

*Ю. В. Цукерман, К. А. Моссэ*

## **Анализ полиморфизма микросателлитных повторов гена фаг в семьях с фенилкетонурией: новые возможности пренатальной диагностики заболевания**

*ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» МЗ РБ*

Ключевые слова: ФКУ, непрямая пренатальная диагностика, микросателлитные повторы.

В семьях с ФКУ, в которых первичный дефект гена ФАГ не выявлен, непрямая пренатальная диагностика может проводиться путем определения генетического маркера, сцепленного с мутантным аллелем. Один из таких STR-маркеров расположен в третьем интроне гена и представляет собой полиморфную последовательность из тандемных четырехнуклеотидных повторов (TCTA)<sub>n</sub>. Исследование микросталлитных повторов проводили в семьях отягощенных ФКУ, не информативных для прямой пренатальной диагностики. Для изучения сцепления мутаций гена ФАГ с различными аллелями STR-маркера была сформирована группа, включающая больных ФКУ и их родителей. Определение аллелей выполняли с помощью полимеразной цепной реакции с последующим капиллярным электрофорезом продуктов амплификации.

На мутантных хромосомах выявлена более высокая частота аллелей 234 и 238 по сравнению с нормальными хромосомами, что обусловлено их сцеплением с мутациями R408W и R158Q, наиболее распространенными у белорусских пациентов.

По результатам исследования STR-маркера, в 45 отягощенных семьях с неизвестным первичным дефектом гена ФАГ, полная информативность для не прямой пренатальной диагностики была установлена в 30 из них (67%). В настоящее время исследование генотипа плода методом прямого мутационного анализа и не прямого анализа внутригенных и фланкирующих полиморфных последовательностей позволяет проводить пренатальную диагностику в 97% семей, отягощенных ФКУ.

### Введение

Фенилкетонурия (ФКУ) – аутосомно-рецессивное моногенное заболевание, обусловленное недостаточностью печеночной фенилаланингидроксилазы (ФАГ), ключевого фермента, контролирующего катаболизм L-фенилаланина. ФКУ вызывает развитие тяжелой умственной отсталости, так как продукты метаболизма фенилаланина оказывают токсическое воздействие на головной мозг. Психические нарушения у больного можно предотвратить при условии раннего перевода на специальную диету, не содержащую аминокислоту фенилаланин. Такая диета требует строгого соблюдения, что значительно снижает качество жизни ребенка, поэтому многие семьи при последующих беременностях обращаются для проведения пренатальной диагностики заболевания. Пренатальная диагностика проводится только молекулярно-

генетическими методами, так как ферментативный анализ невозможен.]6[из-за тканеспецифической экспрессии ФАГ в печени

Ген, кодирующий ФАГ человека, расположен на участке q22-24 12-ой хромосомы и имеет размер более 100 т.п.н. Он включает 13 экзонов и сложную 5'-нетранслируемую область, содержащую трансактивируемые регуляторные цис-элементы. В настоящее время в гене идентифицировано более 500 мутаций, которые имеют выраженную гетерогенность по частоте и спектру в различных.]10[популяциях мира

Мутация R408W является наиболее распространенной у белорусских пациентов с ФКУ (67%), другие диагностически значимые мутации имеют меньшие частоты (от 7.05% до 0.39%). Информативность прямой молекулярно-генетической диагностики. В тех семьях, где]1[составляет 76.7% для белорусских пациентов с ФКУ первичный дефект гена ФАГ не выявлен, может быть проведена непрямая пренатальная диагностика путем определения генетического маркера, сцепленного с мутантным аллелем.

К ДНК-маркерам относятся внутригенные и внегенные высокополиморфные участки ДНК, содержащие повторяющиеся последовательности. Короткие микросателлитные повторы –STR (Short Tandem Repeats) представляют собой один из вариантов таких последовательностей. Они равномерно распределены по всему геному и имеют стабильное менделевское наследование. Расположенные в некодирующих областях или нерекombинирующие с генами, обладающие высоким уровнем полиморфизма, STR локусы могут служить высокоинформативными маркерами для многих генов.

Эффективность маркера зависит от степени его полиморфизма. Чем большее количество аллелей он имеет, тем выше вероятность того, что парные хромосомы, несущие интересующий нас ген, у родителей пробанда будут иметь разные аллели. По наследованию одного из аллелей больным ребенком можно установить, какая из родительских хромосом содержит дефектный ген.

Один из STR-маркеров расположен в третьем интроне (на расстоянии 700 п.н. от 3'-конца третьего экзона) гена, кодирующего ФАГ. Анализ фрагмента ДНК, включающего данный полиморфный маркер, выявил в нем несколько участков, содержащих тандемно повторяющуюся последовательность (TCTA)<sub>n</sub>. Всего было.]8[идентифицировано девять аллелей, отличающихся по числу повторов Локализация внутри гена, высокая степень полиморфизма, а также достаточно простые и удобные методы анализа определили высокую эффективность применения ДНК-анализа данного STR-сайта для непрямой пренатальной диагностики в.]4[неинформативных и не полностью информативных семьях с ФКУ

Цель данной работы – идентифицировать аллели STR-маркера гена ФАГ и проанализировать их распределение в семьях пациентов с ФКУ для повышения уровня информативности пренатальной диагностики данной патологии.

## Материалы и методы

Исследуемую группу составили пациенты с ФКУ, выявленные по результатам неонатального биохимического скрининга и состоящие на учете в ГУ РНПЦ «Мать и дитя», а также их родители. Определение аллелей STR-маркера проводилось в отягощенных семьях, в которых одна или обе мутации гена ФАГ ранее не были установлены. Для исследования сцепления аллелей с определенными мутациями анализ STR-маркера проводился в семьях с установленным носительством мажорных мутаций гена ФАГ. В качестве биологического материала использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции и пятна крови, высушенные на специальных бланках. Прямое определение ТСТА повторов гена ФАГ выполняли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукты амплификации разделяли с использованием капиллярного электрофореза. Реакционная смесь для ПЦР с конечным объемом 20 мкл содержала 100 нг ДНК, 1хПЦР буфер, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, по 5 пМ праймеров и 0,75 единиц активности полимеразы. Для обеспечения флуоресценции образцов ДНК при тестировании в автоматическом анализаторе использовали вариант прямого праймера STR1 с меткой 6-FAM на 5' конце. Денатурацию ДНК проводили в течение 5 минут при 95°C. Затем выполнялось 25 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: денатурация 30 сек- при 95°C, отжиг - 22 сек при 56°C, синтез – 22 сек при 72°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживались 5 мин. при 72°C. Продукты ПЦР анализировали с помощью автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Из каждой реакции отбирали 0.7 мкл амплификата и смешивали с 0.6 мкл маркера молекулярного веса ROX 350 (Applied Biosystems) и 8,5 мкл деионизированного формамида. Электрофорез проводили при следующих параметрах: время инъекции образца в капилляр - 3 секунды, время разделения - 24 минуты, напряжение 7,5 кВ, длина детектора - 36 см. Для разделения использовали 4% раствор полимера POP-4™ (Applied Biosystems). Обработку данных и определение аллелей выполняли с помощью пакета компьютерной программы GENESCAN (Applied Biosystems).

## Результаты и обсуждение

Принципиально различают прямую и непрямую ДНК-диагностику моногенных наследственных болезней. В случае прямой диагностики объектом молекулярного анализа являются мутации в соответствующем гене, идентификация которых и составляет основную задачу исследования. Главное преимущество прямого подхода в диагностике ФКУ – это возможность судить о наличии или отсутствии соответствующей мутации по анализу ДНК одного индивидуума. Такой подход особенно важен для семей высокого риска, где уже есть больной ребенок.

Непрямой метод диагностики ФКУ основан на идентификации хромосомы с мутацией по аллелям одного или нескольких полиморфных маркеров, расположенных внутри гена ФАГ или вблизи него. Для проведения такого анализа необходимо обследовать родителей и больного ребенка, так как только таким способом можно определить, с каким маркерным аллелем каждого из родителей сцеплен мутантный ген. Главное преимущество непрямого метода – возможность пренатальной диагностики в семьях, в которых не удалось определить одну или обе мутации.

Микросателлитные повторы STR-маркера были изучены в 45 семьях с ФКУ не информативных для прямой пренатальной диагностики. Для установления сцепления аллелей с определенными мутациями была сформирована группа, включающая больных ФКУ и их родителей с установленным носительством мутаций R408W, R158Q, R261Q, IVS 10-11 g>a, IVS 12nt1 и R252W. Для определения гетерозиготности полиморфизма были использованы результаты ДНК-анализа родительских хромосом, не несущих мутацию в гене ФАГ, которые составили группу контроля. Всего распределение аллелей STR-маркеров исследовано в 138 нормальных хромосомах и 148 хромосомах с мутацией.

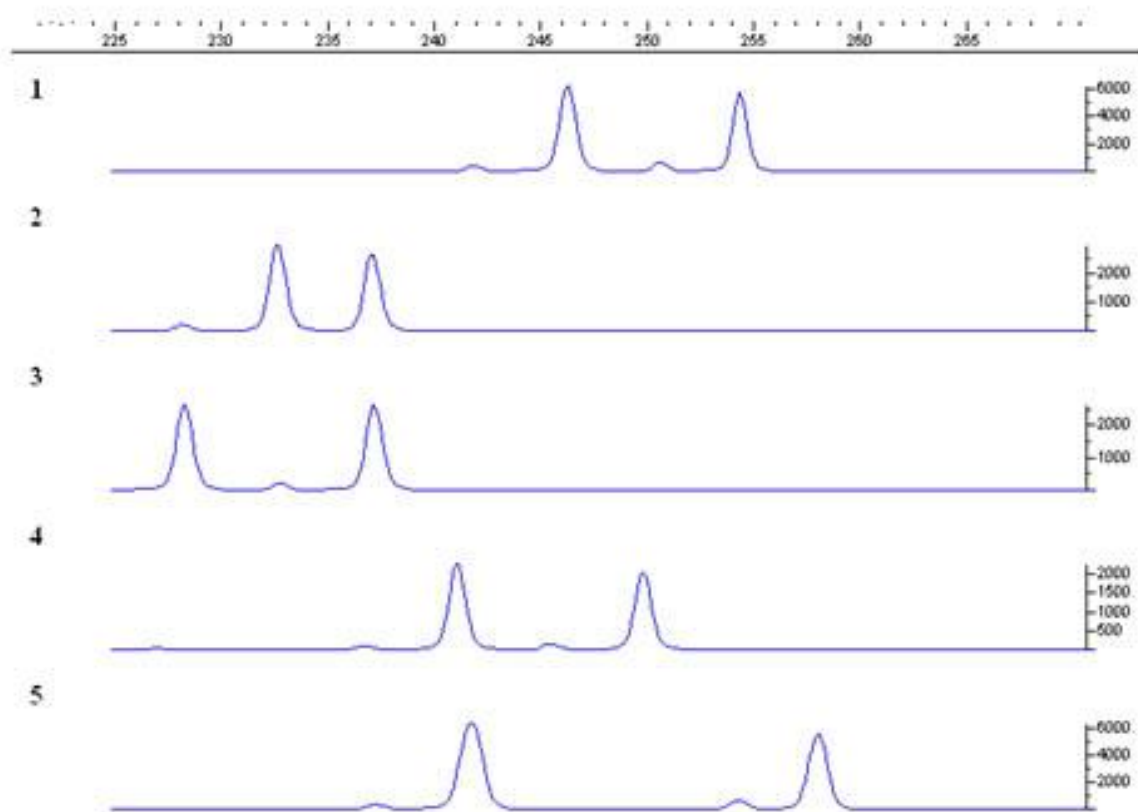


Рис. 1. Варианты аллелей гена ФАГ с различным числом ТСТА повторов, идентифицированные в ходе исследования. Дорожка 1 – аллели 246\254, дорожка 2 – аллели 234\238, дорожка 3 – аллели 226\238, дорожка 4 – аллели 242\250, дорожка 5 – аллели 242\258.

В исследованных группах выявлено 8 вариантов аллелей (рис.1) с длиной синтезированных фрагментов 226-254 п. н. В группе популяционного контроля

(на родительских хромосомах без мутации в гене ФАГ) наиболее распространенными были аллели размером 238 и 242 п.н., которые были выявлены на 31 (26.27%) и 38 (32,2%) хромосомах соответственно. Частота аллелей 246 и 234 составила 16.95% и 11.02%. Сходные результаты были получены в работах по исследованию российских популяций (Москвы и Западной Сибири) [3].

У пациентов с ФКУ было идентифицировано 7 различных аллелей; не было выявлено ни одного аллеля длиной 254 п.о. на хромосомах, несущих мутацию в гене ФАГ. На хромосомах с мутацией выявлена более высокая частота аллелей 234 и 238 и более низкая – аллеля 242 по сравнению с нормальными хромосомами (табл. 1).

Таблица 1. Частота аллелей STR гена ФАГ в группе пациентов и контрольной группе.

Аллели	Частота STR аллелей гена ФАГ, %							
	226	230	234	238	242	246	250	254
Хромосомы с мутацией	0.7	3.4	20.5	46.6	15.8	10.3	2.7	–
Хромосомы без мутации	1.7	6.8	11	26.3	32.2	16.9	3.4	1.7

Увеличение частоты аллеля 238 у больных с ФКУ обусловлено тем, что с ним ассоциировано 84% хромосом, несущих мутацию R408W, наиболее распространенную у больных ФКУ в Республике Беларусь (рис.2). Также на хромосомах с R408W были выявлены аллели 230 (на одной хромосоме), 234 (на двух хромосомах), 242 (на двух хромосомах) и 246 (на трех хромосомах). У белорусских пациентов все хромосомы с мутацией R408W, ассоциированы также с одним аллелем фланкирующего минисателлитного VNTR-маркера [2].

Гаплотип VNTR3/STR238 является типичным для хромосом R408W балто-славянского происхождения. Несколько случаев сцепления аллеля 234 с мутацией R408W и VNTR3 выявлено в польской популяции, а аллель 242 также был описан на единичных хромосомах в Польше, Латвии и Ирландии. [5,7,9]

Ассоциация мутации R408W с гаплотипами VNTR3/STR230 и VNTR3/STR246 показана впервые.

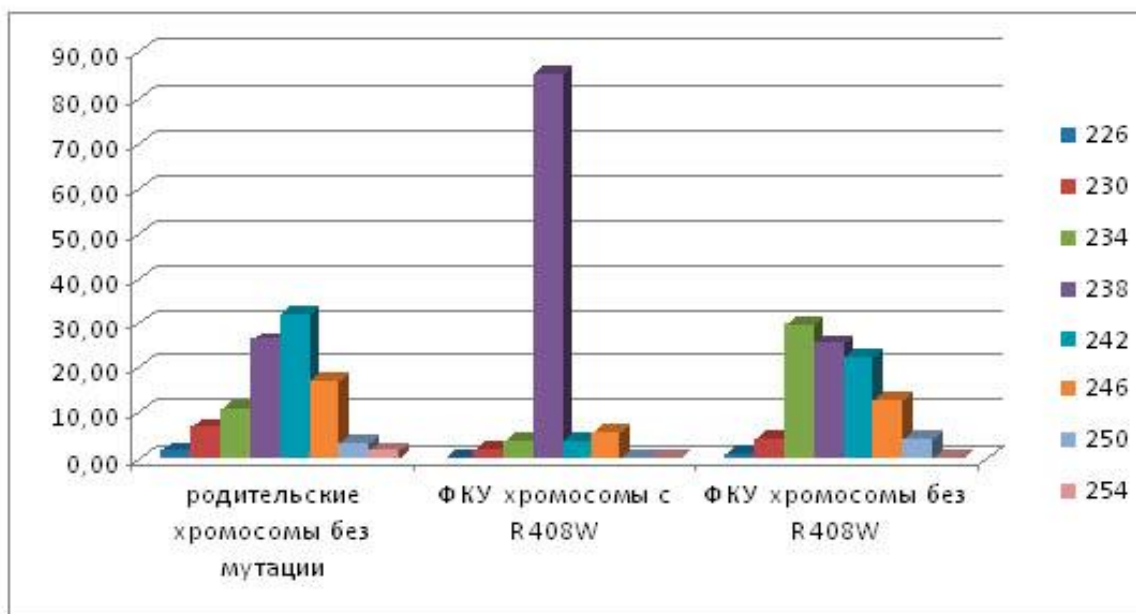


Рис.2 Частоты аллелей микросателлитного маркера STR гена ФАГ в нормальных хромосомах и хромосомах с мутацией.

Высокая частота аллеля 234 у пациентов с ФКУ обусловлена его преимущественным сцеплением с мутацией R158Q, которая является второй по частоте (около 7%) у белорусских пациентов [1]. С этим аллелем ассоциирована также и еще одна распространенная в Беларуси мутация R252W.

Результаты исследования сцепления аллелей STR-маркера с мутациями гена ФАГ показаны в таблице 2. Практически для всех проанализированных мутаций имеет место ассоциация с несколькими вариантами полиморфных повторов. При этом наблюдается преимущественное сцепление мутации с одним определенным аллелем, а частота других аллелей на хромосомах с данной мутацией значительно ниже. Вероятнее всего, причина в более высоком уровне изменчивости данного STR-маркера вследствие ошибок репликации в области высокополиморфных повторов, произошедших уже после возникновения мутации.

Хромосомы с неустановленными мутациями в нашем исследовании были ассоциированы с семью различными STR-маркерами (табл.2).

Таблица 2. Ассоциация аллелей STR-маркера с мутациями в гене ФАГ.

мутации	STR аллели						
	226	230	234	238	242	246	250
R.408W		1	2	46	2	3	
R.158Q			19	2	2	2	
R.261Q				5	1		
IVS12nt1				1	3		
IVS 10-11		1					1
g>a							
R.252W			4				
неустановле нные мутации	1	3	6	15	15	10	3
Всего	1	5	30	70	23	15	4

Гетерозиготность полиморфного маркера была рассчитана по формуле  $H=1-\sum q^2$ , где  $q$  – частота каждого аллеля, и составила 78% для популяции Беларуси.

Высокий показатель гетерозиготности свидетельствует о высокой информативности этой мультиаллельной системы для проведения непрямой пренатальной диагностики в семьях пациентов с ФКУ.

По результатам исследования STR-маркера, в 45 отягощенных семьях с неизвестным первичным дефектом гена ФАГ, полная информативность для непрямой пренатальной диагностики была установлена в 30 из них (67%).

В настоящее время исследование генотипа плода методом прямого мутационного анализа и непрямого анализа внутригенных и фланкирующих полиморфных последовательностей позволяет проводить пренатальную диагностику в 97% семей, отягощенных ФКУ. Разработана оптимальная стратегия обследования семей и проведения пренатального тестирования, которая используется в практической работе с применением всего спектра молекулярных методов анализа.

## Литература

1. Цукерман, Ю. В. Мутации гена ФАГ у белорусских пациентов с фенилкетонурией / Ю. В. Цукерман, К. А. Моссэ // Молекулярная и прикладная генетика. Сборник научных трудов. 2008. Т.7. С. 133–136.
2. Цукерман, Ю. В. Исследование тандемных полиморфных повторов гена ФАГ у пациентов с фенилкетонурией в Беларуси: материалы Междунар. науч. конф. / Ю. В. Цукерман, К. А. Моссэ // Генетика и биотехнология 21 века. Фундаментальные и прикладные аспекты. 2008. С. 333–335.
3. Одинокова, О. Н. Характеристика информативности STR-полиморфизма гена PAH для использования в идентификационных тест-системах / О. Н. Одинокова [и др.] // Сборник научных трудов к 20-летию Томского научного центра Сибирского отделения РАМН. 1999. Т. 127. Приложение № 1.
4. Goltsov, A. A. A single polymorphic STR system in human phenylalanine hydroxylase gene permits rapid prenatal diagnosis and carrier screening for phenylketonuria / A. A. Goltsov [et al.] // Hum Mol Genet. 1993. Vol. 2. P. 577–581.
5. Ekanowski, C. Association between Minihaplotypes and Mutations at the PAH Locus in Polish Hyperphenylalaninemic Patients / C. Ekanowski, M. Jurkowska, J. Bal // Hum Hered. 2001. Vol. 51, № 1–2.
6. Kohli. Prenatal diagnosis of phenylketonuria / Kohli [et al.] // Indian J Med Res. 2005. Vol. 122. P. 400–403.
7. Pronina, N. The Molecular Basis of Phenylketonuria in Latvia / N. Pronina [et al.] // Hum Mut. 2003. Mutation in Brief № 585.
8. Zschocke, J. The STR system in the human phenylalanine hydroxylase gene: True fragment length obtained with fluorescent labelled PCR primers / J. Zschocke [et al.] // Acta Paediatr Suppl. 1994. Vol. 407. P. 41–42.
9. Zschocke, J. Phenylketonuria Mutation Analysis in Northern Ireland: A Rapid Stepwise Approach / J. Zschocke [et al.] // Am J Hum Genet. 1995. Vol. 57. P. 1311–1317.
10. web site  
[http://data.mmch.mcgill.ca/pahdb\\_new/images/reported\\_pah\\_mutations/jpg](http://data.mmch.mcgill.ca/pahdb_new/images/reported_pah_mutations/jpg).