

Conclusie

De hier beschreven SELDI-TOF-MS-applicaties laten zien dat hepcidinmetingen in zowel serum als urine goed mogelijk zijn, maar dat serummetingen gestandaardiseerde afnameprotocollen vereisen. Door de introductie van de hepcidine wordt het tevens mogelijk klinische studies uit te voeren, waardoor inzicht in de (patho)fysiologie van het ijzermetabolisme vergroot wordt. Deze inzichten kunnen bijdragen tot de ontwikkeling van nieuwe farmaca ter behandeling van ijzermetabolisme-gerelateerde aandoeningen waaronder hereditaire en secundaire hemochromatose (bijvoorbeeld thalassemie) en anemie van de chronische ziekte. Daarnaast kan de diagnostische meerwaarde van deze bepaling ten opzichte van al bestaande parameters gevalideerd worden.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32: 263-265

Referenties

1. Swinkels DW, Janssen MCH, Bergmans J, Marx JJM. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. *Clin Chem* 2006; 52: 950-68.
2. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferrremia in inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004; 113: 1271-6.
3. Kemna E, Tjalsma H, Laarakkers C, Nemeth E, Willems H, Swinkels D. Novel hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood* 2005; 106: 3268-70.
4. Kemna EHJM, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin Chem* 2007; 53: 620-8.

Surfactantproteïne-C-mutaties in families met idiopathische pulmonale fibrose

C.H.M. van MOORSEL^{1,2}, M.F.M. van OOSTERHOUT³, J.M.M. van den BOSCH¹, H.J.T. RUVEN²
en J.C. GRUTTERS¹

Een belangrijke barrière tegen ingeademde microbiële, organische en anorganische deeltjes in de longen wordt gevormd door de surfactantvloeistof die het longepitheel bedekt. Pulmonaal surfactant bestaat voor ongeveer 90% uit lipiden en voor 10% uit proteïnen. Eén van deze proteïnen is het zgn. surfactantproteïne-C (SP-C), dat de oppervlaktetensionverlagende werking van het surfactant verbetert. Het humaan pro-proteïne C bestaat uit een precursor van 197 aminozuren, die in de cel sequentieel wordt gekleefd tot zijn uiteindelijke vorm van 35 aminozuren. Het is bekend dat dit proteïne bij zeer jonge kinderen met ernstige respiratoire aandoeningen niet altijd aanwezig is in bronchoalveolaire lavage(BAL-)vloeistof. Genetische analyse van het gen dat codeert voor surfactant C (SFTPC) bij deze kinderen liet zien dat in een aantal gevallen een heterozygote mutatie in een exon of 'splice site' aanwezig was. In alle gevallen waarin de mutatie ook in één van de ouders werd aangetoond, vertoonden ook deze ernstige longproblemen met een beeld behorende bij idiopathische pulmonale fibrose (IPF) (1). IPF behoort tot de idiopathische interstitiële pneumonieën (IIP) en kenmerkt zich door ernstige progressieve longfibrose, waarvan de oorzaak onbekend is, en een zeer slechte prognose. De gemiddelde

leeftijd bij diagnose ligt rond de 60 jaar en de gemiddelde overleving is ongeveer vier jaar. Het ziekteproces verloopt via schade aan het alveolaire epitheel waar fibroblastenfoci ontstaan die de longfunctie irreversibel verstoren. Wat betreft de oorzaak wordt IPF gezien als een zogenaamde 'complexe ziekte' waarbij men denkt dat een combinatie van omgevings- en genetische factoren bijdragen aan het ziekteproces. Er zijn associaties met polymorfismen in de human-leukocyte-antigenregio en cytokinen gevonden (2). Sinds jaren zijn er families bekend waarin meerdere familieleden lijden aan IPF en waarbij een dominante overerving van de ziekte wordt gezien. Bestudering van de genetica van deze families kan inzicht geven in de mogelijke oorzaak en het verloop van het ziekteproces en kan daardoor leiden tot nieuwe etiologische inzichten en aanknopingspunten voor nieuwe therapieën. In deze studie onderzoeken we of mutaties in het SFTPC-gen een rol zouden kunnen spelen bij patiënten met een familiale vorm van IPF.

Materiaal en methoden

De patiënten zijn behandeld in het Centrum voor Interstitiële Longziekten, St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein, waar de diagnose IPF is gesteld in overeenstemming met de internationale multidisciplinaire ATS/ERS-consensusclassificatie van IIP. Dit onderzoek is uitgevoerd met toestemming van de patiënt en is goedgekeurd door de medisch-ethische toetsingscommissie van het St Antonius Ziekenhuis. DNA van

Centrum voor Interstitiële Longziekten¹, afdeling Klinische Chemie², Sint Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein; afdeling Pathologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht³, Nederland

tien patiënten met IPF die eerstegraads familieleden hebben met IIP is geëxtraheerd uit perifere bloed. Het volledige SFTPC-gen, inclusief promotor, exonen, intronen en 3'UTR is gesequenced. Hiervoor is het DNA d.m.v. PCR in fragmenten geamplificeerd, waarna het gepurificeerde amplicon werd gesequenced (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing reactie, Applied Biosystems, Foster City, VS).

Resultaten

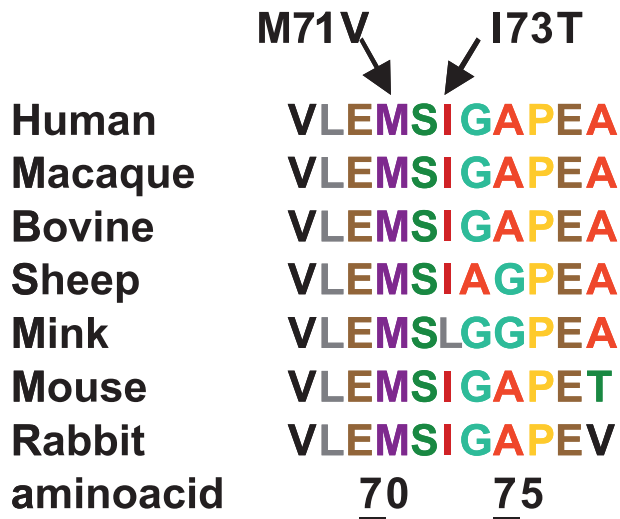
De demografische gegevens van de tien patiënten zijn te vinden in tabel 1. In patiënt 7 is een mutatie van A naar G op de eerste positie van codon 71 gevonden, die niet in gezonde familieleden is aangetoond. Hierdoor verandert het wild-typeaminozuur methionine in valine (M71V). In patiënt 9 is de mutatie I73T gevon-

den, welke tevens is aangetoond in haar zuster met longfibrose, maar niet in haar gezonde vader. Beide SFTPC-mutaties (M71V en I73T) werden gevonden in exon 3, waarvan in figuur 1 wordt aangetoond dat de aminozuurvolgorde bijzonder geconserveerd is binnen zoogdieren. Hieruit blijkt dat er een strenge natuurlijke selectie tegen mutaties op deze posities is.

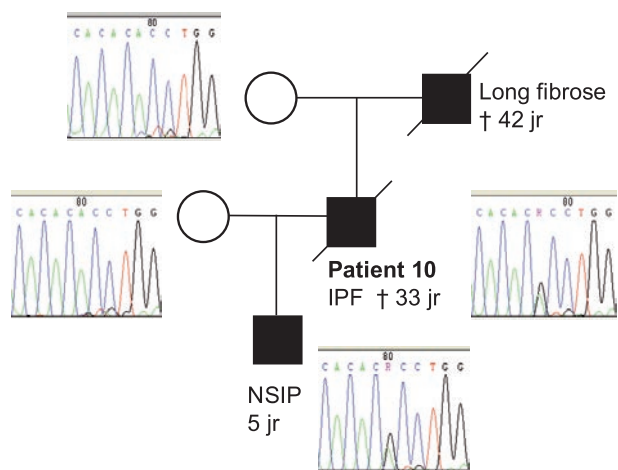
In patiënt 10 is de mutatie IVS4+2 aangetoond. Deze intronmutatie heeft tot gevolg dat de donor-splicesitessequentie op de exon-intron-4-grens verandert. De mutatie is tevens aangetoond in de zoon van de patiënt, die ook aan longfibrose lijdt (de vorm 'non-specific interstitial pneumonia'), maar niet in de gezonde moeder van de patiënt en de gezonde moeder van de zoon (figuur 2).

Tabel 1. Gegevens van patiënten met familiale idiopathische pulmonale fibrose (IIP)

Patiënt	Geboorteaar	M/V	Leeftijd bij diagnose	Status	IIP in familieleden
1	1945	M	59 jr.	overleden, 61 jr.	2 broers
2	1940	M	64 jr.	in leven, 67 jr.	moeder, neef
3	1961	V	42 jr.	longtransplantatie 2007, in leven, 46 jr.	broer, moeder, grootmoeder, ooms
4	1937	M	57 jr.	overleden, 64 jr.	broer, zus
5	1957	M	40 jr.	longtransplantatie 2003, overleden 47 jr.	broer
6	1944	M	59 jr.	overleden, 60 jr.	broer, zus
7	1975	M	30 jr.	in leven, 32 jr.	moeder, grootmoeder, tante
8	1927	M	75 jr.	overleden, 76 jr.	broer
9	1973	V	29 jr.	longtransplantatie 2006, in leven, 34 jr.	zus, moeder, grootmoeder
10	1971	M	32 jr.	overleden 33 jr.	zoon, vader



Figuur 1. Aminozuurvolgorde van proSP-C posities 68 tot 78 in verschillende zoogdiersoorten. Methionine op positie 71 is in de loop van de evolutie compleet geconserveerd maar gemuteerd naar valine in patiënt 7. Positie 73 kent twee functionele vormen leucine in de nerts (mink) en isoleucine in alle andere soorten, maar beide aminozuren behoren tot dezelfde groep. In patiënt 9 vindt op deze positie een substitutie plaats naar threonine. (Aminozuurvolgorde verkregen door translatie van sequenties in GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide>)



Figuur 2. Overerving van idiopathische interstiële pneumonieën binnen de familie van patiënt 10 en bijbehorende sequentiepatronen rondom positie IVS4+2. Heterozygotie voor de middelste sequentiepositie valt samen met longfibrose in de familie en laat zien dat het om een dominante mutatie gaat. De linkersequentiepatronen zijn afkomstig van de gezonde moeder en partner van patiënt 10. De rechtersequentiepatronen, met mutatie, zijn afkomstig van patiënt 10 en zijn zoon, beide met interstiële longfibrose. IPF, idiopathische pulmonale fibrose; NSIP, non-specific interstitial pneumonia; □ gezond; ■ long-aandoening; † overleden.

Discussie

In drie van de tien patiënten is een mutatie aangetoond in het SFTPC-gen, waarbij de distributie van de mutatie en de ziekte binnen de families overlappen. Deze drie patiënten hebben tevens de laagste leeftijd bij diagnose. De I73T-mutatie is al elf keer onafhankelijk aangetoond in patiënten en families met ernstige longfibrose en daarbij nog nooit in reeds honderden controles. De leeftijd waarop de ziekte zich openbaart varieert sterk binnen en tussen families. De moeder van patiënt 9 is overleden op 49-jarige leeftijd, terwijl haar beide dochters op 34-jarige leeftijd in kritieke toestand een longtransplantatie hebben ondergaan. Het is mogelijk dat mutaties in andere genen zoals SFTPB en ABCA3, waarvan bekend is dat zij bij homozygotie/compound-heterozygotie tot ernstige neonatale en juveniele longcomplicaties lijden, een negatief modifierend effect hebben op het ziekteverloop (3). Dit zal in deze families in de toekomst worden onderzocht.

De IVS4+2-mutatie verandert de sequentie van de donor-splice-site. In eerder onderzoek zijn twee verschillende IVS4+1-mutaties (G>T,G>A) gevonden. In sequenties van mRNA van deze patiënten is exon 4 afwezig, waaruit blijkt dat de donorsite niet meer herkend wordt, hetgeen 'exon skipping' tot gevolg heeft. Het pro-proteïne is zodanig veranderd dat zij via het endoplasmatisch reticulum voor degradatie naar het ubiquitinase-proteasomesysteem (UPS) wordt geleid. Immunohistochemie met proSP-C van UIP-biopen laat zien dat de hoeveelheid afgekeurd product te groot is om te verwerken en daardoor voor 'tijdelijke' opslag in zgn. aggresomen wordt verzameld. Dergelijke aggresomen hopen zich op in de cel die daardoor in apoptose gaat. Onderzoek laat zien dat de cellulaire gevolgen van de I73T- en IVS4+1-mutatie niet hetzelfde zijn (4). Immunohistochemie van proSP-C van patiënten met een I73T-mutatie laat zien dat het

proSP-C zich ophoopt in kleine endosomale vesicles, die onderdeel zijn van het surfactant 'recycling'pad. De hoeveelheid afgekeurd materiaal in dat pad is zo groot dat onderhoud van de surfactantvloeistof onmogelijk wordt. Het verschil tussen deze processen geeft aan dat therapieën afgestemd zouden kunnen worden op het veranderen van specifieke mutatie-gerelateerde cellulaire processen. Daarom is het van belang om bij verdenking van een genetische grondslag van IPF op zoek te gaan naar oorzakelijke mutaties.

Conclusie

In drie van de tien patiënten en hun familie zijn mutaties in SFTPC aangetoond. Dit maakt het aandeel van dergelijke mutaties in familiale vormen van longfibrose aanzienlijk. De drie patiënten worden gekarakteriseerd door de relatief jonge leeftijd waarop zij de ziekte krijgen. Hierbij is aangetoond dat het screenen van relatief jonge patiënten met onbegrepen interstitiële longfibrose, of patiënten waarbij een erfelijke component wordt verondersteld, zinvol is.

Referenties

1. Nogee LM, Dunbar AE 3rd, Wert S, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. Mutations in the surfactant protein C gene associated with interstitial lung disease. *Chest* 2002; 121 (3 Suppl): 20S-21S.
2. Grutters JC, Bois RM du. Genetics of fibrosing lung diseases. *Eur Respir J.* 2005; 25: 915-27.
3. Hartl D, Griese M. Interstitial lung disease in children – genetic background and associated phenotypes. *Respir Res.* 2005; 6: 32.
4. Stevens PA, Pettenazzo A, Brasch F, Mulugeta S, Baritussio A, Ochs M, Morrison L, Russo SJ, Beers MF. Nonspecific interstitial pneumonia, alveolar proteinosis, and abnormal proprotein trafficking resulting from a spontaneous mutation in the surfactant protein C gene. *Pediatr Res.* 2005; 57: 89-98.