

## Молекулярно-генетичний аналіз мутацій та мінігаплотипів гена фенілаланінгідроксилази в Україні

М. В. Нечипоренко, С. А. Кравченко, Л. А. Лівшиць

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

*Наведено результати молекулярно-генетичного аналізу мутацій та мінігаплотипів гена фенілаланінгідроксилази серед хворих на фенілкетонурію, членів їхніх родин та здорових індивідів (усього 443 осіб). Показано, що частота мажорної мутації R408W складає 57,3 %. Ідентифіковано вісім алейних варіантів STR-поліморфізму та 24 варіанти STR/VNTR мінігаплотипів. Показано достовірну нерівновагу у зчепленні між мутацією R408W та алелем 238 п. н. STR-поліморфізму.*

Вступ. Ген фенілаланінгідроксилази (ФАГ) було картовано Ву та співавт. у 1984 році в хромосомній області 12q24.1 [1]. У 1986 році ті ж самі автори показали, що до складу гена входить 13 екзонів, а розмір його становить 90 тис. п. н [2].

Мутації гена ФАГ призводять до розвитку одного з найпоширеніших спадкових захворювань групи ензимопатій з аутосомно-рецесивним типом успадкування — фенілкетонурії (ФКУ) [3]. За даними Міжнародного Консорціуму з генетичного аналізу фенілкетонурії на 2000-й рік, виявлено більш ніж 400 мутацій гена ФАГ, більшість з яких відноситься до типу міссенс-мутацій (<http://www.mcgill.ca/pahdb> (for mutations)).

При вивченні інтронних послідовностей гена ФАГ ідентифіковано три види поліморфізмів. Першими було відкрито біалельні ПДРФ-поліморфізми (поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів), назва яких походить від назви відповідних рестриктаз: *BglII*, *PvuII(a)*, *PvuII(b)*, *EcoRI*, *MspI*, *XmnI*, *HindIII*, *EcoRV* [4]. У 1992 р. Гольцовим та співавт. у 3'-нетрансльованій ділянці гена ФАГ на відстані 3 тис. п. н. від останнього екзона знайдено мінісателітний VNTR-поліморфізм (variable number tandem repeat), повторювана послідовність якого має розмір 30 п. н. [5]. На сьогодні ідентифіковано сім алелей цього мінісателіту, які відрізняються

числом повторів. У 1993 році тим самим автором у 5'-ділянці гена ФАГ людини виявлено тандемно повторюваний мотив. Наступні рестрикційне картування та гібридаційний аналіз підтвердили існування мікросателітного STR-поліморфізму (short tandem repeat) та дозволили локалізувати його в 3-му інтроні гена ФАГ на відстані 700 п. н. від 3-го екзона [6]. Розмір повторюваної одиниці [TCTA] для цього мікросателітного поліморфізму становить 4 п. н., а кількість ідентифікованих на сьогодні алелей не перевищує дев'яти.

Комбінація восьми ПДРФ поліморфізмів передбачає існування великої кількості ПДРФ-гаплотипів ФАГ-локусу, а комбінація алелей STR- та VNTR-поліморфізмів являє собою «мінігаплотип» локусу ФАГ.

Дослідження частот і розподілення ПДРФ-гаплотипів та мінігаплотипів серед здорових і хворих на ФКУ осіб у багатьох популяціях показали стійку асоціацію більшості мутацій з певними гаплотипами [7—10].

Метою роботи склали дослідження частот та спектра мутацій гена ФАГ, вивчення алейних варіантів STR-поліморфізму та мінігаплотипів гена ФАГ у родинах з високим ризиком ФКУ, а також аналіз асоціації мутації R408W з STR-гаплотипами та мінігаплотипами.

Матеріали і методи. Зразки периферійної крові

із стандартним консервантом глюціциром хворих на ФКУ і членів їхніх родин було отримано з установ, де вони проходили клінічне обстеження та медико-генетичне консультування.

Олігонуклеотидні праймери для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) синтезовано в Інституті біоорганічної хімії РАН (Москва). В роботі використано ендонуклеази рестрикції виробництва фірм «Fermentas» (Литва) та «Boehringer Mannheim» (Німеччина), а також термостабільну Taq ДНК-полімераза виробництва фірми «Fermentas» за умов, рекомендованих виробниками ферментів.

Препарати ДНК виділяли із зразків свіжої крові та очищували за методом [11], а з крові з великим терміном давності та тканинних препаратів — за допомогою стандартного методу — гідролізом лізатів клітин протеїназою К з наступною фенольною екстракцією [12].

ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Perkin Elmer» («Cetus», США), а також на ампліфікаторах вітчизняного виробництва за методом [13]. Реакційні суміші об'ємом 15–25 мкл містили: 67 мМ трис-НСІ, рН 8,8, при температурі 25 °С; 16,7 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 6,7 мкМ ЕДТА; 2,5–4 мМ MgCl<sub>2</sub>; 170 мкг/мл бичачого сироваткового альбуміну; 10 мМ бета-меркаптоетанол; 400 мкМ dNTP кожного типу; 1 мкг ДНК; 0,5 од. активності термостабільної ДНК-полімерази; по 1·10<sup>-3</sup> опт. од. кожного з олігонуклеотидних праймерів. При проведенні ампліфікації STR-локусу гена ФАГ один з праймерів мітили флюоресцентною міткою Су5.

Мутації та алейні варіанти VNTR-локусу аналізували за методиками, описаними раніше [14].

Точний розмір продуктів ПЛР STR-поліморфізму визначали за допомогою автоматичного лазерного секвенатора «ALF express» виробництва «Pharmacia Biotech» (Швеція), при цьому аліквоту міченого продукту (об'єм 1 мкл) змішували з 3 мкл розчину для нанесення на гель. До складу розчину входили: формамід (95 %), декстран синій (5 мг/мл) і два внутрішні маркери визначеного розміру. Приготовлену суміш денатурували протягом 3 хв за температури 95 °С і різко охолоджували, після чого наносили на ALF-гель, який містив 8 %-й акриламід/бісакриламід, 0,6 × TBE та 7 М сечовину. Електрофорез проводили за таких умов: температура — 45 °С, напруга — 1000 В, сила струму — 50 мА, час — 90 хв. Після сканування ALF-гель обробляли за допомогою програми FM2.1 (Fragment Manager Software V2.1, «Pharmacia», Швеція). Для точного визначення розмірів алей використовували стандартні маркери попередньо визначеного розміру.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою пакету програми GENEPOP [15].

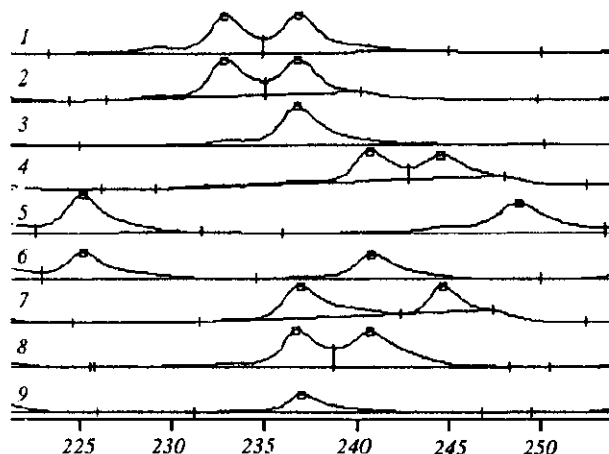
Результати і обговорення. Аналіз спектра та розповсюдженості мутацій гена ФАГ, а також дослідження алейного поліморфізму STR-локусу з 5'-ділянки гена ФАГ було проведено нами серед хворих на ФКУ та членів їхніх родин (284 особи).

Мутацію R408W виявлено на 110 хромосомах, що становить 57,3 %. Частота другої за розповсюдженістю мутації R158Q склала 3,6 %. Мутації Y414C, Ivs10nt546, Ivs12nt1 виявлено з частотами 1,04 % кожна. Мутації гена ФАГ ідентифіковано на 123 з 192 ФКУ хромосом (64 %). Вищезгадані мутації проаналізовано також у рамках програми генетичного тестування в групі з 162 осіб, у родин яких не було хворих на ФКУ. У двох осіб з цієї групи ідентифіковано мутації гена ФАГ (R408W, Y414C) у гетерозиготному стані, в обох випадках рекомендовано молекулярно-генетичне обстеження чоловіка.

Алейні варіанти STR-поліморфізму ідентифіковано на 164 «нормальних» та 146 мутантних хромосомах. Виявлені нами алейні мали розмір від 226 до 254 п. н., що відповідало восьми різним алейним варіантам (рисунок). Рівень гетерозиготності склав 74 %, що робить використання згаданого маркера високоінформативним для проведення пренатальної ДНК-діагностики ФКУ в родинах з високим ризиком цього захворювання.

Для вивчення асоціації мутації R408W з алейними варіантами STR-поліморфізму нами проведено внутрішньородинний аналіз типування STR-поліморфізму на мутантних хромосомах. У 54 випадках мутацію R408W виявлено на хромосомах з алейом 238 п. н., у трьох випадках — на хромосомі з алейом 246 п. н, та в поодиноких випадках — на хромосомах з алейами 234 та 242 п. н. Характер асоціації оцінювали за значенням тетракоричного критерію Пірсона [16]. Показано статистично вірогідну нерівновагу у зчепленні мутації R408W з алейом розміром 238 п. н. ( $r_A = 0,672$ ,  $\chi^2 = 45,6$ ). Існування інших алейних варіантів STR-локусу гена ФАГ на хромосомі з мутацією R408W є наслідком мутаційного процесу, частота якого для мікросателітних локусів відносно висока і становить  $(1-3) \cdot 10^{-3}$  [17].

Раніше нами здійснено молекулярно-генетичний аналіз VNTR-поліморфізму в групі хворих на ФКУ та донорів з різних регіонів України [14]. Комбінація STR- та VNTR-поліморфізмів дозволила проаналізувати мінігаплотипи гена ФАГ, які були ідентифіковані для 121 мутантної хромосоми та для 98 «нормальних» хромосом. У ході до-



Аналіз STR-поліморфізму гена ФАГ у трьох родинах високого ризику фенілкетонурії з використанням автоматичного лазерного секвенатора «A.L.F. express»: 1—3 — родина П. (1 — мати (234/238 п. н.), 2 — батько (234/238 н. н.), 3 — пробанд (238/238)); 4—6 — родина М. (4 — мати (242/246 п. н.), 5 — батько (226/250), 6 — пробанд (226/242)); 7—9 — родина К. (7 — мати (238/246), 8 — батько (238/242), 9 — пробанд (238/238))

сліджень виявлено 24 різних варіанти мінігаплотипів, причому вісім з них протиповані лише на «нормальних» хромосомах і не зустрічалися в послідовностях мутантного гена ФАГ (табл. 1, 2).

Досліджуючи генетичну диференціацію між «нормальними» та ФКУ хромосомами, ми порівняли рівні розподілу мінігаплотипів між цими двома групами. Показано статистично вірогідну різницю між розподілом варіантів мінігаплотипів у послідовностях «нормальних» та мутантних генів ФАГ ( $p < 0,001$ ).

Розподіливши ФКУ хромосоми на дві підгрупи — з мутацією R408W та з мутаціями, відмінними від R408W, ми встановили, що ця різниця створюється виключно за рахунок хромосом з мутацією R408W ( $p < 0,001$ ). Статистично вірогідних розбіжностей між розподілом мінігаплотипів у послідовностях «нормального» гена ФАГ та гена ФАГ з мутаціями, відмінними від R408W, не було виявлено ( $p = 0,115$ ). Це може свідчити, з одного боку, про відсутність селективних процесів у виникненні мутацій гена ФАГ, а з іншого, — вказувати на те, що в українській популяції мутація R408W має одноподібне походження і виникла саме на хромосомі з алелем 03 VNTR-поліморфізму та з алелем 238 п. н. STR-поліморфізму. Результати аналізу зчеплення мутації R408W у популяції населення України збігаються з даними, отриманими для

Таблиця 1  
Кількість хромосом з мутаціями гена ФАГ, асоційованих з різними мінігаплотипами гена ФАГ в Україні

STR	VNTR					Разом
	03	07	08	09	12	
234	7	1	2	—	—	10
238	65	5	6	—	1	77
242	12	1	4	1	—	18
246	9	—	1	—	—	10
250	—	2	1	3	—	6
Разом	93	9	14	4	1	121

Таблиця 2  
Кількість «нормальних» хромосом, асоційованих з різними мінігаплотипами гена ФАГ в Україні

STR	VNTR					Разом
	03	07	08	09	12	
226	—	—	1	—	—	1
230	—	—	3	1	1	5
234	7	—	7	2	—	16
238	17	—	9	4	1	31
242	12	4	5	2	1	23
246	3	2	5	2	1	12
250	1	—	2	5	—	8
254	1	—	—	—	—	1
Разом	41	6	32	16	3	98

інших популяцій із слов'янським населенням [10, 18, 19].

Для з'ясування внеску STR- та VNTR-поліморфізмів у створення різниці в розподілі мінігаплотипів на «нормальних» та ФКУ хромосомах ми здійснили аналіз окремо по кожному поліморфізму. Показано, що статистично вірогідна різниця ( $p < 0,0001$ ) має місце як для STR-, так і для VNTR-поліморфізму.

У представленій роботі вивчено зчеплення між VNTR- та STR-поліморфізмами гена ФАГ на «нормальних» хромосомах. Виявлено існування статистично вірогідного зчеплення ( $p = 0,029$ ), що пояснюється надлишком мінігаплотипу 03/238 по від-

ношенню до інших варіантів мінігаплотипу в популяції здорових індивідів. Це дозволяє припустити, що саме цей мінігаплотип є найстарішим, а існування всіх інших варіантів є наслідком мутаційних процесів, які розпочалися саме з цього мінігаплотипу.

*M. V. Nechyporenko, S. A. Kravchenko, L. A. Livshits*

Molecular genetics analysis of mutations and minihaplotypes of the phenylalanine hydroxylase gene in Ukraine

Summary

445 persons (including 93 PKU patients) diagnosed in Ukraine neonatal screening program, 190 members of their families and 162 persons without PKU history in their families were examined for five mutations: R408W, R158Q, Y414C, 1vs10nt546, 1vs12nt1. The most common mutation observed in the Ukrainian population is R408W (57,3 %). The allelic variations of the STR-polymorphism were analysed. 9 allelic variants of the STR-polymorphism and 24 STR/VNTR minihaplotypes were identified. The lack of equilibrium in the linkage between the mutation R408W and STR-allele 238 bp was found.

*M. B. Нечипоренко, С. А. Кравченко, Л. А. Лившиц*

Молекулярно-генетический анализ мутаций и миниаплотипов гена фенилаланингидроксилазы в Украине

Резюме

Приведены результаты молекулярно-генетического анализа мутаций и миниаплотипов гена фенилаланингидроксилазы среди больных фенилкетонурией, членов их семей и здоровых индивидов (всего 445 человек). Установлено, что частота мажорной мутации R408W составляет 57,3 %. Идентифицированы восемь аллельных вариантов STR-полиморфизма и 24 варианта STR/VNTR миниаплотипов. Показано достоверное неравновесие по сцеплению между мутацией R408W и аллелем 238 п. н. STR-полиморфизма.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lidsky A. S., Robson K., Chandra T., Thirumalachary C., Barker P., Ruddle F., Woo S. L. C. The PKU locus in man is on chromosome 12 // Amer. J. Hum. Genet.—1984.—36.—P. 527—533.
2. DiLella A. G., Kwok S. C. M., Ledley F. D., Marvit G., Woo S. L. C. Molecular structure and polymorphic map of the human // Biochemistry.—1986.—25.—P. 743—749.
3. McKusick V. A., Francomano C. A., Antonarakis S. E., Pearson P. L. Mendelian inheritance in man: A catalogs of human genes and genetic disorders / 11th ed.—Baltimore: The Johns Hopkins Univ. press, 1994.
4. Lidsky A. S., Law M. L., Morse L. G., Koa F.-T., Rabin M., Ruddle F., Woo S. L. C. Regional mapping of phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria lokus in the human genome // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82.—P. 6221—6225.
5. Goltsov A. A., Eisensmith R. C., Koneski D. S., Woo S. L. C. Associations between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene // Amer. J. Hum. Genet.—1992.—51.—P. 627—636.

6. Goltsov A. A., Eisensmith R. C., Naughten R. C., Woo S. L. C. A single polymorphic STR system in the human phenylalanine hydroxylase gene permit rapid prenatal diagnosis and carrier screening for phenylketonuria // Hum. Mol. Genet.—1993.—2.—P. 577—581.
7. Daiger S. P., Lidsky A. S., Chakraborty R., Woo S. L. C. Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase locus in prenatal diagnosis of phenylketonuria // Lancet.—1986.—1.—P. 229—232.
8. Zschoche J., Graham C., Carson D. J., Nevin N. C. Phenylketonuria mutation analysis in Northern Ireland: rapid and stepwise approach // Amer. J. Hum. Genet.—1995.—N 57.—P. 1311—1317.
9. Kidd J. R., Pakstis A. J., Zhou H., Okonofua F. E., Odunsi A., Grigorenko E., Tamir B. B., Friedlaender J., Schulz L. O., Parnas J., Kidd K. K. Haplotype and linkage disequilibrium at the phenylalanine hydroxylase locus, PAH, in a global representation of populations // Amer. J. Hum. Genet.—2000.—N 66.—P. 1882—1899.
10. Zekanovski C., Jurkovska M., Bal J. Association between minihaplotypes and mutations at the PAH locus in Polish hyperphenylalaminemia population // Hum. Hered.—2001.—51, N 1—2.—P. 117—120.
11. Wehnert M., Herrmann F. H., Metzke H., Thiele H., Vogel G., Kuhnert W., Ebener U., Wulff K. Erste ergebnisse bei der genomischen carrier diagnostik in Risikosippen mit haemophilie A und B in der DDR // Z. gesamte inn. Med.—1988.—43, N 16.—S. 441—444.
12. Маниатис Т., Фрич Е. Е., Сэмбрук Ж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1985.—420 с.
13. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science.—1988.—239, N 5850.—P. 487—491.
14. Нечипоренко М. В., Кравченко С. А., Лившиц Л. А. Анализ мутаций и VNTR-полиморфизма гена фенилаланингидроксилазы // Укр. биохим. журн.—2001.—73, № 2.—С. 63—67.
15. Raymond M., Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism // J. Hered.—1986.—86.—P. 248—249.
16. Лакин Б. И. Биометрия.—М.: Высш. школа, 1980.—291 с.
17. Kayser M., Roewer L., Hedman M., Henke L., Henke J., Brauer S., Kruger C., Krawczak M., Nagy M., Dobosz T., Szibor R., de Knijff P., Stoneking M., Sajantila A. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y Chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs // Amer. J. Hum. Genet.—2000.—66.—P. 1580—1584.
18. Eisensmith R. N., Ocano Y., Dasovich T., Wang T., Guttler F., Lou H., Guldborg P., Lichter-Konecki U., Konecki D. S., Svensson E. Multiple origins for phenylketonuria in Europe // Amer. J. Hum. Genet.—1992.—51.—P. 1355—1365.
19. Kozaki L., Blazkova M., Kuhrova V., Pijackova A., Ruzickova S., S'ashna S. Mutation and haplotype analysis of phenylalanine hydroxylase alleles in classical PKU patients from the Czech Republic: identification of four novel mutations // J. Med. Genet.—1997.—34.—P. 893—898.

УДК 577.352  
Надійшла до редакції 30.10.2000