

de toepasbaarheid, ook voor vroege prenatale diagnostiek in chorionvilli, vaststaat.¹⁵ Een volledig betrouwbare prenatale diagnostiek, zoals reeds beschikbaar voor zo'n 70 erfelijke stofwisselingsziekten,¹⁶ lijkt pas mogelijk wanneer de mutatie van het gen dat verantwoordelijk is voor kystische fibrose direct op DNA-niveau of op eiwitniveau kan worden aangetoond. Tot die tijd zal het nu reeds beschikbare vruchtwateronderzoek van darm-enzymen voor vele ouderparen met een herhalingsrisico van grote betekenis kunnen zijn.

Wij danken de heer H.C.Janse voor zijn assistentie in dit onderzoek en de vele collegae in binnen- en buitenland die patiënten verwezen of vruchtwater inzonden.

SUMMARY

Prenatal diagnosis of cystic fibrosis. – In a large proportion of pregnancies that end in birth of a child with cystic fibrosis (CF) the activities in the amniotic fluid of certain enzymes of intestinal origin are found to be decreased. In our study of 66 pregnant women at risk for recurrence of CF, maltase and intestinal alkaline phosphatase (IAP) proved to offer the best possibilities for prenatal diagnosis of CF. Both enzymatic activities were abnormally low in 24 of the 26 prospectively or retrospectively studied cases of CF (= 92%). In the prospective diagnostic investigation of 35 pregnancies with a 1:4 risk of recurrence, the births of 9 children with CF and of 26 normal children were predicted correctly. In four European centres, over 100 diagnoses of CF have so far been made correctly in 450 pregnancies. The reliability of the prenatal diagnosis of CF may be over 95%, provided the amniocentesis is performed in the 17th-18th week. Adequate information on the possibilities and limitations is required, and should preferably be given prior to conception.

LITERATUUR

- 1 Kate LP ten. Erfelijkheid en voorkomen van kystische fibrose. *Mndshr Kindergeneeskd* 1975; 43: 316-28.
- 2 Kaback M, Zippin D, Boyd P, Cantor R. Attitudes toward prenatal diagnosis of cystic fibrosis among parents of affected children. In: Lawson D. *Cystic fibrosis: Horizons*. Chichester: John Wiley, 1984: 15-28.
- 3 Carbarns NJB, Gosden C, Brock DJH. Microvillar peptidase activity in amniotic fluid: Possible use in the prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Lancet* 1983; i: 329-31.
- 4 Diggelen OP van, Janse HC, Kleijer WJ. Disaccharidases in amniotic fluid as possible prenatal markers for cystic fibrosis. *Lancet* 1983; i: 817.
- 5 Brock DJH. Amniotic fluid alkaline phosphatase isoenzymes in early prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Lancet* 1983; ii: 941-3.
- 6 Muller F, Berg S, Frot JC, Boué J, Boué A. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis. I. Prospective study of 51 pregnancies. *Prenat Diagn* 1985; 5: 97-108.
- 7 Muller F, Aubry MC, Gasser B, Duchatel F, Boué J, Boué A. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis. II. Meconium ileus in affected fetuses. *Prenat Diagn* 1985; 5: 109-17.
- 8 Kleijer WJ, Janse HC, Diggelen OP van, Niermeijer MF. Amniotic fluid disaccharidases in the prenatal detection of cystic fibrosis. *Prenat Diagn* 1985; 5: 135-43.
- 9 Aitken DA, Yaqoob M, Ferguson-Smith MA. Microvillar enzyme analysis in amniotic fluid and the prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Prenat Diagn* 1985; 5: 119-27.
- 10 Brock DJH. A comparative study of microvillar enzyme activities in the prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Prenat Diagn* 1985; 5: 129-34.
- 11 Claass AHW, Diggelen OP van, Hauri HJ, Sterchi EE, Sips HJ. Characteristics of maltase activity in amniotic fluid. *Clin Chim Acta* 1985; 145: 275-81.
- 12 Brock DJH, Bedgood D, Barron L, Hayward C. Prospective prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Lancet* 1985; i: 1175-8.
- 13 Boué A, Brock DJH. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Lancet* 1985; i: 47-8.
- 14 Newmark P. Testing for cystic fibrosis. *Nature* 1985; 318: 309.
- 15 Brock DJH, Heyningen V van. The facts on cystic fibrosis testing. *Nature* 1986; 319: 184.
- 16 Galjaard H, Sachs ES, Kleijer WJ, Jahoda MGJ. Prenatale diagnostiek van aangeboren afwijkingen. *Ned Tijdschr Geneesk* 1982; 126: 2252-62.

Aanvaard op 9 juni 1986

Brieven aan de redactie

Prenatale diagnostiek van kystische fibrose met behulp van DNA-analyse

D. J. J. HALLEY, J. MORREAU, H. J. NEIJENS, E. VAN SWAAY, L. A. SANDKUYL EN B. A. OOSTRA

Kystische fibrose (synoniemen o.a.: pancreas-fibrose, mucoviscidose, taaislijmziekte) komt in ons land bij 1 op 3600 levendgeborenen voor.¹ De ziekte heeft een autosomaal recessief overervingspatroon. De behandeling en

Zie ook het artikel op bl. 2267.

Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Dijkzigt, afd. Klinische Genetica, Postbus 1738, 3000 DR Rotterdam.

Dr. D. J. J. Halley, moleculair bioloog; E. van Swaay, kinderarts; L. A. Sandkuyl, assistent-geneeskundige.

Erasmus Universiteit, afd. Celbiologie en Genetica, Rotterdam.

J. Morreau, assistent-geneeskundige; dr. B. A. Oostra, moleculair bioloog. Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Sophia Kinderziekenhuis, afd. Kindergeneeskunde, Rotterdam.

Dr. H. J. Neijens, kinderarts.

Correspondentie-adres: dr. D. J. J. Halley.

begeleiding van patiënten zijn in de laatste decennia verbeterd en hun gemiddelde levensverwachting is toegenomen (gemiddelde levensduur ongeveer 20 jaar).² Desondanks is de levensverwachting nog steeds kort en is de morbiditeit hoog.²

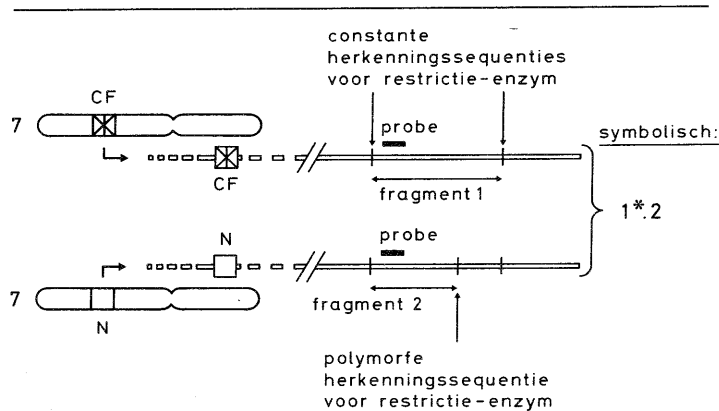
Tot nu toe zochten velen tevergeefs naar het primaire eiwitdefect dat verantwoordelijk is voor de ziekte. Er komen steeds meer aanwijzingen dat het transport van chloride door de celmembraan gestoord is.³ Een 100% betrouwbare methode voor prenatale diagnostiek en

dragerschapsonderzoek is nog niet beschikbaar. Bij erfelijkheidsvoorlichting aan de ouders bleek in de V.S. 85% van de ondervraagden een methode voor prenatale diagnostiek zeer belangrijk te vinden.⁴

Sinds enkele jaren kan kystische fibrose met 95% betrouwbaarheid voor de geboorte worden opgespoord door het vaststellen van verlaagde activiteiten van microvillaire (darm)enzymen in het vruchtwater na punctie in de 17e-18e zwangerschapsweek waarover Kleijer et al. elders in dit tijdschrift berichten.⁵

Een andere benadering voor (prenatale) moleculaire diagnostiek van kystische fibrose is het aantonen van het gemuteerde gen. Pogingen om dit gen te lokaliseren door aantonen van genetisch gekoppelde eigenschappen zijn lang zonder resultaat gebleven. Eiberg et al. en Tsui et al. toonden in 1985 voor het eerst koppeling aan van kystische fibrose en wel met het enzym para-oxonase en een DNA-probe (DOCR I-917).^{6,7} Kystische fibrose kon worden gelokaliseerd op het midden van de lange arm van chromosoom 7.⁸⁻¹⁰ Inmiddels zijn ten minste 4 andere DNA-probes getest, die in een aantal families met een zeer grote kans op een betrouwbare uitslag kunnen worden gebruikt voor het aantonen van de mutatie, zowel bij patiënten als bij (gezonde) dragers (tabel). Dit opende de weg naar prenatale diagnostiek op DNA-niveau via gekoppelde polymorfismen.¹¹ Een belangrijk voordeel van DNA-analyse is de toepasbaarheid op chorionvlokken, verkregen door chorionaspiratie in de 10e zwangerschapsweek.¹²

Het principe van het DNA-koppelingsonderzoek (figuur 1) is, dat een probe een op (genetisch) korte afstand gelegen polymorfisme detecteert. DNA-polymorfismen zijn erfelijk bepaalde, variabele DNA-structuren. Deze kunnen met bepaalde DNA-splitsende enzymen (restrictie-enzymen) herkend worden. Ze zijn toepasbaar als merker van een naburig (ziekte)gen. DNA-polymorfismen komen in minimaal 2 verschillende vormen voor. Voorafgaand aan een prenatale diagnose moet door familieonderzoek uitgezocht worden aan welke van de verschijningsvormen van het polymorfisme het ziektegen in deze familie gekoppeld is. Toepassing bij kystische



FIGUUR 1. Het kystische-fibrose-locus gekoppeld aan een DNA-polymorfisme bij een drager van de ziekte (niet op schaal getekend). □ N = normaal gen; ⊠ CF = gemuteerd gen. De probe detecteert bij afwezigheid van de polymorfe herkenningssequentie van het restrictie-enzym een groot DNA-fragment: fragment 1; bij aanwezigheid hiervan wordt een kleiner fragment gezien: fragment 2. 1*2 = heterozygoot voor het polymorfisme; CF-mutatie gekoppeld aan fragment 1.

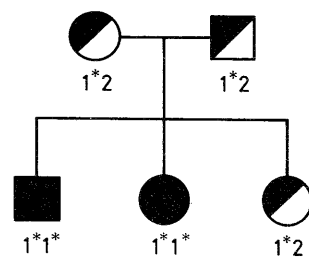
fibrose (figuur 2) laat in de getoonde familie zien dat de beide patiënten homozygoot zijn voor vorm 1 van de merker; de ouders hebben beiden zowel vorm 1 als vorm 2. Vorm 1 van de merker is in deze familie gekoppeld aan het gemuteerde kystische fibrose-gen. Elke probe die een polymorfisme detecteert is slechts toepasbaar in een deel van de families waarin eerder kinderen met kystische fibrose geboren werden. Immers, als beide ouders homozygoot zijn voor één van beide vormen van het polymorfisme, is dit polymorfisme in deze familie niet informatief. Het aantal families waarin toepassing mogelijk is, is derhalve afhankelijk van de frequentie waarmee de beide vormen van het polymorfisme in de bevolking voorkomen. De grootste kans op informatief zijn ontstaat wanneer beide vormen met een gelijke frequentie voorkomen. Door het toepassen van meer DNA-polymorfismen wordt het onderzoek in een groter deel van de

DNA-probes op korte afstand van het kystische-fibrose-locus

probe	restrictie-enzym	frequenties*	genetische afstand tot kystische-fibrose-locus in centi-morgans**	onderzoekers
pJ3.11	MspI	0,8/0,2	1,0	Wainwright et al. ⁹
pMetD	TaqI	0,7/0,3	1,25	White et al. ¹³ en Dean et al. ¹⁰
pMetD	BanI	0,55/0,45	1,25	
pMetH	MspI	0,03/0,53/0,44	1,25	
pMetH	TaqI	0,56/0,44	1,25	et al. ¹⁰
7c.22	EcoRI	0,76/0,24	4,5	Scambler et al. ¹⁴

* De frequenties van de verschillende verschijningsvormen van het polymorfisme, bepaald in buitenlandse centra.

** Naar schriftelijke mededelingen van J.Schmidtke (1986) en G.F. Vande Woude (1986).



FIGUUR 2. Voorbeeld van koppeling van een DNA-polymorfisme met kystische fibrose in een familie met 2 kinderen met de ziekte en 1 kind zonder de ziekte. ● vrouw heterozygoot voor kystische fibrose; ◻ man heterozygoot voor kystische fibrose; ● vrouwelijke patiënt met kystische fibrose; ◼ manlijke patiënt met kystische fibrose. 1 en 2 zijn de beide vormen van het polymorfisme; * geeft de koppeling aan met kystische fibrose. In deze familie is de ziekte gekoppeld aan vorm 1 van het polymorfisme. Kinderen met kystische-fibrose in deze familie zijn homozygoot voor vorm 1. Kinderen zonder de ziekte zijn of 1 2 (heterozygoot voor kystische fibrose) of 2 2 (homozygoot normaal wat betreft het kystische-fibrose-locus).

families informatief. Daarnaast kan de afstand tussen de merker en het kystische fibrose-gen een beperkende factor zijn: door recombinatie tijdens de reductiedeling kan de merker van het ziekte-gen ontkoppeld raken. Ook in dit verband is het analyseren van meer probes van groot belang, vooral van probes die aan weerszijden van het kystische fibrose-gen gelegen zijn.

Tot nu toe zijn door ons 10 families onderzocht die 2 kinderen met de ziekte kregen. De resultaten van ons totale familieonderzoek zullen worden opgenomen in een publikatie waarin de gegevens van alle centra in de wereld die zich met DNA-onderzoek van kystische fibrose bezighouden zullen worden gebundeld. Hierdoor zal in de nabije toekomst met zeer grote precisie een uitspraak gedaan kunnen worden over de te verwachten betrouwbaarheid en toepasbaarheid van het onderzoek van DNA-polymorfismen. Vervolgens zal worden nagegaan hoe betrouwbaar prenataal DNA-onderzoek zal zijn in (veel vaker voorkomende) families die slechts 1 kind met kystische fibrose kregen. Het stellen van een prenatale diagnose met DNA-polymorfismenonderzoek is aan zekere beperkingen onderhevig, vooral in een familie met slechts één kind dat de aandoening heeft. Bij onderzoek in de families met probes gelegen aan één kant van het kystische fibrose-gen, is er een risico op een fout-negatieve uitslag van ca. 2% en een risico op een fout-positieve uitslag van ca. 6%.¹⁵ Deze risico's berusten op de onmogelijkheid om recombinatie te detecteren. Indien de informatieve probes aan weerszijden van het kystische fibrose-gen gelegen zijn, is een foutieve uitslag vrijwel uitgesloten. Recombinatie is dan namelijk wel te detecteren omdat een discrepantie gevonden wordt met het eerder voor deze familie bepaalde koppelpatroon. Vruchtwateronderzoek (18e week) van microvillaire enzymen kan dan uitsluitend geven met 95% zekerheid.

Onlangs werden door de groep van Williamson de eerste 5 prenatale diagnoses van kystische fibrose met behulp van gekoppelde DNA-probes gepubliceerd.¹⁵ De auteurs berekenden dat met de door hen geteste polymorfismen volledig informatief prenataal DNA-onderzoek mogelijk zal zijn in ca. $\frac{2}{3}$ van de families met minimaal 1 kind met kystische fibrose dat nog in leven is. Thans zijn – ook in ons laboratorium – 6 bruikbare polymorfismen beschikbaar (zie de tabel), die in naar schatting $\frac{3}{4}$ van de families prenatale diagnostiek mogelijk zullen maken.

Prenataal DNA-onderzoek van kystische fibrose lijkt toepasbaar in een groot deel van de families, hetgeen de mogelijkheid biedt tot vroege prenatale diagnostiek (10e week) met een betrouwbaarheid die vergelijkbaar is met die van het vruchtwateronderzoek (18e week).

Wij danken de families die bereid waren aan het onderzoek mee te werken, de Sophia Stichting voor financiële steun en prof.dr. M.F. Niermeijer voor zijn bijdrage aan het tot stand komen van dit artikel. Dr. J. Schmidtke (Institut für Humangenetik, Göttingen), prof.dr. R. Williamson (St. Mary's Hospital Medi-

cal School, Londen) en prof.dr. G.F. Vande Woude (NCI Frederick Cancer Research Facility, Frederick, Maryland, USA) stelden welwillend hun probes ter beschikking.

NASCHRIFT

Onlangs verrichtten wij prenataal DNA-onderzoek bij een 37-jarige vrouw die in 1974 een zoon met kystische fibrose en in 1977 een gezonde zoon ter wereld had gebracht. Uit vooronderzoek van de familie was gebleken dat prenatale DNA-analyse volledig informatief zou zijn (J3.11/MspL, zie de tabel). In de 10e zwangerschapsweek werd onder ultrageluidcontrole langs transcervicale weg enig chorionweefsel afgenomen (Mw.dr.M.G.J.Jahoda, afd. Verloskunde, Academisch Ziekenhuis Rotterdam/Dijkzigt), waaruit DNA werd geïsoleerd. Het patroon van het foetale DNA bleek identiek aan dat van de index-patiënt zodat met 99% betrouwbaarheid de prenatale diagnose kystische fibrose kon worden gesteld. De zwangerschap werd door middel van zuigcurettagage in de 12e week afgebroken.

LITERATUUR

- 1 Kate LP ten. Erfelijkheid en vóórkomen van kystische fibrose. Mndschr Kindergeneesk 1975; 43: 316-28.
- 2 Jongste JC de, Neijens HJ, Duiverman EJ, Horrevorts AM, Sinaasappel M, Kerrebijn KF. De behandeling van kystische fibrose. Ned Tijdschr Geneesk 1986; 130: 297-301.
- 3 Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. Nature 1983; 301: 421-2.
- 4 Kaback M, Zippin D, Boyd P, Cantor R. Attitudes toward prenatal diagnosis of cystic fibrosis among parents of affected children. In: Lawson D, ed. Cystic fibrosis: horizons. Chichester: John Wiley, 1984: 15-28.
- 5 Kleijer WJ, Niermeijer MF. Prenatale diagnostiek van kystische fibrose. Ned Tijdschr Geneesk 1986; 130: 2267-70.
- 6 Eiberg H, Mohr J, Schmiegelow K, et al. Linkage relationships of paraoxanase (PON) with other markers: indication of PON-cystic fibrosis synten. Clin Genet 1985; 28: 265-71.
- 7 Tsui L-C, Buchwald M, Barker D, et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. Science 1985; 230: 1054-7.
- 8 Knowlton RG, Cohen-Hagenauer O, Cong N van, et al. A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. Nature 1985; 318: 380-2.
- 9 Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, et al. Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7 cen-q22. Nature 1985; 318: 384-5.
- 10 Dean M, Park M, Beau MM le, et al. The human *met* oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes. Nature 1985; 318: 385-8.
- 11 Veenema H, Leschot NJ, Ommen G-JB van, Pearson P. Het belang van recombinant-DNA-onderzoek voor de opsporing van draagsters van de spierdystrofie van Duchenne. Ned Tijdschr Geneesk 1985; 129: 1137-41.
- 12 Sachs ES, Jahoda MGJ, Vosters RPL, Kleijer WJ, Galjaard H. Resultaten van prenatale diagnostiek bij 350 zwangeren in de 10e week van de zwangerschap. Ned Tijdschr Geneesk 1985; 129: 1968-74.
- 13 White R, Woodward S, Leppert M, et al. A closely linked marker for cystic fibrosis. Nature 1985; 318: 382-4.
- 14 Scambler PJ, Wainwright BJ, Watson E, et al. Isolation of a further anonymous informative DNA sequence from chromosome seven closely linked to cystic fibrosis. Nucleic Acids Res 1986; 14: 1951-6.
- 15 Farral M, Rodeck CH, Stanier P, et al. First-trimester prenatal diagnosis of cystic fibrosis with linked DNA probes. Lancet 1986; ii: 1402-5.

Aanvaard op 28 juli 1986