

**Анализ нуклеотидной последовательности 7 экзона гена
фенилаланингидроксилазы у пациентов с фенилкетонурией**

*ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» МЗ РБ,
Ул. Орловская 66, 220053, Минск, Беларусь*

Ключевые слова: фенилкетонурия, фенилаланингидроксилаза, мутации, секвенирование, полиморфизм

Фенилкетонурия (ФКУ) является одним из наиболее распространенных моногенных заболеваний в нашей стране: ее частота составляет 1: 6000 новорожденных. В основе заболевания лежит дефект гена, кодирующего фенилаланингидроксилазу (ФАГ) – ключевой фермент, контролирующий катаболизм L-фенилаланина. По данным Dworniczak (1992) более 80% мутаций гена ФАГ затрагивают экзоны с 5-го по 12-ый, а около 20% всех известных мутаций приходится на 7-ой экзон, который содержит «горячие точки мутагенеза» - CG динуклеотиды.

В данной статье приведены результаты исследования нуклеотидной последовательности 7-го экзона и прилегающих интронных участков гена ФАГ у пациентов с неустановленным ранее первичным генным дефектом, выполненного с целью дальнейшего изучения спектра мутаций и повышения эффективности молекулярно-генетической диагностики ФКУ в Беларуси.

В ходе проведения исследования в 7 экзоне гена ФАГ были идентифицированы 24 мутации у 19 пациентов. Всего в данном экзоне было выявлено семь различных мутаций (E280K, R252W, P281L, R243X), пять из которых – более чем на одной хромосоме.

В целом мутации 7-ого экзона гена ФАГ идентифицированы нами в 6% мутантных аллелей у пациентов с ФКУ в Беларуси. Секвенирование данного экзона позволяет выявлять наличие трех мутаций R252W, E280K и R261Q с частотой более 1%, а также более редких генных дефектов в ходе одного молекулярно-генетического исследования. Исходя из этого прямое определение последовательности 7-го экзона, на наш взгляд, является более эффективным, чем поиск нескольких мажорных мутаций с помощью ПДРФ-анализа.

Введение

Фенилкетонурия (ФКУ) является одним из наиболее распространенных моногенных заболеваний в нашей стране: ее частота составляет 1: 6000 новорожденных. В основе заболевания лежит дефект гена, кодирующего фенилаланингидроксилазу (ФАГ) – ключевой фермент, контролирующий катаболизм L-фенилаланина. У больных, не получающих своевременного адекватного лечения, развивается тяжелая форма олигофрении, так как продукты измененного метаболизма фенилаланина оказывают токсическое воздействие на головной мозг ребенка. Важность раннего выявления заболевания обусловлена тем, что эффективность лечения напрямую зависит от своевременного начала диетотерапии сразу после рождения.

Ген ФАГ расположен в районе 22-24 бэндов длинного плеча 12-ой хромосомы и имеет размер около 90 т.п.н. Кодированная последовательность представлена 13 экзонами, суммарная длина которых составляет 2448 п.о. Экзоны 6-13 расположены компактно на участке гена размером 20 т.п.н, в то время как 1-5]1[экзоны разделены большими интронами

Предполагают, что центральный участок полипептидной цепи фермента, кодируемый экзонами 4-11, включает различные домены необходимые для его нормального функционирования, в том числе для связывания кислорода и кофактора, а так же для каталитической конверсии субстрата. Так, домены, ответственные за связывание с

кофактором и с простетической группой и за конформационную стабильность белка, находятся в регионе, кодируемом 7-ым экзоном.

В настоящее время в гене ФАГ идентифицировано более 500 мутаций, включая миссенс (60%), нонсенс (6,0%) мутации, делеции (13%), мутации сплайсинга (13%) и нейтральные полиморфизмы. По данным Dworniczak (1992) более 80% мутаций гена ФАГ затрагивают 2[(7,0%) экзоны с 5-го по 12-ый, а около 20% всех известных мутаций приходится на 7-ой экзон, который содержит «горячие точки мутагенеза» - CG динуклеотиды.]3[

R.P. Eisensmith с соавторами, анализируя данные о частоте и спектре мутаций гена ФАГ в 10 европейских популяциях, выявил преобладание пяти мутаций R408W, R261Q, IVS10nt546, IVS12nt1 и R158Q. Частоты и спектр мутаций имеют значительные межпопуляционные различия, а происхождение четырех из них может быть связано с определенными этническими группами.]4[

Мутация R408W является наиболее распространенной в нашей стране и ее определение у пациентов с ФКУ проводится в Беларуси с 1992 года. Нами также было выполнено исследование частоты других диагностически значимых мутаций – R261Q, IVS10nt546, IVS12nt1 и . Анализ этих мутаций позволил увеличить процент идентифицированных]5[R158Q дефектных аллелей гена ФАГ у пациентов с ФКУ в Беларуси до 76.7%.

В данной статье приведены результаты исследования нуклеотидной последовательности 7-го экзона и прилегающих интронных участков гена ФАГ у пациентов с неустановленным ранее первичным генным дефектом, выполненного с целью дальнейшего изучения спектра мутаций и повышения эффективности молекулярно-генетической диагностики ФКУ в Беларуси.

Материалы и методы

Исследуемую группу составили пациенты с ФКУ, выявленные по результатам неонатального биохимического скрининга и состоящие на учете в РНПЦ «Мать и дитя», у которых одна или обе мутации не были идентифицированы в ходе стандартного молекулярно-генетического анализа.

Работа выполнена с использованием 81 образца ДНК от пациентов из неродственных семей. В качестве биологического материала использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Секвенирование проводили с использованием методов полимеразной цепной реакции и автоматического капиллярного электрофореза.

Для амплификации 7-го экзона реакционная смесь с конечным объемом 20 мкл содержала 100 нг геномной ДНК, 1xПЦР буфер, 1.5 mM MgCl₂, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, по 5 пМ олигопраймеров и 0,75 единиц активности термофильной ДНК-полимеразы. ПЦР выполняли при следующих температурно-временных условиях: начальная денатурация при 95°C -5 мин, затем 35 циклов амплификации: 94°C – 45 сек., 58°C – 45 сек., 72°C – 45 сек. На завершающей стадии синтеза пробы выдерживали 7 мин при 72°C.

Реакцию секвенирования выполняли с использованием набора реагентов BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Амплификационная смесь (20 мкл) для реакции содержала 4 мкл смеси для секвенирования, 2 мкл буфера, 2 пмоль обратного праймера, 4 мкл ПЦР-продукта. Секвенирующая реакция включала 25 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 10 сек. денатурации при 96°C, 5 сек. отжига при 50°C и 4 мин синтеза при 60°C.

Разделение синтезированных фрагментов проводили методом автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Анализ выполняли при следующих параметрах: время инъекции образца в капилляр 30 секунд, время разделения 25 минут, напряжение 11 кВ, длина капилляра 36 см. Для разделения использовали 4% раствор полимера POP-4™ (Applied Biosystems). Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Sequencing Analysis 5.1, в качестве референсной использовали последовательность гена ФАГ, размещенную на сайте <http://pahdb.mcgill.ca>.

Результаты и обсуждение

На сегодняшний день в РНПЦ «Мать и дитя» создана база данных, включающая информацию о 549 неродственных семьях с ФКУ, собраны образцы ДНК от 282 пробандов и их родственников. Наиболее распространенным генным дефектом, у пациентов с ФКУ в нашей стране, является мутация R408W, которая присутствует в 66% мутантных хромосом как в гетеро-, так и в гомозиготном состоянии. Другие диагностически значимые мутации имеют меньшие частоты (от 7.05% до 0.39%).]5[

Пациенты, у которых одна или обе генные мутации не были установлены после тестирования на диагностически значимые мутации, составили исследуемую группу. В нее были включены 64 пациента с одной, и 17 пациентов с двумя неизвестными мутациями. Всего было исследовано 98 хромосом с неустановленным генным дефектом.

В ходе проведения исследования в 7 экзоне гена ФАГ были идентифицированы 24 мутации у 21 пациента. У 3 компаунд гетерозигот было подтверждено наличие мутации R261Q. Всего в данном экзоне было выявлено семь различных мутаций, пять из которых – более чем на одной хромосоме (табл.1).

Таблица 1

Мутации 7 экзона гена фенилаланингидроксилазы у пациентов с фенилкетонурией.

Выявленная нуклеотидная замена	Мутация	Кол-во хромосом с мутацией	Частота мутации (%)	Генотипы (n)
c.838G>A	E280K	10	1.8	R408W\E280K (5), E280K\? (4), E280K\R252W (1)
c.754C>T	R252W	7	1.2	R252W\R252W (1), R408W\R252W (2), R252W\? (1), E280K\R252W (1), G272X\R252W (1)
c.842C>T	P281L	3	0.5	P281L\?, R408W\P281L (2)
c.727C>T	R243X	2	0.4	IVS12nt1\R243X, R408W\R243X
c.814G>T	G272X	1	0.2	G272X\R252W
c.721C>T	R241C	1	0.2	R408W\R241C
c.782G>A	R261Q*	9	1.6	R261Q\? (4), R408W\R261Q (4), R261Q\ IVS12nt1 (1)
Всего		33	5.9	

* Мутация была определена ранее методом ПДРФ-анализа.

Все обнаруженные нами мутации уже были ранее описаны и встречаются в ряде других европейских популяций.

Мутация E280K затрагивает птерин-связывающий домен и приводит к изменению электростатического потенциала активного сайта и снижению активности фермента до 1%. В нашем исследовании данная мутация была определена на 10 хромосомах в

гетерозиготном состоянии (1.8%). Мутация E280K в европейских популяциях имеет относительно высокую частоту, которая достигает 4% в Испании, 5% в Греции и 5,5% в Латвии [7]

Мутация R252W возникает в результате транзиции цитозина на тимин в 754 основании гена ФАГ и ведет к замене аргинина на триптофан в 252 аминокислоте белковой молекулы. Аргинин-252 образует солевой мостик с аспарагиновой кислотой-315 и водородную связь с карбонильным кислородом аланина-313, формируя устойчивую структуру каталитического домена. Любая замена аргинина на другую аминокислоту приводит к дестабилизации связей в каталитическом домене и снижению . В исследованной выборке мутация R252W была [8] активности фермента до 0,5% выявлена на 7 хромосомах, в 5 случаях в гетерозиготном состоянии и у одного пациента в гомозиготном состоянии. В целом частота встречаемости составила 1.2%. Данная мутация в европейских популяциях встречается с частотой 1-3%, высокая частота установлена только в северо-западной части Италии, где на ее долю [6] приходится 15% мутантных аллелей

Замена цитозина на тимин в 281 кодоне ФАГ является одной из наиболее частых мутаций Юго-Восточной Европы. Пролин в 281 положении необходим для поддержания конфигурации, при которой активный сайт находится около атома железа. Поэтому, замена на менее ригидный лейцин нарушает форму активного сайта путем снятия конформационных ограничений, налагаемых . С наибольшей частотой мутация R281L встречается в Хорватии (11%) и [8] пролином . В обследованной группе мутация была выявлена на трех [6] Греции (10%) хромосомах, во всех случаях наблюдалось гетерозиготное носительство. Частота мутации составила 0.6%.

Нонсенс мутация R243X обусловлена заменой цитозина на тимин в 727 основании гена, что приводит к синтезу укороченной полипептидной цепи фермента. Данная мутация была выявлена на двух хромосомах в гетерозиготном состоянии (0.4%). Мутация не была выявлена в соседних с Беларусью странах . В [9] Польше, Литве и Латвии, тогда как в Чехии ее частота достигает 3.4% других европейских странах частота не превышает 1-2%.

Мутации G272X и R241C были определены в нашей выборке на единичных хромосомах, их частота составила 0.2%. По данным литературы мутация G272X имеет скандинавское происхождение (ее [10] частота достигает 6% в Нидерландах и 16% в Норвегии)

В обследованной →группе также был выявлен полиморфизм V245V, который возникает за счет замены G A в третьем нуклеotide 245 кодона и не приводит к замене аминокислоты. Гомозиготное носительство полиморфизма было установлено у двух пациентов, гетерозиготное – у семнадцати. Полиморфизм был выявлен на 13% исследованных хромосом (21/162).

Мутация 7-го экзона R261Q определялась ранее с помощью анализа ПДРФ и была выявлена на 9 хромосомах, во всех случаях в гетерозиготном состоянии. У двух пациентов данная мутация находилась в компаунд гетерозиготе с неизвестной мутацией, и ее наличие в этих образцах было подтверждено при секвенировании. Мутация R261Q обусловлена заменой гуанина на аденин в 782 положении гена ФАГ, ведущей к замещению аргинина на глутамин в белковом продукте. Это приводит к нарушению водородных связей с аминокислотами Gln304 и Thr238, которые стабилизируют вторичную структуру активного сайта, и . Данная замена [11] препятствует правильному формированию димера/тетрамера обнаружена у пациентов с ФКУ практически из всех европейских стран. Самая высокая частота мутации R261Q зарегистрирована в Швейцарии (32%) и Франции (17%). Реже данная мутация встречается в Литве (0.5%), Латвии (2.1%), Чехии (1.9%) и . Частота R261Q

у пациентов с ФКУ в нашей стране]6, 7, 9[Польше (2.2%) сопоставима с таковыми в странах Восточной Европы и составляет 1.6%.

В целом мутации 7-го экзона гена ФАГ идентифицированы нами в 6% мутантных аллелей у пациентов с ФКУ в Беларуси. Секвенирование данного экзона позволяет выявлять наличие трех мутаций R252W, E280K и R261Q с частотой более 1%, а также более редких генных дефектов в ходе одного молекулярно-генетического исследования. Исходя из этого прямое определение последовательности 7-го экзона, на наш взгляд, является более эффективным, чем поиск нескольких мажорных мутаций с помощью ПДРФ-анализа. Целесообразным является включение данного теста в комплексную программу молекулярно-генетической диагностики ФКУ, а алгоритм идентификации мутаций гена ФАГ у пациентов с ФКУ может быть представлен следующим образом:

- 1) Тестирование наиболее частых мутаций гена ФАГ R408W и R158Q;
- 2) Если мутации в двух хромосомах не выявлены – анализ нуклеотидной последовательности 7-го экзона и фланкирующих интронных участков методом секвенирования;
- 3) При отсутствии мутаций 7-го экзона – определение интронных мутаций IVS10nt546, IVS12nt1.

Проведенное исследование показало, что нуклеотидные замены в 7-ом экзоне встречаются с высокой частотой среди больных с ФКУ в Беларуси. В исследованной выборке мутации в данном фрагменте были выявлены на 33 хромосомах. В 20 семьях это позволило повысить информативность прямой пренатальной диагностики до 100% и в 10 семьях идентифицировать одну из двух ранее не установленных мутаций. Использование ДНК-анализа нуклеотидной последовательности 7-го экзона гена ФАГ увеличивает процент выявления мутантных аллелей у больных ФКУ в Беларуси до 82% и существенно повышает эффективность молекулярно-генетической диагностики и профилактики заболевания.

Литература

1. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. DiLella A., Kwok S., Ledley F., Woo S. // *Biochemistry*. 1986. Vol. 25, № 4. P.743–748.
2. web site http://data.mmch.mcgill.ca/pahdb_new/images/reported_pah_mutations/jpg.
3. Analysis of exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene: a mutation hot spot / B. Dworniczak [et al.] // *Hum. Mut.* 1992. Vol. 1, № 2. P. 138–146.
4. Multiple origins for phenylketonuria in Europe / R. Eisensmith [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* 1992. Vol. 51, № 6. P. 1355–1365.
5. Цукерман, Ю. В. Мутации гена ФАГ у белорусских пациентов с фенилкетонурией / Ю. В. Цукерман, К. А. Моссэ // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. Минск: Право и экономика, 2008. Т. 7. С. 133–136.
6. Zschocke, J. Phenylketonuria Mutations in Europe / J. Zschocke // *Hum. mut.* 2003. Vol. 21, № 4. P. 345–356.
7. The molecular basis of phenylketonuria in Latvia / N. Pronina [et al.] // *Hum. mut.* 2003. Mutation in Brief № 585.
8. Structural Studies on phenylalanine hydroxylase and implications toward understanding and treating phenylketonuria / H. Erlandsen [et al.] // *Pediatrics*. 2003. Vol. 112. P. 1557–1565.
9. Mutation and haplotype analysis of phenylalanine hydroxylase alleles in classical PKU patients from the Czech Republic: identification of four novel mutations / L. Kozak [et al.] // *Med. Genet.* 1997. Vol. 34. P. 893–898.

10. The phenylketonuria G272X haplotype 7 mutation in European populations / J. Apold [et al.] // Hum. Genet. 1993. Vol. 92. P. 107–109.

11. Blaua, N. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency / N. Blaua, H. Erlandsen // Mol. Gen. and Met. 2004. Vol. 82. P. 101–111.

АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 7 ЭКЗОНА ГЕНА ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ

Ю.В. Цукерман, К.А. Мосса

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

Ул. Орловская 66, 220053, Минск, Беларусь