

MICHAŁ WITT

Zakład Genetyki Człowieka PAN  
w Poznaniu

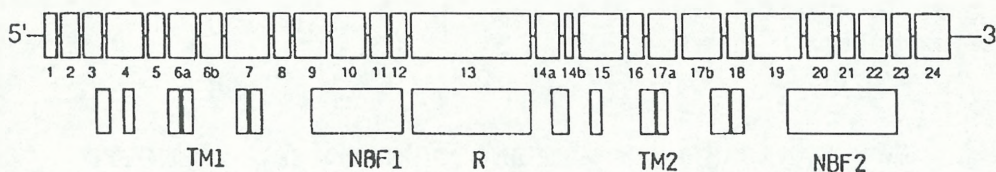
WYBRANE ASPEKTY ZALEŻNOŚCI GENOTYP — FENOTYP  
W MUKOWISCYDOZIE

WSTĘP

Mukowiscydoza (ang. cystic fibrosis, CF) jest najczęstszą chorobą recesywną autosomalną rasy białej. Jej częstość waha się w dość szerokich granicach, jednak średnio występuje u jednego noworodka na 2500 urodzeń (TSUI 1992). Choroba charakteryzuje się postępującymi zmianami obturacyjnymi drzewa oskrzelowego, z towarzyszącymi licznymi infekcjami oraz ogólnym niedożywieniem, spowodowanym uszkodzeniem funkcji zewnątrzwydzielniczej trzustki i wynikającym stąd upośledzeniem wchłaniania jelitowego, w szczególności tłuszczów (dokładny przegląd genetyki, patofizjologii i kliniki mukowiscydozy patrz: MAZURCZAK i współaut. 1992, SKIBIŃSKA i WITT 1992).

Gen powodujący CF zmapowano do chromosomu 7 w 1985 roku, by w cztery lata później gen ten sklonować i dokładnie scharakteryzować. Nadano mu nazwę *CFTR* (ang. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), która odzwierciedlała lokalizację komórkową i ciągle jeszcze wtedy spekulatywną funkcję jego produktu białkowego. W białku tym wyróżnić można dwa fragmenty transbłonowe (TM1, TM2), zakotwiczone białko w błonie komórkowej, dwa fragmenty wiążące wysokoenergetyczne nukleotydy (NBF1, NBF2), bezpośrednio związane z funkcją *CFTR* jako kanału chlorkowego oraz domenę regulatorową (R), mającą — zgodnie z nazwą — znaczenie regulatorowe (ryc. 1). Najczęstszą mutacją genu *CFTR* jest delecja trójki nukleotydów w eksonie 10, zwana  $\Delta F508$ , powodująca wypadnięcie fenyloalaniny w pozycji 508 białka *CFTR*. W skali światowej 67% chromosomów CF zawiera tę właśnie mutację (TSUI 1992). Opracowano stosunkowo proste metody molekularnej detekcji  $\Delta F508$ , nadające się do użycia nawet na masową skalę (WITT i współaut. 1993). Konsekwencją mutacji genu *CFTR* jest zaburzenie transportu jonów chlorkowych w poprzek nabłonków wydzielniczych różnych organów, manifestujące się wzmożoną lepkością odwodnionej wydzieliny drzewa oskrzelowego, zacopowaniem kanalików wyprowadzających trzustki czy zwiększeniem stężenia chlorków w pocie (WELSH i SMITH 1993). W sensie swej prezentacji klinicznej mukowiscydoza jest chorobą bardzo heterogenną. Do tej

pory (maj 1994) zidentyfikowano ponad 400 różnych mutacji genu *CFTR* powodujących CF; ostatnio istnienie mutacji genu *CFTR* wykazano również w kilku innych jednostkach chorobowych. Wszystkie te przyczyny sprawiają, że relacje genotyp — fenotyp w przypadku genu *CFTR* są niezwykle różnorodne i złożone.



Ryc. 1. Wzajemna zależność domen (odcinków funkcjonalnych) białka CFTR i kodujących je fragmentów genu *CFTR*: TM1 i TM2 — domeny transbłonowe; NBF1 i NBF2 — domeny wiążące ATP; R — domena regulatorowa. Cyframi oznaczono eksony genu *CFTR* (według L.-C. Tsui 1992, zmienione).

#### ZABURZENIA ZE STRONY UKŁADU POKARMOWEGO W CF

Większość chorych na mukowiscydozę charakteryzuje się niewydolnością zewnątrzwydzielniczą trzustki (pancreatic insufficiency, PI), co pociąga za sobą takie typowe objawy tej choroby, jak wydalanie tłuszczów w kale („tłuste stolce”, *steatorrhea*) oraz opóźnienie wzrostu i przyrostu wagi, często znacznego stopnia. Uszkodzenie funkcji zewnątrzwydzielniczej trzustki nierzadko manifestuje się już wewnątrzłonowo, w 5%–10% przypadków CF powodując niedrożność smółkową (*meconium ileus*, MI). Zaledwie u 10%–15% chorych na mukowiscydozę enzymy trzustkowe są produkowane we właściwej ilości i ci pacjenci (pancreatic sufficiency, PS) nie wymagają doustnej suplementacji tychże enzymów, co dla pozostałych 85%–90% chorych CF jest codzienną rutyną, towarzyszącą każdemu posiłkowi.

Stopień wydolności trzustki jest z reguły zgodny pomiędzy rodzeństwem z CF (COREY i współaut. 1989), jak i tym bardziej pomiędzy bliźniętami z CF (SANTIS i współaut. 1992), co jednoznacznie dowodzi bezpośredniego wpływu czynników genetycznych na funkcjonowanie tego organu. Zaraz po odkryciu genu *CFTR* zaobserwowano, że homozygotyci  $\Delta F508/\Delta F508$  zawsze należą do grupy pacjentów z daleko posuniętą niewydolnością trzustkową (PI), podczas gdy chorzy z jedną tylko kopią  $\Delta F508$  i drugą nie znaną mutacją genu *CFTR* lub w ogóle z dwoma nie zidentyfikowanymi mutacjami, mogą być trzustkowo wydolni (PS) (KEREM i współaut. 1989b). Wysunięto hipotezę, że — nie znane jeszcze wtedy konkretnie — „łagodne mutacje” (allele PS) warunkują zachowanie pewnej rezydualnej czynności zewnątrzwydzielniczej trzustki i są dominujące względem „ciężkich mutacji” (alleli PI), które warunkują całkowity zanik wydzielania enzymów



trzustkowych. Hipoteza ta została wkrótce potwierdzona w badaniach innych autorów, prowadzonych na populacjach o znacznie większej różnorodności genotypów prowadzących do podobnych obrazów klinicznych w zakresie wydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki (BORGO i współaut. 1990a).

Obecnie wiadomo, że większość znanych mutacji genu *CFTR* to allele PI; do tej grupy należą wszystkie rodzaje mutacji (delecje, mutacje nonsensowne, przesunięcia fazy odczytu, mutacje zmiany sensu, mutacje zaburzające splicing) (KRISTIDIS i współaut. 1992). Grupa alleli PS („mutacje łagodne”) jest znacznie mniej liczna i w jej skład wchodzi wyłącznie mutacje zmiany sensu (R117H, P205S, R334W, T338I, R347P, A455E, S549N, G551S, P574H) oraz nieliczne mutacje zaburzające splicing (1898+3A → G, 3849+10 kbC → T) (za HAMOSH i CUTTING 1993). Również lokalizacja mutacji w genie *CFTR* wydaje się podlegać pewnej ogólniejszej zasadzie; allele PI definiowane są na ogół przez mutacje w obrębie domen NBF, podczas gdy „łagodne mutacje”, prowadzące do powstania alleli PS, dotyczą głównie domen TM.

Opisano również przypadki wyłamujące się z opisanej tu reguły. Znani są, na przykład, chorzy na mukowiscydozę homozygotyczni pod względem mutacji  $\Delta F508$ , u których czynność zewnątrzwydzielnicza trzustki jest zachowana (KOPPELMAN i ROZEN 1990, LANNG i współaut. 1991, HAMOSH i współaut. 1993). Sprzeczne dane dotyczą również wydolności trzustki towarzyszącej paru innym mutacjom, jak na przykład G85E (CHALKEY i HARRIS 1991, GASPARINI i współaut. 1993) czy R117H (*Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium* 1993). Przyczyn tych niejasności może być kilka; pierwszy to niewątpliwie niemożność przeprowadzenia właściwej, precyzyjnej diagnostyki funkcji trzustki u wszystkich pacjentów, ze względu na dość znaczne obciążenia towarzyszące tym procedurom diagnostycznym. Kolejnym czynnikiem jest wiek badanych chorych. Wiadomo, że w miarę rozwoju choroby następuje progresja od stanu pełnej lub częściowo tylko ograniczonej wydolności trzustki do stanu pełnej niewydolności funkcjonalnej tego organu (BORGO i współaut. 1990b, KRISTIDIS i współaut. 1992). Nie można również wykluczyć istnienia genetycznych czynników modyfikujących: postuluje się, że, na przykład, mutacja V1212I, występując w jednym chromosomie z  $\Delta F508$ , może pełnić rolę czynnika modulującego fenotypowy efekt tej ostatniej (MACEK i współaut. 1993).

Jak już wspomniano, rezultatem niewydolności trzustki zaistniałej wewnątrzłonowo może być niedrożność smółkowa (MI). Zasadniczo dochodzi do niej wyłącznie u noworodków obarczonych allelami PI (KRISTIDIS i współaut. 1992). Wyniki ostatnich badań wskazują, że niedrożność smółkowa pojawia się u chorych z wieloma różnymi genotypami, z wyłączeniem pacjentów o genotypie R117H/ $\Delta F508$ . Częstość MI na tle różnych genotypów wygląda różnie i waha się w granicach od 6% (W1282X/ $\Delta F508$ ) do 24% (G542X/ $\Delta F508$ ); u homozygot  $\Delta F508/\Delta F508$  wynosi 14,5% (*Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium* 1993). Częstość MI u noworodków z tym ostatnim genotypem w badaniach innych autorów kształtuje się na wyższym poziomie: 18% (KRISTIDIS i współaut. 1992) lub 24% (HAMOSH i współaut. 1992).

U starszych pacjentów CF sporadycznie dochodzi do rozwoju wtórnej cukrzycy, jednak nietolerancja glukozy wydaje się zjawiskiem stosunkowo częstym w tej jednostce chorobowej (BOAT i współaut. 1989). Wykazano, że zaburzenie

funkcji wewnątrzwydzielniczej trzustki jest zjawiskiem niezależnym od homo- lub heterozygotyczności  $\Delta F508$  (LANNG i współaut. 1991).

#### ZABURZENIA ZE STRONY UKŁADU ODDECHOWEGO W CF

Zaburzenia układu oddechowego stanowią zasadniczą przyczynę wysokiej śmiertelności w mukowiscydozie. W tym przypadku, w przeciwieństwie do zaburzeń funkcjonalnych trzustki czy poziomu chlorków w pocie (WITT i współaut. 1991), korelacja z odpowiednimi mutacjami genu *CFTR* jest znacznie trudniejsza do wykazania. Dość trudno wystandaryzować tu model badawczy; trudnymi do wyeliminowania są takie zmienne, jak etap rozwoju choroby zależny od wieku oraz wpływ stosowanego leczenia. Najlepszym wykładnikiem zaburzenia funkcji płuc dla celów tego typu badań wydaje się, wyrażone procentowo, zmniejszenie wartości natężonej pojemności wydechowej pierwszosekundowej (przewidywany % FEV<sub>1</sub>) w stosunku do wartości odpowiedniej dla danego wieku, płci, wysokości i masy ciała. Wartość ta z reguły jest podobna u rodzeństwa z CF, co wyraźnie wskazuje na komponentę genetyczną wpływającą na jej wielkość (SANTIS i współaut. 1990). Wykazano również zasadniczą zgodność wartości przewidywanego % FEV<sub>1</sub> pomiędzy bliźniętami CF, jedno- i dwujajowymi (SANTIS i współaut. 1992). Wydolność trawienna wydaje się w sposób zasadniczy wpływać na stan układu oddechowego u pacjentów z CF. Wykazano, że u pacjentów z mutacjami PS wydolność układu oddechowego jest lepsza niż u pacjentów PI (KEREM i współaut. 1990). Podobnie, pacjenci z prawidłową absorpcją jelitową tłuszczów charakteryzują się znacząco lepszymi parametrami funkcjonalnymi płuc od pacjentów z jej zaburzeniami (GASKIN i współaut. 1992).

Korelacje funkcji układu oddechowego z poszczególnymi mutacjami genu *CFTR* nie są jednoznaczne; na przykład niektórzy autorzy donoszą o gorszej funkcji płuc u homozygot  $\Delta F508$  w stosunku do heterozygot (JOHANSEN i współaut. 1991), podczas gdy inni zależności takiej zaprzeczają (AL-JADER i współaut. 1992). U homozygot  $\Delta F508$  wcześniej dochodzi do epizodów obturacji drzewa oskrzelowego (MOHON i współaut. 1993). Co ciekawe, homozygoty oraz złożone heterozygoty z mutacjami nonsensownymi (np. G542X/G542X, R553X/R553X, R1162X/R1162X, S1255X/G542X, W1316X/R553X) charakteryzują się słabiej zaznaczonymi objawami ze strony drzewa oskrzelowego, niż homozygoty  $\Delta F508$  (HAMOSH i CUTTING 1993). Kilka mutacji nonsensownych, sklasyfikowanych jako „ciężkie” z punktu widzenia wpływu na czynność trzustki, jest uważanych za „mutacje łagodne” w sensie ich manifestacji płucnej. Przyczyny, dla których mutacje powodujące przedwczesne zakończenie syntezy produktu białkowego powodują silniejsze skutki negatywne w układzie pokarmowym niż w układzie oddechowym, nie są znane. Ekspresja genu *CFTR* w tkance płucnej utrzymuje się na stosunkowo niskim poziomie (BREMER i współaut. 1992) i bardzo niewielka ilość jego prawidłowego transkryptu wystarczy dla utrzymania funkcji *CFTR* na poziomie tkankowym (CHU i współaut. 1992). W komórkach organizmów homozygotycznych pod względem mutacji genu *CFTR* transkrypt taki pojawiać się może, na przykład, w wyniku działania mechanizmu alternatywnego dojrzewania transkryptu (alternative splicing) i procesu tak zwanego omijania eksonów



(exon skipping) (DIETZ i współaut. 1993). Inną możliwością jest istnienie tkanowo-specyficznych mechanizmów komórkowych, powodujących substytucję funkcji białka CFTR podczas jego nieobecności (fizycznej lub funkcjonalnej).

Znanym jest również fakt znacznego zróżnicowania objawów płucnych w grupach chorych o tych samych genotypach (GASPARINI i współaut. 1992, SHOSHANI i współaut. 1992), co wyraźnie sugeruje wpływ innych czynników genetycznych i/lub środowiskowych na ich ekspresję. Przypuścić można, że duża anatomiczna dostępność drzewa oskrzelowego i tkanki płucnej dla czynników środowiskowych, powoduje — większą niż w przypadku trzustki — wrażliwość na ich działanie.

Analizowano również zależność między podatnością układu oddechowego na infekcje bakteryjne a genotypem. Osobnicy homozygotyczni  $\Delta F508$  wykazują większą skłonność do przewlekłego zakażenia *Pseudomonas aeruginosa*, niż heterozygoty złożone z  $\Delta F508$  (JOHANSEN i współaut. 1991). Stwierdzono również, analogicznie jak dla funkcji płuc, zależność skłonności do kolonizacji przez *Pseudomonas* od stanu funkcjonalnego trzustki; skłonność ta była znamienne niższa u osobników PS w stosunku do osobników PI. Jednocześnie wykazano, że wraz z wiekiem skłonność ta rośnie najszybciej u osobników homozygotycznych pod względem mutacji  $\Delta F508$  lub mutacji nonsensownych zlokalizowanych w NBF1 (KUBESH i współaut. 1993). Częstość przypadków kolonizacji pałeczkami *Pseudomonas aeruginosa* waha się w szerokich granicach: od 30% (dla genotypu R117H/ $\Delta F508$ ) do 82% (dla W1282X/ $\Delta F508$ ); homozygoty  $\Delta F508$  wykazywały kolonizację *Pseudomonas* w 56% badanych przypadków (*Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium* 1993).

#### INNE ZABURZENIA ZWIĄZANE Z MUTACJAMI GENU CFTR — OBJAWY CF CZY ODDZIELNE JEDNOSTKI CHOROBOWE?

Obustronna agenezja nasieniowodów (congenital bilateral absence of vas deferens, CBAVD) jest jednym z istotnych kryteriów diagnostycznych mukowiscydozy, gdyż występuje u 97% pacjentów CF płci męskiej. Izolowany CBAVD stanowi 1%–2% przypadków niepłodności męskiej (*Editorial, Lancet* 1992). Analiza molekularna przypadków izolowanego CBAVD wykazała, że u 64% chorych występują mutacje genu CFTR (ANGUIANO i współaut. 1992). Niektórzy z badanych pacjentów byli heterozygotami złożonymi, z mutacją  $\Delta F508$  w jednym i jedną z kilku innych znanych mutacji genu CFTR w drugim chromosomie pary 7. Do tych ostatnich należą W1282X, R75Q, G551D, R553X, G576A i przede wszystkim R117H (HAMOSH i CUTTING 1993). Wydaje się, że właśnie R117H jest najczęstszą mutacją związaną z CBAVD, występującą aż w 10% przebadanych przypadków (OATES i AMOS 1993). Z tych oraz podobnych badań (HANDELIN i współaut. 1992) wynika, że R117H występuje u heterozygot złożonych reprezentujących trzy zupełnie różne fenotypy: u chorych CF z zachowaną funkcją zewnątrzwydzielniczą trzustki (CF-PS), u chorych z izolowanym CBAVD oraz u osobników zdrowych. Są wysuwane sugestie, że manifestacja fenotypowa jednej i tej samej mutacji zależeć może od kontekstu molekularnego, w jakim ona się pojawia; w przypadku R117H czynnikiem takim może być długość odcinka

polipirymidynowego (5T lub 7T), występującego w kierunku 3' od samej mutacji, który zmieniać może wydajność splicingu eksonu 9 genu *CFTR* (KIESEWETTER i współaut. 1993).

Najczęstszym genotypem związanym z CBAVD jest  $\Delta F508/R117H$ ; prawie wszystkie znane heterozygoty złożone z tą jednostką chorobową mają jedną z tych dwóch mutacji. Aż w 62% badanych przypadków CBAVD udało się zidentyfikować jedną mutację genu *CFTR*, w 14% zidentyfikowano mutacje obu kopii tego genu (HAMOSH i CUTTING 1993). Jak dotąd nie znaleziono ani jednego przypadku CBAVD homozygotycznego pod względem mutacji genu *CFTR* — taki genotyp prawdopodobnie może być związany wyłącznie z CF. Nie wiadomo również, czy izolowany CBAVD zawsze jest związany z mutacjami genu *CFTR*. Ze wszystkich tych danych wynika, że w grupie chorych z CBAVD występuje pewien określony zestaw mutacji genu *CFTR* — ponieważ jednak wszystkie zidentyfikowane tu genotypy występować mogą zarówno w CBAVD, jak i w CF muszą istnieć jeszcze jakieś inne czynniki modyfikujące ekspresję fenotypową tych mutacji. Narzucające się w tym momencie pytanie: czy CBAVD jest samodzielną jednostką chorobową, czy też genitalną formą mukowiscydozy, pozostaje ciągle bez ostatecznej odpowiedzi. Ewentualnym potwierdzeniem drugiej z tych możliwości byłby postępujący z czasem rozwój objawów płucnych i/lub trzustkowych u pacjentów z CBAVD.

Okazuje się, że również w przypadku jednostronnej agenezji nasieniowodu (unilateral absence of vas deferens, UAVD) 43% badanych nieplodnych mężczyzn było heterozygotycznych pod względem  $\Delta F508$ , R117H lub R75Q, a jeden z nich miał dwóch braci z CBAVD (MICKLE i współaut. 1993). Znane są również dane mówiące o podwyższonej częstości niektórych mutacji genu *CFTR* w nieplodności męskiej, spowodowanej asteno-, oligo- lub teratozoospermia; jeden z przebadanych przypadków azoospermii był heterozygotą złożoną R117H/G551D (VAN DER VEN i współaut. 1993). Wynikałoby z tego, że gen *CFTR* również może wpływać na różnicowanie się jądra oraz na funkcjonowanie nabłonka plemnikotwórczego.

Warto w tym miejscu również wspomnieć kilka pulmonologicznych jednostek chorobowych. Przewlekła obturacyjna choroba płuc (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) jest powodowana przez chroniczne zapalenia oskrzeli lub rozedmę płuc; często elementem współlistniejącym są tu rozstrzenia oskrzeli. Wiadomo, że w patogenezie tego schorzenia udział swój ma gen  $\alpha$ -1-antytrypsyny (KUEPPERS 1992). Badania pod kątem występowania mutacji genu *CFTR* u chorych z COPD wykazały, że mamy tu do czynienia z istotnie zwiększoną częstością występowania niektórych ze znanych mutacji:  $\Delta F508$ , R117H, R1066C, R75Q i kilku innych (GERVAIS i współaut. 1993b; PIGNATTI i współaut. 1993). Prawie wszystkie z tych mutacji są zlokalizowane we fragmentach genu kodujących odcinki transbłonowe białka *CFTR* (domeny TM). Niektóre z tych mutacji stwierdzono również u chorych z łagodną postacią mukowiscydozy oraz z obustronną agenezją nasieniowodów (patrz wyżej). Związek z mutacjami genu *CFTR* (heterozygota złożona  $\Delta F508/R347H$ , nosiciele  $\Delta F508$ ) wykazano również w przypadku uczuleniowej postaci grzybicy kropidlakowej płuc (allergic broncho-pulmonary aspergillosis, ABPA); zależności takiej nie wykryto natomiast w przewlekłym zapaleniu oskrzeli powodowanym przez pałeczki *Pseudomonas* (chronic *Pseudomonas* bronchitis, CPB) (MILLER i współaut. 1993).



Występowanie polipów nosa należy do stosunkowo częstych objawów mukowiscydozy. Badania pacjentów z izolowaną polipowatością nosa wykazały obecność takich mutacji genu *CFTR*, jak G551D,  $\Delta$ F508 i R553X, z wyraźną przewagą pierwszej z nich (BURGER i współaut. 1991). U pacjentów z mukowiscydozą polipy nosowe występują w powiązaniu ze wszystkimi badanymi genotypami, zarówno PI jak PS, z częstością wahającą się od 14% (heterozygoty złożone 1717-1G→A/ $\Delta$ F508) do 40% (W1282X/ $\Delta$ F508); jeśli chodzi o homozygoty  $\Delta$ F508 polipy nosowe występują tu z częstością 16% (*Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium* 1993).

#### PODSUMOWANIE

Na podstawie przedstawionych powyżej wrywkowych danych, obraz fenotypów mających związek z genem *CFTR* jawi się jako zestaw różnorodnych manifestacji klinicznych jednej choroby, albo też jako grupa kilku różnych jednostek chorobowych, mających ze sobą pewne wspólne cechy. Pod względem ogólnej ciężkości przebiegu klinicznego poszczególnych form choroby (lub chorób), zauważyć tu można pewne kontinuum: od najcięższych postaci mukowiscydozy z niewydolnością trzustkową i niedrożnością smółkową (CF-PI, CF-MI), przez lżejsze postacie mukowiscydozy (CF-PS), polipowatość nosa, po izolowaną obulub jednostronną agenezję nasieniowodów (CBAVD, UAVD) i niepłodności męskie oraz przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (COPD) i uczuleniową grzybicę krodplakową płuc (ABPA). Nie można wykluczyć, że przynajmniej niektóre z tych chorób związanych z genem *CFTR* są współczesną formą ujawniania się przewagi heterozygot, na którym to mechanizmie najprawdopodobniej jest oparta tak wysoka częstość mukowiscydozy w populacji (HANNSON 1988, ROMEO i współaut. 1989).

#### SELECTED ASPECTS OF GENOTYPE — PHENOTYPE RELATIONSHIP IN CYSTIC FIBROSIS

##### Summary

A review of a current knowledge on the relationship of various clinical symptoms of cystic fibrosis (CF) and genotype of CF patients with regard to *CFTR* gene mutations is presented. In the case of pancreatic disease two groups of *CFTR* alleles can be discerned, corresponding to the relative severity of the disease, PI (pancreatic insufficient) and PS (pancreatic sufficient). In pulmonary disease such a relationship can hardly be observed and it is much more difficult to define. Several disorders which can be either treated as separate entities or as CF-related syndromes have been described; their common feature is a dependence on *CFTR* gene mutations: congenital bilateral absence of vas deferens, unilateral absence of vas deferens, chronic obstructive pulmonary disease, allergic broncho-pulmonary aspergillosis, nasal polyposis and azoospermias. The dependence of these disorders on individual *CFTR* mutations is discussed.

#### LITERATURA

- AL-JADER L. N., MEREDITH A. L., RYLEY H. C., CHEADLE J. P., MAGUIRE S., OWEN G., GOODCHILD M. C., HARPER P. S., 1992. *Severity of chest disease in cystic fibrosis patients in relation to their genotypes*. J. Med. Genet. 29, 883-887.

- ANGUIANO A., OATES R. D., AMOS J. A., DEAN M., GERRARD B., STEWART C., MAHER T.A., WHITE M. B., MILUNSKY A., 1992. *Congenital bilateral absence of the vas deferens — a primarily genital form of cystic fibrosis*. JAMA 267, 1794-1797.
- BOAT T. F., WELSH M. J., BEAUDET A. L., 1989. *Cystic fibrosis*. [W:] The Metabolic Basis of Inherited Diseases, (red. SCRIVER C. L., BEAUDET A. L., SLY W. S., VALLE D.), McGraw-Hill, New York, 2649-2680.
- BORGIO G., MASTELLA G., GASPARINI P., ZORZANELLO A., DORO R., PIGNATTI P. F., 1990a. *Pancreatic function and gene deletion  $\Delta F508$  in cystic fibrosis*. J. Med. Genet. 27, 665-669.
- BORGIO G., MASTELLA G., GASPARINI P., PIGNATTI P. F., 1990b. *Genotype analysis and pancreatic function classification in cystic fibrosis*. Lancet 335, 1601.
- BREMER S., HOOF T., WILKE M., BUSCHE R., SHOLTE B., RIORDAN J. R., MAASS G., TÜMLER B., 1992. *Quantitative expression of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) and differentially spliced CFTR mRNA transcripts in human epithelia*. Eur. J. Biochem. 206, 137-149.
- BURGER J., MACEK M., STUHRMANN M., 1991. *Genetic influences in the formation of nasal polyps*. Lancet 337, 974.
- CHALKEY G., HARRIS A., 1991. *A cystic fibrosis patient who is homozygous for the G85E mutation has very mild disease*. J. Med. Genet. 28, 875-877.
- CHU C-S., TRAPNELL B. C., CURRISTIN S. M., CUTTING G. R., CRYSTAL R. G., 1992. *Extensive posttranscriptional deletion of the coding sequences for part of nucleotide-binding fold 1 in respiratory epithelial mRNA transcripts of the CFTR gene is not associated with the clinical manifestations of CF*. J. Clin. Invest. 90, 785-790.
- COREY M., DURIE P., MOORE D., FORSTNER G., LEVISON H., 1989. *Familial concordance of pancreatic function in cystic fibrosis*. J. Pediatr. 115, 274-277.
- Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium*, 1993. *Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis*. N. Engl. J. Med. 329, 1308-1313.
- DIETZ H., KENDZIOR R., ELDADAH Z., 1993. *Nonsense mutations act in cis to alter splice-site selection: verification in a heterologous expression system*. Am. J. Hum. Genet. 53 (suppl. 3), 675.
- Editorial*, 1992. *Congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis*. Lancet 339, 1328-1329.
- GASKIN K., GURVITZ D., DURIE P., COREY M., LEVISON H., 1992. *Improved respiratory prognosis in patients with cystic fibrosis with normal fat absorption*. J. Pediatr. 100, 857-862.
- GASPARINI P., BORGIO G., MASTELLA G., BONZATTO A., DOGNINI M., PIGNATTI P. F., 1992. *Nine cystic fibrosis patients homozygous for the CFTR nonsense mutation R1162X have mild or moderate lung disease*. J. Med. Genet. 29, 558-562.
- GASPARINI P., MARIGO C., BISCEGLIA G., NICOLIS E., ZELANTE L., BOMBIERI C., BORGIO G., PIGNATTI P. F., CABRINI G., 1993. *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. 2, 389-394.
- GERVAIS R., LAFITTE J-J., DUMUR V., KESTELOOT M., LALAU G., HOUDRET N., ROUSSEL P., 1993b. *Sweat chloride and delta F508 mutation in chronic bronchitis or bronchiectasis*. Lancet 342, 997.
- HAMOSH A., CUTTING G. R., 1993. *Genotype/phenotype relationships in cystic fibrosis*. [W:] *Current Topics in Cystic Fibrosis*, (red. DODGE J. D., BROOK D. J. H., WIDDICOMPE J.W.) John Wiley & Sons, New York, 69-92.
- HAMOSH A., KING T. M., ROSENSTEIN B. J., COREY M., LEVISON H., DURIE P., TSUI L-C., MCINTOSH I., KESTON M., BROCK D. J. H., MACEK M. J. R., ZEMKOVA D., KRASNICANOVA H., VAVROVA V., MACEK M. Sr., GOLDER N., SCHWARTZ M. J., SUPER M., WATSON E. K., WILLIAMS C., BUSH A., O'MAHONEY S. M., HUMPHRIES P., DE ARCE M. A., REIS A., BURGER J., STUHRMANN M., SCHMIDTKE J., WULBRAND U., DÖRK T., TÜMLER B., CUTTING G. R., 1992. *Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly Asp at codon 551 and the delta F508 mutation are clinically indistinguishable from delta F508 homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus*. Am. J. Hum. Genet. 51, 245-250.
- HAMOSH A., MACEK M., NASH E., CURRISTIN S. M., ROSENSTEIN B. J., CUTTING G. R., 1993. *Mutation analysis in cystic fibrosis patients with pancreatic sufficiency, pancreatitis, borderline sweat chloride concentrations or isolated congenital bilateral absence of the vas deferens*. Am. J. Hum. Genet. 53 (suppl. 3), 1169.
- HANDELIN B., WITT D., SKOLETSKY J., SHUBER A., 1992. *Unexpected prevalence of R117II and G551D CF mutations in a randomly screened population*. Am. J. Hum. Genet. 51 (suppl. 4), 858.
- HANSSON G., 1988. *Cystic fibrosis and chloride secreting diarrhoea*. Nature 333, 711.
- JOHANSEN H. K., NIR M., HOIBY N., KOCH C., SCHWARTZ M., 1991. *Severity of cystic fibrosis in patients homozygous and heterozygous for delta F508 mutation*. Lancet 337, 631-634.



- KEREM B. S., ROMMENS J., BUCHANAN J., MARKIEWICZ D., COX T., CHAKRAVARTI A., BUCHWALD M., TSUI L.-C., 1989. *Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis*. Science 245, 1073–1080.
- KEREM E., COREY M., KEREM B. S., ROMMENS J., MARKIEWICZ D., LEVISON H., TSUI L.-C., 1990. *The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis — analysis of the most common mutation (delta F508)*. N. Engl. J. Med. 323, 1517–1522.
- KIESEWETTER S., MACEK M., DAVIS C., CURRISTIN S. M., CHU C.-S., GRAHAM C., SHRIMPTON A. E., CASHMAN S. M., TSUI L.-C., MICKLE J., AMOS J., HIGSMITH W. E., SHUBER A., WITT D. R., CRYSTAL R. G., CUTTING G. R., 1993. *A mutation in CFTR gene produces different phenotypes depending on chromosomal background*. Nature Genetics 5, 274–278.
- KOPELMAN H., ROZEN R., 1990. *Genetic analysis and pancreatic function in cystic fibrosis*. Lancet 335, 1601.
- KRISTIDIS P., BOZON D., COREY M., MARKIEWICZ D., ROMMENS J., TSUI L.-C., DURIE P., 1992. *Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis*. Am. J. Hum. Genet. 50, 1178–1184.
- KUBESH P., DÖRK T., WULBRAND U., KALIN N., NEUMANN T., WULF B., GEERLINGS H., WEISSBRODT H., VON DER HARDT, TÜMMLER B., 1993. *Genetic determinants of airways colonization with Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis*. Lancet 341, 189–193.
- KUEPERS F., 1992. *Chronic obstructive pulmonary disease*. [W:] *The Genetic Basis of Common Diseases* (red. KING R., ROTTER J., MOTULSKY A.). Oxford University Press, Oxford, 222–239.
- LANNING S., SCHWARTZ M., THORSTEINSSON B., KOCH C., 1991. *Endocrine and exocrine pancreatic function and the delta F508 mutation in cystic fibrosis*. Clin. Genet. 40, 345–348.
- MACEK M. JR., VAVROVA V., DAVIS C., HAMOSH A., MACEK M., CUTTING G. R., 1993. *Two delta F508 homozygote siblings with delayed onset of pancreatic insufficiency carry a second cystic fibrosis gene mutation in one allele*. Am. J. Hum. Genet. 53 (suppl. 3), 83.
- MAZURCZAK T., BAL J., NOWAKOWSKA A., 1992. *Mukowiscydoza (Cystic Fibrosis)*. Instytut Matki i Dziecka, Warszawa, 1992.
- MICKLE J., OATES R., COLIN A., MAHER T. A., MILUNSKY A., AMOS J. A., 1993. *Increased frequency of cystic fibrosis mutations in males with unilateral absence of the vas deferens (UAVD)*. Am. J. Hum. Genet. 53 (Suppl.3), 1204.
- MILLER P., MACEK M. JR., HAMOSH A., WALDEN S., LOURY M. C., CUTTING G. R., 1993. *Identification of CFTR mutations in adult patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis and chronic Pseudomonas bronchitis*. Pediatr. Pulmonol. 15 (suppl. 9), 128.
- MOHON R., WAGENER J., ABMAN S., SELTZER W., ACCURSO F., 1993. *Relationship of genotype to early pulmonary function in infants with cystic fibrosis identified through neonatal screening*. J. Pediatr. 122, 550–555.
- OATES R., AMOS J., 1993. *Congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. A genetic commonality*. World J. Urol. 11, 82–88.
- PIGNATTI P. F., BOMBIERI C., MARIGO C., LUISETTI M., 1993. *Cystic fibrosis gene mutations found in chronic obstructive pulmonary disease patients*. Am. J. Hum. Genet. 53 (suppl. 3), 1213.
- ROMEO G., DEVOTO M., GALIETTA L. J. V., 1989. *Why is the cystic fibrosis gene so frequent?* Hum. Genet. 84, 1–5.
- SANTIS G., OSBORNE L., KNIGHT R., HODSON M., 1990. *Independent genetic determinants of pancreatic and pulmonary status in cystic fibrosis*. Lancet 336, 1081–1084.
- SANTIS G., OSBORNE L., KNIGHT R., SMITH M., DAVISON T., HODSON M., 1992. *Genotype-phenotype relationship in cystic fibrosis: results from the study of monozygotic and dizygotic twins with cystic fibrosis*. Pediatr. Pulmonol. 14 (suppl. 8), 239.
- SHOSHANI T., AUGARTEN A., GAZIT E., BASHAN N., YAHAV Y., RIVLIN Y., TAL A., YAAAR L., KEREM E., KEREM B.-S., 1992. *Association of a nonsense mutation W1282X, the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease*. Am. J. Hum. Genet. 50, 222–228.
- SKIBIŃSKA A., WITT M., 1992. *Molekularne podstawy mukowiscydozy*. Post. Biol. Kom. 19, 263–273.
- TSUI L.-C., 1992. *The spectrum of cystic fibrosis mutations*. Trends Genet. 8, 392–398.
- VAN DER VEN K., RAHMAN A., VAN DER VEN H., HEILMAN S., JEYENDREN R. S., OBER C., 1993. *CFTR mutations in men with impaired sperm function (ISF) and azoospermia without congenital absence of the vas deferens (CBAVD)*. Am. J. Hum. Genet. 51 (suppl. 31), 1246.
- WELSH M., SMITH A., 1993. *Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis*. Cell 73, 1251–1254.

- WITT M., ERICKSON R. P., OBER C., HOWATT W. F., FARBER R., 1991. *Correlation of phenotypic and genetic heterogeneity in cystic fibrosis: variability in sweat electrolyte levels contributes to heterogeneity and is increased with the XV2c/KM19 haplotype.* Am. J. Med. Genet. 39, 137-143.
- WITT M., JARUZELSKA J., KUCZORA I., MATUSZAK R., CICHY W., BORSKI K., 1993. *A simplified method of detection of the mutations predominantly causing cystic fibrosis and phenylketonuria in Polish families.* Clin. Genet. 44, 44-45.