

**Μοριακή μελέτη και πρόληψη
κυστικής ίνωσης
στον ελληνικό πληθυσμό**

ΣΚΟΠΟΣ Έγινε χαρακτηρισμός του φάσματος και της συχνότητας των μεταλλάξεων στους Έλληνες ασθενείς με κυστική ίνωση (ΚΙ) και στις μονοσυμπτωματικές μορφές της νόσου, με σκοπό το σχεδιασμό προγραμμάτων πρόληψης για τον εντοπισμό των φορέων και την παροχή προγεννητικής διάγνωσης. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Η μέθοδος (DGGE) χρησιμοποιήθηκε για ανίχνευση μεταλλάξεων στα 27 εξόνια του γονιδίου *CFTR* σε 500 ασθενείς με κλασική μορφή της νόσου και σε 134 άνδρες με στειρότητα (μονοσυμπτωματική μορφή ΚΙ). Χρησιμοποιώντας την ίδια μεθοδολογία εφαρμόστηκε πιλοτικό πρόγραμμα εντοπισμού φορέων σε 900 άτομα. Προγεννητική διάγνωση (ΠΔ) πραγματοποιήθηκε σε 167 κυήσεις, 110 από τις οποίες εμφάνισαν υπερηχογένεια εντέρου στο έμβρυο κατά το 2ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Χαρακτηρίστηκαν συνολικά 83 μεταλλάξεις στους ασθενείς με ΚΙ, που καλύπτουν το 92% των χρωμοσωμάτων. Έλεγχος μονοσυμπτωματικών μορφών της νόσου έδειξε ότι το 83,3% των ανδρών με αμφοτερόπλευρη έλλειψη σπερματικού πόρου (CBAVD), 27,5% των ανδρών με αποφρακτική αζωοσπερμία (ΟΑ) και 13% των ανδρών με ολιγοσπερμία ήταν φορείς μίας μετάλλαξης ή διπλοί ετεροζυγώτες. Το πρόγραμμα ανίχνευσης φορέων εντόπισε 188 φορείς, η πλειονότητα των οποίων προερχόταν από το συγγενικό περιβάλλον των ασθενών, καθώς και 6 ζευγάρια που χρειάστηκαν ΠΔ. Από τις 167 προγεννητικές διαγνώσεις εντοπίστηκαν 41 πάσχοντα, 80 ετερόζυγα και 46 φυσιολογικά έμβρυα. Από τα έμβρυα με υπερηχογένεια εντέρου βρέθηκαν 15 ετεροζυγώτες και 4 ομοζυγώτες. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Στην Ελλάδα και την περιοχή της Μεσογείου παρουσιάζεται η μεγαλύτερη ποικιλομορφία μεταλλάξεων, δημιουργώντας ιδιαίτερα προβλήματα στη μοριακή γενετική διάγνωση των ασθενών με ΚΙ. Ο έλεγχος με μοριακές τεχνικές θα πρέπει να καλύπτει τουλάχιστον 86% των αλληλομόρφων ΚΙ στο συγκεκριμένο πληθυσμό, προκειμένου να μπορεί να εφαρμοστεί αποτελεσματικά πρόγραμμα πρόληψης της νόσου.

Η κυστική ίνωση (ΚΙ) (cystic fibrosis, CF: OMIM 219700, *CFTR*: OMIM 602421) είναι το συχνότερο κληρονομικό νόσημα στη λευκή φυλή (1 σε 2500 γεννήσεις) και κληρονομείται με υπολειπόμενο σωματικό χαρακτήρα με συχνότητα φορέων ~4%.¹⁻⁴ Ο μέσος χρόνος ηλικίας διάγνωσης είναι 7 μηνών και σε περίπου 60% των πασχόντων η διάγνωση τίθεται μέχρι τον πρώτο χρόνο ζωής. Χωρίς θεραπευτική αντιμετώπιση, η ΚΙ καταλήγει σε θάνατο κατά τη νεογνική και παιδική περίοδο. Νέα θεραπευτικά πρωτόκολλα έχουν αυξήσει το μέσο όρο ζωής στα 30 χρόνια, όμως οι ασθενείς εξακολουθούν να αντιμετωπίζουν σοβαρό πρόβλημα υγείας λόγω της δημιουργίας παχύρρευστης βλέννης και συ-

χνών αναπνευστικών λοιμώξεων, που οδηγούν σε αποφρακτική πνευμονοπάθεια.¹ Οι άνδρες ασθενείς παρουσιάζουν στειρότητα σε ποσοστό >96% λόγω έλλειψης σπερματικού πόρου, ενώ το 85% των ασθενών έχει παγκρεατική ανεπάρκεια. Υπάρχει σημαντική ετερογένεια στον κλινικό φαινότυπο της νόσου, με μερικούς ασθενείς να μην παρουσιάζουν συμπτώματα μέχρι την ενήλικη ζωή. Άτυπες μορφές της νόσου περιλαμβάνουν την ανδρική στειρότητα λόγω αμφοτερόπλευρης έλλειψης σπερματικού πόρου, τη χρονία παγκρεατίτιδα, ορισμένες μορφές βρογχεκτασιών, την ασθματική βρογχίτιδα και χρόνιες πνευμονοπάθειες αδιευκρίνιστης αιτιολογίας. Η αυξημένη συγκέντρωση άλατος (NaCl), >60 mEq/L,

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2006, 23(5):455-472
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2006, 23(5):455-472

**Ε. Καναβάκης,
Μ. Τζέτη**

*Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής,
Νοσοκομείο Παιδών «Αγία Σοφία»,
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Αθήνα*

Screening for cystic fibrosis mutations: Methods for molecular diagnosis, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals – the Greek experience

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Ανδρική στειρότητα
Κυστική ίνωση
Μονοσυμπτωματικές μορφές κυστικής ίνωσης
Μοριακή γενετική ανάλυση
Υπερηχογένεια εντέρου

*Υποβλήθηκε 21.10.2005
Εγκρίθηκε 28.11.2005*

στον ιδρώτα των ασθενών αποτελεί το κυριότερο διαγνωστικό μέσο.

Η ΚΙ κληρονομείται με υπολειπόμενο σωματικό χαρακτήρα και πάσχοντα άτομα κληρονομούν ένα παθολογικό αλληλόμορφο από κάθε γονέα. Επομένως, όταν και τα δύο μέλη του ζευγαριού είναι φορείς έχουν πιθανότητα 25% να αποκτήσουν παιδί με νόσο σε κάθε εγκυμοσύνη. Τα υγιή αδέρφια του πάσχοντος, έχουν 2/3 πιθανότητα να είναι φορείς, ενώ συγγενείς δεύτερου και τρίτου βαθμού έχουν 50% και 25%, αντίστοιχα, κίνδυνο να είναι φορείς.

Το υπεύθυνο για τη νόσο γονίδιο εντοπίστηκε το 1986 σε τμήμα του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 7 (7q31.2). Η απομόνωση και η λεπτομερής ανάλυση του γονιδίου, 3 χρόνια αργότερα (1989), απέδειξε ότι πρόκειται για γονίδιο σχετικά μεγάλου μεγέθους (230 kb), που περιλαμβάνει 27 κωδικοποιούσες περιοχές (εξόνια) και παράγει mRNA μεγέθους 6,5 kb.²⁻⁴

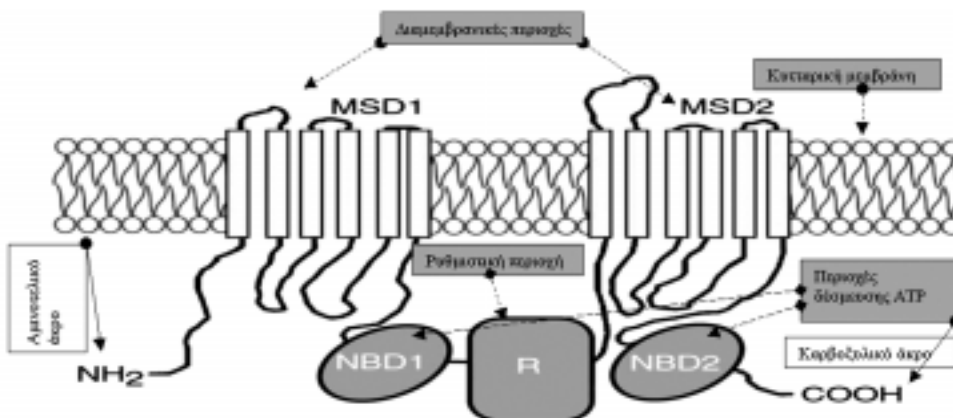
Το πολυπεπτιδικό παράγωγο του γονιδίου ονομάζεται «ρυθμιστής διαμεμβρανικής διακίνησης ιόντων» (CFTR, cystic fibrosis transmembrane regulator) και αποτελείται από 1480 αμινοξέα. Σχηματίζεται από δύο επαναλαμβανόμενα τμήματα, που το καθένα περιλαμβάνει μία διαμεμβρανική περιοχή (TMD1 και TMD2) με 6 διαμεμβρανικά ελικοειδή τμήματα και μία περιοχή δέσμωσης ATP (NBD1 και NBD2). Τα δύο αυτά τμήματα ενώνονται διαμέσου της ρυθμιστικής περιοχής (R) (εικ. 1). Η πρωτεΐνη που βρίσκεται στο πάνω τμήμα της μεμβράνης των αναπνευστικών και εκκριτικών επιθηλιακών κυττάρων παρουσιάζει ποικίλες δραστηριότητες, η κυριότερη των οποίων είναι ότι αποτελεί κανάλι Cl⁻ που ενεργοποιείται με την παρουσία cAMP.⁵ Έχουν διατυπωθεί υποθέσεις ότι η πρωτεΐνη CFTR ρυθμίζει τη λειτουργία και άλλων επιθηλιακών αγωγών (ORCC: outward rectifying chloride channel, ENaC: epithelial sodium channel)

και επίσης διευκολύνει ή συμβάλλει στη μεταφορά HCO₃⁻ με την απελευθέρωση ATP.

Η κανονική παγκρεατική λειτουργία βασίζεται στη σωστή λειτουργία της πρωτεΐνης CFTR, η οποία συμβάλλει στην αραίωση και το αλκαλικό pH του παγκρεατικού υγρού, εμποδίζοντας έτσι την απόφραξη των μικρών παγκρεατικών διόδων. Μειωμένη λειτουργικότητα της CFTR συμβάλλει στην απόφραξη των παγκρεατικών πόρων και στην ιδιοπαθή παγκρεατίτιδα.⁶

Με τη λεπτομερή ανάλυση DNA ασθενών με ΚΙ έχουν ανιχνευτεί μέχρι σήμερα >1000 μεταλλάξεις (cystic fibrosis genetic analysis consortium: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>),⁷ η πλειονότητα των οποίων θεωρούνται παθολογικές και παρουσιάζουν συχνότητα που διαφέρει γεωγραφικά και πληθυσμιακά.² Συνολικά, 6 μεταλλάξεις, συμπεριλαμβανομένης της συχνότερης F508del, έχουν εντοπιστεί σε όλες τις πληθυσμιακές ομάδες. Η F508del χαρακτηρίζεται από έλλειμμα του αμινοξέος φαινυλαλανίνη στο κωδικόνιο 508 της πρωτεΐνης. Η συχνότητά της ανέρχεται στο 70% στο βορειο-ευρωπαϊκό χώρο και 30-50% στη νότια Ευρώπη (εικ. 2).⁸

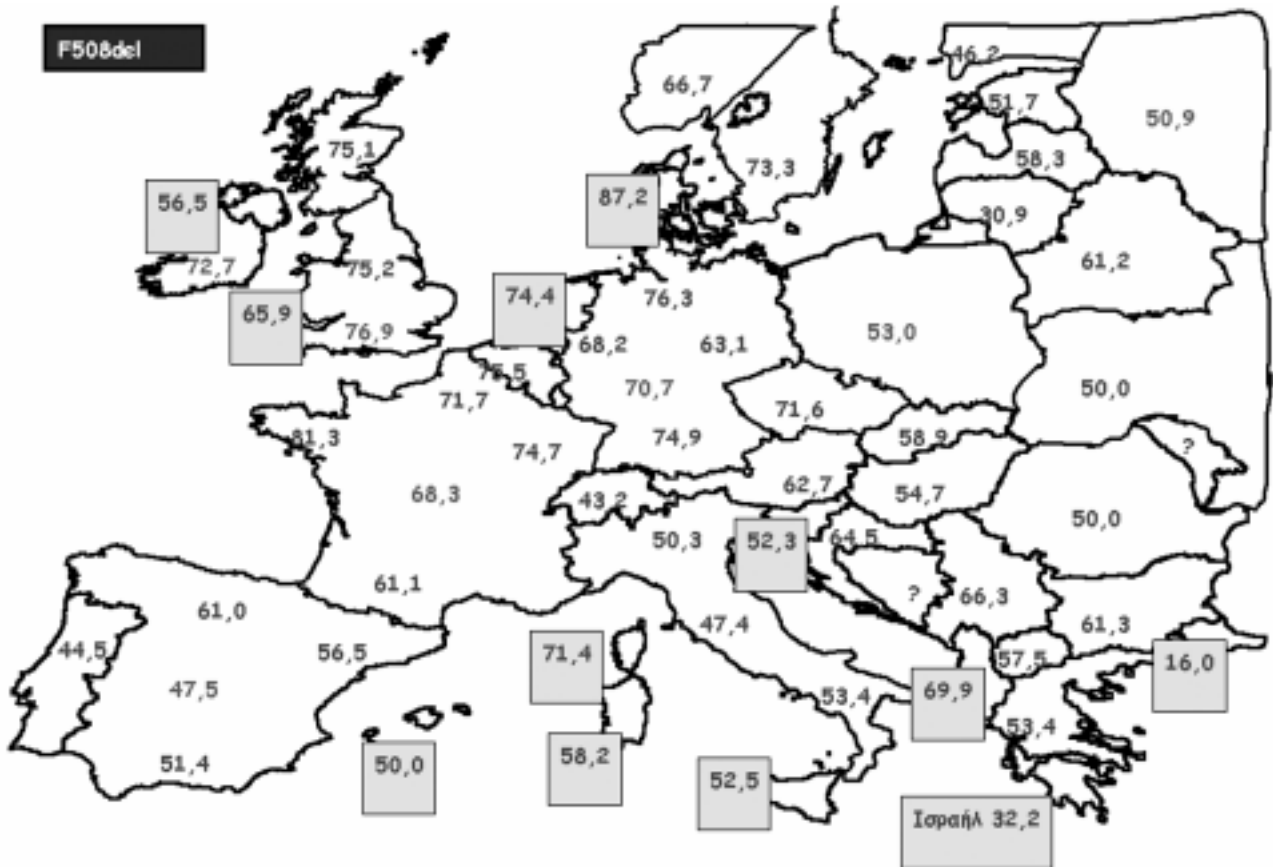
Οι μεταλλάξεις εκφράζουν τη δράση τους στην πρωτεΐνη με διαφορετικούς μηχανισμούς, καταλήγοντας στη μη παραγωγή λειτουργικής πρωτεΐνης ή πρωτεΐνης με μειωμένη λειτουργικότητα, και κατατάσσονται σε 6 ομάδες.^{5,9} Η 1η ομάδα περιλαμβάνει ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις και μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης με μηδενική παραγωγή πρωτεΐνης. Η 2η ομάδα περιλαμβάνει δυσερμηνεύσιμες μεταλλάξεις και ελλείμματα αμινοξέων, όπως η F508del μετάλλαξη, που οδηγούν σε πρωτεΐνη η οποία δεν ωριμάζει φυσιολογικά και καταστρέφεται από τους μηχανισμούς του κυττάρου. Η 3η ομάδα περιλαμβάνει δυσερμηνεύσιμες μεταλλάξεις, που αφορούν κυρίως στις περιοχές δέσμωσης ATP (NBD1 και NBD2) και επηρεάζουν τη ρύθμιση της πρω-



Εικόνα 1. Πολυπεπτιδικό παράγωγο CFTR.⁷

τεΐνης, καταλήγοντας στη μειωμένη δραστικότητα της διόδου Cl⁻. Η 4η ομάδα περιλαμβάνει δυσερμνεύσιμες μεταλλάξεις, οι οποίες εντοπίζονται στις διαμεμβρανικές περιοχές της πρωτεΐνης (TMD1 και TMD2) και προκαλούν ελαττωματική αγωγιμότητα. Η 5η ομάδα περιλαμβάνει μεταλλάξεις ματίσματος, που οδηγούν σε μειωμένη σύνθεση της CFTR. Ιδιαίτερα με τις μεταλλάξεις ματίσματος μπορεί να υπάρχει μερική παραγωγή ενός μικρού ποσοστού λειτουργικής πρωτεΐνης, οδηγώντας σε περισσότερο ήπιους φαινότυπους. Τέλος, η 6η ομάδα αποτελείται από μεταλλάξεις που επηρεάζουν την ικανότητα ρύθμισης από την πρωτεΐνη CFTR άλλων διαμεμβρανικών αγωγών ή προκαλούν μείωση της σταθερότητάς της στην ακραία μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων. Μεταλλάξεις των ομάδων 1-3 χαρακτηρίζονται ως βαριές, συσχετιζόμενες με παγκρεατική ανεπάρκεια, εφόσον δεν υπάρχει παραγωγή λειτουργικής πρωτεΐνης. Ασθενείς με ΚΙ και μεταλλάξεις που ανήκουν στις ομάδες 4 και 5, οι οποίες θεωρούνται ήπιες και παράγουν ένα ποσοστό φυσιολογικής πρωτεΐνης, έχουν παγκρεατική επάρκεια. Στις κλασικές μορφές της ΚΙ η διάγνωση γίνεται στη νεογνική περίοδο, ενώ στις μη

τυπικές μορφές στην ενήλικη ζωή λόγω ήπιων συμπτωμάτων. Παραδείγματα μονοσυμπτωματικών μορφών της νόσου αποτελούν η ανδρική στειρότητα με αμφοτερόπλευρη ή μονόπλευρη έλλειψη σπερματικού πόρου (CBAVD, CAVD), η ιδιοπαθής χρόνια ή οξεία παγκρεατίτιδα (ICP και ARP), η παραρρινοκολπίτιδα, οι διάχυτες βρογχεκτασίες, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και το άσθμα.¹⁰⁻¹⁵ Άτομα με μονοσυμπτωματικές μορφές έχουν φυσιολογική ή οριακή δοκιμασία ιδρώτα και συχνά είναι διπλοί ετεροζυγώτες μίας βαριάς και μίας ήπιης σπάνιας μετάλλαξης (μεταλλάξεις των ομάδων 4 και 5) ή είναι ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό IVS8-5T. Πλησίον του 3' του ιντρονίου 8 στη θέση αποδέκτη υπάρχει μια σειρά 5, 7 ή 9 θυμιδινών (5T, 7T, 9T). Συνήθως υπάρχουν στη συγκεκριμένη θέση 7 ή 9 θυμιδίνες, που επιτρέπουν το σωστό μάτισμα του εξονίου 9 του γονιδίου *CFTR* και την παραγωγή φυσιολογικού *CFTR* mRNA. Όταν υπάρχουν μόνο 5 θυμιδίνες (πολυμορφισμός IVS8-5T), εμποδίζεται η παραγωγή του εξονίου 9 στο γονίδιο *CFTR* και παράγεται μόνο 5-10% φυσιολογικό λειτουργικό mRNA. Η κωδικοποιούσα περιοχή 9 του γονιδίου είναι σημαντική για



Εικόνα 2. Πληθυσμιακή κατανομή της κοινής μετάλλαξης F508del.

την παραγωγή λειτουργικής πρωτεΐνης.¹⁶ Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός απαντάται συχνά σε μορφές ανδρικής στειρότητας (CBAVD και ολιγοσπερμία), καθώς και σε άλλες μονοσυμπτωματικές μορφές της νόσου.¹⁷

Η F508del μετάλλαξη παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα στη βόρεια σε σύγκριση με τη νότια Ευρώπη, όπου αυξάνεται η συχνότητα άλλων παθολογικών χρωμοσωμάτων.^{1,18} Επειδή η συχνότητα και το είδος των μεταλλάξεων παρουσιάζει γεωγραφική και εθνική κατανομή, η γνώση της κατανομής των παθολογικών αλληλομόρφων σε κάθε εθνική ομάδα είναι απαραίτητη πριν από την εφαρμογή προγραμμάτων πρόληψης. Η διαδικασία της πρόληψης της νόσου με σκοπό τη μείωση της επίπτωσής της στο γενικό πληθυσμό βασίζεται στην αποκάλυψη των φορέων και την προγεννητική διάγνωση.

Η απλούστευση και η βελτίωση των τεχνικών ανάλυσης του DNA δημιουργεί ελπίδες για τη δυνατότητα ευρύτερης εφαρμογής των τεχνικών αυτών σε πληθυσμιακές μελέτες και αποκάλυψη φορέων σε γενετικά νοσήματα για τα οποία δεν υπάρχουν άλλες μέθοδοι ανιχνευτικού ελέγχου. Ωστόσο, το θέμα αυτό έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τη διεθνή επιστημονική κοινότητα και έχουν ήδη διεξαχθεί πολλές πιλοτικές μελέτες σε διάφορους πληθυσμούς, λόγω της μεγάλης μοριακής ετερογένειας που παρουσιάζει η νόσος και των δυσκολιών εφαρμογής των μοριακών τεχνικών σε ευρείες πληθυσμιακές ομάδες.

Σε πολλές χώρες έχει ήδη αρχίσει να εφαρμόζεται πρόγραμμα ελέγχου των φορέων της νόσου με μοριακές τεχνικές. Η επιλογή της κατάλληλης ομάδας ελέγχου εξακολουθεί να αποτελεί πεδίο προβληματισμού για τη βιβλιογραφία. Συστήνεται η επιλογή αυτή να γίνεται ανάλογα με την ιδιαιτερότητα κάθε πληθυσμού.

Χαρακτηριστική είναι η οδηγία που έδωσε πρόσφατα μια ειδική επιτροπή του National Institute of Health στην Αμερική, συστήνοντας έλεγχο σε όλα τα ζευγάρια πριν από την εγκυμοσύνη.¹⁹

Με τα σημερινά δεδομένα στη χώρα μας, ο ανιχνευτικός έλεγχος θα πρέπει να εφαρμοστεί σε όλες τις ομάδες υψηλού κινδύνου, που είναι οι εξής:

- Τα μέλη οικογενειών με ΚΙ (cascade screening). Ο έλεγχος στις περιπτώσεις αυτές είναι απλός και οικονομικότερος, επειδή αφορά στην ανίχνευση συγκεκριμένης μετάλλαξης, που καθορίζεται από τη μοριακή μελέτη των ασθενών. Υπολογίζεται από ορισμένους συγγραφείς ότι εάν σε μια κοινωνική ομάδα ελεγχθούν όλοι οι συγγενείς των αρρώστων με ΚΙ

μέχρι τέταρτα εξαδέλφια, η ανίχνευση των φορέων στον πληθυσμό αυτό θα πλησίαζε το 100%

- Στο άλλο μέλος του ζευγαριού όπου ο ένας είναι φορέας της νόσου
- Σε άνδρες με στειρότητα λόγω έλλειψης του σπερματικού πόρου. Στα άτομα αυτά, η παρουσία ΚΙ σε ετερόζυγη τουλάχιστον μορφή υπολογίζεται σε ποσοστό >70%
- Σε άτομα με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και ιδιοπαθή χρόνια παγκρεατίτιδα, η παθογένεια των οποίων δεν έχει διευκρινιστεί
- Σε εγκυμοσύνες που παρουσιάζουν υπερηχογένεια εντέρου στο έμβρυο κατά τον υπερηχογραφικό έλεγχο στο δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Η υπερηχογένεια εντέρου στο έμβρυο εμφανίζεται με συχνότητα 0,6–1,8% κατά το δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης και έχει περιγραφεί ως ένα φυσιολογικό εύρημα, έχει όμως συνδεθεί και με χρωμοσωμικές ανωμαλίες (~9%), ΚΙ (~2%), ενδομήτριο περιορισμό της ανάπτυξης του εμβρύου (~8%), απόφραξη εντέρου, συγγενείς λοιμώξεις (3%) και ενδομήτρια αιμορραγία.²⁰ Σε εγκυμοσύνες με 25% κίνδυνο ύπαρξης ΚΙ, η υπερηχογένεια του εντέρου πιθανόν να αντιπροσωπεύει ενσφήνωση μκωνίου στο λεπτό έντερο. Η διαδικασία ανίχνευσης των συγκεκριμένων περιπτώσεων θα πρέπει να περιλαμβάνει το 85–90% των υπεύθυνων για ΚΙ στο συγκεκριμένο πληθυσμό αλληλίων με ταχεία μέθοδο, λόγω της προχωρημένης ηλικίας της εγκυμοσύνης.

Θεωρούμε επίσης ότι ο ανιχνευτικός έλεγχος θα μπορούσε να επεκταθεί και σε όσα ζευγάρια το επιθυμούν, εφόσον είναι σε θέση να καλύψουν το κόστος της εξέτασης, με την προϋπόθεση ότι το εργαστήριο που εκτελεί τον έλεγχο έχει τη δυνατότητα να καλύψει το 85–90% των γνωστών μεταλλάξεων στη χώρα μας.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Μοριακή γενετική ανάλυση και προσδιορισμός απλοτύπων

Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 500 πάσχοντα άτομα ελληνικής καταγωγής (1000 χρωμοσώματα), η πλειονότητα των οποίων παρακολουθούνται στην Κλινική ΚΙ στο Νοσοκομείο Παιδών «Αγία Σοφία», καθώς και από άλλα νοσοκομεία της χώρας. Κριτήρια διάγνωσης αποτέλεσαν θετική δοκιμασία ιδρώτα (>60 mEq/L) και τυπικά κλινικά ευρήματα πνευμονικής ή γαστρεντερικής νόσου. Τα 27 εξόνια του γονιδίου *CFTR* και οι γειτονικές περιοχές των ιντρονίων ελέγχθηκαν με ηλεκτρο-

φόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης με αυξανόμενη συγκέντρωση αποδιατακτικών παραγόντων (DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis). Ανάλυση του απλοτύπου των δι-αλληλομορφικών τόπων -XV2c-KM19-D9-J44-M470V-T854-TUB20- έγινε σε 261 χρωμοσώματα με τη μετάλλαξη F508del και σε 51 φυσιολογικά χρωμοσώματα. Για τις τρεις δι-νουκλεοτιδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, IVS8CA-IVS17BTA-IVS17BCA, η ανάλυση έγινε σε 46 χρωμοσώματα με τη μετάλλαξη F508del και σε 136 φυσιολογικά.

Μοριακή ανάλυση μονοσυμπωματικών μορφών κυστικής ίνωσης

Ανδρική στειρότητα-αμφοτερόπλευρη έλλειψη σπερματικού πόρου (CBAVD), αποφρακτική αζωοσπερμία (OA) και ολιγοσπερμία. Μελετήθηκαν συνολικά 134 άνδρες με στειρότητα (48 CBAVD, 40 OA και 46 ολιγοσπερμικοί). Οι άνδρες παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο για μοριακό έλεγχο ΚΙ από κέντρα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ΚΥΑ). Η κλινική διάγνωση για CBAVD βασίστηκε στο μικρό όγκο εκσπερμάτισης και στην ολική έλλειψη σπερματοζωαρίων, καθώς και σε τυπικά βιοχημικά ευρήματα που προκαλούνται από την αγενεσία σπερματικού πόρου.¹⁰ Η παρουσία σπερματικού πόρου στους 40 άνδρες με OA επιβεβαιώθηκε με κλινικές εξετάσεις. Στους άνδρες με CBAVD δεν έγινε υπερηχογράφημα νεφρών για τον αποκλεισμό νεφρικής αγενεσίας ως αιτίας του CBAVD φαινοτύπου. Η μοριακή ανάλυση περιελάμβανε έλεγχο με DGGE 15 εξονίων του γονιδίου *CFTR* και ανάλυση της αλληλουχίας συγκεκριμένης περιοχής, αν το πρότυπο ηλεκτροφόρησης δεν ταίριαζε με γνωστή μετάλλαξη.

Κανένας από τους μονοσυμπωματικούς ασθενείς δεν παρουσίαζε συμπτώματα κλασικής μορφής ΚΙ.

Ανίχνευση ετεροζυγωτών

Η ανίχνευση φορέων περιελάμβανε μοριακή ανάλυση με DGGE 15 εξονίων του γονιδίου *CFTR* (ταυτοποίηση του 86% των γνωστών μεταλλάξεων ΚΙ στον ελληνικό πληθυσμό) σε 900 άτομα. Στην ομάδα αυτή περιελήφθησαν 175 ζευγάρια (350 άτομα, όπου το ένα ή και τα δύο μέλη ζευγαριού προήλθαν από το συγγενικό περιβάλλον ασθενών με ΚΙ) ή ήταν ζευγάρια από ΚΥΑ με τον άνδρα να πάσχει από στειρότητα, 91 μη πάσχοντα αδέρφια ασθενών, 285 συγγενείς ασθενών και 174 άτομα γενικού πληθυσμού χωρίς ιστορικό ΚΙ στην οικογένεια.

Προγεννητικός έλεγχος

Προγεννητικός έλεγχος (προγεννητική διάγνωση, ΠΔ) έγινε σε 150 οικογένειες (152 διαγνώσεις), η πλειονότητα των οποίων είχαν ήδη ένα παιδί που έπασχε, και σε 7 ζευγάρια (15 διαγνώσεις) με στειρότητα. Η ΠΔ έγινε με μελέτη χοριακών λαχνών σε 139 περιπτώσεις και αμνιακό υγρό σε 28. Έξι περιπτώσεις περιελάμβαναν δίδυμες κύσεις, 4 από τις οποίες προήλθαν από εξωσωματική γονιμοποίηση (ΕΓ), και μία τριπλή κύηση.

Προεμφυτευτική προγεννητική διάγνωση (ΠΓΔ)²¹ έγινε σε δύο ζευγάρια μετά από ΕΓ που κατέληξε σε μία τριπλή και μία μονήρη κύηση. Τα αποτελέσματα της ΠΓΔ επιβεβαιώθηκαν με ΠΔ. Σε δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκαν γονεϊκά αλληλόμορφα με δύο μεταλλάξεις στο ίδιο χρωμόσωμα (in cis) και 4 περιπτώσεις με γονείς που ήταν διπλοί ετεροζυγώτες για δύο μεταλλάξεις ΚΙ, δύο από τους οποίους ήταν ασυμπωματικοί και δύο CBAVD. Συνδυασμός της μεθοδολογίας DGGE και επιβεβαίωση της μετάλλαξης με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με εκκινητές προσαρμοσμένους στην υπό έλεγχο μετάλλαξη (polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis, PMS)^{22,23} χρησιμοποιήθηκε για κάθε ΠΔ. Επίσης, σε κάθε ΠΔ έγινε επανέλεγχος του DNA των γονέων και του πάσχοντος παιδιού, εάν υπήρχε. Οι τρεις δι-νουκλεοτιδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (IVS8CA, IVS17BTA και IVS17BCA) χρησίμευσαν για έμμεση διάγνωση των μεταλλάξεων, καθώς και για επιβεβαίωση πατρότητας και αποκλεισμό μητρικής ανάμιξης του εμβρυϊκού DNA.

Προγεννητική διάγνωση λόγω εμφάνισης υπερηχογένειας εντέρου στο έμβρυο

Συνολικά, ελέγχθηκαν 74 δείγματα αμνιακού υγρού (δείγματα DNA των γονέων συμπεριλήφθηκε σε 37 περιπτώσεις) και 36 ζευγάρια για μεταλλάξεις στο γονίδιο *CFTR*. Κανένα από τα ζευγάρια δεν είχε οικογενειακό ιστορικό ΚΙ.

Η παραπομπή για έλεγχο όλων των περιπτώσεων έγινε από μαιευτήρια από όλη τη χώρα και από γυναικολόγους που διενέργησαν το υπερηχογράφημα μεταξύ του 1999-2005. Ο βαθμός υπερηχογένειας και τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διάγνωση ήταν ετερογενή και συνήθως δεν συνόδευαν το προς εξέταση δείγμα. Όταν στον έλεγχο συμπεριλαμβανόταν αμνιοπαρακέντηση για τον έλεγχο χρωμοσωμικών ανωμαλιών, ο έλεγχος για ΚΙ συμπεριελάμβανε τους γονείς και DNA του εμβρύου για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω μη πατρότητας. Στις περιπτώσεις όπου οι γονείς επέλεξαν την αποφυγή αμνιοπαρακέντησης, γινόταν πρώτα ανίχνευση μεταλλάξεων ΚΙ στο DNA των γονέων και, αν ήταν φορείς, ακολουθούσε αμνιοπαρακέντηση για τον έλεγχο του εμβρύου. Η μέση ηλικία κύησης κατά την αμνιοπαρακέντηση ήταν 20,5 εβδομάδες (εύρος 20-23 εβδομάδες). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με αυτή για τις ΠΔ.

Μεθοδολογία ανάλυσης του DNA για ανίχνευση μεταλλάξεων

Εκκώλιση του γενωμικού DNA έγινε από ολικό αίμα (λευκοκύτταρα), χοριακές λάχνες και αμνιακό υγρό χρησιμοποιώντας QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Germany).²⁴ Η ανίχνευση μεταλλάξεων στα 27 εξόνια του γονιδίου *CFTR* και τις γειτονικές περιοχές των ιντρονίων έγινε με τη μέθοδο DGGE μετά από πολλαπλασιασμό της υπό έλεγχο περιοχής με απλή ή πολλαπλή PCR.²⁵ Ο έλεγχος του πολυμορφισμού των πολυ-πυριμιδινών (IVS8-9T, 7T, 5T) έγινε με τη μέθοδο που έχει ήδη περιγραφεί.²⁶ Όλα τα δείγματα DNA των οποίων το

ηλεκτροφορητικό πρότυπο με DGGE δεν συμφωνούσε με πρότυπο γνωστών μεταλλάξεων υποβλήθηκαν σε ανάλυση της αλληλουχίας, η οποία έγινε σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας VISGEN Long Read Tower system-V3.1 με τις φθορίζουσες χρωστικές Cy5/Cy5.5 και το Dye primer bi-directional sequencing kit σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή (Visible Genetics Inc, Toronto, Καναδάς). Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της αλληλουχίας του DNA είχαν στο 5' άκρο τους κοινές αλληλουχίες M13 [forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3', reverse: 5'-CAGGAAACAGC TATGAC-3']. Για τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων του γονιδίου πριν από την ανάλυση της αλληλουχίας χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που έχουν ήδη περιγραφεί.²⁷ Στην ΠΔ, επιβεβαίωση των μεταλλάξεων έγινε με τη μέθοδο PMS, όπως έχει ήδη περιγραφεί.^{22,23}

Ανάλυση απλοτύπων

Οι δι-αλληλομορφικοί τόποι αναλύθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και τα περιοριστικά ένζυμα με μεθοδολογία η οποία έχει ήδη περιγραφεί.²⁸ Το αλληλόμορφο 1 αντιπροσωπεύει απουσία κοπής, ενώ το αλληλόμορφο 2 αντιπροσωπεύει κοπή από περιοριστικό ένζυμο. Η ανίχνευση του πολυμορφισμού GATT έγινε με μέτρηση μεγέθους κατόπιν ηλεκτροφόρησης σε γέλη πολυακρυλαμίδης 10%. Το αλληλόμορφο 1 αντιπροσωπεύει 7 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες GATT, το αλληλόμορφο 2 έξι, ενώ το αλληλόμορφο 3 οκτώ. Η ταυτοποίηση των δι-νουκλεοτιδικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών IVS8CA, IVS17BTA και IVS17BCA έγινε με πολλαπλή PCR, με μεθοδολογία που έχει ήδη περιγραφεί.²⁹ Ένας από τους δύο εκκινητές είχε σημειωθεί με φθορίζουσα ουσία Cy5.5 (Prologo LLC, Boulder, Co, ΗΠΑ). Τμήμα της αντίδρασης PCR αναμιγνύεται με μάρτυρες μεγέθους 100_{ZB} και 350_{ZB} (VISGEN Long Read Tower system-V3.1, Visible Genetics, Inc, Toronto, Καναδάς), κατόπιν θερμαίνεται στους 95 °C για 5 min και ψύχεται σε πάγο. Το μέγεθος των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών προσδιορίζεται κατόπιν ηλεκτροφόρησης σε γέλη αποδιατακτικής πολυακρυλαμίδης 6%, σε σύγκριση με τους μάρτυρες μεγέθους από το ειδικό πρόγραμμα Fragment Analysis Software (Visible Genetics, Inc, Toronto, Καναδάς).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μοριακή ανάλυση ασθενών

Σε δείγμα 500 ασθενών με ΚΙ ανιχνεύθηκαν 83 συνολικά μεταλλάξεις, συμπεριλαμβανομένων 3 διπλών αλληλίων (με 2 μεταλλάξεις στο ίδιο χρωμόσωμα). Είκοσι από τις μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί μόνο στον ελληνικό πληθυσμό (πίν. 1). Οι 83 μεταλλάξεις αντιπροσωπεύουν το 92% των αλληλομόρφων ΚΙ, παράγοντας 111 διαφορετικούς γονότυπους και 10 γονότυπους σε ομόζυγη κατάσταση με τις εξής μεταλλάξεις: p.F508del, c.621+1G>T, p.G542X, p.R1158X, p.I507del, p.W496X,

p.E822X, c.2789+5G>A, p.G85E και p.R1070Q. Επτά μεταλλάξεις ήταν οι πλέον κοινές και ανήκουν (εκτός της p.E822X) σε μεταλλάξεις που εμφανίζονται με αυξημένη συχνότητα σε όλες τις πληθυσμιακές ομάδες. Η p.F508del εμφανίζεται με συχνότητα 54,5%, 16 μεταλλάξεις εμφανίζονται με συχνότητες μεταξύ 0,4–1,1%, ενώ οι υπόλοιπες 60 ήταν σπάνιες, εμφανιζόμενες σε 1–3 ασθενείς.

Ανάλυση απλοτύπων

Η φάση των δι-αλληλομόρφων και μικροδορυφορικών πολυμορφισμών προσδιορίστηκε από οικογενειακές μελέτες (ελέγχοντας τους γονείς και το πάσχον παιδί). Για τα φυσιολογικά αλληλομόρφα βρέθηκαν 27 διαφορετικοί απλότυποι δι-αλληλομόρφων [πλέον κοινός 11117212 (16%)] και 69 μικροδορυφορικοί απλότυποι [περισσότερο κοινοί 17-29/30/31-13 (19,1%) και 18-31/32-13 (15,4%)]. Ένα σύνολο 16 δι-αλληλομόρφων και 18 μικροδορυφορικών απλοτύπων βρέθηκαν να συνδέονται με τη μετάλλαξη p.F508del. Ο απλότυπος 12216112 (65,2%) ήταν ο πλέον κοινός (σε συμφωνία με άλλους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς), ενώ οι 25-31/32-13 (40,4%), 26-32/33-13 (15,7%) και 17/19-31-13 (8,9%) ήταν οι πλέον κοινοί μικροδορυφορικοί απλότυποι για τη μετάλλαξη p.F508del. Ο 25-31-13 μπορεί να προήλθε από ολίσθηση κατά τη διαδικασία της μείωσης από τον κοινό ευρωπαϊκό απλότυπο 23-31-13, ο οποίος παρουσιάζει συχνότητα μόνο 6,5% στον ελληνικό πληθυσμό. Οι άλλες κοινές μεταλλάξεις βρέθηκαν να συνδέονται με 22 δι-αλληλομορφικούς απλότυπους (πλέον κοινοί 12216112 – 25,7%, 11127212 – 3,7%) και 31 μικροδορυφορικούς απλότυπους. Ο πλέον κοινός απλότυπος για τη μετάλλαξη c.621+1G>T ήταν ο 23-32-13, για την p.G542X ο 25-33/34-13, για την p.N1303K ο 25-32-13 και για την p.E822X ο 17-30-13 (πίνακες 2–4).

Άνδρες με υπογονιμότητα

Στους 48 άνδρες με CBAVD, βρέθηκαν συνολικά 22 διαφορετικές μεταλλάξεις, με 56,2% να είναι τουλάχιστον φορείς κάποιας μετάλλαξης στο γονίδιο *CFTR*, και 27,1% διπλοί ετεροζυγώτες δύο μεταλλάξεων ή μίας μετάλλαξης και του πολυμορφισμού IVS8-5T. Όπως ήταν αναμενόμενο, η p.F508del βρέθηκε με υψηλή συχνότητα (20,8%). Μερικές από τις μεταλλάξεις ήταν κοινές με αυτές που βρέθηκαν σε ασθενείς με την κλασική μορφή της νόσου (p.W496X, c.621+1G>T, c.4010delTAT, p.R1158X), ενώ οι υπόλοιπες εκτός της p.L932X ήταν ήπιες δυσερμνεύσιμες ή μεταλλάξεις ματίσματος, που

Πίνακας 1. Συχνότητα μεταλλάξεων γονιδίου κυστικής ίνωσης σε 500 πάσχοντες Έλληνες.

Μετάλλαξη	Θέση στο γονίδιο εξόνιο/ιντρόνιο	Αριθμός χρωμοσωμάτων (συχνότητα %)	Απλότυπος μικροδορυφορικών αλληλουχιών ^β	Πληθυσμιακή ομάδα ^γ
p.F508del	10	545 (54,5)	25-31/32-13	Πανευρωπαϊκή
c.621+1G>T	Intron 4	63 (6,3)	23-32-13	Ουαλία
p.G542X	11	39 (3,9)	25-33/34-13	Μεσόγειος
p.N1303K	21	23 (2,3)	25/26-32-13	Μεσόγειος
c.2789+5G>A	Intron 14 ^β	20 (2,0)	8-18/28-18	Μεσόγειος
p.E822X ^α	13	18 (1,8)	17-30-13	Ελλάδα
c.21833AA>G	13	15 (1,5)	17-29/31-13	Ισπανία
p.R1158X	19	11 (1,1)	25-34-13	Μεσόγειος
p.G85E	3	9 (0,9)	18-8/24-18/13	
p.R334W	7	8 (0,8)		Πανευρωπαϊκή
c.574delA	4	8 (0,8)		
p.W1282X	20	8 (0,8)	18-8-17	Ασκενάσι Εβραίοι
c.1677delTA	10	7 (0,7)		Ρωσία
c.3120+1G>A	Intron 16	7 (0,7)		Αφρο-αμερικανική/Αραβική
p.W496X	10	7 (0,7)	18-32-13	
c.3272-26A>G	Intron 17 ^α	7 (0,7)	18-8-18	Μεσόγειος
p.I507del	10	6 (0,6)	26-32-13	Ισπανία
c.711+3A>G	Intron 5	6 (0,6)		Μεσόγειος
c.621+3A>G ^β	Intron 4	6 (0,6)		Μεσόγειος
p.R1070Q	17 ^β	5 (0,5)		Βουλγαρία
p.R1070Q+S466X	17 ^β και 10	4 (0,4)		Βουλγαρία
c.1525-1G>A	Intron 9	4 (0,4)		Μεσόγειος
p.L137P ^α	4	4 (0,4)		Ελλάδα
p.A46D ^α	2	3 (0,3)	25-33-13	Ελλάδα
c.3120+1kdel8.5kb	Intron 16	3 (0,3)		Αραβική
c.2184insA	13	3 (0,3)		
p.G551D	11	3 (0,3)		Κέλτικη
p.D110H	4	3 (0,3)		Μεσόγειος
p.C276X	6 ^β	3 (0,3)		
p.R117C	4	3 (0,3)		
CFTRdel2,3(21kb)	Διαγραφή των εξονίων 2 και 3	3 (0,3)		Ανατολικο-σλαβική
p.C524X	10	2 (0,2)		
p.R553X	11	2 (0,2)		Ελβετία
c.3152delT ^α	17 ^α	2 (0,2)	18-34-13 και 17-49-18	Ελλάδα
p.D110E ^α	4	2 (0,2)		Ελλάδα
c.4382delA	24	2 (0,2)		Μεσόγειος
c.1898+1G>A	Intron 12	2 (0,2)		Ουαλία
c.2790-1G>C	Intron 14 ^β	2 (0,2)		
p.M348K	7	2 (0,2)		Μεσόγειος
p.E831X	13	2 (0,2)		Συρία
p.L1065F ^α	17 ^β	2 (0,2)		Ελλάδα
p.A46D+c.3272-4A>G ^α	2 και Intron 17 ^α	1 (0,1)		Ελλάδα
c.1898+1G>T	Intron 12	1 (0,1)	19-8-13	Ανατολική Ασία

Πίνακας 1. Συχνότητα μεταλλάξεων γονιδίου κυστικής ίνωσης σε 500 πάσχοντες Έλληνες (συνέχεια).

Μετάλλαξη	Θέση στο γονίδιο εξόνιο/ιντρόνιο	Αριθμός χρωμοσωμάτων (συχνότητα %)	Απλότυπος μικροδορυφορικών αλληλουχιών ^β	Πληθυσμιακή ομάδα ^γ
p.D1445N ^α	24	1 (0,1)		Ελλάδα
p.D1152H	18	1 (0,1)		
c.296+1G>C ^α	Intron 2	1 (0,1)		Ελλάδα
p.R75L	3	1 (0,1)		
c.3849+4A>G	Intron 19	1 (0,1)		
p.R1162X	19	1 (0,1)		Πανευρωπαϊκή
p.G1069R	17 ^β	1 (0,1)		
p.E725K ^α	13	1 (0,1)		Ελλάδα
p.F1052V	17 ^β	1 (0,1)		
c.525delT	4	1 (0,1)		Γουγκοσλαβία
p.R347P	7	1 (0,1)		
p.R347H	7	1 (0,1)		
p.L732X	13	1 (0,1)		
p.D836Y	14 ^α	1 (0,1)		
c.2751+2T>A ^α	Intron 14 ^α	1 (0,1)	18-32-13	Ελλάδα
p.F1074L	17 ^β	1 (0,1)		
c.1497delGG ^α	Intron 9	1 (0,1)	18-30-17	Ελλάδα
p.S813P ^α	13	1 (0,1)		Ελλάδα
c.1571delG	10	1 (0,1)		Σλαβική
c.2118del4	13	1 (0,1)		
c.547insTA	4	1 (0,1)		
p.G1244V	20	1 (0,1)		
p.Q2X; p.R3W	1	1 (0,1)		
p.R75X	3	1 (0,1)		Ισπανία
c.1716+1G>A ^α	Intron 10	1 (0,1)		Ελλάδα
c.441delA	4	1 (0,1)		
p.D565G ^α	12	1 (0,1)		Ελλάδα
p.R352W	7	1 (0,1)		
p.Y247X ^α	6 ^α	1 (0,1)	17-34-13	Ελλάδα
p.S945L	15	1 (0,1)		Ιταλία
p.P1021A ^α	17 ^α	1 (0,1)		Ελλάδα
p.S997F	16	1 (0,1)		Ιταλία
p.E823X ^α	13	1 (0,1)		Ελλάδα
c.4040delA	21	1 (0,1)		
c.2752-26A>G ^α	Intron 14 ^α	1 (0,1)	17-25-13	Ελλάδα
p.L1093P	17 ^β	1 (0,1)		
c.406-6T>C	Intron 3	1 (0,1)		Μεσόγειος
c.457TAT>G	4	1 (0,1)		Μεσόγειος
c.3849+10kbC>T	Intron 19	1 (0,1)		Ασκενάσι Εβραίοι
c.2418GG>T ^α	13	1 (0,1)		Ελλάδα
Άγνωστες		79 (7,9)		
Σύνολο		83 (91,9)		

^αΜεταλλάξεις που έχουν βρεθεί μόνο στην Ελλάδα. ^βΠλέον κοινός μικροδορυφορικός απλότυπος. ^γBobadilla et al 2002, Estivill et al 1997, CFGAC database. Ονοματολογία μεταλλάξεων DNA και πρωτεΐνης: Για τις αλλαγές στα ιντρόνια, ελλείμματα, ενθέσεις και αλλαγές πλαισίου ανάγνωσης δίνεται ο αριθμός του νουκλεοτιδίου για την αλληλουχία cDNA (c.) για αλλαγές αμινοξέων δίνεται ο αριθμός του αμινοξέος στο επίπεδο της πρωτεΐνης (p).

Πίνακας 2. Απλότυποι *CFTR* για τους δι-αλληλομορφικούς και μικροδορυφορικούς δείκτες σε 217 χρωμοσώματα με την p.F508del μετάλλαξη.

XV2C-KM19-D9-J44-GATT-M470V-T854T-TUB20	8CA-17BTA-17BCA
1-2-2-1-6-1-1-2 (135)	25-31-13(26), 25-32-13(15), 25-33-13(2), 25-27-13(1), 25-49-13(1), 25-7-13(1), 25-35-13(2), 26-32-13(10), 26-33-13(7), 26-31-13(2), 26-34-13(2), 23-31-13(3), 23-28-13(2), 23-32-13 (1), 24-31-13(3), 24-33-13(2), 19-31-13(2), 19-29-13(1), 19-32-13(2), 19-34-13(1), 17-31-13(4), 17-30-13(2), 18-32-13(3), 18-31-13(1), 18-29-13(1)
1-1-2-1-6-1-1-2 (20)	25-31-13(6), 25-32-13(1), 25-30-13(1), 26-32-13(2), 26-31-13(1), 17-30-13(1)
1-2-1-1-6-1-1-2 (14)	25-31-13(2), 25-32-13(1), 17-31-13(2), 19-31-13(1)
1-2-2-1-6-1-2-2 (8)	25-31-13(1), 25-32-13(1), 26-34-13(1), 19-34-13(2)
2-2-2-1-6-1-1-2 (8)	18-32-13(2), 19-31-13(2)
1-1-1-1-6-1-1-2 (5)	25-32-13(2), 26-32-13(1)
1-2-2-1-6-1-1-1 (5)	26-33-13(1), 18-29-13(1), 23-31-13(1), 25-27-23(1)
2-1-1-1-6-1-1-2 (2)	25-31-13(2), 24-32-13 (1)
2-2-1-1-6-1-1-2 (2)	25-31-13(1)
2-1-1-2-6-1-1-2 (2)	17-24-13(1), 17-34-13(1)
2-1-2-1-6-1-1-2 (1)	19-31-13(1)
1-1-2-2-6-1-1-2 (1)	17-32-13 (1)
2-1-2-2-6-1-1-2 (1)	17-32-13(1)
2-2-2-1-6-1-2-2 (1)	26-33-13(1), 19-31-13(1), 18-32-13 (2), 24-31-13(1)
2-2-2-1-6-1-1-1 (1) 1-2-2-2-6-1-1-2 (1)	25-31-13(1)

Αλληλόμορφο 1 απουσία σημείου κοπής, αλληλόμορφο 2 παρουσία σημείου κοπής. Οι αριθμοί για τους μικροδορυφορικούς δείκτες GATT, IVS8CA, IVS17BTA και IVS17BCA αντιπροσωπεύουν αριθμό επαναλήψεων. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν αριθμό χρωμοσωμάτων p.F508del. Κοινοί απλότυποι εμφανίζονται με έντονα γράμματα. Περισσότερο κοινοί μικροδορυφορικοί απλότυποι: **25-31-13(39), 25-32-13(20), 26-32-13(15), 26-33-13 (8), 19-31-13(7), 17-31-13(6), 18-32-13(5), 24-31-13(4), 17-30-13(3), 23-31-13(3)**

παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης φυσιολογικού *CFTR* mRNA (p.M1I, p.R352W, c.711+3A>G, p.F1052V, p.R117C, p.D110E, p.D110H, p.D565G, c.3272-26A>G, p.I521F, p.P1021A, p.G817V, p.M952I). Ανιχνεύθηκαν και πολυμορφισμοί με ποικιλομορφία στη διεισδυτικότητα (p.F508C, p.R668C, p.R75Q, p.R1162L), όπως και μεγάλη συχνότητα (11/48, 22.9%) του πολυμορφισμού IVS8-5T σε σύγκριση με 3% στο φυσιολογικό πληθυσμό.

Από τους 40 άνδρες με OA, 27,5% ήταν τουλάχιστον φορείς, 3 από τους οποίους με σοβαρές μεταλλάξεις (p.F508del, p.W496X, και p.W1282X), καθώς και διπλοί ετεροζυγώτες του πολυμορφισμού IVS8-5T με άλλους πολυμορφισμούς με μειωμένη διεισδυτικότητα. Από τους 46 με σοβαρή ολιγοσπερμία, 13% ήταν φορείς και 2,2% φορείς του αλληλίου IVS8-5T (πίν. 5).

Ανίχνευση ετεροζυγωτών

Ανίχνευση μεταλλάξεων σε 900 άτομα αποκάλυψε συνολικά 188 ετεροζυγώτες. Ειδικότερα, βρέθηκαν 58/91 ετεροζυγώτες (63,7%) ανάμεσα στα αδέρφια ασθενών, 115/285 (40,4%) στο συγγενικό περιβάλλον των ασθενών (Σ) και 15/174 (8,6%) ανάμεσα στο γενικό

πληθυσμό (ΓΠ). Από τα 175 ζευγάρια που ελέγχθηκαν, 14 είχαν ένα πάσχον μέλος με ΚΙ (ΓΠ/ΚΙ), σε 106 το ένα μέλος είχε οικογενειακό ιστορικό ΚΙ (ΓΠ/Σ), σε 23 υπήρχε άνδρας με υπογονιμότητα (ΓΠ/CBAVD) και σε 32 ζευγάρια και τα δύο μέλη δεν είχαν ιστορικό ΚΙ στην οικογένεια (ΓΠ/ΓΠ). Από τα 175 ζευγάρια, στα 23 προϋπήρχε εγκυμοσύνη όταν ξεκίνησε ο έλεγχος για ΚΙ και 6 ζευγάρια χρειάστηκαν προγεννητική διάγνωση [1 ΓΠ/Σ (0,9%), 2 ΓΠ/ΓΠ (6,25%), 2 ΓΠ/CBAVD (8,7%) και 1 ΓΠ/ΚΙ (7,1%)].

Προγεννητική διάγνωση

Στις 167 προγεννητικές διαγνώσεις βρέθηκαν 57 διαφορετικοί γονότυποι, 13 από τους οποίους σε ζευγάρια από ΚΥΑ. Σε 4 περιπτώσεις ήταν γνωστή μόνο η μία γονεϊκή μετάλλαξη, οπότε έγινε έμμεση διάγνωση με τις μικροδορυφορικές επαναλαμβανόμενες αλληλουκίες. Η έμμεση διάγνωση έδωσε αποτέλεσμα σε 3 από τις 4 ΠΔ. Το συγκεκριμένο έμβρυο είχε τουλάχιστον τη γνωστή μετάλλαξη του ενός γονέα, ενώ οι απλότυποι δεν ήταν πληροφοριακοί. Σε 46 ΠΔ τα έμβρυα ήταν φυσιολογικά, σε 80 ετεροζυγώτες και σε 41 πάσχοντα. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα αναμενόμενα για νό-

Πίνακας 3. Απλότυποι *CFTR* για τους δι-αλληλομορφικούς και μικροδορυφορικούς δείκτες για άλλες κοινές μεταλλάξεις *CFTR*.

Μεταλλαξη	XV2C-KM19-D9-J44-GATT-M470V-T854T-TUB20	8CA-17BTA-17BCA
c.621+1G>T (26)	1-2-2-1-6-1-1-2 (20) , 1-1-2-1-6-1-1-2 (3), 2-2-2-1-6-1-1-2(2)	23-32-13(7) , 24-32-13(4), 23-31-13(4), 24-33-13(2), 24-8-17(1), 22-8-13(1), 18-8-17(1)
p.G542X (19)	1-2-2-1-6-1-1-2 (10) , 2-2-2-1-6-1-1-2 (3), 1-1-1-6-1-1-2 (2), 2-2-1-1-6-1-1-2 (1), 1-2-1-1-6-1-1-2 (2), 1-1-1-2-1-6-1-1-2 (1)	25-34-13(3) , 24-33-13(3) , 25-31-13(1), 19-35-13(1), 26-32-13(1), 17-31-13(1)
p.N1303K (14)	1-2-2-1-6-1-1-2 (5) , 1-1-2-1-6-1-1-2 (5) , 2-2-2-1-6-1-1-2 (2), 1-1-1-2-7-1-1-2(1), 1-2-1-1-6-1-1-2 (1)	26-32-13(2), 25-32-13(2), 26-33-13(1), 25-7-13(1), 17-8-13(1), 25-28-13(1)
c.2183AA>G (7)	2-2-2-1-7-1-1-2 (3) , 1-2-2-1-6-1-1-2 (2), 2-2-1-1-7-1-1-2(1)	17-29-13(2), 17-31-13(1)
p.E822X (10)	1-1-1-2-7-2-1-2 (5) , 1-1-1-1-7-2-1-2 (2), 2-1-1-2-7-2-2-2 (1)	17-30-13(7) , 17-32-13(2), 17-7-18(1)
c.2789+5G>A (3)	1-1-1-1-8-2-1-2 (1), 2-1-2-1-8-1-2-1 (1), 1-2-2-1-7-1-1-2(1)	18-8-18 (1), 18-28-18(1)
p.R1158X (6)	2-2-2-1-6-1-1-1 (3) , 2-1-1-2-6-1-1-2 (1), 1-2-1-1-6-1-1-2(1), 2-1-1-1-7-2-1-2 (1)	25-34-13(3) , 25-33-13(1), 17-28-13(1)
p.R1070Q (3)	1-1-2-1-6-1-1-2 (2), 1-1-1-2-7-1-1-2(1)	18-35-13(1), 19-32-13(1), 17-31-13(1)
p.G85E (5)	2-2-2-1-8-2-2-1 (2), 1-2-2-1-8-2-2-1(1), 1-1-1-2-8-2-1-2(1)	18-8-18(3) , 18-24-13(1)
c.3272-26A>G (4)	2-2-2-1-?-1-2-1(2), 1-1-1-?-2-2-1 (1)	18-8-18(3)
p.I507del (4)	1-2-2-1-6-1-1-2 (1), 2-2-2-1-6-1-1-2 (2), 1-2-1-1-6-1-1-2(1)	26-32-13(1), 20-32-13(1), 24-31-13(1), 18-31-13(1)
p.W1282X (2)	1-2-2-1-6-1-2-1(2)	18-8-17(1)
p.C276X (1)	1-2-1-1-?-?-1-2	18-47-13
c.1898+1G>T (1)	1-1-1-2-?-?-1-2	19-8-13
c.3849+10kbC>T (1)	1-2-2-1-7-1-1-2	17-31-13
p.W496X (1)	2-2-2-2-?-1-1-2	18-32-13
p.A46D (1)	1-2-2-1-7-1-1-2	25-33-13
c.3152delT (2)	2-1-1-2-7-1-1-2 (1), 2-2-2-1-7-1-2-2 (1)	18-34-13, 17-49-18
c.2752-26A>G (1)		17-25-13
p.Y247X (1)	2-1-1-2-6-1-1-2	17-34-13
c.1497delGG (1)	1-2-2-1-7-1-2-1	18-30-17
p.L1065F (1)	1-2-2-2-6-2-1-2	
p.K162E (1)		18-30-13
c.2751+2T>A (1)	1-1-1-2-7-2-1-2	18-32-13

Αλληλόμορφο 1 απουσία σημείου κοπής, αλληλόμορφο 2 παρουσία σημείου κοπής. Οι αριθμοί για τους μικροδορυφορικούς δείκτες GATT, IVS8CA, IVS17BTA και IVS17BCA αντιπροσωπεύουν αριθμό επαναλήψεων. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν αριθμό χρωμοσωμάτων. Κοινοί απλότυποι εμφανίζονται με έντονα γράμματα.

σημα που μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Όλες οι ΠΔ με φυσιολογικό αποτέλεσμα κατέληξαν στη γέννηση φυσιολογικών παιδιών. Σε 2 περιπτώσεις, ένας από τους γονείς είχε δύο μεταλλάξεις στο ίδιο χρωμόσωμα, p.R1070Q+p.S466X και p.Q2X+p.R3W, αντίστοιχα, και στο εμβρυϊκό DNA έγινε έλεγχος για μία από τις δύο μεταλλάξεις του σύνθετου αλληλομόρφου (p.R1070Q και p.Q2X, αντίστοιχα). Επίσης, σε 4 ζευγάρια, ένας από τους γονείς ήταν διπλός ετεροζυγώτης χωρίς συμπτώματα KI (γονότυποι: p.F508del/p.K162E και p.R1158X/p.R1070Q) ή άνδρας με CBAVD (γονότυποι: p.F1052V/p.F1052V και

p.F508del/p.M952I). Σε αυτές τις περιπτώσεις, το εμβρυϊκό DNA εξετάστηκε και για τις 3 γονεϊκές μεταλλάξεις. Στις περιπτώσεις όπου ο γονότυπος του εμβρύου συνδυάζει μια βαριά και την ήπια μετάλλαξη, η γενετική συμβουλευτική για τον κλινικό φαινότυπο είναι αρκετά δύσκολη. Αντιμετωπίστηκε μία τέτοια περίπτωση σε ζευγάρι από ΚΥΑ. Τα έμβρυα είχαν γονότυπους που συνδύαζαν μια βαριά μετάλλαξη και την πολύ ήπια μετάλλαξη του πατέρα με CBAVD (p.F1052V/p.M348K και p.D565G/p.406-6T>C). Στα δύο ζευγάρια δόθηκε γενετική συμβουλευτική για την ηπιότητα της μετάλλαξης και αποφάσισαν τη διατήρηση της εγκυμοσύνης.

Πίνακας 4. Συχνότητα αλληλομόρφων για τις 8CA και 17BTA επαναλήψεις σε φυσιολογικά και παθολογικά χρωμοσώματα.

Αριθμός επαναλήψεων		Συχνότητα													
		Φυσιολογικά (n=136)		p.F508del (n=146)		c.621+1G>T (n=20)		p.G542X (n=10)		p.N1303K (n=8)		p.E822X (n=10)		p.R1158X (n=5)	
8CA	17BTA	8CA	17BTA	8CA	17BTA	8CA	17BTA	8CA	17BTA	8CA	17BTA	8CA	17BTA	8CA	17BTA
13	7	0,007	0,015		0,007						0,125		0,1		
16	8	0,022	0,11				0,2				0,125				
17	9	0,294	0,074	0,089				0,1		0,125		1		0,2	
18	18	0,397	0,007	0,068		0,05									
19	20	0,132	0,007	0,089				0,1							
20	22	0,015	0,007												
22	23	0,015	0,007			0,05									
23	24	0,007		0,048	0,007	0,55									
24	25	0,044	0,007	0,048		0,35		0,3							
25	26	0,029	0,007	0,466				0,4		0,5				0,8	
26	27	0,007		0,192	0,014			0,1		0,375					
	28		0,015		0,014						0,125				0,2
	29		0,081		0,02										
	30		0,103		0,027								0,7		
	31		0,22		0,438		0,2		0,2						
	32		0,147		0,315		0,55		0,1		0,5		0,2		
	33		0,066		0,089		0,2		0,3		0,125				0,2
	34		0,029		0,048				0,3						0,6
	35		0,015		0,014				0,1						
	36		0,015												
	38		0,015												
	45		0,029												
	47		0,007												
	48		0,007												
	49				0,007										
	55		0,007												

Προγεννητική διάγνωση λόγω υπερηχογένειας εντέρου

Έγινε έλεγχος σε 74 δείγματα αμνιακού υγρού για μεταλλάξεις στο γονίδιο *CFTR* λόγω ύπαρξης υπερηχογένειας εντέρου στο έμβρυο κατά το 2ο τρίμηνο της κύησης. Τέσσερα έμβρυα (3,6%) βρέθηκαν ομοζυγώτες για ΚΙ με τους ακόλουθους γονότυπους: p.F508del/p.L732X, p.F508del/c.574delA, p.F508del/p.F508del και p.F508del/p.G542X, ενώ 15 (13,6%) βρέθηκαν φορείς με τις ακόλουθες μεταλλάξεις: 10 με p.F508del, και από ένα έμβρυο με τις c.621+1G>T, p.I148T, c.2789+5G>A, p.R297Q, p.E822X. Ενδιαφέρον εύρημα θεωρείται και η ανίχνευση συγκεκριμένων πολυμορφισμών: 5/110 περιπτώσεις με 1716G/A (p.E528E), 2 με c.2752-15G/C, 2 με p.R1162L και ένα με c.4029A/G, των οποίων η κλινική σπουδαιότητα είναι δύσκολο να προσδιοριστεί.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ**Πρόληψη της νόσου στη χώρα μας**

Μοριακή ετερογένεια κυστικής ίνωσης στον ελληνικό πληθυσμό. Οι πλέον κοινές μεταλλάξεις σε όλες τις πληθυσμιακές ομάδες, με συχνότητα >1%, είναι οι εξής: p.F508del, p.G542X, p.N1303K, p.G551D και p.W1282X. Άλλες 19 με συχνότητα 0,1-1% παρουσιάζουν σημαντική πληθυσμιακή ετερογένεια, με τις περισσότερες να περιορίζονται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές. Η πλέον κοινή μετάλλαξη της νόσου p.F508del παρουσιάζει ελάττωση της συχνότητας στην Ευρώπη από βορρά προς νότο (30-90%), με αποτέλεσμα την αυξημένη συχνότητα άλλων ποικίλων μεταλλάξεων συνδεόμενων με τα παθολογικά αλλήλια.^{7,8,30} Η

περιοχή της Μεσογείου εμφανίζει τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία μεταλλάξεων της νόσου, δημιουργώντας ιδιαίτερα προβλήματα στη μοριακή γενετική διάγνωση των ασθενών.^{24,31-37} Ιδιαίτερα για τον πληθυσμό της Ισπανίας, έχουν χαρακτηριστεί 73 διαφορετικές μεταλλάξεις υπεύθυνες για το 87% των αλληλομόρφων ΚΙ, από τις οποίες μόνο 10 παρουσιάζουν συχνότητα 1%, ενώ για τον πληθυσμό της Γαλλίας 105 μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για το 86% χρωμοσωμάτων ΚΙ και, συγκεκριμένα, στην πληθυσμιακή ομάδα των Κελτών της Βρετανίας 19 μεταλλάξεις ευθύνονται για 98% των αλληλομόρφων ΚΙ.^{33,36,38} Μελέτες σε ασθενείς ΚΙ στη βορειοανατολική Ιταλία χαρακτήρισαν 62 μεταλλάξεις υπεύθυνες για το 73,8% των παθολογικών αλληλομόρφων.^{38,39}

Μοριακή γενετική ανάλυση με τη μέθοδο DGGE των 27 κωδικοποιουσών περιοχών και των γειτονικών ιντρονίων του γονιδίου *CFTR* στον ελληνικό πληθυσμό αποκάλυψαν την παρουσία 83 διαφορετικών μεταλλάξεων καλύπτοντας ένα ποσοστό 92% των αλληλίων ΚΙ, αποδεικνύοντας ότι ο ελληνικός πληθυσμός παρουσιάζει μια από τις μεγαλύτερες γενετικές ποικιλομορφίες ως προς το γονίδιο ΚΙ. Είκοσι από τις μεταλλάξεις μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί μόνο στην Ελλάδα σε μεμονωμένους (1-3) ασθενείς, εκτός της p.E822X, η οποία παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα στη βόρεια Ελλάδα. Πλήρης κατάλογος των μεταλλάξεων ΚΙ φαίνεται στον πίνακα 1. Τρεις από τις μεταλλάξεις (p.F508del, p.G542X και p.N1303K) είναι κοινές διεθνώς, οι υπόλοιπες -με εξαίρεση την p.E822X- παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα στην περιοχή της Μεσογείου σε ευρείες γεωγραφικές περιοχές, ενώ άλλες εμφανίζονται σε περιορισμένες περιοχές.^{7,8,30} Η μετάλλαξη p.G542X είναι κοινή στην περιοχή της Μεσογείου, με μέση συχνότητα 4,3%, ενώ η p.N1303K βρίσκεται στις περισσότερες χώρες της δυτικής Μεσογείου, με την υψηλότερη συχνότητα στην Τυνησία (17,2%). Άλλες κοινές μεταλλάξεις, όπως η c.621+1G>T, η οποία θεωρείται Κέλτικη, η c.2789+5G>A και η c.2183AA>G, οι οποίες θεωρούνται νοτιο-Ευρωπαϊκές, έχουν αποκτήσει σχετικά υψηλές συχνότητες στη νοτιοανατολική Μεσόγειο. Η p.R1158X θεωρείται αρκετά σπάνια και βρίσκεται στη νότια Ιταλία και Ελλάδα με παρόμοια συχνότητα. Θεωρείται ότι έχει προέλευση στη συγκεκριμένη περιοχή.^{23,31,32,35,40} Η p.E822X έχει μέχρι στιγμής βρεθεί μόνο στον ελληνικό πληθυσμό, στη βορειοκεντρική Ελλάδα. Δεκαέξι μεταλλάξεις παρουσιάζουν συχνότητα μεταξύ 0,4-1,1% (πίν. 1). Από αυτές, οι c.1677delTA και p.R1070Q έχουν αυξημένη συχνότητα στη Βουλγαρία και την Τουρκία, η c.3272-26A>G στην Πορτογαλία, τη Γαλλία και το Βέλγιο (συχνότητα 1-2,8%) και η c.3120+1G>A, η οποία θεωρεί-

ται αφρικανική, παρουσιάζεται με αυξημένη συχνότητα σε αфро-αμερικανούς (13,9%).^{8,41} Η p.R334W θεωρείται κοινή στην ανατολική Μεσόγειο, με αρκετά υψηλή συχνότητα στην Κρήτη. Η p.W1282X είναι η πλέον κοινή μετάλλαξη στους Ασκενάσι Εβραίους και η c.621+3A>G, η οποία επίσης εμφανίζεται στη Γαλλία, αρχικά αναφερόταν ως πολυμορφισμός και καθορίστηκε ως μετάλλαξη ματίσματος μετά από μελέτες έκφρασης.^{7,30,41-43}

Απλότυποι μεταλλάξεων στον ελληνικό πληθυσμό. Τα φυσιολογικά αλληλόμορφα βρέθηκαν να συνδέονται με 11 αλληλία για τη θέση IVS8CA (17 και 18 επαναλήψεις συχνότερες), με 23 αλληλία για τη θέση IVS17BTA (30, 31 και 32 επαναλήψεις περισσότερο συχνές) και μόνο με 6 αλληλία για τη θέση IVS17BCA, η οποία έδειξε τη μικρότερη ετερογένεια (επαναλήψεις 13 και 17 συχνότερες). Η μετάλλαξη p.F508del συνδέεται με 7 αλληλία για τη θέση IVS8CA (25 και 26 επαναλήψεις περισσότερο κοινές), 12 αλληλία για τη θέση IVS17BTA (31 και 32 πλέον κοινές επαναλήψεις) και μόνο ένα αλληλίο (13 επαναλήψεις) για τη θέση IVS17BCA. Οι άλλες κοινές μεταλλάξεις έδειξαν μικρότερη ετερογένεια αλληλομόρφων και για τις θέσεις IVS8CA και IVS17BTA (πίνακες 2-4). Η μετάλλαξη p.F508del έδειξε ισχυρή σύνδεση με ένα δι-αλληλομορφικό απλότυπο (12216112, 65,2%), που έχει συχνότητα 0,02% στα φυσιολογικά χρωμοσώματα στον ελληνικό πληθυσμό. Με τον ίδιο απλότυπο συνδέονται και οι άλλες τρεις κοινές μεταλλάξεις c.621+1G>T, p.G542X και p.N1303K, εύρημα που έχει πιστοποιηθεί και σε άλλους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, ενισχύοντας τη θεωρία της αρχαίας προέλευσης αυτών των μεταλλάξεων.^{28,44-46} Ο κοινός απλότυπος 25-31-13 των μικροδορυφορικών επαναλήψεων, που βρέθηκε στον ελληνικό πληθυσμό να συνδέεται με τη μετάλλαξη p.F508del, πιθανόν να προήλθε από τον κοινό ευρωπαϊκό 23-31-13 μέσω της διαδικασίας ολίσθησης κατά τη μείωση. Οι άλλες κοινές μεταλλάξεις p.G542X (25-33/34-13) και p.N1303K (25-32-13) παρουσιάζουν τις 25 επαναλήψεις για τη θέση 8CA από κοινού με τους υπόλοιπους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Ο πλέον κοινός απλότυπος για τη μετάλλαξη c.621+1G>T ήταν ο 23-32-13 (πίνακες 2 και 3). Η παρατηρούμενη μεγαλύτερη ετερογένεια στους απλότυπους που συνδέονται με την p.F508del στον ελληνικό πληθυσμό συνηγορεί υπέρ της θεωρίας της εμφάνισης της συγκεκριμένης μετάλλαξης πρώτα στη νότια Ευρώπη, γεγονός που θα ευνοούσε τον ανασυνδυασμό μεταξύ των αλληλίων και τη μεγαλύτερη ετερογένεια στους απλότυπους.^{31,46} Η p.R1158X θεωρείται μετάλλαξη της περιοχής της Μεσογείου (Ιταλία, Γαλλία, Ελλάδα), όμως εμφανίζεται με διαφορετικό απλότυπο σε καθέναν από

αυτούς τους πληθυσμούς, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί με την επανεμφάνιση της μετάλλαξης εκ νέου σε καθεμιά από τις παραπάνω πληθυσμιακές ομάδες.⁴⁰ Ο μικροδορυφορικός απλότυπος 16-7-17 βρέθηκε να συνδέεται με τα ιταλικά χρωμοσώματα ΚΙ, ενώ στους Γάλλους ασθενείς με ΚΙ ο απλότυπος της μετάλλαξης ήταν 16-7/45-17/13 και για τον ελληνικό πληθυσμό ήταν 25/17-28/33/34-13 (25-34-13, 3 αλληλίες). Η μετάλλαξη μπορεί να εισήχθη στη νότια Ιταλία από τους αρχαίους Έλληνες. Οι σπάνιες και οι ελληνικές μεταλλάξεις συνδέονται η καθεμιά με συγκεκριμένους απλότυπους, οι οποίοι είναι κοινοί και στα φυσιολογικά χρωμοσώματα υποστηρίζοντας τη θεωρία της πρόσφατης προέλευσης αυτών των μεταλλάξεων. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για την κοινή ελληνική μετάλλαξη p.E822X, που βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά συνδεδεμένη με τους απλότυπους 17-30-13 και 11117212, επίσης κοινούς στα φυσιολογικά χρωμοσώματα. Η ανάλυση σύνδεσης των απλοτύπων με τις μεταλλάξεις στον ελληνικό πληθυσμό προσθέτει στοιχεία για την ιστορική καταγωγή των μεταλλάξεων στον ευρωπαϊκό χώρο και επιβεβαιώνει ότι η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί έναν έγκυρο τρόπο αξιολόγησης της μοριακής ετερογένειας ενός πληθυσμού. Η μεγάλη μοριακή ετερογένεια του ελληνικού πληθυσμού (τόσο σε επίπεδο μεταλλάξεων όσο και σε επίπεδο απλοτύπων) συμφωνεί με την πρωτύτερη εμφάνιση μεταλλάξεων ΚΙ στη νότια Ευρώπη.^{31,46-48}

Μονοσυμπωματικές μορφές κυστικής ίνωσης

Ανδρική υπογονιμότητα: CBAVD, αποφρακτική αζωοσπερμία (OA) και ολιγοσπερμία. Στειρότητα σε άνδρες με ΚΙ οφείλεται κυρίως σε απόφραξη ή έλλειψη του σπερματικού πόρου,¹ όμως η πρωτεΐνη CFTR μπορεί να συμβάλλει και σε κάποια ανωμαλία στη σπερματογένεση, επειδή έχει παρατηρηθεί ελαττωμένος αριθμός ώριμων σπερματίδων και παρουσία πολλών δυσμορφικών σπερματίδων στο τελευταίο στάδιο της ανάπτυξης σε ασθενείς με ΚΙ.⁴⁹

Η συσχέτιση μεταξύ CBAVD και μεταλλάξεων στο γονίδιο ΚΙ έχει ήδη καταγραφεί.^{10,14,50-52} Η ύπαρξη δύο μεταλλάξεων ΚΙ (συμπεριλαμβανομένου του πολυμορφισμού IVS8-5T) έχει παρατηρηθεί σε περίπου 47% των περιπτώσεων και μία μετάλλαξη στο 24% των ανδρών με CBAVD. Το πλέον συχνό αλληλίο σε άνδρες με CBAVD είναι ο πολυμορφισμός IVS8-5T.^{10,17,30,52,53} Γενικά, παρατηρείται ο συνδυασμός μίας «βαριάς» μετάλλαξης και μίας «ήπιας» ή κάποιου σπάνιου πολυμορφισμού, έτσι ώστε η ήπια μετάλλαξη να επικρατεί, με αποτέλεσμα ήπιο κλινικό φαινότυπο. Αυτά τα ήπια αλληλία

παράγουν πρωτεΐνη CFTR με μειωμένα επίπεδα έκφρασης (8-10% του φυσιολογικού), προκαλώντας ανωμαλίες μόνο στο σπερματικό πόρο χωρίς να επηρεάζουν τα υπόλοιπα όργανα, που υπολειπόμενα σε κλασικές μορφές της νόσου. Αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων έχει επίσης παρατηρηθεί σε υγιείς άνδρες με μειωμένη ποιότητα σπέρματος και σε άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία παρουσία σπερματικού πόρου.^{10,54,55}

Δικές μας μελέτες σε 48 άνδρες με CBAVD απέδειξαν την παρουσία δύο μεταλλάξεων σε ποσοστό 27,1%, με την p.F508del περισσότερο κοινή (20,8% έναντι 54,5% σε ασθενείς ΚΙ), ενώ 25% ήταν φορείς. Ο πολυμορφισμός IVS8-5T βρέθηκε με συχνότητα 22,9%, σε σύγκριση με 3% στο γενικό πληθυσμό. Σε αυτή την ομάδα ασθενών βρέθηκαν συνολικά 22 διαφορετικά αλληλία ΚΙ, με την πλειονότητα των μεταλλάξεων, εκτός των p.R352W, p.M952I, p.L932X, c.4010delTAT, p.G817V, c.3659delC, c.2790-8C>G, p.S549N, p.C491S, c.2752-6T>C και p.M1I, να εμφανίζονται και σε ασθενείς ΚΙ (πίνακες 1 και 5). Αυξημένη δοκιμασία ιδρώτα (Na >60 mEq/L) βρέθηκε μόνο σε 4 άνδρες με CBAVD, οι οποίοι ήταν διπλοί ετεροζυγώτες. Τρεις παρουσίασαν επιπρόσθετα και επαναλαμβανόμενα επεισόδια βρογχίτιδας ή χρόνιο βήχα.

Από τους 40 άνδρες με OA, 27,5% ήταν τουλάχιστον φορείς, 3 με βαριά μετάλλαξη (p.F508del, p.W496X, p.W1282X). Η συχνότητα του IVS8-5T αλληλίου ήταν 7,5%. Η δοκιμασία ιδρώτα παρουσίασε οριακές τιμές (Na 40-60 mEq/L) σε τρεις. Η υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων ΚΙ σε αυτή την ομάδα (27,5%) προτείνει ότι η πρωτεΐνη CFTR μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη σπερματογένεση ή στην ωρίμανση του σπέρματος, που είναι ανεξάρτητος από το ρόλο της στην ανάπτυξη επιθηλιακών αγωγών, όπως ο σπερματικός πόρος.^{49,54,55}

Από τους 46 άνδρες με σοβαρή μορφή ολιγοσπερμίας, 13% βρέθηκαν φορείς μετάλλαξης ΚΙ και 2,2% ήταν φορείς του αλληλίου IVS8-5T (πίν. 5).

Συμπερασματικά, η ύπαρξη μεταλλάξεων ΚΙ αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα ανδρικής υπογονιμότητας, ιδιαίτερα της CBAVD (συχνότητα μεταλλάξεων ΚΙ 56,2%), αλλά επίσης και στις περιπτώσεις OA (27,5%). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σημαντικά στα ζευγάρια που καταφεύγουν σε εξωσωματική γονιμοποίηση με τη μέθοδο μικρογονιμοποίησης (ICSI). Τα ζευγάρια αυτά θα πρέπει να υποβάλλονται σε λεπτομερή ανιχνευτικό έλεγχο του 85-90% των παθολογικών αλληλίων ΚΙ του συγκεκριμένου πληθυσμού όπου ανήκουν. Λόγω της μειωμένης διεισδυτικότητας ορισμένων σπάνιων μεταλλάξεων που φέρουν οι άνδρες με υπογονιμότητα, η γενετική συμ-

βουλευτική για τον κλινικό φαινότυπο των παιδιών τους είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Περιπτώσεις σπάνιων συνδυασμών γονοτύπου (p.F1052V/p.M384K και p.D565G/c.406T>C) έχουν αντιμετωπιστεί από την ομάδα μας. Οι διπλοί ετεροζυγώτες με CBAVD και θετική δοκιμασία ιδρώτα χρήζουν κλινικής παρακολούθησης για περαιτέρω εμφάνιση πνευμονολογικών συμπτωμάτων της νόσου.

Πιλοτικό πρόγραμμα ανίχνευσης ετεροζυγωτών

Τα προγράμματα ανίχνευσης ετεροζυγωτών, ιδιαίτερα για γενετικά νοσήματα με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο μεταβίβασης, στοχεύουν στην αναγνώριση φορέων του νοσήματος στο γενικό πληθυσμό. Δύο διαφορετικές στρατηγικές έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί σε πιλοτικά προγράμματα διεθνώς. Η 1η στρατηγική προσφέρει έλεγχο φορέων στο γενικό πληθυσμό, ενώ η άλλη στοχεύει ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως το συγγενικό περιβάλλον του ασθενούς ή άτομα (ζευγάρια) με συγκεκριμένους κλινικούς φαινότυπους της νόσου.⁵⁶⁻⁵⁹ Για πληθυσμούς με μεγάλη μοριακή ετερογένεια, όπως οι πληθυσμοί της Μεσογείου και των Βαλκανίων, τα αυτοματοποιημένα συστήματα (ASR-kits) που κυκλοφορούν στην αγορά καλύπτουν μόνο το 70-75% των αλληλομόρφων ΚΙ, επομένως δεν είναι κατάλληλα για ανίχνευση μεταλλάξεων στο γενικό πληθυσμό ή ακόμη και για τις μονοσυμπτωματικές μορφές της νόσου.

Για την αποκάλυψη φορέων, στο εργαστήριό μας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DGGE για έλεγχο ποσοστού 86% των μεταλλάξεων που εντοπίζονται σε 15 κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου *CFTR*. Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου, αν και δεν επιδέχεται αυτοματοποίησης και δεν είναι αρκετά ταχεία για ανιχνευτικό έλεγχο, είναι η δυνατότητα ανίχνευσης μετάλλαξης σε οποιαδήποτε κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου και η μεγάλη ευαισθησία της (~100%) ως προς τον εντοπισμό μεταλλάξεων. Μέχρι την ανάπτυξη αυτοματοποιημένων συστημάτων που να καλύπτουν 86-90% των παθολογικών αλληλίων σε πληθυσμούς με μεγάλη ποικιλομορφία στις μεταλλάξεις υπεύθυνες για το νόσημα, θεωρείται προς το παρόν ως η πλέον κατάλληλη. Ο ανιχνευτικός έλεγχος περιορίστηκε σε ομάδες υψηλού κινδύνου, στο συγγενικό περιβάλλον των ασθενών, σε ζευγάρια όπου το ένα μέλος έχει συγγενή με τη νόσο και σε ζευγάρια (ελέγχοντας και τα δύο μέλη του ζευγαριού) που καταφεύγουν σε ΚΥΑ λόγω ανδρικής υπογονιμότητας.¹⁰ Ο εναπομένον κίνδυνος μετά από ανιχνευτικό έλεγχο που καλύπτει το 86% των μεταλλάξεων στο συγκεκριμένο πληθυσμό είναι 1/161. Ζευγάρια όπου το ένα μέλος είναι φορέας και το άλλο μετά από ανι-

χνευτικό έλεγχο αποδειχθεί αρνητικό, μειώνουν τον κίνδυνο απόκτησης παιδιού με ΚΙ από 1/644 στο 1/100. Στις περιπτώσεις όπου και τα δύο μέλη ενός ζευγαριού αποδειχθούν αρνητικά, ο κίνδυνος απόκτησης παιδιού με ΚΙ μειώνεται στο 1/103324. Για τα περισσότερα ζευγάρια αυτό αποτελεί σημαντική καθυστερητική πληροφορία.

Μέσω του συγκεκριμένου προγράμματος ελέγχθηκαν 900 άτομα συνολικά [175 ζευγάρια, 91 μη πάσχοντα αδέρφια ασθενών, 285 συγγενείς ασθενών (Σ) και 174 άτομα γενικού πληθυσμού (ΓΠ)] και αποκαλύφθηκαν 188 φορείς ΚΙ. Όπως αναμενόταν, το μεγαλύτερο ποσοστό των φορέων βρέθηκε ανάμεσα στα 91 αδέρφια ασθενών (63,7%) και ατόμων στο άμεσο συγγενικό περιβάλλον (40,4%). Η συχνότητα φορέων στο γενικό πληθυσμό ανήλθε σε 8,6% (15/174). Βρέθηκαν και 6 ζευγάρια (6/175) όπου και τα δύο μέλη ήταν φορείς [1 ΓΠ/Σ (0,9%), 2 ΓΠ/ΓΠ (6,25%), 2 ΓΠ/CBAVD (8,7%) και 1 ΓΠ/ΚΙ (7,1%)]. Προγεννητική διάγνωση προσφέρθηκε σε αυτά τα ζευγάρια, συμπεριλαμβανομένης και μίας δίδυμης κύησης από μικρογονιμοποίηση, λόγω CBAVD. Ο έλεγχος απέδειξε την ύπαρξη ενός ομοζυγώτη, 4 ετεροζυγωτών και 3 φυσιολογικών εμβρύων.

Προγεννητική διάγνωση

Ο χαρακτηρισμός του είδους και της συχνότητας των μεταλλάξεων σε συγκεκριμένο πληθυσμό αποτελεί προϋπόθεση για την εφαρμογή προγραμμάτων πρόληψης και προγεννητικής διάγνωσης. Για τον ελληνικό πληθυσμό, που παρουσιάζει μεγάλη μοριακή ετερογένεια, η στρατηγική της μεθοδολογίας DGGE και η ανάλυση της αλληλουχίας συγκεκριμένων τμημάτων του γονιδίου κατέληξε στο χαρακτηρισμό του 92% των αλληλομόρφων ΚΙ. Στις περιπτώσεις οικογενειών με 25% κίνδυνο γέννησης παιδιού με ΚΙ, εάν οι μεταλλάξεις είναι γνωστές στην οικογένεια πριν από την εγκυμοσύνη, η ανάλυση με DGGE επιτρέπει τον εντοπισμό των μεταλλάξεων σε δείγμα χοριακών λαχνών ή αμνιακού υγρού μέσα σε δύο μέρες. Η πρόσθετη χρήση των πολυμορφικών μικροδορυφορικών δεικτών επιτρέπει τη διάγνωση σε περιπτώσεις όπου είναι γνωστή μόνο η μία γονεϊκή μετάλλαξη και ελέγχει το δείγμα DNA εμβρύου για μητρική ανάμιξη και επιβεβαίωση πατρότητας.

Προγεννητική διάγνωση εφαρμόστηκε σε 176 ζευγάρια. Σε όλα εκτός από 4 εφαρμόστηκε άμεση ανίχνευση μεταλλάξεων, ενώ στα 4 ζευγάρια που ήταν γνωστή μόνο η μία μετάλλαξη εφαρμόστηκε συνδυασμός άμεσης ανίχνευσης και μελέτης πολυμορφισμών. Τα αποτελέσματα του ελέγχου αποκάλυψαν 46 φυσιο-

λογικά, 80 ετεροζυγώτες και 41 πάσχοντα έμβρυα. Μητρική ανάμιξη δεν παρατηρήθηκε σε κάποια από τις περιπτώσεις.

Ένας παράγοντας που μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στον προγεννητικό έλεγχο είναι η ύπαρξη δύο μεταλλάξεων στο ίδιο χρωμόσωμα (in cis) στους μη πάσχοντες γονείς. Στο υλικό που μελετήθηκε, εντοπίστηκαν δύο τέτοιες περιπτώσεις (p.R1070Q+p.S446X και p.Q2X+p.R3W, αντίστοιχα). Η επιβεβαίωση ότι το ένα γονεϊκό αλληλόμορφο περιέχει 2 μεταλλάξεις πρέπει να γίνει πριν από την προγεννητική διάγνωση και το έμβρυο να ελεγχθεί για μία από τις δύο μεταλλάξεις. Άλλη περίπτωση που χρήζει ιδιαίτερης προσοχής είναι γονείς διπλοί ετεροζυγώτες χωρίς να παρουσιάζουν συμπτώματα κλασικής μορφής ΚΙ. Βρέθηκαν 4 τέτοιες περιπτώσεις, δύο (p.F508del/p.K162E και p.R1158X/p.R1070Q) με τελείως ασυμπτωματικούς γονείς και δύο με ένα γονέα CBAVD (p.F1052V/p.F1052V και p.F508del/p.M952I). Το DNA του εμβρύου έπρεπε να ανιχνευθεί για την ύπαρξη τριών γονεϊκών μεταλλάξεων. Προβλήματα γενετικής συμβουλευτικής προκύπτουν όταν το έμβρυο συνδυάζει μία κλασική μετάλλαξη και μία σπάνια, που απαντάται σε μη τυπικές μορφές της ΚΙ. Δύο τέτοιες περιπτώσεις προέκυψαν από ζευγάρια που προήλθαν από ΚΥΑ και τα έμβρυα διαγνώστηκαν με τους ακόλουθους γονότυπους: p.F1052V/p.M384K και p.D565G/c.406T>C. Στα ζευγάρια δόθηκε γενετική συμβουλευτική για την πιθανή ηπιότητα του κλινικού φαινοτύπου και αποφάσισαν τη συνέχιση της εγκυμοσύνης.

Προγεννητική διάγνωση σε κήσεις με ύπαρξη υπερηχογένειας εντέρου στο έμβρυο

Σε 74 περιπτώσεις, λόγω υπερηχογένειας που παρατηρήθηκε στο έμβρυο σε έλεγχο ρουτίνας κατά το δεύτερο τρίμηνο κύησης, έγινε έλεγχος σε αμνιακό υγρό. Αρνητικό αποτέλεσμα ελέγχου των δειγμάτων για 62 συνολικά μεταλλάξεις (86% των αλληλίων ΚΙ στον ελληνικό πληθυσμό) μειώνει την πιθανότητα ΚΙ στο έμβρυο. Βιβλιογραφικά, αναφέρεται ότι εάν δεν βρεθούν μεταλλάξεις ΚΙ, η πιθανότητα το έμβρυο να πάσχει κυμαίνεται μεταξύ 1/453 έως 1/1516, ενώ εάν το έμβρυο βρεθεί ετεροζυγώτης η πιθανότητα να πάσχει τελικά ανέρχεται στο 10–20%.^{20,60–62} Στις περιπτώσεις υπερηχογένειας είναι σωστό να ελέγχονται οι γονείς συγχρό-

ως με το DNA του εμβρύου. Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο των 74 περιπτώσεων αποκάλυψαν ομοζυγωτία σε 4 περιπτώσεις (3,6%), με τους ακόλουθους γονότυπους: p.F508del/p.L732X, p.F508del/c.574delA, p.F508del/p.F508del και p.F508del/p.G542X. Ετεροζυγωτία παρατηρήθηκε σε 15 έμβρυα (13,6%), 10 με p.F508del και από ένα φορέα των μεταλλάξεων c.621+1G>T, p.I148T, c.2789+5G>A, p.R297Q, p.E822X. Οι μελέτες μας έδειξαν ότι ο προϋπάρχων κίνδυνος το έμβρυο που παρουσιάζει υπερηχογένεια να πάσχει από ΚΙ είναι 3,6% (1/29 γεννήσεις, ποσοστό ~90 φορές υψηλότερο από αυτό του γενικού πληθυσμού) και ο κίνδυνος που παραμένει για ένα έμβρυο στο οποίο έχει βρεθεί μία μετάλλαξη να πάσχει υπολογίζεται στο 17,3%.⁶⁰ Οι πληροφορίες αυτές θεωρούνται αρκετά σημαντικές για σωστή γενετική συμβουλευτική στα ζευγάρια με το πρόβλημα.

Η πρόοδος που έχει συντελεστεί τα τελευταία χρόνια στη γενετική μετά από την ταυτοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει εισέλθει και στον τρόπο άσκησης της Ιατρικής όσον αφορά στη διάγνωση και τη θεραπεία γενετικών νοσημάτων. Μοριακός έλεγχος για γενετικά κληρονομικά νοσήματα με μεθοδολογία αιχμής, που είναι γρήγορη και ακριβής στον εντοπισμό πλήθους μεταλλάξεων, αποτελεί πλέον σημαντικό παράγοντα παροχής γενετικής πληροφορίας. Η εκτεταμένη έρευνα στο γονίδιο *CFTR* και στις κλασικές και μονοσυμπτωματικές μορφές της νόσου προσθέτει νέα στοιχεία για τον πλέον κατάλληλο τρόπο γενετικού ελέγχου. Η γνώση του γονοτύπου των ασθενών συμβάλλει στην κατάταξη των ασθενών σε συγκεκριμένες κατηγορίες, ώστε μελλοντικά να μπορέσουν να επωφεληθούν από τις νέες θεραπείες, που θα πρέπει να εξατομικεύονται ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε θερμά τους παρακάτω συναδέλφους για τη συνεργασία τους: Σ. Νιουντουνάκη, Σ.Ν. Αρβανιτάκη, Κ. Πάντο, Ι. Τσανάκα, Σ. Μηλλίγγο, Μ. Μαστρομηνά. Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την Κ. Πούλιου για την τεχνική βοήθεια. Η μελέτη έχει μερικώς επιχορηγηθεί από το Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο Μελέτης Γενετικών και Κακοήθων Νοσημάτων της Παιδικής Ηλικίας (ΕΠΙΚΝ).

ABSTRACT

Screening for cystic fibrosis mutations: Methods for molecular diagnosis, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals – the Greek experience

E. KANAVAKIS, M. TZETIS

Department of Medical Genetics, "St. Sophia" Children's Hospital, University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2006, 23(5):455-472

OBJECTIVE Cystic fibrosis (CF) is a severe autosomal recessive genetic disease, affecting 1 in 2,500 Caucasians, with 4% being asymptomatic carriers. The aim of this study was to characterize the spectrum of CF mutations in the Greek population with the purpose of initiating a prevention program for the identification of carriers among high risk individuals, including males with sterility, and offering prenatal diagnosis (PNO).

METHOD Mutation identification with the use of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of the coding regions of the *CFTR* gene was carried out on 500 classic CF patients of Greek origin and on 134 male infertility subjects (monosymptomatic form of *CFTR*). A prevention program was applied to 900 individuals. Prenatal diagnosis (PND) was carried out in 167 cases, including 110 with intrauterine bowel echogenicity.

RESULTS Among the 500 CF patients, 83 different mutations were characterized, accounting for 92% of CF genes. Mutation testing on 134 male infertility subjects showed that 56.2% of bilateral absent vas deferens (CBAVD) males were carriers and 27.1% were compound heterozygotes. Of the obstructive azoospermia (OA) males, 27.5% had at least 1 CF allele while only 13% of the severe oligospermia males were carriers. Mutation analysis on 900 individuals identified a total of 188 heterozygotes the majority amongst siblings and relatives of index cases. PND revealed 41 affected, 80 heterozygous, and 46 normal fetuses. Of the echogenic bowel fetuses, 15 had one detectable mutation and 4 were homozygotes. **CONCLUSIONS** Accurate knowledge of CF mutations provides information for CF prevention programs applicable through heterozygote screening and prenatal diagnosis.

Key words: CBAVD, Cystic fibrosis, Echogenic bowel, ICP, Mutation screening, Obstructive azoospermia, Oligospermia, Prenatal diagnosis

Βιβλιογραφία

1. WELSH MJ, RAMSEY BW, ACCURSO F, CUTTING GR. Cystic fibrosis. In: Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. McGraw-Hill, New York, 2001:5121–5188
2. KEREM B, ROMMENS JM, BUCHANAN JA, MARKIEWICZ D, COX TK, CHAKRAVARTI A ET AL. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* 1989, 245:1073–1080
3. RIORDAN JR, ROMMENS JM, KEREM B, ALON N, ROZMAHEL R, GRZELCZAK Z ET AL. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989, 245:1066–1073
4. ROMMENS JM, IANNUZZI MC, KEREM B, DRUMM ML, MELMER G, DEAN M ET AL. Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping. *Science* 1989, 245:1059–1065
5. VANKEERBERGERGHEN A, CUPPENS H, CASSIMAN JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: An intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 2002, 1:13–29
6. COHN JA. Reduced CFTR function and the pathobiology of idiopathic pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2005, (Suppl):S70–S77
7. CYSTIC FIBROSIS GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM – CFGAC. The CFTR mutation database <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>
8. BOBADILLA JL, MACEK MJR, FINE JP, FARRELL PM. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of *CFTR* mutations: Correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002, 19:575–606
9. ZIELENSKI J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000, 67:117–133
10. KANAVAKIS E, TZETIS M, ANTONIADI TH, PISTOFIDIS G, MILLIGOS S, KATTAMIS C. Cystic fibrosis mutation screening in CBAVD patients and men with obstructive azoospermia or severe oligospermia. *Mol Hum Reprod* 1998, 4:333–337
11. TZETIS M, EFTHYMIADOU A, STROFALIS S, PSYCHOU P, DIMAKOU A, POULIOU E ET AL. *CFTR* gene mutations –including three novel nucleotide substitutions– and haplotype background in patients with asthma, disseminated bronchiectasis and chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Genet* 2001, 108:216–221
12. NOONE PG, KNOWLES MR. CFTR-opathies: Disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. *Respir Res* 2001, 2:328–332

13. CASALS T, De GRACIA J, GALLEGO M, DORCA J, RODRIGUEZ-SANCHON B, RAMOS MD ET AL. Bronchiectasis in adult patients: An expression of heterozygosity for *CFTR* gene mutations? *Clin Genet* 2004, 65:490–495
14. CLAUSTRES M. Symposium: Genetic aspects of male (in)fertility. Molecular pathology of the *CFTR* locus in male infertility. *Reprod BioMedicine Online* 2005, 10:14–41
15. AHMED N, COREY M, FORSTNER G, ZIELENSKI J, TSUI LC, ELLIS L ET AL. Molecular consequences of cystic fibrosis transmembrane regulator (*CFTR*) gene mutations in the exocrine pancreas. *Gut* 2003, 52:1159–1164
16. STRONG TV, WILKINSON DJ, MANSOURA MK, DEVOR DC, HENZE K, YANG Y ET AL. Expression of an abundant alternatively spliced form of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene is not associated with a cAMP-activated chloride conductance. *Hum Mol Genet* 1993, 2:225–230
17. GROMAN JD, HEFFERON TW, CASALS T, BASSAS L, ESTIVILL X, DES GEORGES M ET AL. Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *Am J Hum Genet* 2004, 74:176–179
18. ZIELENSKI J, TSUI LC. Cystic fibrosis: Genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 1995, 29:777–807
19. WATSON MS, CUTTING GR, DESNICK RJ, DRISCOLL DA, KLINGER K, MENNUTI M ET AL. Cystic fibrosis population screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med* 2005, 6:387–391
20. MONAGHAN KG, FELDMAN GL. The risk of prenatal diagnosis with prenatally detected echogenic bowel in an ethnically and racially diverse North American Population. *Prenat Diagn* 1999, 19:604–609
21. VRETTOU C, TZETIS M, TRAEGER-SYNODINOS J, PALMER G, KANAVAKIS E. Multiplex sequence variation detection throughout the *CFTR* gene appropriate for pre-implantation genetic diagnosis in populations with heterogeneity of cystic fibrosis mutations. *Mol Hum Reprod* 2002, 8:880–886
22. FRIEDMAN KJ, HIGHSMITH WE Jr, SILVERMAN LM. Detecting multiple cystic fibrosis mutations by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem* 1991, 37:753–755
23. TZETIS M, KANAVAKIS E, ANTONIADI TH, DOUDOUNAKIS S, ADAM G, KATTAMIS C. Characterization of more than 85% of cystic fibrosis alleles in the Greek population, including five novel mutations. *Hum Genet* 1997, 99:121–125
24. KANAVAKIS E, EFTHYMIADOU A, STROFALIS S, DOUDOUNAKIS S, TRAEGER-SYNODINOS J, TZETIS M. Cystic fibrosis in Greece: Molecular diagnosis, haplotypes, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals. *Clin Genet* 2003, 63:400–409
25. FANEN P, GHANEM N, VIDAUD M, BESMOND C, MARTIN J, COSTES B ET AL. Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) coding regions and splice site junctions. *Genomics* 1992, 13:770–776
26. FRIEDMAN KJ, HEIM R, KNOWLES MR, SILVERMAN LM. Rapid characterization of the variable length polythymidine tract in the cystic fibrosis (*CFTR*) gene: Association of the 5T allele with selected *CFTR* mutations and its incidence in atypical sinopulmonary disease. *Hum Mutat* 1997, 10:108–115
27. ZIELENSKI J, ROZMAHEL R, BOZON D, KEREM B, GRZELCZAK Z, RIORDAN JR ET AL. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. *Genomics* 1991, 10:214–228
28. DORK T, NEUMANN T, WULBRAND U, WULF B, KALIN N, MAASS G ET AL. Intra- and extragenic marker haplotypes of *CFTR* mutation in cystic fibrosis families. *Hum Genet* 1992, 88:417–425
29. MORRAL N, ESTIVILL X. Multiplex PCR amplification of three microsatellites within the *CFTR* gene. *Genomics* 1992, 13:1362–1364
30. ESTIVILL X, BANCELLS C, RAMOS C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat* 1997, 10:135–154
31. CLAUSTRES M, DESGEORGE M, MOINE P, MORRAL N, ESTIVILL X. *CFTR* haplotypic variability for normal and mutant genes in cystic fibrosis families from southern France. *Hum Genet* 1996, 98:336–344
32. CHILLON M, CASALS T, GIMENEZ J, NUNES V, ESTIVILL X. Analysis of the *CFTR* gene confirms the high genetic heterogeneity of the Spanish population: 43 mutations account for only 78% of CF chromosomes. *Hum Genet* 1994, 93:447–451
33. CASALS T, GIMENEZ J, RAMOS M, NUNES V, ESTIVILL X. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis in a highly heterogeneous population. *Prenat Diagn* 1996, 16:215–222
34. MENDES F, ROXO-ROSA M, DRAGOMIR A, FARINHA CM, ROOMANS GM, AMARAL MD ET AL. Unusually common cystic fibrosis mutation in Portugal encodes a misprocessed protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 311:665–671
35. CASTALDO G, POLIZZI A, TOMAIUOLO R, CAZENEUVE C, GIRODON E, SANTOSTASI T ET AL. Comprehensive cystic fibrosis mutation epidemiology and haplotype characterization in a southern Italian population. *Ann Hum Genet* 2005, 69:15–24
36. DES GEORGES M, GUITTARD C, ALTIERI JP, TEMPLIN C, SARLES J, SARDA P ET AL. High heterogeneity of *CFTR* mutations and unexpected low incidence of cystic fibrosis in the Mediterranean France. *J Cyst Fibros* 2004, 3:265–272
37. RADIVOJEVIC D, DJURISIC M, LALIC T, GUC-SCEKIC M, SAVIV J, MINIC P ET AL. Spectrum of cystic fibrosis mutations in Serbia and Montenegro and strategy for prenatal diagnosis. *Genet Test* 2004, 8:276–280
38. GASPARINI P, MARIGO C, BISCEGLIA G, NICOLIS E, ZELANTE L, BOMBIERI C ET AL. Screening of 62 mutations in a cohort of cystic fibrosis patients from north eastern Italy: Their incidence and clinical features of defined genotypes. *Hum Mutat* 1993, 2:389–394
39. FEREC C, AUDREZET MP, MERCIER B, GUILLERMIT H, MOULLIER P, QUERE I ET AL. Detection of over 98% cystic fibrosis mutations in a Celtic population. *Nat Genet* 1992, 3:188–191

40. CASTALDO G, FUCCIO A, CAZENEUVE C, PIZZI L, SALVATORE D, RAlA V ET AL. Detection of five rare cystic fibrosis mutations peculiar to southern Italy. Implications in screening for the disease and phenotype characterization for patients with homozygote mutations. *Clin Chem* 1999, 47:929–931
41. DORK T, EL-HARITH EH, STRUHRMANN M, MACEK MJR, EGAN M, CUTTING GR ET AL. Evidence for a common ethnic origin of cystic fibrosis mutation 3120+1G>A in diverse populations. *Am J Hum Genet* 1998, 63:652–662
42. AMARAL MD, PANCHECO P, BECK S, FARINHA CM, PENQUE D, NOGUEIRA P ET AL. Cystic fibrosis patients with the 3272–26A>G splicing mutation have milder disease than F508del homozygotes: A large European study. *J Med Genet* 2001, 38:777–782
43. TZETIS M, EFTHYMIADOU A, DOUDOUNAKIS S, KANAVAKIS E. Qualitative and quantitative analysis of mRNA associated with four putative splicing mutations (621+3A>G, 2751+2T>A, 296+1G>C, 1717–9T>C-D565G) and one nonsense mutation (E822X) in the *CFTR* gene. *Hum Genet* 2001, 109:592–601
44. MORRAL N, NUNES V, CASALS T, CHILLON M, GIMENEZ J, BERTRANPETIT J ET AL. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: Mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Mol Genet* 1993, 2:1015–1022
45. MORRAL N, BERTRANPETIT J, ESTIVILL X, NUNES V, CASALS T, GIMENEZ J ET AL. The origin of the major cystic fibrosis mutation (DF508) in European populations. *Nat Genet* 1994, 7:169–175
46. MORRAL N, DORK T, LLEVADOT R, DZIADEK V, MERCIER B, FEREC C ET AL. Haplotype analysis of 94 cystic fibrosis mutations with seven polymorphic *CFTR* DNA markers. *Hum Mutat* 1996, 8:149–159
47. BERTRANPETIT J, CALAFELL F. Genetic and geographical variability in cystic fibrosis: Evolutionary considerations. *Ciba Found Symp* 1996, 197:97–118
48. ANGELICHEVA D, CALAFELL F, SAVOV A, JORDANOVA A, KUFARDJIEVA A, GALEVA I ET AL. Cystic fibrosis mutations and associated haplotypes in Bulgaria – a comparative population genetic study. *Hum Genet* 1997, 99:513–520
49. TREZISE AEO, LINDER CC, GRIEGER D, THOMPSON EW, MEUNIER H, GRISWOLD MD ET AL. *CFTR* expression is regulated during both the cycle of seminiferous epithelium and the oestrous cycle of rodents. *Nat Genet* 1993, 3:157–164
50. CHILLON M, CASALS T, MERCIER B, BASSA SL, LISSENS W, SILBER S ET AL. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995, 332:1475–1480
51. COSTES B, GIRODON E, GHANEM N, FLORI E, JARDIN A, SOUFIR JC ET AL. Frequent occurrence of the *CFTR* intron 8 (TG)_n5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Eur J Hum Genet* 1995, 3:285–293
52. CLAUSTRES M, GUITTARD C, BOZON D, CHEVALIER F, VERLINGUE C, FEREC C ET AL. Spectrum of *CFTR* mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. *Hum Mut* 2000, 16:143–156
53. ESTIVILL X. Complexity in monogenic disease. *Nat Genet* 1996, 12:348–350
54. MESCHENDE D, DWORNICZAK B, BEHRE HM, KLIESCH S, CLAUSTRES M, NIESCHLAG E ET AL. *CFTR* gene mutations in men with bilateral ejaculatory-duct obstruction and anomalies of the seminal vesicles. *Am J Hum Genet* 1997, 61:1200–1202
55. VAN DER VEN K, MESSER L, VAN DER VEN H, JEYENDRAN R, OBER C. Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduced sperm quality. *Hum Reprod* 1996, 11:513–517
56. SUPER M, SCHWARZ MJ, MALONE G, ROBERTS T, HOWORTH A, DERMODY G. Active cascade testing for carriers of cystic fibrosis gene. *Br Med J* 1994, 308:1462–1468
57. BROCK DJH. Heterozygote screening for cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 1995, 3:2–13
58. MENNUTI MT. Lights! Camera! Action! *Obstet Gynecol* 2001, 98:539–541
59. PALOMAKI GE, FITZSIMMONS SC, HADDOW JE. Clinical sensitivity of prenatal screening for cystic fibrosis via *CFTR* carrier testing in a United States panethnic population. *Genet Med* 2004, 6:405–414
60. BOSCO AF, NORTON ME, LIEBERMAN E. Predicting the risk of cystic fibrosis with echogenic fetal bowel and one cystic fibrosis mutation. *Obstet Gynecol* 1999, 94:1020–1023
61. STROCKER AM, SNIJDERS RJ, CARLSON DE, GREENE N, GREGORY KD, WALLA CA ET AL. Fetal echogenic bowel: Parameters to be considered in differential diagnosis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000, 16:519–523
62. SEPUVELDA W, SEBINE NJ. Fetal echogenic bowel: A complex scenario. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000, 16:510–514

Corresponding author:

M. Kanavakis, Department of Medical Genetics, “St. Sophia” Children’s Hospital, University of Athens, GR-115 27 Athens, Greece
 e-mail: ekanavak@cc.uoa.gr