jallat S., Dott K., Dreyer D., Crystal R. G., Pavirani A., Lecocq J. P., Lazdunski M. (1991):

Altered chloride ion channel kinetics associated with delta F508 cystic fibrosis mutation

Nature 354: 526–528.

Dean M., White M. B., Amos J., Gerrard B., Stewart C., Khaw K.-T., Leppert M. (1990):

Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients

Cell 61: 863–870.

Denning G. M., Ostegaard L. S., Welsh M. J. (1992):

Abnormal localization of cystic fibrosis transmembrane regulator in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelia

J. Cell. Biol. 118: 551–559.

Devoto M., Ronchetto P., Fanen P., Telleria Orriols J. J., Romep G., Goossens M., Ferrari M., Magnani C., Seia M., Cremonesi L. (1991):

Screening for non- Δ F508 mutations in five exons of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene in Italy

Am. J. Hum. Genet. 48: 1127–1132.

DiSant'Agnese P. A. et al. (1953):

Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas

Pediatrics 12: 549–552.

Editorials (1990):

Cystic fibrosis: prospects for screening and therapy

Lancet 335: 79–80.

Erlach H. A. (1989):

PCR technology

Stockton Press, New York

Estivill X., Casals T., Morral N., Chillón M., Bosch A., Nunes V., Gasparini P., Seia A., Pignatti P. F., Novelli G., Dallapiccola B., Fernández E., Benítez J., Williamson R. (1989):

$\Delta F508$ gene deletion in cystic fibrosis in Southern Europe

Lancet 2: 1404.

European Working Group on Cystic Fibrosis Genetics (1990):

Population analysis of the major mutation in cystic fibrosis

Hum. Genet. 85: 391–445.

Fanconi G., Urlinger E., Knauer C. (1936):

Das Coeliak Syndrome bei angeborener zystischer Pancreasfibromatose und Bronchiektasien

Wien. Med. Wochenschr. 86: 753.

Fekete Gy. (1992):

Molekuláris genetikai diagnosztika egyes gyermekgyógyászati kórképekben

Doktori Értekezés, Budapest

Fekete Gy., Váradi A., Pipiras É., Németh K., Réthy L. A., Holics K., Ujhelyi R. (1992):

A $\Delta F508$ mutáció kimutatása cystikus fibrosisban

Orvosi Hetilap 133: 2423–2429.

Férec C., Audrézet M. P., Mercier B., Guillermit H., Quéré I., Verlihue C., Jehanne M., Le Fur J. M., Parent P., Rault G., Moullier P. (1992):

Detection of over 98% cystic fibrosis mutations in a Celtic population

Ped. Pulm. Suppl. 8: 242–243.

Gasparini P., Nunes V., Savola A., Dognini M., Morral N., Gaona A., Bonizzato A., Chillon M., Sangiulio F., Novelli G., Dallapiccola B., Pignatti P. F., Estivill X. (1991):

The search for South European cystic fibrosis mutations: Identification of two new mutations, four variants, and intronic sequences

Genomics 10: 193–200.

Gilbert F. (1990):

Is population screening for cystic fibrosis appropriate now?

Am. J. Hum. Genet. 46: 394–395.

Gyurkovits K. (1991):

Mucoviscidosis

Medicina Könyvkiadó, Budapest

Haliassos A., Chomel J. C., Tesson L., Baudis M., Kruh J., Kaplan J. C., Kitzis A. (1989):

Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations

Nucleic Acid Res. 17: 3606.

Handyside A. H., Lesko J. G., Tarin J. J., Winston R. M. L., Hughes M. R. (1992):
Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic
testing for cystic fibrosis
New Engl. J. Med. 327: 905–909.

Heely A. (1983):
Screening for cystic fibrosis
J. Paediatrics 103: 836.

Hundrieser J., Bremer S., Peinemann F., Stuhmann M., Hoffknecht N., Wulf B.,
Schmidtke J., Reiss J., Maas G., Tümmler B. (1990):
Frequency of the $\Delta F508$ deletion in the CFTR gene in Turkish cystic fibrosis
patients
Hum. Genet. 85: 409–410.

Ianuzzi M. C., Collins F. S. (1990):
Reverse genetics and cystic fibrosis
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2: 309–316.

Isolauri, J., Uitti J., Visakorpi J K. (1979):
Screening of cystic fibrosis in newborn
Duodecim 95: 16–19.

Kaplan E., Schwachman H., Perlmutter A. D., Rule A., Khaw K.-T., Holsclaw D. S.
(1968):
Reproductive failure in males with cystic fibrosis
New Eng. J. Med. 279: 65–69.

Kartner N., Augustinas O., Jensen T. J., Naismith A. L., Riordan J. R. (1992):

Mislocalization of $\Delta F508$ CFTR in cystic fibrosis sweat gland

Nature Genet. 1: 321–327.

Kazy Z., Rozovsky I. S., Bakharev V. A. (1982):

Chorion biopsy in early pregnancy: A method of early prenatal diagnosis for inherited disorders

Prenat. Diagn. 2: 39–45.

Kere J., Norio R., Savilahti E. (1989):

Cystic fibrosis in Finland: a molecular and genealogical study

Hum. Genet. 83: 20–25.

Kerem B.-S., Rommens J. M., Buchanan J. A., Markiewicz D., Cox T. K., Chakravarti

A., Buchwald M., Tsui L.-C. (1989):

Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis

Science 245: 1073–1080.

Kerem B.-S., Zielenski J., Markiewicz D., Bozon D., Gazit E., Yahav J., Kennedy

D., Riordan J. R., Collins F. S., Rommens J. M., Tsui L.-C. (1990):

Identification of mutations in regions corresponding to the two putative nucleotide (ATP)–binding folds of the cystic fibrosis gene

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8447–8451.

Kulczycki L., Schauf V. (1974):

Cystic Fibrosis in Blacks in Washington, D.C.: incidence and characteristics

Am. J. Dis. Child 127: 64.

Lemna W. K., Feldman G. L., Kerem B.-S., Fernbach S. D., Zevkovich E. P., O'Brian W. E., Riordan J. R., Collins F. S., Tsui L.-C., Beaudet A. L. (1990):

Mutation analysis for heterozygote detection and the prenatal diagnosis of cystic fibrosis

New Engl. J. Med. 322: 291–296.

Madisen I., Hoar D. I., Holroyd C. D., Crisp M., Hodes M. E. (1987):

DNA banking: The effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA

Am. J. Med. Genet. 27: 379–390.

Mckusick V. A. (1991):

Mendelian inheritance in man, 10th Edition

The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 1992.

Mercier B., Gaucher C., Feugeas O., Mazurier C. (1990):

Direct PCR from whole blood, without DNA extraction

Nucleic Acid Research. 18: 5908.

Németi M., Bolodár A., Papp Z. (1990):

A cysticus fibrosis DNS analízisen alapuló praenatalis diagnosztikája

Orvosi Hetilap 131: 2421–2426.

Németi M., Louie E., Papp Z., Johnson J. P. (1991):

Molecular analysis of cystic fibrosis in the Hungarian population

Hum. Genet. 87: 511–512.

Németi M., Johnson J. P., Louie E. (1992):

The occurrence of various non- $\Delta F508$ CFTR gene mutations among Hungarian cystic fibrosis patients

Hum. Genet. 89: 245–246.

Németi M., Papp Cs. Tóth-Pál E., Papp Z. (1992):

A cysticus fibrosis praenatalis diagnosztikája mutáció analízissel

Orvosi Hetilap 133: 1433–1435.

Osborne L., Knight R. A., Santis G., Hodson M. (1991):

A mutation in the second nucleotide binding fold of the cystic fibrosis gene

Am. J. Hum. Genet. 48: 608–612.

Papp Z. (1986):

Szülészeti genetika

Medicina Könyvkiadó, Budapest

Perl A., Fehér J. (1990):

Polimeráz láncreakció alkalmazása a klinikai diagnosztikában

Orvosi Hetilap 131: 671–675.

Riordan J. R., Rommens J. M., Kerem B.-S., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., 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: 1066–1073.

Rommens J. M., Ianuzzi M. C., Kerem B.-S., 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 the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping
Science 245: 1059–1065.

Rubin E. M., Andrews K. A., Kan Y. W. (1989):

Newborn screening by DNA analysis of dried blood spots
Hum. Genet. 82: 134–136.

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: 487–491.

Saiki R. K., Gelfand D. H. (1989):

Introducing ampliTag DNA polymerase
Amplifications 1: 4–6.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. I. (1989)

Molecular cloning; a laboratory manual
Cold Spring Harbor Press

Schwartz M., Johansen H. K., Koch C., Brandt N. J. (1990):

Frequency of the $\Delta F508$ mutation on cystic fibrosis chromosomes in Denmark
Hum. Genet. 85: 427–428.

Schwartz E. I., Khalchitsky S. E., Eisensmith R. C. (1990):

Polymerase chain reaction amplification from dried blood spots on Guthrie cards
Lancet 336: 639–640.

Scott C., Kogan and Jane Gitschier (1990):

Genetic Prediction of Hemophilia A

PCR Protocols

Edited by Michael A. Innis, David H. Gelfand, John J. Sninsky, Thomas J. White

Academic Press, Inc.

Shoshani T., Augarten A., Gazit E., Boshan N., Yahav Y., Rivlin Y., Tal A., Seret H.,

Yaar L., Kerem E., Kerem B.–S. (1991):

Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the
Ashkenazi Jewish cystic fibrosis in Israel, with presentation of severe disease
Am. J. Hum. Genet. 50: 222–228.

Taylor G. R., Noble J. S., Hall J. L., Quirke P., Stewart A. D., Mueller R. F. (1989):

Rapid screening for $\Delta F508$ deletion in cystic fibrosis
Lancet ii: 1345.

Teem J. L., Berger H. A., Ostegaard L. S., Rich D. P., Tsui L.–S., Welsh M. J.
(1993):

Identification of revertants for the cystic fibrosis $\Delta F508$ mutation using STE6–CFTR
chimeras in yeast
Cell 73: 335–346.

Wainwright B. J., Scambler P. J., Schmidtke J., Watson E. A., Law H.-Y., Farrall M., Cooke H. J., Eiberg H., Williamson R. (1985):

Localisation of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22

Nature 318: 384–385.

Williams C., Weber L., Williamson R., Coutelle C. (1988):

Guthrie spots for DNA-based carrier testing in cystic fibrosis

Lancet 2: 693.

Zielenski J., Bozon D., Kerem B.-S., Markiewicz D., Durie P., Rommens J. M., Tsui L.-C. (1991):

Identification of mutations in exon 1 through 8 of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance (CFTR) gene

Genomics 10: 229–235.