

БАТУРИНА О.А., ТУПИКИН А.Е., БОНДАРЬ А.А., МОРОЗОВ И.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 8, e-mail: Olga.Baturina@niboch.nsc.ru

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПЕКТРА МУТАЦИЙ ГЕНА ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗЫ В НОВОСИБИРСКОЙ И КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТЯХ

Фенилкетонурия (ФКУ) – наследственное заболевание, в основе которого лежит аномалия аминокислотного обмена вследствие отсутствия или существенного уменьшения активности фермента фенилаланингидроксилазы, что приводит к нарушению превращения фенилаланина в тирозин [1]. Фенилкетонурия проявляется главным образом выраженной олигофренией (идиотией или имбецильностью). Лечение сводится главным образом к специальной диете (резкое ограничение продуктов, содержащих фенилаланин), с целью предотвращения накопления токсических продуктов в организме больного, приводящее к хронической интоксикации организма и поражению ЦНС с выраженным снижением интеллекта.

Материалы и методы

В группу исследования входили 104 ребенка в возрасте до пяти лет с диагнозом фенилкетонурия, выявленные в ходе неонатального скрининга в 2005–2012 гг.

Геномную ДНК выделяли из ядросодержащих клеток периферической крови пациентов обработкой протеиназой К с последующим осаждением пептидов в присутствии NaCl [5]. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили амплификацию 13 фрагментов ДНК, содержащих экзоны и участки интронов гена ФАГ. ПЦР проводили в 40 мкл, в буфере, содержащем 65 мМ Трис-НСl (рН 8,9), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 1,5 мМ MgCl₂, 0,01 % Tween-20, 10 мМ меркаптоэтанол, 0,1 мкМ dNTP, 0,2 мкМ олигонуклеотидных праймеров, 50-100 нг геномной ДНК, 2 ед. Таq-полимеразы (ИХБФМ, Новосибирск, Россия), в следующих условиях: начальная денатурация 3 мин при 95°C, далее в

Результаты и обсуждение

Частота встречаемости ФКУ в Западной Сибири превышает среднемировые значения (1:10000) [6] для данного заболевания и составляет 1:7000 новорожденных [7]. В исследуемой выборке было идентифицировано 32 типа мутаций гена ФАГ, ассоциированных с ФКУ (табл.).

Этнически-ассоциированные миграции сегодня оказывают значительное влияние на социально-экономическую, демографическую и эт-

Спектр мутаций гена ФАГ, ассоциированных с ФКУ, насчитывает более 500 типов мутаций [2]. Различные популяции мира имеют выраженную генетическую гетерогенность по частоте и характеру мутаций гена ФАГ [3, 4].

Целью данной работы является изучение частоты и спектра мутаций в гене ФАГ среди больных ФКУ, проживающих на территории Новосибирской и Кемеровской областей. Исследование распределения аллелей в этих популяциях представляет интерес не только для характеристики генетической структуры и истории популяций, но и позволяет выявлять гетерозиготных носителей заболевания и осуществлять эффективную перинатальную диагностику ФКУ

течение 32 циклов: денатурация – 1 мин при 94°C; отжиг праймеров – 1 мин при 58°C; элонгация – 2 мин при 72°C. Секвенирование проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 300-500 фмоль продукта ПЦР, 10 пмоль праймера и 1 мкл реактива BigDye. Температурный профиль реакции секвенирования был следующим: 1 цикл - 96°C – 1 мин.; 38 циклов – 98 °C – 10 сек., 50 °C – 5 сек., 60 °C – 4 мин. Очистку от не включившихся флуоресцентно меченных дидезоксинуклеотидтрифосфатов проводили, при помощи колонок Centri-Sep (Princeton Separations, США) по протоколу производителя. Анализ продуктов реакции проводили на автоматическом анализаторе ДНК ABI3130xl (Applied Biosystems, США) Центра коллективного пользования «Геномика» (ИХБФМ СО РАН).

ническую ситуацию практически во всех странах. Немцы, живущие в России и покинувшие Германию почти два с половиной века назад, находились в состоянии практически непрерывных миграций, не случайно по отношению к ним существует устойчивое определение «Volk auf dem Weg» – «народ в пути» и следует также учесть то обстоятельство, что большая их часть проживает в Сибирском регионе. Наличие в ис-

следуемой выборке, распространенных мутаций, вызывающих ФКУ в европейских популяциях есть следствие миграционных процессов [8]. Известно, что в европейских популяциях преобладают пять мутаций: R408W, R261Q, IVS10-11G>A, R158Q и IVS12+1G>A [9]. Исторически впервые была выявлена мутация сайта сплайсинга IVS12+1G>A, наиболее распространенная в Дании (более трети частоты от общего числа

аллелей ФАГ) [10]. Мутация IVS10-11G>A наиболее распространена в популяциях Южной Европы [11]. На долю R408W в популяциях Восточной Европы приходится до 80% и более от общего числа аллелей [12]. Мутация R261Q чаще встречается в Швейцарии (32 % аллелей) [13]. Мутация R158Q интересна тем, что имеет независимое происхождение в разных популяциях Западной Европы [13].

Таблица. Спектр и частота встречаемости мутаций в гене ФАГ

Локализация	Мутация	Число и частота аллелей	
		Новосибирская обл.	Кемеровская обл.
Экзон 1	S16>XfsX1	1 (0.7 %)	-
Интрон 1	IVS1+5G>T	1(0.7 %)	-
Экзон 2	L48S	2 (1.3 %)	1 (1.4 %)-
Интрон 2	IVS2+1delG	1 (0.7 %)	-
Интрон 2	IVS2+5G>A	1 (0.7 %)	-
Интрон 2	IVS2-13T>G	1 (0.7 %)	-
Экзон 3	R68S	-	1 (1.4 %)
Интрон 4	IVS4+5G>T	3 (2.1 %)	1 (1.4 %)
Экзон 5	R155H	-	2 (2.9 %)
Экзон 5	R158Q	7 (5 %)	2 (2.9 %)
Экзон 5	Y168H	-	1 (1.4 %)
Экзон 6	E221 D222>Efs	-	1 (1.4 %)
Экзон 6	D222>STOP	1 (0.7 %)	-
Экзон 7	R243Q	-	2 (2.9 %)
Экзон 7	R243X	1 (0.7 %)	1 (1.4 %)
Экзон 7	R252W	-	1 (1.4 %)
Экзон 7	R261Q	12 (8.5 %)	2 (2.9 %)
Экзон 7	R261X	2 (1.3 %)	-
Экзон 7	E280K	1 (0.7 %)	-
Экзон 7	P281L	4 (2.85 %)	2 (2.9 %)
Экзон 10	A342T	-	1 (1.4 %)
Интрон10	IVS10-11G>A	3 (2.1 %)	3 (4.2 %)
Экзон 11	Y386C	-	2 (2.9 %)
Экзон 11	E390G	1 (0.7 %)	-
Интрон 11	IVS11+1G>C	-	1 (1.4 %)
Экзон 12	A403V	1 (0.7 %)	-
Экзон 12	P407L	1 (0.7 %)	-
Экзон 12	R408Q	1 (0.7 %)	-
Экзон 12	R408W	86 (61.3 %)	39 (55.7 %)
Экзон 12	Y414C	2 (1.3 %)	3 (4.2 %)
Интрон 12	IVS12+1G>A	3 (2.1 %)	1 (1.4 %)-
-	X	4 (2.85 %)	3 (4.2 %)

Примечание. X- мутация не обнаружена.

Проведенный сравнительный анализ распределения частоты мутаций между исследуемыми регионами и центральными областями РФ не показал достоверных различий (рис.). Можно лишь отметить, незначительное увеличение значений частоты для двух мутаций, а именно: R158Q и R261Q и мутация I65T не была обнаружена. Частота встречаемости мутации R408W в исследуемой выборке сопоставима с частотой в регионах РФ, и в целом соответствует частоте

данной мутации в европейской популяции [14]. Частота этой мутации среди больных ФКУ Новосибирской области составила 61.3 %, Кемеровской – 55.7%. Анализ полученных данных показал, что целесообразным является поиск не только наиболее распространенной мутации R408W или наиболее частых мутаций (R261Q, IVS10-11G>A, R158Q и IVS12+1G>A), но и выявление всех мутаций, ассоциированных с ФКУ I типа.

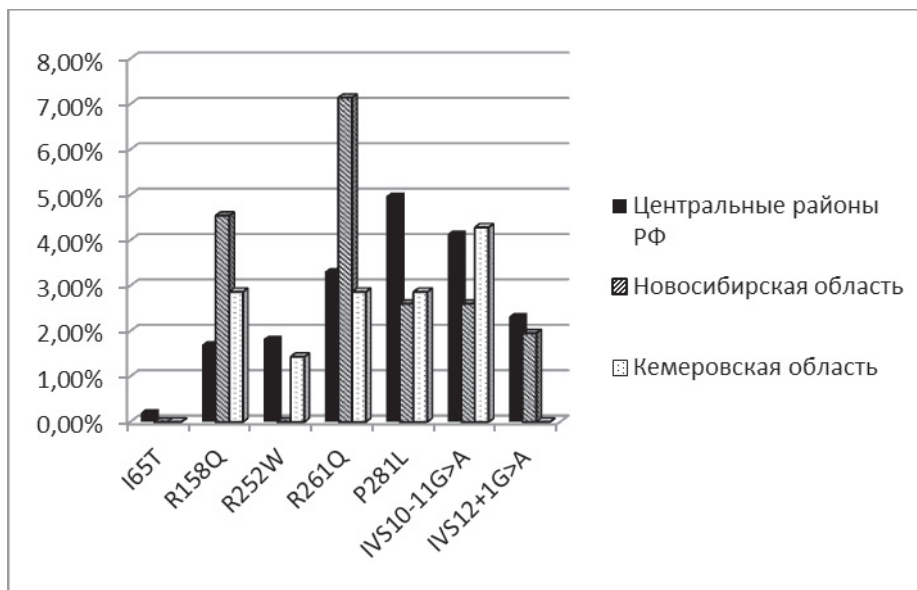


Рис. Распределение наиболее распространенных мутаций по регионам

В популяции Новосибирской области, помимо описанных выше мутаций нами выявлены редко встречающиеся мутации гена ФАГ. Мутация сайта сплайсинга IVS4+5G>T, возникающая на границе 4 экзона и 4 интрона гена ФАГ, вызывает сдвиг рамки считывания белка, начиная с 5 экзона гена ФАГ. Мутация IVS2+5G>A, возникающая на границе 2 и 3 экзона, изменяя сайт сплайсинга, нарушает вырезание интронов из первичного транскрипта мРНК, так что вырезается либо часть третьего экзона, либо весь экзон. Впервые данная мутация была описана в Германии [15]. Еще одна мутация сайта сплайсинга IVS2-13T>G, возникающая на границе 2 и 3 эк-

зона, обнаружена в сочетании с миссенс мутацией R408W. Мутация сайта сплайсинга IVS1+5G>T, возникающая в результате замены G на T в основании 60, в первом интроне гена ФАГ была отмечена в Дании [16]. В ходе данной работы были выявлены 3 делеции: делеция первого экзона S16>XfsX1, делеция второго экзона IVS2+1delG, делеция 6 экзона D222>STOP. Частота встречаемости составляет – 0.7 %.

Миссенс мутации: L48S, R243Q, R261X, Y414C, R243X, E280K, E390G, A403V, P407L, R408Q были обнаружены в 2, 7, 10, 12 экзоне, частота встречаемости перечисленных мутаций не превышает 2 % (табл.).

Спектр мутации, выявленный у пациентов Кемеровской области, представлен не так разнообразно. Мутация сайта сплайсинга IVS11+1G>C расположена на границе 11 экзона и 11 интрона гена фенилаланингидроксилазы. Впервые упоминается в 1995 году при описании больного из Индии. В обследуемой группе па-

циентов данная мутация была обнаружена у больного из Кемеровской области, в гетерозиготном состоянии в сочетании с мутацией сайта сплайсинга IVS10-11G>A. Делеция E221_D222>Efs 6 экзона встретилась один раз в гетерозиготном состоянии у пациента из Кемеровской области. Делеция двух пар оснований

(AG), затрагивающая 221 и 222 кодоны, приводит к сдвигу рамки считывания белка. Эта мутация описана в единичных случаях в Германии, Дании [16, 17]. Кроме того были обнаружены миссенс мутации: R68S, R155H, Y168H, R243Q, R243X, A342T, Y386C, Y414C в 3, 5, 7, 10, 11, 12 экзонах. Частота встречаемости не превышает 2–3 % (табл.). Возможные причины формирования наблюдаемого на территории Новосибирской области разнообразного спектра мутаций, ассоциированных с ФКУ, обусловлены особенностями миграционных процессов, в ходе которых формировалось современное население области. Так, в период с начала 1990-х годов Новосибирск в период сильного экономического кризиса стал крупным перераспределительным центром, куда был направлен миграционный приток русскоязычного населения из Казахстана и Средней Азии. Новосибирская область расположена на юге Западной Сибири, на оси Транссибирской железнодорожной магистрали, и входит в наиболее освоенную и заселенную зону Азиатской части России. Природные условия области благоприятны для проживания и ведения сельского хозяйства по сравнению с остальной обширной территорией Сибири и Дальнего Востока. Миграционный поток населения из Казахстана и республик Средней Азии в Новосибирскую область был наиболее массовым и продолжительным [18]. Приведенные данные объясняют наибольшее количество разнообразных мутаций, выявленных у пациентов медико-

генетической консультации г. Новосибирска.

Современная Кемеровская область – один из самых индустриальных регионов нашей страны. Высокий уровень загрязнения окружающей среды, отсутствие новых рабочих мест, слабо развитая социальная инфраструктурой делает этот регион менее привлекательным для миграционных потоков. До 2003 г. миграционный прирост был ниже среднего по стране и даже отрицательным. В последующие годы, когда экономика Кузбасса начала расти быстрее, увеличился и миграционный прирост [18]. Спектр мутаций, выявленный при исследовании пациентов Кемеровской области, не отличается таким большим разнообразием как в Новосибирской. В данной выборке наряду с характерными для Европы мутациями ФАГ мы обнаружили мутации, типичные для Юго-Восточной Азии и Турции мутации – R261Q и R243Q.

Таким образом, сравнительный анализ распределения частоты мутаций между исследуемыми регионами и центральным областям РФ не показал достоверных различий между исследуемыми регионами и центральным областям России. Мутация R408W в исследуемой выборке является преобладающей, ее частота встречаемости соответствует частоте данной мутации в европейской популяции. Спектр мутаций, выявленный при исследовании пациентов Новосибирской области, отличается большим разнообразием, чем среди больных Кемеровской области.

Литература

1. Guldberg P, Rey F, Zschocke J. et al. A European Multicenter Study of Phenylalanine Hydroxylase Deficiency: Classification of 105 Mutations and a General System for Genotype-Based Prediction of Metabolic Phenotype // *Am. J. Hum. Genet.* – 1998. – Vol. 63. – P. 71–79.
2. Scriver Ch. R. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift // *Hum. Mut.* – 2007. – Vol. 28, № 9. – P. 831-845.
3. Okano Y., Eisenmith R.C., Guttler F. et al. Molecular basic of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria // *N. Engl. J. Med.* – 1991. – Vol. 324. – P. 1232–1238.
4. Eisensmith R.C., Okano Y., Dasovich M. Multiple origins for phenylketonuria in Europe // *Am. J. Hum. Genet.* – 1992. – Vol. 51. – P. 1355–1365.
5. Смагулова Ф.О., Бреннер Е.В., Котова Л.Ю. и др. Идентификация мутаций гена фенилгидроксилазы с использованием автоматического секвенатора ДНК // *Генетика.* – 2004. Т. 40. – С. 1–5.
6. Steinfeld, R., Kohlschutter, A., Ullrich, K. et al. Efficiency of long-term tetrahydrobiopterin monotherapy in phenylketonuria // *J. Inher. Metab.* – 2004. – Dis. 27. – P. 449–45.
7. Смагулова Ф., Масленников А., Морозов И. и др. Мутации в структуре экзона 7 гена фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией Новосибирской области // *Генетика человека.* – 2000. – Т. 36. – С. 849–852.
8. Смирнова Т.Б. Миграции и динамика численности немецкого населения Западной Сибири в конце XIX–начале XXI в. // *Известия Алтайского государственного университета.* – 2007. –Т.4. – С. 174–181.
9. Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe // *Hum. Mut.* – 2003. – Vol. 21. – P. 345–356.
10. DiLella A. G., Kwok S.C.M., Ledley F.D. et al. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene // *Biochemistry.* – 1986. – Vol. 25 – P. 743–749.
11. Perez B., Desviat L.R., Ugarte M. Analysis of Phenylalanine Hydroxylase gene in the Spanish population: Muta-

- tion profile and Association with Intragenic polymorphic markers. // *Am. J. Hum. Genet.* – 1997. – Vol. 60. – P. 95–102.
12. Eisensmith R.C., Woo S.L.C. Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemias: Mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. // *Hum. Mut.* – 1992. – Vol. 1. – P. 13–21.
 13. Eisensmith R.C., Okano Y., Dasovich M. et al. Multiple origins for phenylketonuria in Europe // *Am. J. Hum. Genet.* – 1992. – Vol. 51 – P. 1355–1365.
 14. Степанова А.А., Тверская С.М., Зинченко Р.А. и др. Молекулярно-генетическое исследование гена фенилаланингидроксилазы в группе российских больных фенилкетонурией // *Медицинская генетика.* – 2006. – Т. 44. – С. 32–44.
 15. Guldborg P, Mallmann R, Henriksen KF, et al. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency in a Population in Germany: Mutational Profile and nine Novel Mutations // *Hum. Mut.* – 1996. – Vol. 8. – P. 276–279.
 16. Guldborg P., Henriksen K.F., Guttler F. Guttler F. Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99 % of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis // *Genomics.* – 1993. – Vol. 17 – P. 141–46.
 17. Zschocke J., Hoffman G.F. Phenylketonuria mutations in Germany // *Hum. Genet.* – 1999 – Vol. 104 – P. 390–398.
 18. Андреев Е.М., Алексеев А.И., Зубаревич Н.В. Россия регионов: в каком социальном пространстве мы живем? // *Независимый институт социальной политики.* М.: Поматур. – 2005 – 17–27.

BATURINA O.A., TUPIKIN A.E., BONDAR A.A., MOROZOV I.V.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Science Russia, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Av., 8, e-mail: Olga.Baturina@niboch.nsc.ru

A COMPARATIVE ANALYSIS OF GENE MUTATIONS PHENYLALANINE HYDROXYLASE (PAH) IN NOVOSIBIRSK AND KEMEROVO REGIONS

Aims. The study summarizes the diversity of PKU-associated mutations of phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in PKU patients from Kemerovo and Novosibirsk region. **Methods.** To reveal the PAH gene mutations, the researchers applied amplification of DNA fragments covering gene exons with subsequent sequencing of the amplification products. **Results.** The study has revealed both well-known mutations (R158Q, R252W, R261Q, P281L, IVS10–11G>A, R408W, IVS12+1G>A) and some rare (IVS2+5G>A, R155H, Y168H, W187R, E221_D222>Efs, A342T, Y386C, and IVS11+1G>C). **Conclusions.** We show here that mixed ethnic populations demonstrate a wider PKU allele diversity in comparison with Central Russia. **Key words:** phenylketonuria; PAH, mutation.

ГЕНИК–БЕРЕЗОВСЬКА С.О.

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»

Україна, 79000, Львів, МСП-169, вул. Лусенка, 31а, e-mail: berezovska.s@gmail.com

ОЦІНКА РИЗИКУ ВИНИКНЕННЯ ПРИРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ СЕРЕД НОВОНАРОДЖЕНИХ ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ ЗА ПЕРІОД 2002–2012 РОКІВ

У більшості розвинутих країн в структурі дитячої захворюваності та смертності на перше місце виходять природжені вади розвитку (ПВР) та спадкова патологія. Це велика група захворювань, яка відрізняється за клінічними ознаками, структурою та генетичним прогнозом. Патологічні стани, в яких однією із складових є генетична компонента, можуть мати різний ступінь важкості та виникати в будь-якому віці. Але ті з них, які присутні у дітей з неонатального періоду, особливо згубні для здоров'я, оскільки можуть призвести до ранньої смерті або інвалідності. Крім того, лікування хворих з природженою патологією тривале і складне, необхідна медико–педагогічна корекція дефектів та соціальна

допомога дітям–інвалідам, що вимагає значних економічних затрат. По прогностичних оцінках до 2015 року частка здорових новонароджених зменшиться до 15–20 %, а частка новонароджених із вродженими та спадковими захворюваннями – збільшиться до 20–25 % [1]. Разом з тим, в статистичних даних, які наводяться американськими дослідниками, в структурі головних причин смерті вроджені вади займають перше місце, хоча і вказується, що майже половина померлих дітей з ВВР були недоношеними [2, 3]. Майже кожна третя мертвонароджена дитина також має цю патологію. Аналіз структури захворювань, які призводять до дитячої інвалідності, зумовленої вродженими вадами розвитку