



Zastupljenost F508del mutacije i 5T alela politimidinskog trakta u CFTR genu kod pacijenata sa hroničnim pankreatitisom i adenokarcinomom pankreasa

Aleksandra Nikolić¹, Jelena Dinić¹, Dragica Radojković¹,
Snežana Lukić², Dragan Popović^{2,4}, Milenko Uglješić^{2,4},
Srboj Knežević^{3,4}

¹Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Beograd

²Klinika za gastroenterologiju i hepatologiju, KCS, Beograd

³Prva hirurška klinika, KCS, Beograd

⁴Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

rezime **Uvod:** Mutacije u CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) genu mogu biti povezane sa različitim tipovima pankreasne patologije i da nose povišen rizik za oboljenja pankreasa. Najčešća mutacija u obolelih od cistične fibroze je F508del, dok je alel 5T povezan sa atipičnim oblicima cistične fibroze. **Cilj rada:** Cilj ove studije bio je da se utvrdi učestalost F508del mutacije i 5T alela u genu za transmembranski regulator provodljivosti u cističnoj fibrozi (CFTR ili Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) u grupama pacijenata sa hroničnim pankreatitisom i adenokarcinomom pankreasa, kao i da se istraži da li ove genske varijante predstavljaju faktore rizika za nastanak bolesti pankreasa. **Metod rada:** Istraživanje je obuhvatilo 50 pacijenata sa hroničnim pankreatitisom i 50 pacijenata sa adenokarcinomom pankreasa, kao i 124 zdrava ispitanika. Utvrđivanje prisustva F508del mutacije i detekcija 5T, 7T i 9T alela politimidinskog trakta vršeni su na DNK izolovanoj iz periferne krvi ispitanika pomoću metode PCR-om posredovane mesto-specifične mutageneze (PSM ili PCR-mediated site-directed mutagenesis). **Rezultati:** Učestalost F508del mutacije u hroničnom pankreatitisu (3,0%) bila je značajno povišena ($p=0,032$) u odnosu na učestalost u grupi zdravih ispitanika (0,4%), dok ostale razlike u učestalostima nisu bile statistički značajne. **Zaključak:** Rezultati ovog istraživanja ukazuju da F508del mutacija u CFTR genu predstavlja faktor rizika za razvoj hroničnog pankreatitisa.

Ključne reči: CFTR gen, hronični pankreatitis, adenokarcinom pankreasa

UVOD

Gen koji kodira transmembranski regulator provodljivosti u cističnoj fibrozi (CFTR ili Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) otkriven je

1989. godine¹. Mutacije u ovom genu dovode do cistične fibroze, najčešćeg monogenetskog naslednog oboljenja autozomno recesivnog tipa. Za cističnu fibrozu karakteristični su hronična opstrukcija respiratornog trakta, insuficijencija pankreasa i infertilitet². Mutacije u CFTR genu nisu povezane samo sa cističnom fibrozom, već i sa drugim poremećajima, kao što su infertilitet kod muškaraca i razni tipovi respiratornih bolesti, što ukazuje da je spektar bolesti uzrokovan genskim varijantama CFTR gena mnogo širi nego što je pretpostavljeno.

Do sada je otkriveno preko 1500 genetskih varijanti u CFTR genu, koje imaju različite efekte na funkcionalnost proteina i različit uticaj na kliničku sliku bolesti³. Najčešća mutacija u obolelih od cistične fibroze je F508del, koja dovodi do poremećaja u obradi CFTR proteina i njegovog odsustva na membrani ćelije². Kod pacijenata sa cističnom fibrozom u Srbiji F508del mutacija se javlja sa učestalošću od 72%⁴. Aleli 5T, 7T i 9T predstavljaju varijante politimidinskog trakta, koji se nalazi ispred egzona 9 CFTR gena i čije prisustvo utiče na procenat pravilno obradjenih RNK transkripata, a time i na količinu funkcionalnog proteina. Ukoliko je prisutan 5T alel, kod 90% transkripata dolazi do izostanka egzona 9 i odsustva funkcionalnog CFTR proteina, dok varijante 7T i 9T ne dovode do izostanka egzona 9 i daju normalan nivo CFTR proteina⁵. Alel 5T je povezan sa atipičnim oblicima cistične fibroze⁶.

Protein CFTR je transmembranski hloridni kanal koji se eksprimira u raznim epitelijalnim tkivima u organizmu, uključujući pankreasne kanalice, gde omogućava razblaživanje i alkalizaciju pankreasnog soka⁷. U normalnim fiziološkim uslovima funkcionisanje CFTR proteina omogućava transport bikarbonatnih jona, koji vrše drugi transmembranski kanali pankreasnih epitelijalnih ćelija u zamenu za hloridne jone istog naelektrisanja. Pankreasni sok bogat bikarbonatnim jonima služi da se digestivni enzimi, koje takodje luče pankreasne ćelije, u njemu rastvore i

TABELA 1

KARAKTERISTIKE GRUPA PACIJENATA

	Hronični pankreatitis	Adenokarcinomi pankreasa
Ukupan broj	50	50
Godine starosti (godine \pm SD)	52.0 \pm 12.4	61.2 \pm 11.4
muški pol (%)	42(84)	30(60)
pušenje (%)	15(30)	28(56)
konzumiranje alkohola (%)	38(76)	26(52)
pozitivna porodična istorija za kancer (%)	1(2)	7(14)
pozitivna porodična istorija za diabetes(%)	3(6)	-
druge bolesti (%)		
diabetes mellitus	11(22)	10(20)
hronični pankreatitis	-	5(10)
holecistektomija	1(2)	5(10)
kalkuloza holeciste	-	2(4)
karcinom bešike	-	1(2)
karcinom jednjaka	1(2)	-
polineuropatija	1/2/	-

pomoću njega ekskretuju iz pankreasnih acinusa i kanalića. Stoga nedostatak funkcije CFTR proteina može da dovede do poremećaja u ekskreciji digestivnih enzima iz pankreasa, a preuranjena aktivacija enzima na mestu sekrecije može da dovede do oštećenja pankreasnog tkiva.

Pretpostavlja se da mutacije u CFTR genu mogu biti povezane sa različitim tipovima pankreasne patologije i da nose povišen rizik za oboljenja pankreasa^{8,9}. U poslednjih deset godina vršena su obimna istraživanja u cilju analize mutacija u CFTR genu kod pacijenata sa hroničnim pankreatitisom, ali njihova uloga u ovoj bolesti još uvek nije razjašnjena. S druge strane, potencijalna uloga mutacija u CFTR genu u karcinomu pankreasa nedovoljno je istražena. Cilj ove studije bio je da se utvrdi učestalost F508del mutacije i 5T alela u CFTR genu u grupama pacijenata sa hroničnim pankreatitisom i adenokarcinomom pankreasa, kao i da se istraži da li ove genske varijante predstavljaju faktore rizika za nastanak ovih bolesti.

MATERIJAL I METODI

Ova studija je obuhvatila 50 pacijenata sa hroničnim pankreatitisom i 50 pacijenata sa adenokarcinomom pankreasa. Pacijenti su lečeni na Klinici za gastroenterohepatologiju i Prvoj hirurškoj klinici Instituta za digestivne bolesti u periodu od 2004. do 2006. godine. Karakteristike grupa pacijenata su prikazane u Tabeli 1.

Dijagnoza hroničnog pankreatitisa je bila postavljena na osnovu kliničkih podataka - prisustva egzorkine i endokrine pankreasne insuficijencije i rezultata morfoloških ispitivanja - kalcifikacije u pankreasu dijagnostikovane tokom ultrazvučnog pregleda abdomena, kompjuterizovane tomografije abdomena (CT) ili nuklearne magnetne rezonance abdomena (NMR); morfoloških promena kanalikularnog sistema pankreasa, dijagnostikovanih tokom endoskopske retrogradne holangiopankreatografije (ERCP); morfoloških promena pankreasa, dijagnostikovanih tokom endoskopske ultrasonografije.

Preoperativna sumnja na karcinom pankreasa je postavljena na osnovu rezultata ultrazvučnog pregleda abdomena, kompjuterizovane tomografije abdomena, nuklearne magnetne rezonance abdomena, endoskopske ultrasonografije pankreasa, dok je postoperativno histopatološkom verifikacijom potvrđena dijagnoza karcinoma pankreasa.

Kontrolnu grupu u ovom istraživanju činilo je 124 zdrava ispitanika, čiji su uzorci krvi dobijeni od Instituta za transfuziju krvi Srbije.

Za genetičke analize je korišćena genomska DNK izolovana iz pune krvi pacijenata i zdravih ispitanika pomoću komercijalnog kita GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Utvrđivanje prisustva F508del mutacije i detekcija 5T, 7T i 9T alela politimidinskog trakta vršeni su metodom PCR-om posredovane mesto-specifične mutageneze (PSM ili PCR-mediated site-directed mutagenesis)^{10,11}.

TABELA 2.

UČESTALOSTI GENOTIPOVA F508DEL MUTACIJE I POLITIMIDINSKOG TRAKTA CFTR GENA KOD PACIJENATA SA BOLESTIMA PANKREASA I ZDRAVIH ISPITANIKA

	Ukupan broj	F508del (%)	7T/7T (%)	7T/9T (%)	9T/9T (%)	5T/7T (%)	5T/9T (%)
Pacijenti sa hroničnim pankreatitisom	50	3 (6)	38 (76,0)	10 (20,0)	0	1 (2,0)	1 (2,0)
Pacijenti sa adenokarcinomom pankreasa	50	1 (2,0)	38 (76,0)	9 (18,0)	1 (2,0)	2 (4,0)	0
Zdravi ispitanici	124	1 (0,8)	94 (75,8)	24 (19,4)	2 (1,6)	3 (2,4)	1 (0,8)

Razlike u učestalosti alela i genotipova između grupa pacijenata i kontrolne grupe analizirane su pomoću SPSS softvera (verzija 10.0.1 za Windows). Za svako poredjenje među grupama računati su sledeći statistički parametri: vrednost p, faktor rizika (OR ili odds ratio) i 95% interval poverenja (95%CI ili 95% confidence interval). Korekcija za razliku između grupa u godinama i polu je izvršena metodom logističke regresije, pri čemu su vrednosti p manje od 0,05 smatrane statistički značajnim.

REZULTATI

Prisustvo F508del mutacije i 5T, 7T i 9T alela politimidinskog trakta u CFTR genu analizirani su na 100 hromozoma pacijenata sa hroničnim pankreatitisom, 100 hromozoma pacijenata sa adenokarcinomom pankreasa i 248 hromozoma zdravih ispitanika. Dobijene učestalosti genotipova su prikazane u Tabeli 2.

Mutacija F508del detektovana je na 3 od 100 hromozoma pacijenata sa hroničnim pankreatitisom, 1 od 100 hromozoma pacijenata sa adenokarcinomom pankreasa i 1 od 248 hromozoma zdravih ispitanika. Učestalost F508del mutacije je u hroničnom pankreatitisu (3,0%) bila značajno povišena ($p=0,032$) u odnosu na učestalost u grupi zdravih ispitanika (0,4%). Učestalost F508del mutacije je takodje bila povišena i kod pacijenata sa adenokarcinomom pankreasa (1,0%), ali ova razlika nije statistički značajna.

Alel 5T detektovan je na 2 od 100 hromozoma pacijenata sa hroničnim pankreatitisom, 2 od 100 hromozoma pacijenata sa adenokarcinomom pankreasa i 4 od 248 hromozoma zdravih ispitanika. Učestalost 5T alela je bila neznatno povišena u grupama pacijenata sa hroničnim pankreatitisom (2,0%) i pacijenata sa adenokarcinomom pankreasa (2,0%) u odnosu na grupu zdravih ispitanika (1,6%), ali razlika nije bila statistički značajna. Poredjenje učestalosti genotipova politimidinskog trakta takodje nije dala statistički značajne razlike između grupa pacijenata i kontrolne grupe.

DISKUSIJA

Zbog značaja koji funkcionalan CFTR protein ima za tkivo pankreasa pretpostavlja se da mutacije u CFTR genu mogu biti povezane sa bolestima pankreasa. Ova studija je imala za cilj da analizira potencijalnu ulogu F508del mutacije i 5T alela u CFTR genu u hroničnom pankreatitisu i adenokarcinomom pankreasa. Navedene genske varijante su relativno česte u opštoj populaciji, u kojoj se F508del mutacija javlja sa alelskom učestalošću od 0,8%, a 5T alel sa alelskom učestalošću od 4,5%¹². U našoj populaciji učestalost 5T alela je 1,0%¹³.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je F508del mutacija povezana sa hroničnim pankreatitisom, što je u skladu sa do sada objavljenim podacima. Utvrđeno je da su mutacije CFTR gena znatno učestalije kod pacijenata sa hroničnim pankreatitisom i smatra se da su povezane sa povišenim rizikom za pojavu ove bolesti¹⁴⁻¹⁸. Na osnovu rezultata studija koje su analizirale CFTR gen kod dece i pacijenata kod kojih su prisutni drugi faktori rizika zaključeno je da prisustvo mutacije u CFTR genu samo po sebi ne može dovesti do bolesti, već da mutacije mogu predstavljati faktor rizika za razvoj bolesti pod dejstvom drugih genetičkih ili negenetičkih faktora^{19,20}.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju za adenokarcinom pankreasa su takodje u skladu sa rezultatima dosadašnjih istraživanja, koji ukazuju na odsustvo povezanosti F508del mutacije sa ovom bolešću^{18,21-23}. Moguće objašnjenje je da su procesi u koje je uključen CFTR protein od daleko većeg značaja za razvoj hroničnog pankreatitisa nego za razvoj tumora pankreasa. U nastanku hroničnog pankreatitisa ključna uloga se pripisuje inflamatornim procesima, a poremećaj u lučenju pankreasnih enzima može da dovede do inflamacije, usled destrukcije pankreasnog tkiva od strane pankreasnih enzima. Poremećaj jonskog transporta na membrani ćelija pankreasnih kanalića može da igra bitnu ulogu u početnim fazama razvoja bolesti²⁴. S druge strane, za razvoj adenokarcinoma pankreasa su od mnogo većeg značaja procesi koji regulišu ćeljski ciklus i štite genetski materijal od potencijalnih oštećenja^{25,26}.

U ovoj studiji nije utvrđena povezanost 5T alela u CFTR genu sa hroničnim pankreatitisom i adenokarcinomom pankreasa. Do sada objavljeni podaci uglavnom ne ukazuju na eventualnu ulogu 5T alela u hroničnom pankreatitisu i adenokarcinomu pankreasa^{16,17,22,23}. Za 5T alel se smatra da je povezan sa određenim brojem slučajeva infertiliteta kod muškaraca, kao i sa nekim blažim respiratornim bolestima^{27,28}. Iako ova genska varijanta dovodi do sniženog nivoa funkcionalnog proteina, moguće je da su posledice njenog prisustva tkivno specifične. Na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da 5T alel nije povezan sa bolestima pankreasa. Verovatno objašnjenje je da se u pankreasnom tkivu u prisustvu 5T alela sa drugog, normalnog alela produkuje količina funkcionalnih transkripata koja je dovoljna da spreči razvoj bolesti, odnosno koja dovodi do sinteze funkcionalnog proteina CFTR u dovoljnoj količini.

ZAKLJUČCI

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da F508del mutacija u CFTR genu predstavlja faktor rizika za razvoj hroničnog pankreatitisa, ali da nije povezana sa adenokarcinomom pankreasa. Alel 5T politimidinskog trakta u CFTR genu na osnovu ovog istraživanja nije povezan sa hroničnim pankreatitisom i adenokarcinomom pankreasa.

SUMMARY

CFTR F508DEL MUTATION AND 5T ALLELE IN PATIENTS WITH CHRONIC PANCREATITIS AND PANCREATIC ADENOCARCINOMA

Introduction: Mutations in the CFTR gene may be associated with various types of pancreatic pathology and result in higher risk of pancreatic disorders. While delta F508 is the most common mutation in cystic fibrosis patients, the allele 5T is associated with atypical forms of cystic fibrosis. **Study aim:** The aim of this study was to establish the frequencies of F508del mutation and 5T allele in the CFTR gene in patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer, as well as to investigate whether these genetic variants represent risk factors for pancreatic diseases. **Study methods:** The study has encompassed 50 patients with chronic pancreatitis and 50 patients with pancreatic adenocarcinoma, as well as 124 healthy individuals. The analysis of F508del mutation and alleles 5T, 7T and 9T of the polythymidine tract was performed on DNA extracted from peripheral blood by PCR-mediated site-directed mutagenesis (PSM) method. **Results:** The frequency of F508del mutation in the group of patients with chronic pancreatitis (3.0%) was significantly increased ($p=0.032$) in comparison to the group of healthy individuals (0.4%), while other analyzed differences were not statistically significant. **Conclusion:** The results of this study indicate that F508del mutation in the CFTR gene represents a risk factor for the development of chronic pancreatitis.

Key words: CFTR gene, chronic pancreatitis, pancreatic adenocarcinoma

REFERENCE

1. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-73.
2. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000;67:117-133.
3. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium: Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat* 1994;4:167-177.
4. Radivojević D, Djurišić M, Lalić T, et al. Spectrum of cystic fibrosis mutations in Serbia and Montenegro and strategy for prenatal diagnosis. *Genet Test* 2004;8:276-80.
5. Delaney SJ, Rich DP, Thomson SA, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variants are not conserved and fail to produce chloride channels. *Nat Genet* 1993;4:426-31.
6. Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, et al. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet* 1993;3:151-6.
7. Marino CR, Matoveik LM, Gorelick FS, et al. Localization of the cystic fibrosis transmembrane regulator in the pancreas. *J Clin Invest* 1991;88:712-6.
8. Southern KW. Cystic fibrosis and formes frustes of CFTR-related disease. *Respiration* 2007;74:241-51.
9. Kerem E. Atypical CF and CF related diseases. *Pediatr Respir Rev* 2006;7 Suppl 1:S144-6.
10. Friedman KJ, Highsmith WE Jr, Silverman LM. Detecting multiple cystic fibrosis mutations by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem* 1991;37:753-5.
11. Shrimpton AE. R117H and IVS8-5T cystic fibrosis mutation detection by restriction enzyme digestion. *Mol Diagn* 2000;5:235-8.
12. Bombieri C, Giorgi S, Carles S, et al. A new approach for identifying non-pathogenic mutations. An analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in normal individuals. *Hum Genet* 2000;106:172-8.
13. Nikolić A, Divac A, Stanković M, et al. Analysis of common CFTR polymorphisms 5T, M470V and R75Q in healthy Serbian population. *Genetika* 2006;42(7):996-8.
14. Gaia E, Salacone P, Gallo M, et al. Germline mutations in CFTR and PSTI genes in chronic pancreatitis patients. *Dig Dis Sci* 2002;47:2416-21.
15. Truninger K, Malik N, Ammann R, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2657-61.
16. Sharer N, Schwarz M, Malone G, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998;339:645-52.
17. Ockenga J, Stuhmann M, Ballmann M, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene, but not cationic trypsinogen gene, are associated with recurrent or chronic idiopathic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2061-7.
18. Pezzilli R, Morselli-Labate AM, Mantovani V, et al. Mutations of the CFTR gene in pancreatic disease. *Pancreas* 2003;27:332-6.

19. Casals T, Aparisi L, Martínez-Costa C, et al. Different CFTR mutational spectrum in alcoholic and idiopathic chronic pancreatitis? *Pancreas* 2004;28:374-9.

20. Sobczynska-Tomaszewska A, Bak D, Oralewska B, et al. Analysis of CFTR, SPINK1, PRSS1 and AAT mutations in children with acute or chronic pancreatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43:299-306.

21. Piepoli A, Gentile A, Valvano MR, et al. Lack of association between UGT1A7, UGT1A9, ARP, SPINK1 and CFTR gene polymorphisms and pancreatic cancer in Italian patients. *World J Gastroenterol* 2006;12:6343-8.

22. Matsubayashi H, Fukushima N, Sato N, et al. Polymorphisms of SPINK1 N34S and CFTR in patients with sporadic and familial pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2003;2:652-5.

23. Malats N, Casals T, Porta M, Guarner L, Estivill X, Real FX. Cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) DeltaF508 mutation and 5T allele in patients with chronic pancreatitis and exocrine pancreatic cancer. PANKRAS II Study Group. *Gut* 2001;48:70-4.

24. Esposito I, Friess H, Büchler MW. Molecular mechanisms in chronic pancreatitis. *Zentralbl Chir* 2001;126:867-72.

25. Welsch T, Kleeff J, Friess H. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer: advances and challenges. *Curr Mol Med* 2007;7:504-21.

26. Choudhuri G, Singh D. Molecular mechanisms of pancreatic cancer. *Trop Gastroenterol* 2005;26:111-4.

27. Noone PG, Pue CA, Zhou Z, et al. Lung disease associated with the IVS8 5T allele of the CFTR gene. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1919-24.

28. Costes B, Girodon E, Ghanem N, et al. Frequent occurrence of the CFTR intron 8 (TG)_n 5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Eur J Hum Genet* 1995;3:285-93.