

*Различные типы ФКУ и
методы их молекулярной
диагностики.*



Фенилкетонурия – частое врожденное нарушение

метаболизма аминокислот, в основе которого лежит

дефицит печеночного фермента

фенилаланингидроксилазы, осуществляющего

превращение фенилаланина.

Основным клиническим симптомом фенилкетонурии,

без своевременного начатого лечения, является задержка

психо-речевого и физического развития и, как следствие,

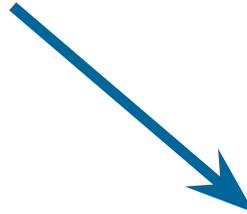
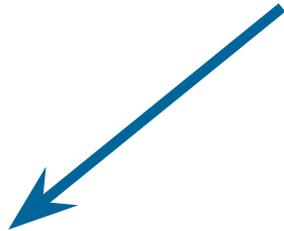
слабоумие, ведущее к тяжелой психической

инвалидности.

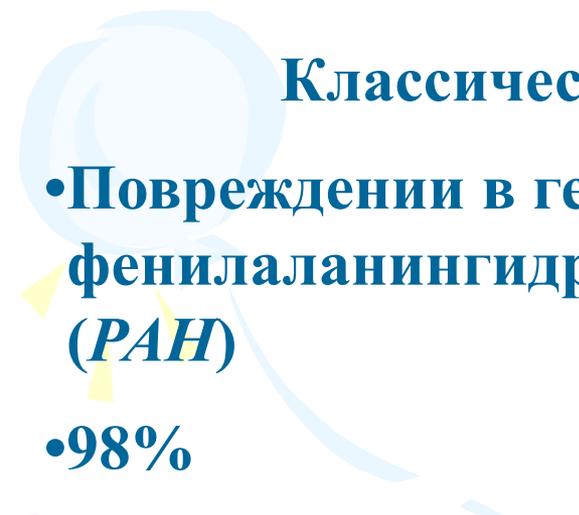
Распространенность ФКУ в различных популяциях мира, по данным массового скрининга

Популяция	Частота носителей	Частота заболевания	Авторы
Турция	1:26	1:2600	Ozalp et al., 1986
Ирландия	1:33	1:4500	DiLella et al., 1986
Восточная Европа	1:50	1:10 000	Scriver & Kaufman, 2001
Япония	1:200	1:143 000	Aoki & Wada, 1988
Финляндия	1:225	1:200 000	Scriver & Kaufman, 2001

ФЕНИЛКЕТОНУРИЯ



Классическая



- Повреждения в гене фенилаланингидроксилазы (*PAH*)

• 98%

Атипичная

- Повреждения в генах синтеза и обмена тетрагидробиоптерина (*BH4*) (*PTS, QDPR* и др.)

• 2%



Phenylalanine hydroxylase (PAH) mutation map

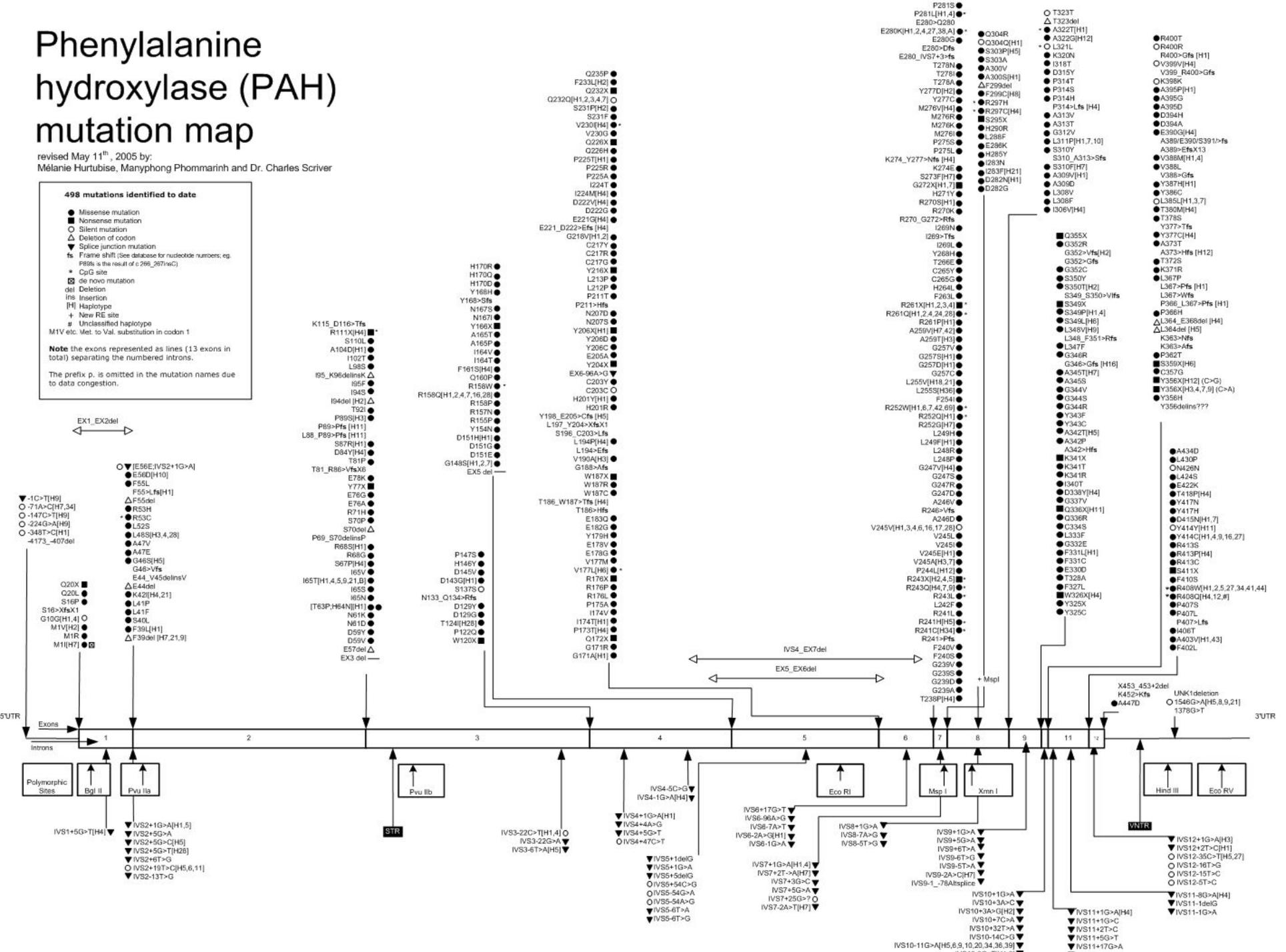
revised May 11th, 2005 by:
Mélanie Hurtubise, Manyong Phommarinh and Dr. Charles Scriver

498 mutations identified to date

- Missense mutation
 - Nonsense mutation
 - Silent mutation
 - △ Deletion of codon
 - ▽ Splice junction mutation
 - fs Frame shift; (See database for nucleotide numbers; eg. P61fs is the result of c.296_297insC)
 - * CpG site
 - ☒ de novo mutation
 - del Deletion
 - ins Insertion
 - [H] Haplotype
 - + New RE site
 - # Unclassified haplotype
- M1V etc. Met. to Val. substitution in codon 1

Note the exons represented as lines (13 exons in total) separating the numbered introns.

The prefix p. is omitted in the mutation names due to data congestion.



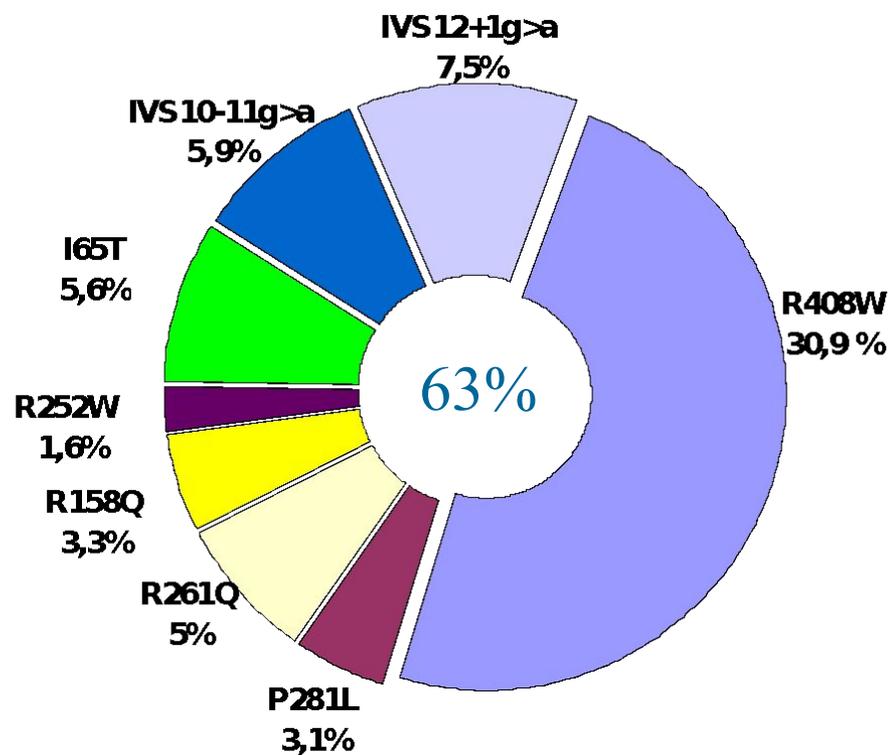
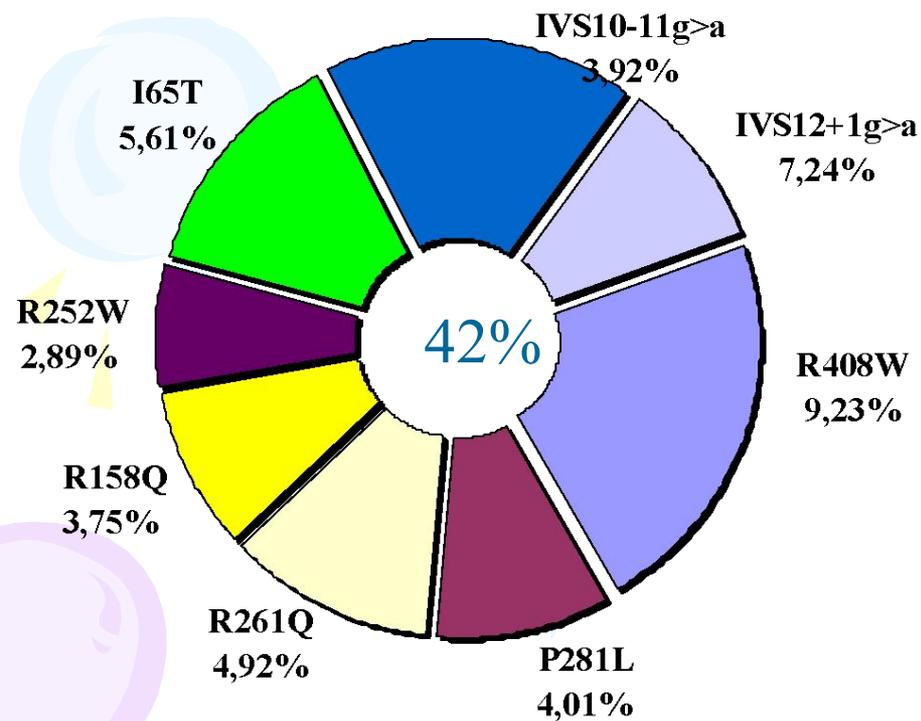
Частота встречаемости наиболее частых мутаций среди больных

в мире

(<http://data.mch.mcgill.ca/pahdb>)

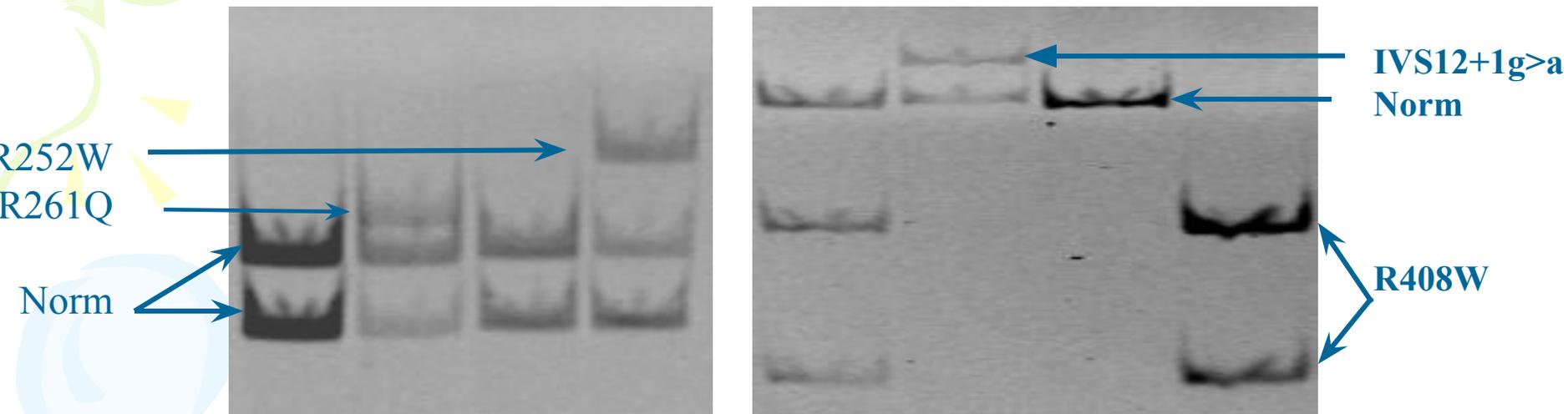
в Европейских

популяциях (Zschocke J., 2003)

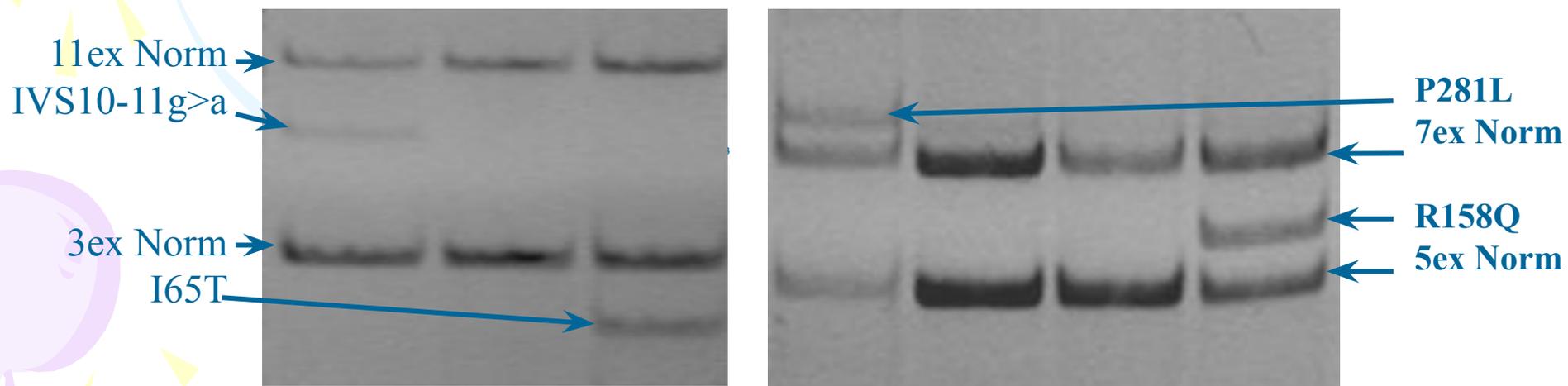


Система регистрации наиболее частых мутаций

А) одна пара праймеров и две эндонуклеазы рестрикции



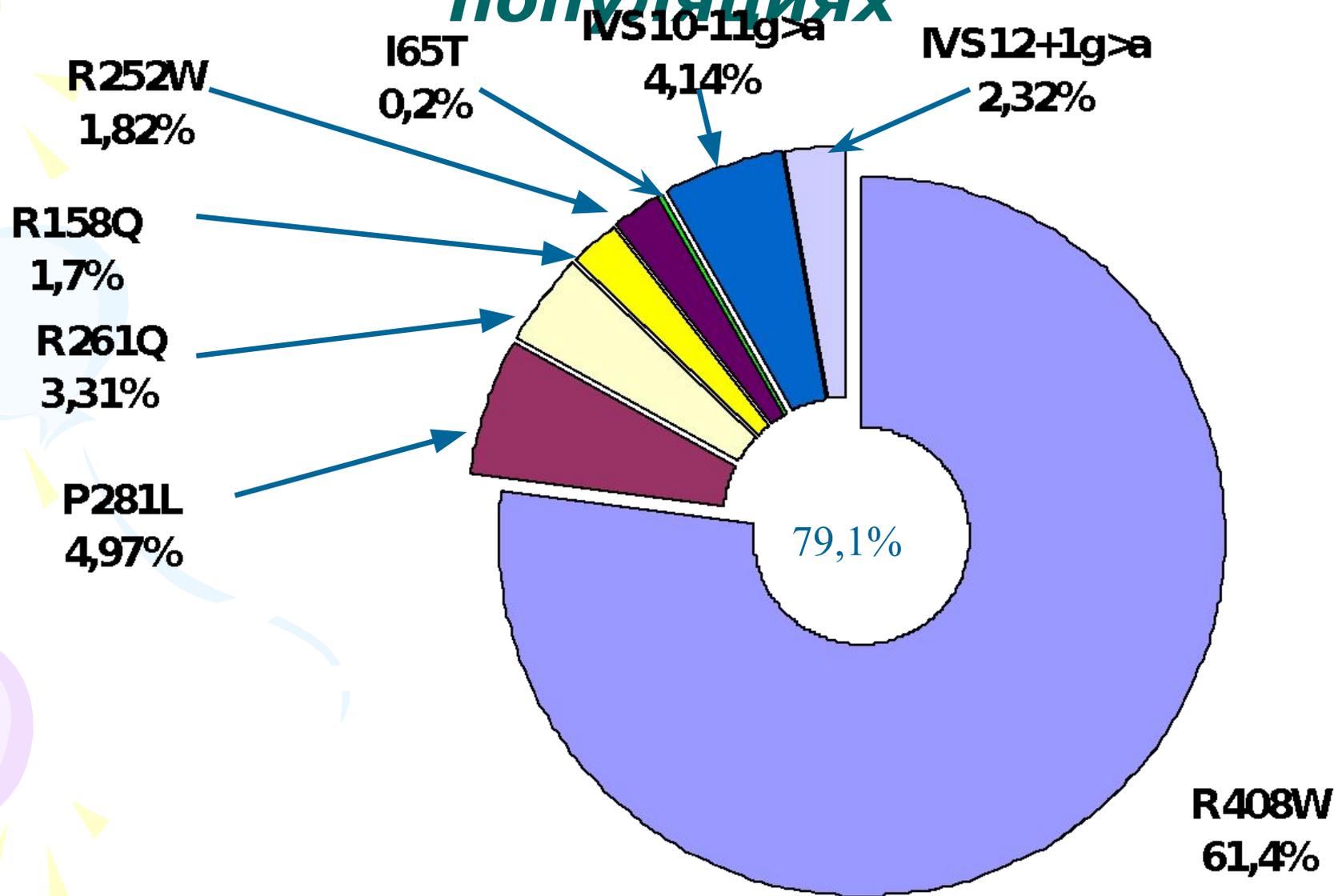
Б) две пары праймеров и одна эндонуклеаза рестрикции



Структура выборки (N=302)

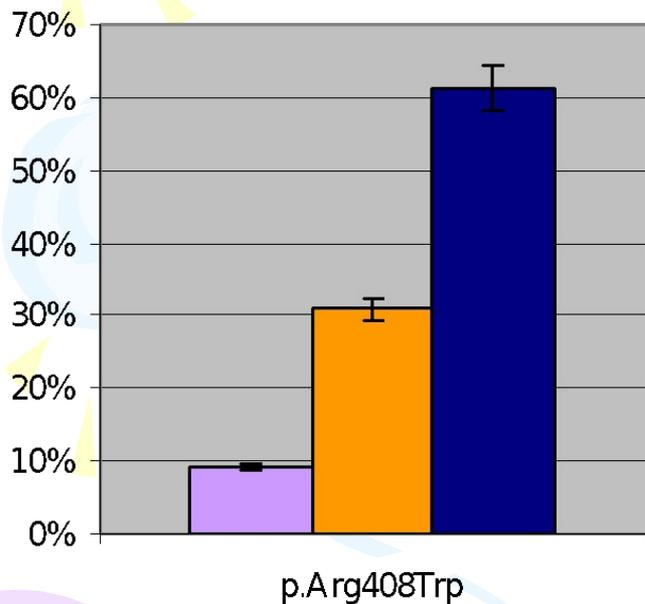
• Воронежская область	• 46 человек
• Свердловская область	• 33 человека
• Самарская область	• 23 человека
• Курская область	• 23 человека
• Вологодская область	• 20 человек
• Архангельская область	• 24 человека
• Удмуртия	• 28 человек
• Московская область	• 47 человек
• Пациенты научно-консультативного отделения ГУ МГНЦ РАМН	• 58 человек

Частота встречаемости наиболее частых мутаций в Российских популяциях



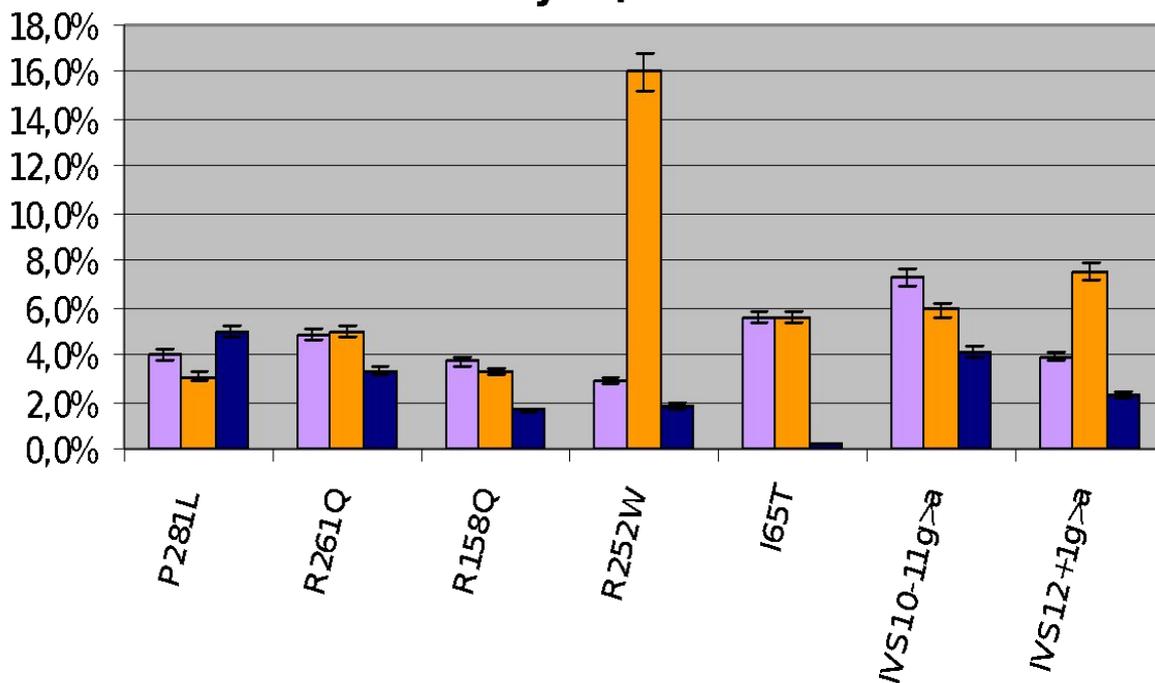
Частота распространения наиболее частых мутаций в мире, в Европейских популяциях и в исследуемых российских популяциях больных ФКУ

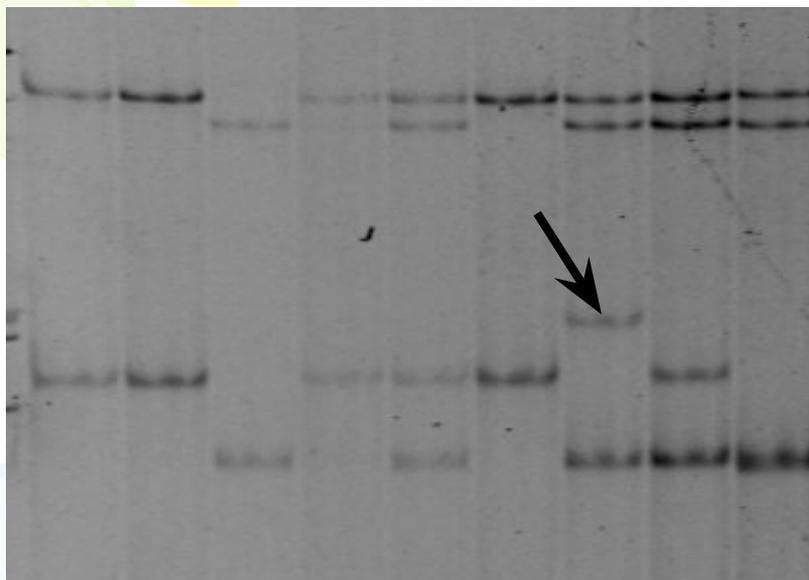
Частота распространения мутации R408W (p.Arg408Trp)



- Мировые данные
- Европейские популяции
- Исследуемые популяции

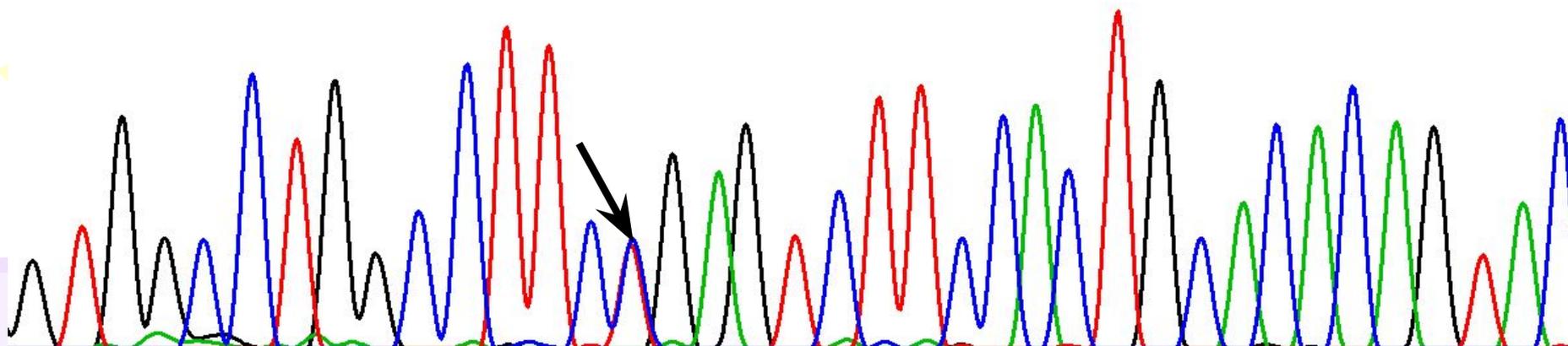
Частота распространения 7 наиболее частых мутаций





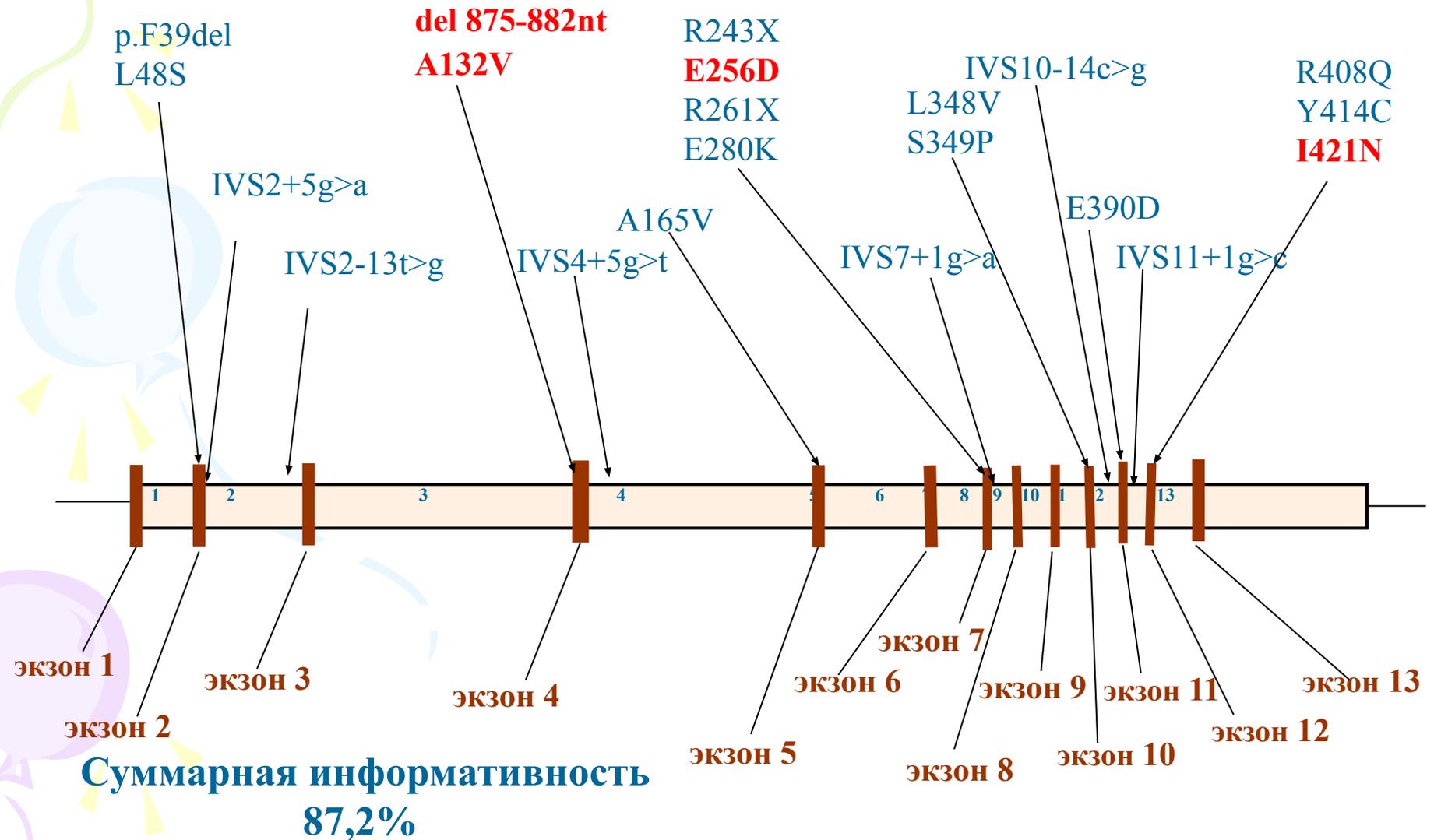
SSCP-анализ экзона 7 гена *PAH*
 Стрелкой обозначено изменение
 электрофоретической
 подвижности соответствующее
 мутации R261X.

G T G G C C T G G C C T T C Y G A G T C T T C C A C T G C A C A C A G T A C

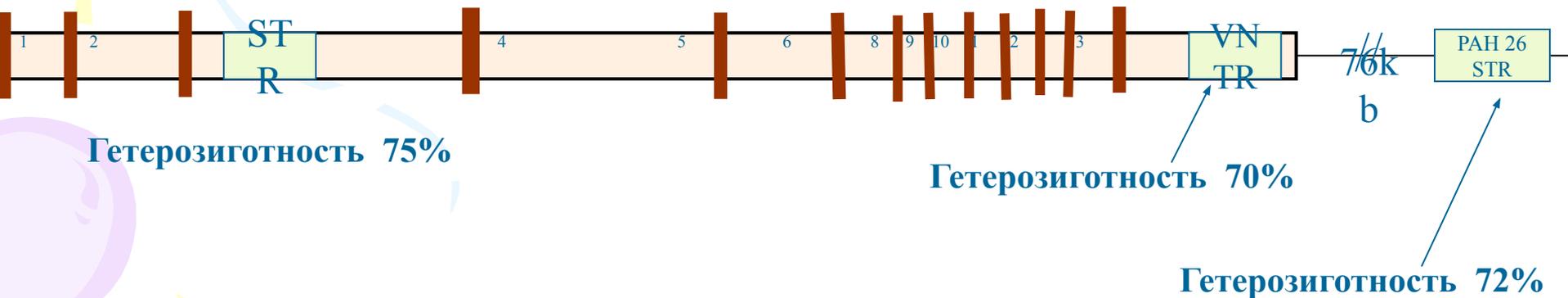
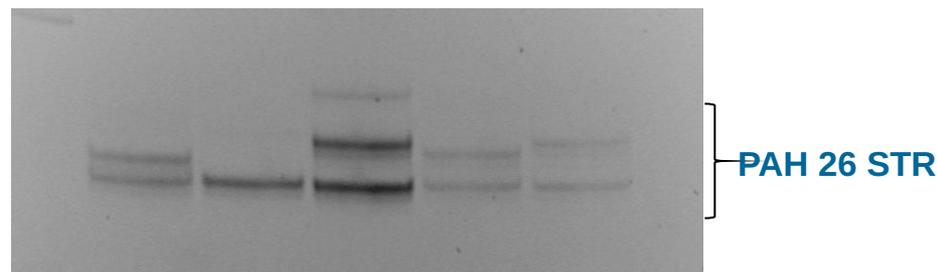
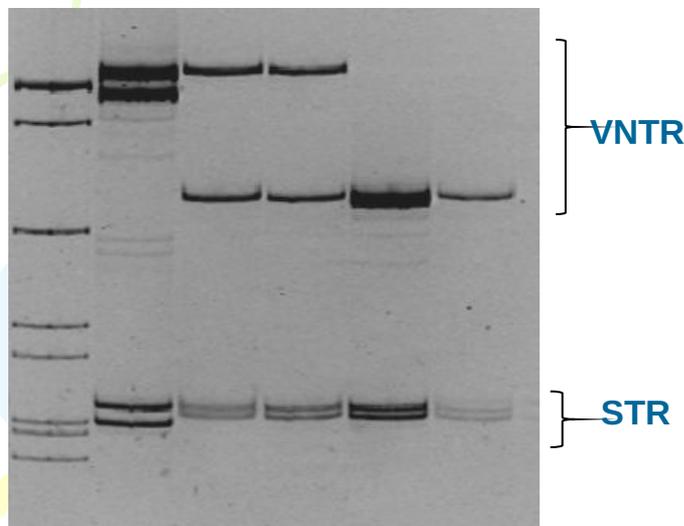


Фрагмент сиквенса экзона 7 гена *PAH*, образца ДНК больного ФКУ из Воронежской области. Замена G на T в 781 основании гена *PAH* приводящая к преждевременному стоп кодону в 261 кодоне (Arg261Stop). Стрелкой обозначена мутация R261X.

Структура гена РАН и локализация обнаруженных мутаций в гене РАН



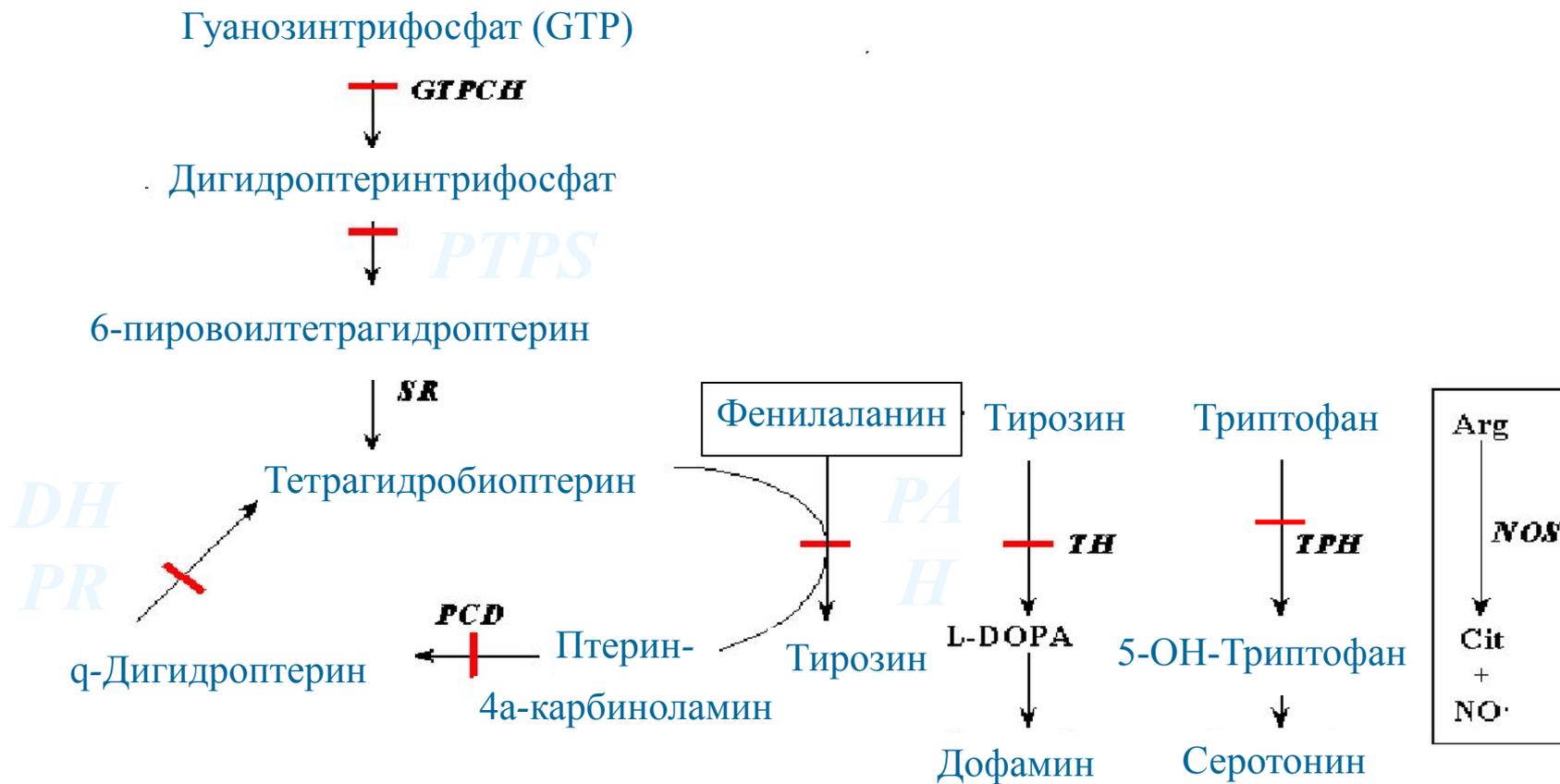
Полиморфные маркеры внутри и непосредственной близости от гена PAH

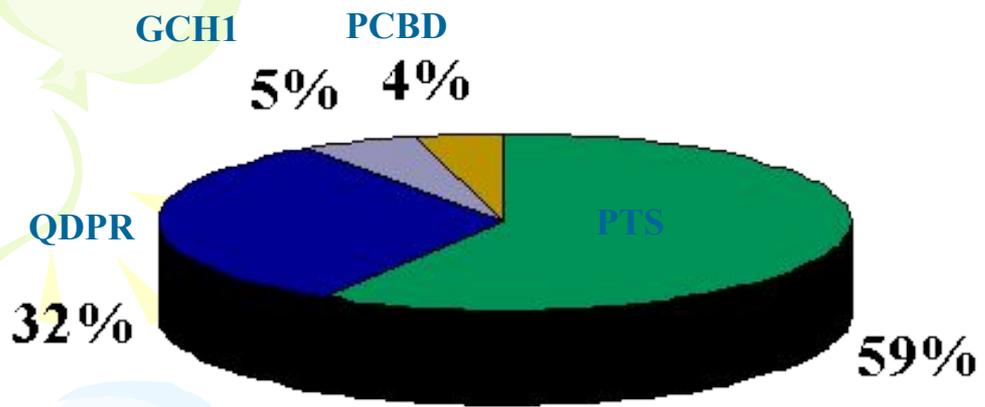


Исследование в гене *РАН*

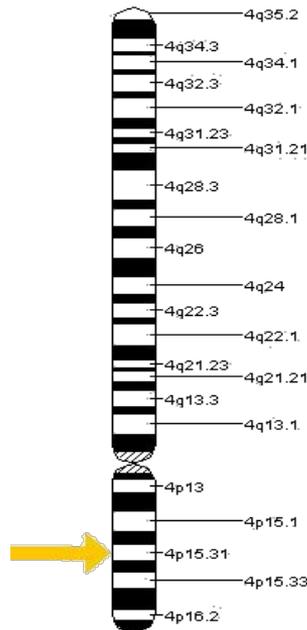
	Количество человек
Обнаружены обе мутации в гене <i>РАН</i>	233
Обнаружены одна мутация в гене <i>РАН</i>	58
Мутаций в гене <i>РАН</i> не обнаружены	11

Синтез и метаболизм тетрагидробиоптерина

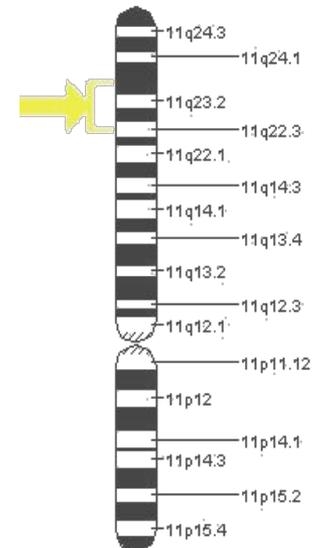




Ген *QDPR* локалізований на хромосомі 4 в районі p15.3

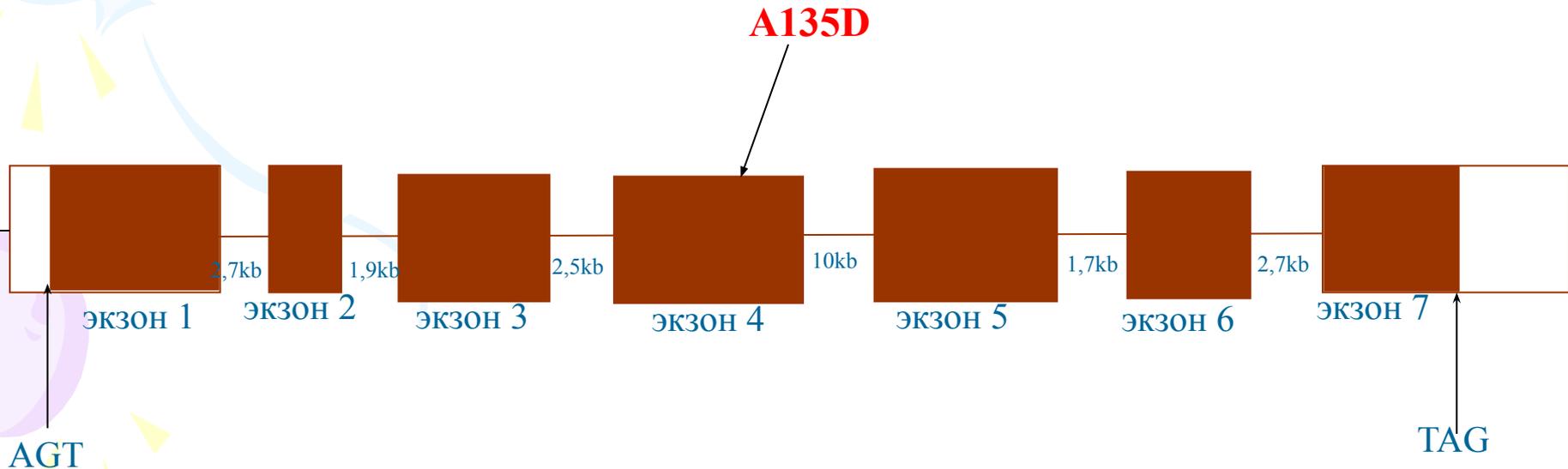


Ген *PTS* розташований на хромосомі 11 в районі q22.3-23.3

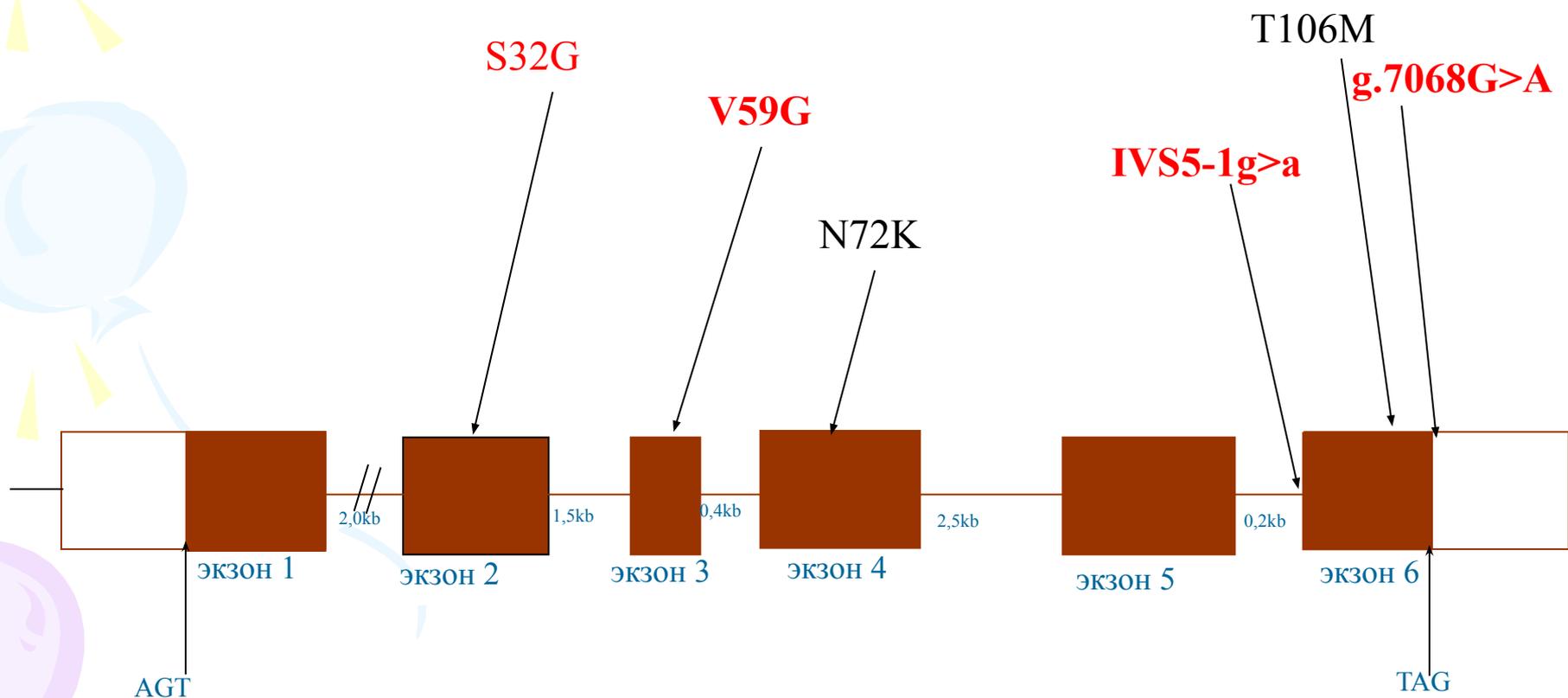


Структура гена QDPR и локализация обнаруженных мутаций в гене QDPR

Query 120 AGCATCTCAAGGAAGGAGGCCTCCTGACCTTGGATGGCGCAAAGGCTGCCCTGGATGGGA 179
|||||
Sbjct 150 AGCATCTCAAGGAAGGAGGCCTCCTGACCTTGGCTGGCGCAAAGGCTGCCCTGGATGGGA 209



Структура и локализация обнаруженных мутаций в гене *PTS*



Мутация	Кол-во хромосом	Ген	Экзон/Инtron	Информат.
A135D	2	<i>QDPR</i>	Экзон 4	41,6%
N72K	2	<i>PTS</i>	Экзон 4	
T106M	2	<i>PTS</i>	Экзон 6	
S32G	1	<i>PTS</i>	Экзон 2	
V59G	1	<i>PTS</i>	Экзон 3	
IVS5-1g>a	1	<i>PTS</i>	Инtron 5	
g.7068G>A	1	<i>PTS</i>	Экзон 6	



Диета с пониженным
содержанием ФА

**Больной ВН4-
зависимой формой
ГФА**

Умственная отсталость
и тяжелые
неврологические
нарушения

Комбинированное
лечение

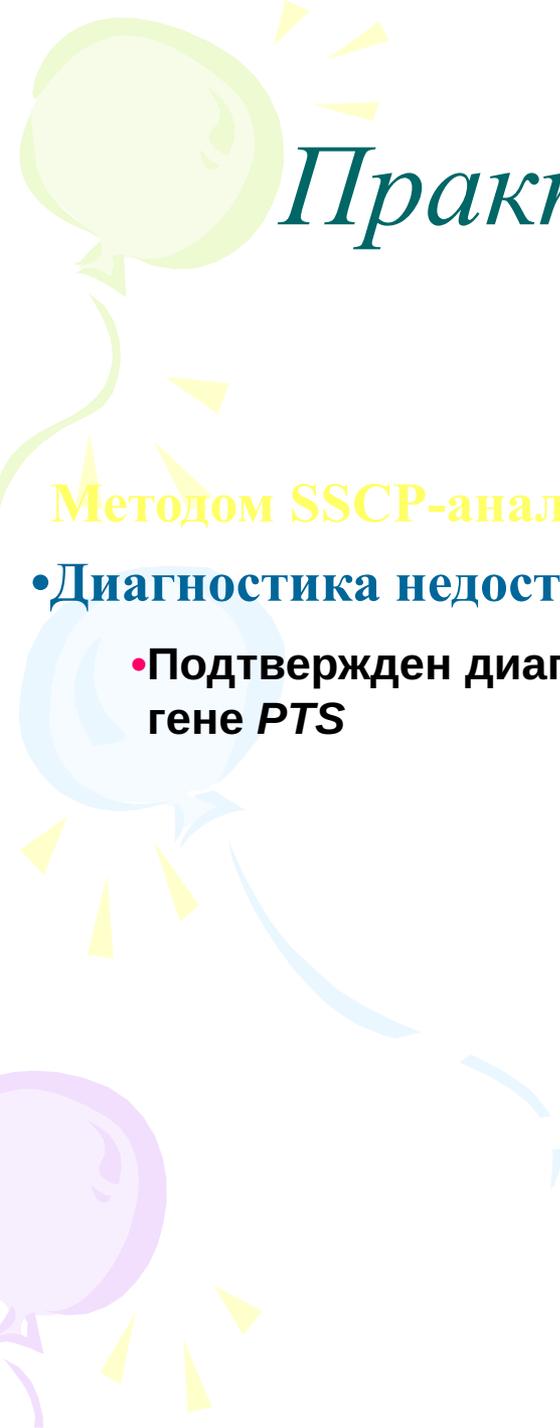
- диета с пониженным
содержанием ФА
- медиаторы
- ВН4

Отсутствие
неврологической
симптоматики

Практическое применение

С помощью разработанной системы регистрации наиболее частых мутаций в гене *РАН* проведено:

- **216** диагностики гетерозиготного носительства мутаций в гене *РАН*:
 - 162 диагностики провели для индивидов, не имеющих в семье больного ФКУ (планирование беременности): обнаружено 4 гетерозиготных носителя мутаций в гене *РАН*
 - 54 диагностики в семьях больных ФКУ: обнаружено 26 гетерозиготных носителя мутаций в гене *РАН*
- **67** пренатальных диагностик, из них:
 - В семи случаях плод унаследовал те же хромосомы, что и больной ребенок
 - В 46 случае плод являлся гетерозиготным носителем заболевания
 - В 14 случаях плод не унаследовал мутации в гене *РАН*



Практическое применение

Методом SSCP-анализа с последующим секвенированием проведена

• **Диагностика недостаточности тетрагидробиоптерина:**

- Подтвержден диагноз «ВН4 – зависимая форма ГФА», найдены мутации в гене *PTS*

Схема молекулярно-генетической диагностики гиперфенилаланинемии

