

*A DOTE Bőr- és Nemikórtani Klinika (igazgató: prof. dr. Hunyadi János)<sup>1</sup>,  
a Glasgowi Egyetem Orvosi Genetikai Intézetének (igazgató: prof. dr. J.M.Connor)<sup>2</sup>,  
a DOTE I. Belgyógyászat (igazgató: prof. dr. Kakuk György)<sup>3</sup> és a NRCET, Queensland,  
Ausztrália (igazgató: prof. dr. Michael Moore)<sup>4</sup> közleménye*

**Erythropoeticus Protoporphyrria:  
Új mutáció a humán ferrokelatáz génen\*  
Erythropoietic Protoporphyrria:  
A novel mutation in the human ferrochelataze gene**

REMEYIK ÉVA DR.<sup>1</sup>, LANYON, W. GEORGE DR.<sup>2</sup>, PARAGH GYÖRGY DR.<sup>3</sup>, WIKONKÁL NORBERT DR.<sup>1</sup>, KÓSA ÁGNES DR.<sup>1</sup>, MOORE, MICHAEL DR.<sup>4</sup>, HORKAY IRÉN DR.<sup>1</sup>

**ÖSSZEFOGLALÁS**

Az erythropoeticus protoporphyrria fényérzékenységgel járó öröklődő betegség, melynek oka a ferrokelatáz enzim csökkent aktivitása. Az enzimzavar az eritrocitákban, szérumban, májban és székletben protoporfirin felhalmozódást eredményez. Eddig számos, a DNS különböző szakaszát érintő mutációt észleltek a betegség okaként, alátámasztva ezzel a heterogén molekuláris patomechanizmust. Szerzők újabb molekuláris eltérések keresése céljából 8 beteg esetében reverz transzkriptáz polimeráz láncreakciót (PCR), chemical cleavage analysis-t és egy esetben DNS szekvenálást végeztek. Egy beteg mintájából G-C transzverziót mutattak ki az első intron acceptor oldalának első bázis helyén, ami a második exon kiesését eredményezte. Az új mutáció felismerése, amelyre a beteg heterozigóta volt, közelebb visz az EPP genetikájának feltérképezéséhez.

**Kulcsszavak:**  
**erythropoeticus protoporphyrria -  
ferrokelatáz - exon 2 - mutáció**

**SUMMARY**

*Erythropoietic protoporphyrria (EPP) is an inherited disorder associated with intense light sensitivity and is caused by the diminished activity of the enzyme ferrochelataze. This results in the accumulation of protoporphyrin in erythrocytes, serum, liver and faeces. Several different mutations have been found to be responsible for the development of EPP, thus illustrating the heterogeneous molecular pathology of the disease. To define further molecular defects reverse transcriptase-PCR (RT-PCR), chemical cleavage analysis, DNA sequencing were performed in 8 EPP cases.*

*In one patient, the analysis revealed a G to C transversion at the first position of the acceptor site of intron 1, indicating loss of exon 2. The discovery of the novel mutation for what the patient was heterozygous, adds new data to the growing list of causes of EPP.*

**Key words:**  
**erythropoietic protoporphyrria -  
ferrochelataze - exon 2 - mutation**

A hem bioszintézisében résztvevő enzimek defektusa következtében különböző klinikai tünetekkel rendelkező kórképek, az úgynevezett porphyriák jönnek létre. Az erythropoeticus protoporphyrria (EPP) egy ritka forma. A ferrokelatáz csökkent aktivitása okozza. Az enzim a hem szintézis utolsó lépését katalizálja, a vas ion beépülését a protoporfirinbe [1]. A hibás működés miatt a protoporfirin IX felhalmozódik a szövetekben (vér, máj, bőr). A klinikai tünetek gyermekkorban kezdődnek és az egész élet folyamán végigkísérik a beteget. A dermatológiai tünetek a protoporfirin fotoaktivitásának a következményei. Napfény behatás után az érintett bőrön égő, viszkető érzés,

ödéma, fájdalom, urtikária, papulák, vezikulák keletkeznek. Kialakulásáért valószínűleg a masztociták degranulációja során felszabaduló mediátorok [2] és a komplement szisztéma [3] a felelősek. A betegek kb. 5%-ban akut, súlyos, gyorsan halálhoz vezető obstruktív májelégtelenség fejlődhet ki [4] a protoporfirin májban történő extrém felgyűlésének következményeként, mely csak szervátültetéssel (máj vagy csontvelő) gyógyítható [5]. Ennek sikere a májelégtelenség progressziójával egyre csökken, gyors lefolyása miatt csak a korai diagnózistól és a preventív transzplantációtól vagy a jövőben génebeszeti beavatkozásoktól várható teljes gyógyulás. Jelen ismereteink szerint nem rendelkezünk olyan paraméterekkel, melyek alapján meg tudnánk jósolni, kik azok az EPP-s betegek, akikben májelégtelenség fog kialakulni, és melyek

\* Az előadás elhangzott a DOTE Bőrklínika 70 éves jubileumi rendezvényén. 1997 szeptember 18-20.

azok a provokáló faktorok, amik erre vezetnek. Ezért a betegség kialakulásáért felelős mutációk feltérképezése, azok összevetése a klinikai képpel és laboratóriumi paraméterekkel nemcsak a betegség okának tisztázásában, hanem a letális kimenetel megelőzésében is jelentős.

A ferrokelatáz cDNS-t 1990-ben [6] klónozták és lokalizálták a 18-as kromoszómára [7, 8]. Azóta több munkacsoport számos mutációt közölt, melyek az EPP genetikai polimorfizmusát támasztják alá [9]. Az öröklésment többnyire domináns, inkomplett penetranciával [10], de recesszív eseteket is ismertettek [11]. A DOTE Bőrklínikán 1966 óta 23 EPPs beteget gondozunk [12]. Ez a betegség gyakoriságát tekintve nagyszámú populáció lehetőségét adott arra, hogy tanulmányozzuk a kórkép genetikáját, patomechanizmusát és epidemiológiáját.

## Anyag és módszer

8 EPP-ben szenvedő beteg perifériás alvadás gátolt vérből történtek a molekuláris genetikai vizsgálatok. A részletesebben vizsgált beteg 35 éves. Klinikai tünetei négy éves korában kezdődtek. A napfénynek kitett területeken, a besugárzás után fél egy órával fájdalom, égő érzés, viszketés jelentkezett, néha apró hólyagok is előfordultak. A beteg évek óta fényvédelem mellett beta carotin prevencióban részesül, jelenleg a kézháton, orron narancshéjra emlékeztető a bőre. Perifériás vérkenetében a vvt-k 25%-a fluoreszcens mikroszkóp alatt vörösen fluoreszkál. Vörösvértest protoporphyrin szintje: 432 µg/100 ml vvt, a ferrokelatáz enzim aktivitása 35%-a a normál kontrollénak (cink-kelatáz módszer [13]). A májfunkciós próbákban elterést nem észleltünk.

### 1. RNS szeparálás

A totál RNS szeparálása a perifériás vérből Histopaque gradiens centrifugálás után nyert buffy coat-ból RNAesy kittel (QUIAGEN) vagy Chomczynsky és Sacchi módszerével [14] TRIzol reagens (Life Technologies) felhasználásával történt.

### 2. DNS szeparálás:

A genom DNS-t a TRIzol reagens protokolljában leírtak szerint az RNS szeparálás után maradt fenolos fázisból nyertük.

### 3. Reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR)

#### a) RT-PCR Ferrokelatáz komplementer DNS (cDNS) szintézise

First strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia Biotech) random hexadexinucleotid primerek felhasználásával történt 37 °C-on 60 percig. A reverztranszkriptáz reakció után azonnal PCR-ban specifikus primerek (p1 primer [10], 5'-GAGGCTGCCAGGCAA-3' és p2 5'-TTTTCAACTCCACTCC-3' (GCG komputer programmal tervezve) felhasználásával sokszoroztuk a ferrokelatáz cDNS-t. A termék a ferrokelatáz enzimet kódoló csaknem teljes szakaszt tartalmazta, nagysága 1105 bp. A PCR körülmények a következők voltak: - 1 perc denaturáció 95 °C-on; 1 perc annealing 57 °C-on és 1 perc 30 másodperc a végső extenzió 72 °C-on. Enzimként Ampli Taq DNA polymerázt használtunk (Perkin Elmer). A PCR termékeket alacsony olvadáspontú agaróz gélen elektroforetizálva, etidium bromid festéssel UV fény alatt vizsgáltuk és fotóztuk. A RT-PCR reakciókat minden mintából három alkalommal egymástól függetlenül elvégeztük.

### 4. A mutáció lokalizálása:

#### a) Chemical Cleavage of Mismatches (CCM)

A PCR termék tisztítása után (Kristal kit) CCMM analízist végeztünk Dahl et al. [15] (1989) módszere szerint ezüstfestéssel.

#### b) Polimeráz láncreakció (PCR) belső primerekkel

A RT-PCR reakció termékét 2% agaróz gélen hosszan futtatva a gélből kivágtuk a rövidebb terméket, majd a p1, p4 már közölt primer [10] valamint a GCG komputer program segítségével tervezett p2, p3, p5 belső primerekkel végeztük PCR-t. (Primerek: p3 forward:- 5'-CACCATTTCGCAAC; p4 reverse:- 5'-

TTTGCCTAACGCCACGGGGT; p5 forward:- 5'-ACACAT-CACCTCCTCATC. A termékek hossza: A: p1, p2 1105 bp; B: p3, p4990 bp; C: p5, p4 630 bp). A PCR körülményei hasonlóak voltak a RT-PCR reakciókban leírtakhoz, azzal a különbséggel, hogy az extenzió ideje 1 perc volt.

### A cDNS szakasz direkt szekvenálása:

Aszimmetrikus PCR-t (Mgone et al., 1992) végeztünk a gélből kimerített és extrahált cDNS-sel mint templáttal p1 primert használva limiting primernek 45 cikluson át. Az aszimmetrikus PCR termék isopropil alkoholos tisztítása után dideoxinukleotid láncterminációs szekvenálás történt Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (United States Biochemical) 35S dATP (Amersham) jelölt deoxinukleotid segítségével. Az elektroforézis 8% ureát tartalmazó szekvenáló gélen 50 °C-on Kodax X-omat filmmel exponáltuk.

### A genom DNS szekvenálása:

A 2 exont és az azt határoló intron területeket genom DNS templát és p4 [4].

Forward primer:- 5'-ATGGAGGTGGAAGTCAGGTG

Reverse primer:- 5'-TTGTGTCTATTGGTGTCTGC

és p5 primer pár [9.]

Forward primer:- 5'-TTACCTGCCTGCAGAGAAATGC

Reverse primer:- 5'ACAGCTATTGAAAGGAAGCCA segítségével sokszoroztuk

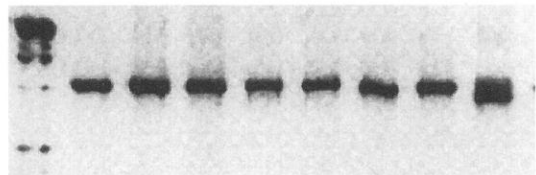
Aszimmetrikus PCR és direkt szekvenálást végeztünk az előzőekben leírtak szerint.

## Eredmények

8 EPP-s beteg perifériás limfocitáiból extrahált, totál RNS felhasználásával készült RT-PCR reakció termékeket agaróz gélen megfuttatva egy beteg esetében kb. 100 bázissal rövidebb terméket is észleltünk a várt 1,1 kb termék mellett (1. ábra). Ezt jelzi a 8. minta megvastagodott csíkja.

Ezt a rövidebb terméket a gélből extrahálva a több belső

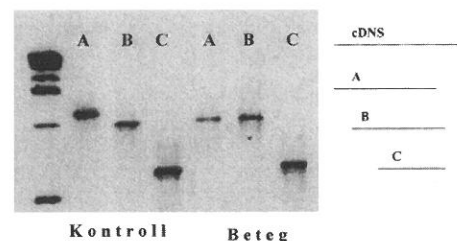
## Ferrokelatáz RT-PCR



1. ábra

EPP-s betegek perifériás limfocitáiból extrahált, totál RNS felhasználásával készült RT-PCR reakció termékei (agaróz gél elektroforézis)

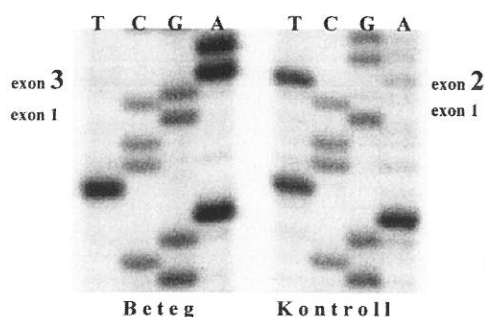
## Ferrokelatáz PCR



2. ábra

Belső primerrel elvégzett PCR termékek. A mellékelt sematikus ábra jelzi a termékek helyzetét a cDNS-hez viszonyítva

### Ferrokelatáz genom cDNS szekvencia



3. ábra

A cDNS elülső szakaszának direkt szekvenálása

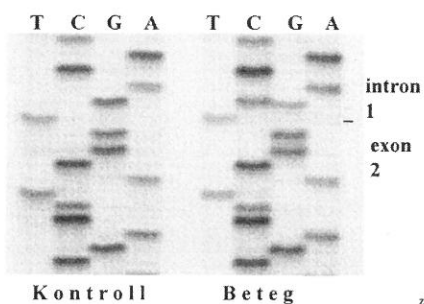
primerrel elvégzett PCR és CCM analízis azt mutatta, hogy az A termék a beteg esetében rövidebb, mint a kontroll (2. ábra).

Ennek alapján a mutációt a cDNS első szakaszára lokalizáltuk.

Ezen szakasz direkt szekvenálásának eredményét összehasonlítva a kontroll és közölt cDNS bázissorrendjével a második exon kiesését észleltük. Az exonok területén mutációt nem találtunk (3. ábra).

A második exont határoló intronok második exonhoz közeli szakaszainak szekvenálása során az első intron első bázisán (g-c) transzverziót észleltünk, melyre vonatkozóan a beteg heterozigóta volt (4. ábra).

### Ferrokelatáz genom DNS szekvencia



4. ábra

A 2 exont határoló intronok 2 exonhoz közeli szakaszainak szekvenálása

### Megbeszélés

A 2 exon kiesését, mint az EPP genetikai okát Nakahashi 1992-ben közölte [16], de a munkacsoport az exon kiesését betegük esetében az 1 intron -23 helyén észlelt mutációnak tulajdonította. Az általunk észlelt intron 1 első bázisát érintő heterozigóta G-C transzverzió eddig még nem közölt bázis-eltérés a ferrokelatáz génen. Ismert, hogy a gének intron/exon határterületei konzervatív régiók. A kü-

lönböző géneken az intron/exon határon tg szekvencia található meg, aminek szerepe van az intronok kivágódásában és az exonok összekapcsolódásában. Az itt bekövetkező mutációk megakadályozzák a pontos illeszkedést és az exon kiesését eredményezhetik. Az általunk észlelt mutáció tehát egy a mRNS érésében (splicing) fontos konzervatív régiót érint és magyarázza az exon kiesését. Ennek a 127 bázisból álló szakasznak a kiesése jelentős változást idéz elő a fehérje konfigurációjában és az enzimaktivitás csökkenését okozza. A ferrokelatáz génen eddig mintegy 24 különböző mutációt írtak le. Közöttük az exon 2 [15] Nakahashi 1992, exon 3 [17] (Sarkany 1994), exon 7 [18] (Nakahashi 1993), exon 9 [10] (Nakahashi 1993/1) és exon 10 [19], 20] (Wang 1993, Gouya 1996) delécióját, amelyeket az EPP klinikai tüneteikért felelős genetikai eltérésnek tartanak. Betegünk az általunk észlelt mutációra heterozigóta, a klinikai tünetek jelenléte, a csökkent enzimaktivitás, valamint az emelkedett vvt porfirin szintek alátámasztják a domináns öröklődési menetet, ugyanakkor a beteg szülei, testvérei és gyermekei klinikailag tünetmentesek. A családban tehát valószínű az irodalom szerint is leggyakoribb domináns öröklődési menetet inkomplett penetranciával. Ennek igazolására a családban további vizsgálatok szükségesek.

A molekuláris genetikai ismeretek fejlődésével egyre több és pontosabb információval rendelkezünk az EPP genetikai hátteréről. A betegség genetikai heterogenitása nemcsak az öröklődési menetben, hanem a mutációk heterogenitásában is megnyilvánul. A genetikai kutatások eredményei részben az érintett családokban az öröklődési menet pontos feltárásához és ezzel a megalapozott genetikai tanácsadáshoz segítenek, részben pedig segítenek párhuzamot vonni a klinikai kép és a genetikai eltérés között. Ez a jövőben lehetővé teszi majd a súlyosabb esetek előrejelzését és a betegség génebeszeti kezelését. Saját vizsgálataink eredménye, egy új mutáció felismerése is hozzájárul ennek eléréséhez.

### IRODALOM

1. Moore M.R., és mtsai.: Disorders of porphyrin metabolism. Plenum Publishing Corporation, New York, NY, (1987) 201-211.
2. Kamide R., Gigli I., Lim H.W.: Participation of mast cells in the immediate phase of hematoporphyrin-induced phototoxicity. J. Invest. Dermatol, (1984) 82, 485-490.
3. Lim H.W., Ph-Fitzpatrick M.B., Gigli I.: Activation of the complement system in patients with porphyrias after irradiation in vivo. J. Clin. Invest. (1984) 74, 1961-1965.
4. Nordmann Y.: Erythropoieic protoporphyria and hepatic complications. J. Hepatol, (1992) 16, 4-6.
5. Bloomer J.R., Weimer M.K., Bossenmaier I.C. et al.: Liver transplantation in a patient with protoporphyria. Gastroenterol, (1989) 90, 191-201.
6. Nakahashi Y.N., és mtsai.: Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human ferrochelatase. Biochem. Biophys. Res. Commun, (1990) 173, 748-755.
7. Taketani S., és mtsai.: Structure of the human ferrochelatase gene. Exon/intron gene organization and location of the gene to chromosome 18. J. Biochem, (1992) 205, 217-222.
8. Witcombe D.M., és mtsai.: Assignment of the human ferrochelatase gene (FECH) and a locus for protoporphyria to chromosome 18q22. Genomics (1991) 11, 1152-1154.

9. Wang X., és mtsai.: Screening for ferrochelatase mutations: molecular heterogeneity of erythropoietic protoporphyria. *Biochem. Biophys. Acta.* (1994) 1225, 187–189.
10. Nakahashi Y., és mtsai.: Molecular defect in human erythropoietic protoporphyria with fatal liver failure. *Hum. Genet.* (1993) 91, 303–306.
11. Sarkany R., Alexander G., Cox T.: Recessive inheritance of erythropoietic protoporphyria with liver failure. *Lancet*, (1993) 343, 1394–1396.
12. Horkay I., Kósa Á.: Protoporphyria erythropoetica. *Bőrgyógy. Vener. Szle.* (1992) 68, 155–161.
13. Nunn A.V.W., és mtsai.: Zinc chelatase in human lymphocytes: detection of the enzymatic defect in erythropoietic protoporphyria. *Analytic. Biochem.* (1988) 174, 146–150.
14. Chomczynsky P., Sacchi N.: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156–159.
15. Dahl H.H. és mtsai.: Detection and localisation of base changes in RNA using chemical cleavage method. *Anal. Biochem.* (1989) 183, 263–268.
16. Nakahashi Y., és mtsai.: The molecular defect of ferrochelatase in a patient with erythropoietic protoporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1992) 89, 281–285.
17. Sarkany R.P., Witcombe D.M., Cox T.M.: Molecular characterisation of a ferrochelatase gene defect causing anomalous RNA splicing in erythropoietic protoporphyria. *J. Invest. Dermatol.* (1994) 102, 481–484.
18. Nakahashi Y. és mtsai.: Human erythropoietic protoporphyria: identification of a mutation at the splice donor site of intron 7 causing exon 7 skipping of the ferrochelatase gene. *Hum. Mol. Genet.* (1993) 2, 1069–1070.
19. Wang X. és mtsai.: A novel mutation in erythropoietic protoporphyria: an aberrant ferrochelatase mRNA caused by exon skipping during RNA splicing. *Biochem. Biophys. Acta.* (1993) 1181, 198–200.
20. Gouya L. és mtsai.: Modulation of the phenotype in dominant erythropoietic protoporphyria by low expression of ferrochelatase allele. *Am. J. Hum. Genet.* (1996) 58, 292–299.

## **Magyar STD Társaság 1998. évi tudományos programja**

**A Magyar STD Társaság  
1998. november 13–14-én rendezi meg III. Nemzetközi Részvételű Nagygyűlést,  
valamint ehhez kapcsolódóan 1998. november 12–13-án a 4. Alpok–Adria–Danubia  
STD Workshop-ot.**

**Helyszín:** Budapest Kongresszusi Központ, Bartók terem  
Budapest, XII., Jagelló u. 1–3.

### **Témák:**

1. A szifilisz epidemiológiája, klinikuma.
2. HIV-fertőzés, AIDS.
3. Gonorrhoea epidemiológiája és klinikuma, különös tekintettel az extragenitalis és szövődmenyes kórformákra.  
Antibiotikum rezisztencia problémái.
4. A szexuális úton terjedő betegségek (STD) hatása a reprodukív képességre és a carcinogenesisre.
5. A szexuális magatartás változásai és hatása az STD epidemiológiai helyzetre.
6. Szabad témák.

### **Információ:**

*dr. Várkonyi Viktória*  
főtitkár

Cím: 1085 Budapest, Mária u. 41.

Tel.: (00-36-1) 266-0120/5736

(00-36-1) 138-2419

Fax: (00-36-1) 210-4874