DOI: 10.25557/2073-7998.2018.12.14-24

Результаты программы генотипирования больных фенилкетонурией и гиперфенилаланинемией

Гундорова П.[1], Кузнецова И.А.[1], Куцев С.И.[1], Голихина Т.А.[2], Аксянова Х.Ф.[3], Ненашева С.А.[4], Круглова О.В.[4], Никитина Н.В.[5], Курилова В.И.[6], Алферова И.П.[7], Буянова Г.В.[7], Поляков А.В.[1]

[1] — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»
[2] — ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница №1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края
[3] — ГБУЗ Нижегородской области «Нижегородская областная детская клиническая больница»
[4] — ГБУЗ Самарской области «Областная клиническая больница им. В.Д. Середавина»
[5] — ГБУЗ Свердловской области «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка»
[6] — ГБУЗ Пермского края «Краевая детская клиническая больница»
[7] — Муниципальное автономное учреждение здравоохранения Ордена Трудового Красного Знамени городская клиническая больница №1
p_gundorova@inbox.ru

Введение: Фенилкетонурия (ФКУ) — наследственное заболевание обмена веществ, возникающее из-за мутаций в гене *PAH*, входит в программу неонатального скрининга в РФ. Больным ФКУ необходимо пожизненно соблюдать диету с ограничением поступления естественного белка в организм для предотвращения развития клинических проявлений заболевания, основным из которых является задержка умственного и психического развития. Данные о генотипе пациентов с ФКУ позволяют предсказать их чувствительность к кофакторной терапии, позволяющей существенно расширить диету и улучшить качество жизни. **Материалы и методы:** Исследование проводилось в период с декабря 2016 по январь 2018 года в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ». Материал от 1254 неродственных пробандов исследован на наличие 25 частых мутаций гена *PAH*. **Результаты:** Патогенные варианты выявлены на 86,3% исследуемых хромосом. У 75,3% пациентов молекулярно-генетическими методами подтвержден диагноз «фенилкетонурия», вызванная мутациями в гене *PAH*. Только один патогенный вариант найден у 22,1% пробандов, у 2,6% не выявлено патогенных вариантов гена *PAH*. Определены аллельные частоты 25 частых мутаций гена *PAH*. Выявлены региональные различия в распространенности мутации R408W, а также тяжелых и мягких мутаций гена *PAH*. По результатам исследования, 56,9% больных не отвечают на терапию BH4, 21,8% — потенциально отвечают. **Обсуждение:** Исследуемая выборка является смещенной, но используя соотношение Харди—Вайнберга, можно рассчитать суммарную аллельную частоту исследуемых мутаций и частоту мутации R408W, и вычислить число пациентов с мутациями в генах синтеза и обмена BH4 и число гомозигот по R408W, не попавших в программу генотипирования.

Ключевые слова: фенилаланингидроксилаза, тетрагидробиоптерин, сапроптерин.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Results of genotyping program of PKU and HPA patients

Gundorova P.[1], Kuznetsova I.A.[1], Kutsev S.I.[1], Golihina T.A.[2], Aksyanova H.F.[3], Nenasheva S.A.[4], Kruglova O.V.[4], Nikitina N.V.[5], Kurilova V.I.[6], Alferova I.P.[7], Buyanova G.V.[7], Polyakov A.V.[1]

[1] — Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics»
[2] — State budgetary health institution «Scientific research institute — Regional clinical hospital №1 S.V. Ochapovsky» Ministry of Health of the Krasnodar Territory
[3] — State budgetary health institution of Nizhny Novgorod region «Nizhny Novgorod Regional Children's Clinical Hospital»
[4] — State budgetary health institution of the Samara region «Regional Clinical Hospital V.D. Seredavina»
[5] — State budgetary health institution in the Sverdlovsk region «Clinical and Diagnostic Center «Mother and Child Healthcare»
[6] — State budgetary health institution of the Perm region «Regional Children's Clinical Hospital»
[7] — Municipal Autonomous Health Organization City Clinical Hospital №1
p_gundorova@inbox.ru

Introduction: Phenylketonuria (PKU) — a hereditary metabolic disease that arises from mutations in the *PAH* gene, the part of the program of neonatal screening in the Russian Federation. Patients with PKU need to follow a diet for life, limiting the intake of natural protein in the body to prevent the development of clinical manifestations of the disease, the main of which is a delay in mental development. Data on the genotype of patients with PKU make it possible to predict their sensitivity to the cofactor therapy, which allows to expand significantly the diet and improve the quality of life. **Patients and methods**: The study was conducted between December 2016 and January 2018 at the DNA Diagnostics Laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics». Material from 1254 unrelated probands was examined for the presence of 25 frequent mutations of the *PAH* gene. **Re-**

sults: Pathogenic variants are revealed on 86,3% of the investigated chromosomes. In 75.3% of patients, the diagnosis of «phenylketonuria» caused by mutations in the *PAH* gene was confirmed by molecular genetic methods. Only one pathogenic variant was found in 22.1% of probands, 2.6% did not reveal pathogenic variants of the *PAH* gene. The allelic frequencies of 25 frequent mutations of the *PAH* gene are determined. Regional differences in the prevalence of the R408W mutation, as well as the heavy and soft mutations of the *PAH* gene, are revealed. According to the results of the study, 56.9% of patients are «non-responders» to BH4 therapy, 21.8% — are potential «responders». **Discussion**: Using the Hardy-Weinberg ratio, we can calculate the total allelic frequency of 25 mutations and the frequency of R408W, calculate the number of patients with mutations in the BH4 synthesis and metabolism genes and the number of R408W homozygous patients not included in the genotyping program.

Key words: phenylalanine hydroxylase, tetrahydrobiopterin, sapropterin.

Введение

Фенилкетонурия (ФКУ, MIM# 261600) — это аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное недостаточностью фермента фенилаланингидроксилазы (ФАГ). Физиологическая функция ФАГ в организме заключается в преобразовании фенилаланина (ФА), поступающего с пищей, в тирозин. При ФКУ из-за повышения концентрации ФА в крови и мозге у пациентов развивается умственная отсталость. Этого можно избежать, если пациент соблюдает диету с ограниченным поступлением натурального белка, которой по современным рекомендациям необходимо придерживаться пожизненно [1]. У человека ФАГ присутствует только в печени, что затрудняет прямое измерение активности мутантного фермента у больных ФКУ. Частота ФКУ в России составляет около 1:7000 новорожденных [2].

Фермент кодируется геном фенилаланингидроксилазы (*PAH*) и представляет собой гомотетрамер, каждая субъединица которого состоит из трех доменов. Регуляторный домен расположен с N-конца, тетрамеризующий домен — с С-конца, а самый крупный каталитический домен расположен посередине [3]. В клетке ФАГ находится в двух конформационных формах: стабильная закрытая и нестабильная рабочая. Для ФАГ доказан механизм активации субстратом, то есть при повышении концентрации свободного ФА ФАГ переходит в рабочую нестабильную конформацию и утилизирует ФА в тирозин [4]. При отсутствии субстрата ФАГ переходит в стабильную конформацию, своеобразный «режим ожидания». Это происходит за счет действия кофактора ФАГ тетрагидробиоптерина (BH4), который по своей сути является ингибитором фермента [5]. У здорового индивида соотношение концентраций ФА и BH4 смещает равновесие конформационных форм ФАГ и обеспечивает правильную работу фермента. Большинство мутаций гена *PAH* являются миссенс-заменами и приводят к нарушениям сворачивания (фолдинга) ФАГ. Мисфолдинг ФАГ ведет к снижению времени жизни молекулы фермента и концентрации рабочего фермента в клетке. С другой стороны, BH4 выполняет роль шаперона, способствуя сворачиванию и стабилизации молекулы ФАГ. Таким образом, ФКУ по своей сути является болезнью фолдинга [5].

Отсутствие BH4 приводит к невозможности для ФАГ перейти в стабильную форму и, как следствие, быстрому ее разрушению. Группа наследственных заболеваний, обусловленных мутациями в генах, кодирующих белки синтеза и обмена кофактора гидроксилаз BH4 — гиперфенилаланинемии (ГФА) с дефицитом тетрагидробиоптерина типов A-D — вызываются мутациями в генах *PTS, GCH1, QDPR, PCBD* соответственно. Также дефицит BH4, приводящий к повышению уровня ФА в головном мозге без ГФА и к развитию ДОФА-зависимой дистонии, возникает из-за мутаций гена *SPR* [6].

Все вышеперечисленные гены задействованы в одном биохимическом пути и до недавнего времени считалось, что их дефекты являются причинами всех ГФА. Тем не менее, в 2017 году был описан ген *DNAJC12*, мутации в котором приводят к развитию ГФА без дефицита BH4 (#617384). Белковый продукт этого гена является шапероном ароматических гидроксилаз (в том числе ФАГ), то есть выполняет схожую функцию с BH4. Компаунд-гетерозиготные и гомозиготные мутации в гене *DNAJC12* уже описаны у пациентов с ГФА, у которых ранее не удавалось установить причину заболевания [7—11].

Все BH4-дефицитные формы ГФА, а также новая нозологическая форма (ГФА без дефицита BH4) успешно лечатся фармакологическим аналогом BH4 — сапроптерином. Изначально сапроптерин был создан для терапии именно таких, BH4-зависимых пациентов. На долю перечисленных клинических форм приходится всего 2—3% всех случаев ФКУ и ГФА. Подавляющее же их большинство вызвано повреждением гена ФАГ [12]. Почти два десятилетия назад был впервые описан эффект снижения уровня ФА при введении сапроптерина больным ФКУ с мутациями в гене *PAH* [13]. Эти наблюдения подтвердились дальнейшими исследованиями, также было установлено, что этот эффект чаще наблюдается среди больных с мягкими клиническими формами заболевания [14]. Первоначально, исследователи сосредоточились на поиске BH4-чувствительных пациентов, которых, в зависимости от популяции, насчитывается менее 50% среди пациентов с ФКУ [15]. Позже, благодаря интересу отдельных групп ученых к механизму фармакологического эффекта сапроптерина, были установлена физиологическая функция

BH4 как шаперона, а вместе с этим открыты пути к созданию новых препаратов для лечения таких наследственных заболеваний, как транстиретиновый амилоидоз, муковисцидоз, метилмалоновая ацидурия, болезнь Гоше и др. [16].

Механизм работы BH4 как шаперона важен для понимания современных реалий диагностики и лечения больных ФКУ. Транскрипты с двух аллелей гена *PAH* комбинируются в тетрамер во всех возможных сочетаниях. Причем из-за того, что время жизни этих вариантов может существенно различаться, их концентрации в гепатоците будут неравны. Мутации, приводящие к образованию укороченного транскрипта, полностью нарушающие фолдинг белка, или приводящие к усиленной агрегации молекул белка, приводят к отсутствию рабочего фермента — тяжелые мутации. Мутантные варианты, приводящие к усилению агрегации и последующей элиминации белка, даже в комбинации с менее поврежденной субъединицей ФАГ, тем не менее приводят к образованию агрегатов, и существенно снижают концентрацию рабочего фермента — псевдодоминантный эффект тяжелой мутации. Такой механизм присущ и самой распространенной в России тяжелой мутации R408W [17]. С другой стороны, некоторые патогенные варианты лишь частично снижают эффективность сворачивания белка, приводя к образованию работающего фермента со сниженной активностью — мягкие мутации. При компаунд-гетерозиготном сочетании мягких вариантов с null-мутациями, в основном будут присутствовать тетрамеры, состоящие только из транскриптов с мягких аллелей и, как следствие, — наличие рабочего фермента со сниженной активностью — псевдодоминантный эффект мягких мутаций. Наличие мягких мутаций приводит к формированию менее тяжелой клинической картины у пациентов с ФКУ [18]. Введение дополнительного количества BH4 извне способствует стабилизации поврежденного фермента и снижает его элиминацию. Разумеется, этот эффект можно наблюдать при условии, что, хотя бы один из аллелей несет мягкую мутацию, то есть синтезируется поврежденный белок не склонный к образованию агрегатов. В таком случае BH4 способствует более правильному фолдингу поврежденной молекулы и увеличивает время ее жизни в клетке. Если оба аллеля несут тяжелые мутации, и белок полностью отсутствует или агрегирует, то введение BH4 не имеет никакого эффекта. Таким образом, мутации гена *PAH* можно разделить на мягкие и тяжелые или на «BH4-чувствительные» и «BH4-нечувствительные», а пациентов с ФКУ на отвечающих и не отвечающих на терапию сапроптерином.

Активность ФАГ измеряют *in vitro* и результаты этих измерений соотносятся с величиной активности *in vivo* в гепатоците. Данные об остаточной активности фермента при разных патогенных вариантах гена *PAH* содержатся в базе данных PAHvdb [19]. Принято считать, что остаточная активность ФАГ для мягких мутаций должна превышать 10% от активности фермента дикого типа и в генотипе пациента должна присутствовать хотя бы одна мягкая мутация, для того чтобы его можно было отнести к группе потенциально отвечающих на терапию BH4 [20]. Вопрос о результирующей активности фермента при наличии двух мутаций в гене *PAH* в компаунд-гетерозиготном состоянии остается открытым, причем такая ситуация встречается чаще всего. Из описанного выше механизма формирования тетрамера ФАГ ясно, что остаточная активность не может быть рассчитана как среднее арифметическое значений для двух мутаций. Наиболее эффективная и перспективная методика, позволяющая оценить ситуацию в гепатоцитах компаунд-гетерозигот, получила название «Activity Landscapes» и основана на прямых измерениях активности ФАГ в культуре клеток, несущих исследуемый генотип [21]. Метод позволяет при известном генотипе пациента подобрать оптимальную концентрацию BH4 для лечения и определить уровень ФА, при котором следует начинать нагрузочный тест.

Накопленные знания о патогенезе заболевания позволяют использовать данные ДНК-диагностики для персонализированного подхода в терапии пациентов с ФКУ и ГФА. В настоящее время ни в одном регионе России нет системы проведения нагрузочного теста BH4 всем новорожденным с ФКУ, выявленных на неонатальном скрининге. Поэтому врачи-генетики, которые собираются проводить нагрузочные тесты для уже находящихся на учете больных ФКУ, сталкиваются с проблемой отсутствия мест в стационарах при большом количестве пациентов (до 100—150 человек в зависимости от региона), претендующих на тест. Также, несмотря на то, что препарат синтетического аналога BH4 закупается за счет государства, существуют проблемы с обеспечением необходимого количества препарата для проведения нагрузочного теста. В современных реалиях анализ ДНК для пациентов можно провести с меньшими материальными и техническими затратами, чем нагрузочный тест. По результатам пилотных исследований, более чем для 50% пациентов из РФ лечение не будет эффективно, исходя из данных о генотипе [22]. Учитывая высокую долю пациентов, не отвечающих на терапию, результаты ДНК-анализа позволят врачам-генетикам сконцентрировать свои силы на небольшом количестве потенциально отвечающих на лечение пациентов. Для выявления больных с ФКУ, потенциально отвечающих на лечение препаратами BH4, была запущена всероссийская программа генотипирования больных ФКУ и ГФА. Данные о генотипе необходимы для семейного консультирования пациентов с наследственными заболеваниями и будут полезны всем участникам программы вне зависимости от результатов предсказания потенциальной чувствительности к терапии сапроптерином.

Материалы и методы

Выборка для исследования сформирована из пациентов, материал которых поступил в лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» с декабря 2016 по январь 2018 гг. в рамках программы генотипирования больных с ФКУ и ГФА. Количество неродственных пробандов составило 1254 человека. Материал пациентов был собран в 50 регионах РФ (табл. 1). Обследованные пациенты подписали письменное информированное согласие на добровольное участие в настоящем исследовании, включая забор биологического материала и публикацию данных в открытой печати. В случае несовершеннолетних детей согласие получено у их родителей. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ».

Все молекулярно-генетические исследования были проведены на базе лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ».

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли с использованием набора реактивов Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) по протоколам производителей.

Для детекции мутаций гена *PAH* использовалась методика поиска 25 частых мутаций (S16* (c.47_48delCT), L48S, IVS2+5G>A, IVS2+5G>C, R111*, IVS4+5G>T, EX5del4154ins268, R158Q, D222* (c.664_665delGA), R243Q, R243*, R252W, R261Q, R261*, E280K, P281L, A300S, I306V, S349P, IVS10-11G>A, E390G, A403V, R408W, Y414C, IVS12+1G>A), которая применяется в рутинной диагностике пациентов с ФКУ и ГФА в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» [23]. Методика основана на технологии MLPA и осуществляется в трех реакциях. Мультиплексная лигазная реакция (MLPA) для детекции частых точковых замен гена *PAH* проводилась на программируемом термоциклере MC2 фирмы «ДНК-технология» (Россия) в 2 этапа. На первом этапе оригинальные олигонуклеотиды отжигали с исследуемой денатурированной ДНК в присутствии термостабильной ДНК-лигазы в течение 1 часа в объеме 5 мкл реакционной смести следующего состава: 10—50 нг геномной ДНК; по 0,16—10 фмоль/мкл каждого олигонуклеотида («Евроген», Россия); 0,4 единицы активности Pfu-DNA-лигазы («Хеликон», Россия), буфер для лигирования (20 ммоль Tris-HCl pH 7.5, 20 ммоль KCl, 10 ммоль $MgCl_2$, 0,1% Igepal, 0.01 ммоль rATP, 1 ммоль DTT); 20—30 мкл минерального масла. На втором этапе проводили стандартную ПЦР с олигопраймерами, комплементарными участкам последовательностей, специально синтезированным в олигонуклеотидах. В смесь, в которой предварительно провели лигазную реакцию, добавляли реакционную смесь для ПЦР в объеме 15 мкл (по 0,25 мкмоль каждого оригинального олигопраймера («Евроген», Россия); по 200 мкмоль каждого нуклеозидтрифосфата («Хеликон», Россия); 1,0 единица активности ДНК-полимеразы Biotaq («БиоМастер»); буфер для ПЦР (67 ммоль Tris-HCl; 16,6 ммоль $(NH_4)_2SO_4$; 0,01% Twin-20; pH 8.8). Результаты исследования оценивали методом вертикального электрофореза (20 х 20 см) в 9% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием геля раствором бромистого этидия и регистрацией на документирующей системе GelDoc фирмы BIO-RAD (США) в УФ-излучении с длиной волны 312 нм.

Классификация мутаций гена PAH

Остаточная активность мутантного белка определялась исходя из информации базы данных PAHvdb (дата обращения 12 февраля 2018 года) [19]. Мутации с остаточной активностью белка 10% и меньше были классифицированы как тяжелые с отрицательной BH4-чувствительностью. Мутации с остаточной активностью белка больше 10% были классифицированы как мягкие с вероятной чувствительностью к BH4 [20].

Предполагаемый эффект от лечения сапроптерином

Пациенты с двумя тяжелыми мутациями в гене ФАГ нечувствительны к терапии сапроптерином. Пациенты с хотя бы одной мягкой мутацией являются потенциально чувствительными к терапии [24, 25]. Необходимо отметить, что в европейской практике на настоящий момент принято начинать лечение без нагрузочного теста при выявлении двух мягких мутаций у пациента. В исследуемой выборке такие пациенты присутствуют, но так как их число мало и вопрос о выборе между нагрузочным тестом и началом лечения решается лечащим врачом, объединение их в отдельную группу не было проведено. Пробанды с не выявленной мутацией на одном или двух аллелях относятся к группе «неизвестный эффект от лечения».

Клиническая классификация

Тяжесть клинических проявлений при ФКУ коррелирует с уровнем ФА крови. Максимальный уровень ФА можно наблюдать у пациентов, не соблюдающих лечение, или на ретесте неонатального скрининга, когда новорожденный еще не находится на диете, но прошло достаточно времени для достижения максимальной концентрации ФА крови. Пациенты, участвующие в исследовании, предоставили свои анкетные данные, в том числе уровень ФА на ретесте, текущий уровень ФА, сведения о соблюдении диеты. Согласно клинической классификации, выделяются классическая ФКУ при концентрации ФА в крови более 20 мг/дл, среднетяжелая ФКУ при 15—20 мг/дл, мягкая ФКУ при 10—15 мг/дл, легкая ГФА — 2—10 мг/дл. Согласно более современному варианту классификации, среднетяжелую и мягкую ФКУ объединяют в умеренную форму (ФА 10—20 мг/дл). Для более детального анализа спектра клинических проявлений при ФКУ, в настоящей работе использован старый вариант классификации.

Таблица 1

Состав выборки пробандов

Регион	Число неродственных пробандов
Алтайский край	1
Архангельская область	17
Астраханская область	8
Белгородская область	11
Брянская область	19
Владимирская область	18
Волгоградская область	43
Вологодская область	17
Воронежская область	28
Ивановская область	3
Иркутская область	19
Кировская область	29
Костромская область	10
Краснодарский край	96
Курганская область	15
Курская область	14
Липецкая область	5
Магаданская область	8
Москва и МО	169
Мурманская область	21
Нижегородская область	81
Оренбургская область	3
Орловская область	9
Пермская область	63
Приморский край	7
Республика Адыгея	1
Республика Башкортостан	10
Республика Дагестан	10
Республика Крым	9
Республика Марий-Эл	9
Республика Мордовия	23
Республика Татарстан	33
Республика Тыва	2
Республика Удмуртия	14
Республика Чувашия	11
Ростовская область	19
Рязанская область	24
Самарская область	56
Санкт-Петербург и ЛО	47
Саратовская область	17
Свердловская область	49
Смоленская область	17
Ставропольский край	5
Тамбовская область	42
Тульская область	18
Тюменская область	27
Ульяновская область	19
Ханты-Мансийский АО	2
Челябинская область	67
Ярославская область	9
Всего	1254

Результаты

Спектр мутаций в гене PAH

Образцы 1254 неродственных пробандов с входящими диагнозами ФКУ и ГФА были проанализированы на наличие 25 частых мутаций гена *PAH*. Патогенные варианты были обнаружены на 86,3% исследуемых хромосом (на 2165 хромосомах). У 75,3% пациентов (944 пациента) были выявлены патогенные варианты на обоих аллелях, то есть был подтвержден диагноз *фенилкетонурия*, вызванная мутациями в гене *PAH*. Только один патогенный вариант был найден у 22,1% пробандов (277 пациентов). У 2,6% пробандов (33 чел.) не было выявлено патогенных вариантов гена *PAH*.

Аллельные частоты 25 частых мутаций гена *PAH* представлены в табл. 2. Наиболее распространенным патогенным вариантом является тяжелая R408W, встречающаяся на 51,8% аллелей в исследуемой выборке. Пациенты с генотипом R408W/R408W составляют 28% выборки (350 чел.).

Частоты мутаций сильно варьируют в зависимости от региона. Для сравнительного анализа частот мутаций и генотипов были выбраны регионы, количество пациентов из которых превышает 15.

Средняя аллельная частота R408W составила 51,8%, но в различных регионах она лежит в диапазоне от 27% в Татарстане до 74% в Кировской области (рис. 1). Высокие частоты мутации R408W (более 60%) также отмечены в Пермской, Нижегородской, Вологодской областях.

Таблица 2

Спектр 25 частых мутаций гена *PAH*

Мутация		Число хромосом	Аллельная частота, %
Позиция в белке	Позиция в кДНК		
R408W	*c.1222C>T*	1300	51,8
R261Q	c.782G>A	146	5,8
IVS12+1G>A	*c.1315+1G>A*	84	3,3
R158Q	*c.473G>A*	74	3,0
P281L	*c.842C>T*	72	2,9
IVS10-11G>A	*c.1066-11G>A*	63	2,5
Y414C	c.1241A>G	49	2,0
*D222**	*c.664_665delGA*	44	1,8
R252W	*c.754C>T*	41	1,6
E280K	*c.838G>A*	37	1,5
IVS4+5G>T	*c.441+5G>T*	31	1,2
*R261**	*c.781C>T*	25	1,0
L48S	c.143T>C	25	1,0
*R243**	*c.727C>T*	22	0,9
A403V	c.1208C>T	21	0,8
EX5del4154ins268	*c.442-2913_509+1173del4154ins268*	20	0,8
*R111**	*c.331C>T*	20	0,8
E390G	c.1169A>G	18	0,7
R243Q	c.728G>A	12	0,5
I306V	c.916A>G	12	0,5
IVS2+5G>C	*c.168+5G>C*	12	0,5
A300S	c.898G>T	11	0,4
IVS2+5G>A	*c.168+5G>A*	11	0,4
*S16**	*c.47_48delCT*	9	0,4
S349P	*c.1045T>C*	6	0,2
25 мутаций		2165	86,3
Тяжелые мутации		1871	74,6
Мягкие мутации		368	11,7
Не обнаружено		343	13,7
Всего		2508	100,0

Примечание. Курсивом выделены тяжелые мутации гена *PAH*

Среди исследуемых мутаций 17 являются тяжелыми (S16* (c.47_48delCT), IVS2+5G>A, IVS2+5G>C, R111*, IVS4+5G>T, EX5del4154ins268, R158Q, D222* (c.664_665delGA), R243*, R252W, R261*, E280K, P281L, S349P, IVS10-11G>A, R408W, IVS12+1G>A) и 8 мягкими (L48S, R243Q, R261Q, A300S, I306V, E390G, A403V, Y414C,) исходя из анализа остаточной активности ФАГ (см. Материалы и методы). Суммарные аллельные частоты тяжелых и мягких мутаций составляют 74,6% и 11,7% аллелей соответственно. Региональные особенности распространения тяжелых и мягких мутаций представлены на рис. 2. Основной вклад в суммарную частоту тяжелых мутаций вносит вариант R408W, взаимосвязь суммарной частоты тяжелых мутаций и частоты мутации R408W прослеживается на рис. 1 и 2. Наиболее «отягощенными» по этому признаку являются Кировская, Пермская, Смоленская, Нижегородская, Ульяновская, Рязанская, Владимирская области. В перечисленных регионах, а также в Вологодской области и Санкт-Петербурге наблюдаются наиболее низкие суммарные частоты мягких мутаций.

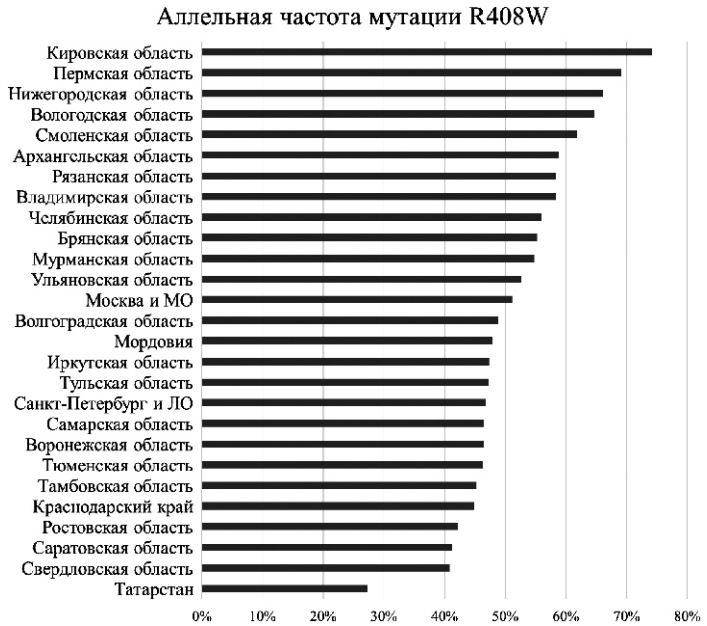

Рис. 1. Аллельная частота мутации R408W в различных регионах РФ.

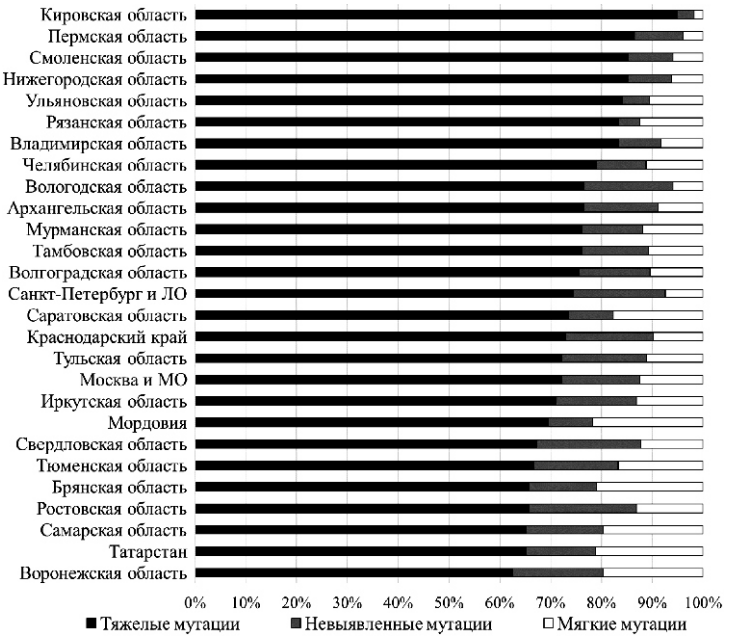

Рис. 2. Суммарные аллельные частоты тяжелых и мягких, а также аллелей с не выявленными патогенными вариантами в различных регионах РФ.

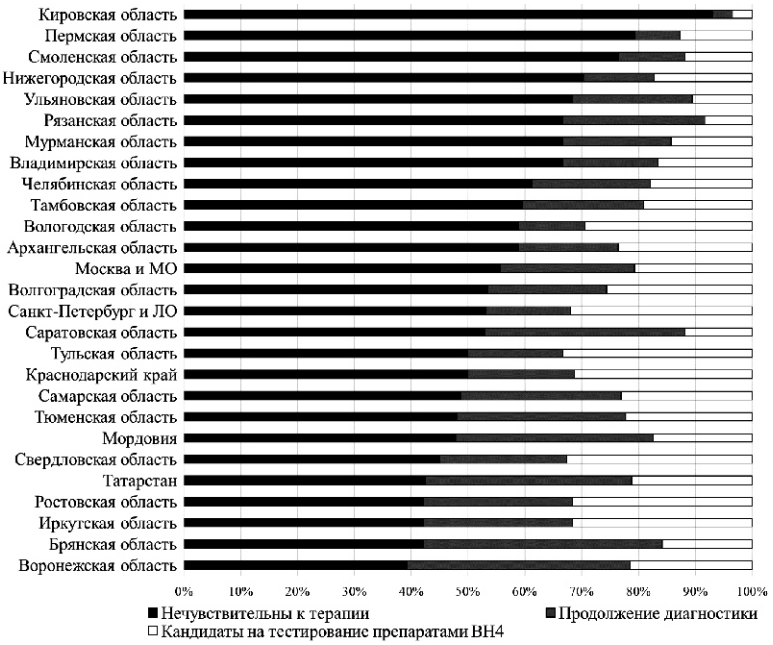

Рис. 3. Пациенты, потенциально отвечающие и не отвечающие на лечение препаратами BH4, в различных регионах РФ.

Потенциальная чувствительность к препаратам BH4

Исходя из генотипа, были определены группы пациентов, которые не чувствительны и потенциально чувствительны к терапии (см. Материалы и Методы). У 56,9% пробандов (713 чел.) обнаружены тяжелые мутации в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии, эти пациенты формируют группу не отвечающих на терапию. Хотя бы одна мягкая мутация выявлена у 21,8% пробандов (273 чел.) — это кандидаты на тестирование препаратами BH4. У 21,4% пробандов (268 чел.) выявлена одна тяжелая мутация или не выявлено мутаций. Для последней группы возможно проведение дальнейшей ДНК-диагностики с целью получения более полных данных о генотипе. При наличии достаточной материально-технической базы в регионах возможно проведение нагрузочного теста без продолжения ДНК-диагностики.

Рассчитанная теоретически частота BH4-чувствительных генотипов составляет 17—79% в Европе, градиент направлен с северо-востока на юго-запад и примерно совпадает с частотой мутации R408W: минимальная доля отвечающих в странах Балтии, максимальная — в Испании [20]. В западноевропейских исследованиях, в которых изучена BH4-чувствительность у новорожденных, более 57% отвечают на лечение [26]. Очевидно, что доля отвечающих пациентов в России ближе к восточноевропейским значениям.

Доля пациентов, потенциально не отвечающих на терапию, напрямую связана с долей тяжелых мутаций в регионе (сравнение рис. 2 и 3). Наибольшее число нечувствительных генотипов отмечено в Кировской области — 93%. Наибольшее число чувствительных генотипов обнаружено в Брянской (42%), Воронежской областях (39%), Республике Татарстан (36%), Саратовской области (35%), Республике Мордовии (35%) и Тюменской области (30%). В некоторых из этих регионов частоты чувствительных генотипов могут быть завышены (см. обсуждение).

Спектр клинических проявлений

От 1243 пациентов из исследуемой выборки удалось получить клинические данные, позволяющие классифицировать тяжесть их клинических проявлений. Классическая ФКУ наблюдается у 71,8% (893 чел.), среднетяжелая у 11,1% (138 чел.), мягкая ФКУ у 8,7% (108 чел.), мягкая ГФА у 8,4% (104 чел.) (рис. 4). Исходя из этих данных, можно заключить, что большинство пациентов

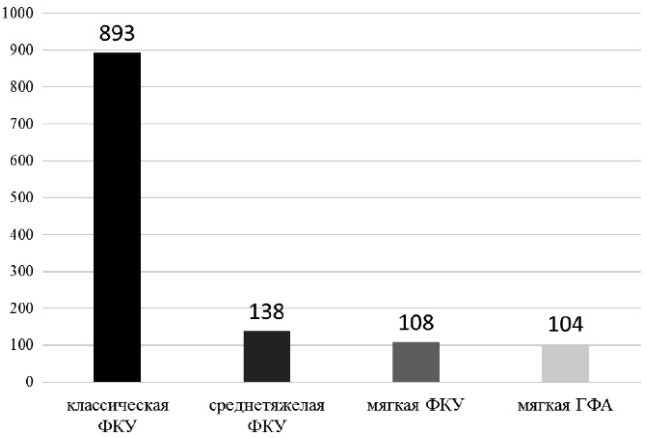

Рис. 4. Клинические проявления пациентов из исследуемой выборки (N = 1243).

с ФКУ из РФ имеют тяжелые клинические проявления. Большинство пациентов с двумя тяжелыми мутациями (96,8% — 686 чел. из 709) имеют классическую или среднетяжелую ФКУ (рис. 5).

Среди пациентов, у которых выявлена мягкая мутация хотя бы на одном аллеле, наблюдается большее разнообразие клинических проявлений, чем среди пациентов с двумя тяжелыми мутациями (рис. 6): классическая ФКУ у 43,5% пациентов, доли среднетяжелой и мягкой ФКУ равны и составляют 17,7%, мягкая ГФА у 21% пациентов. Интересно, что у 56,8% пациентов с классической ФКУ в этой группе, в генотипе присутствует мутация R261Q в гетерозиготном или гомозиготном состоянии. У 47,9% пациентов со среднетяжелой ФКУ в генотипе также присутствует мутация R261Q в гетерозиготном или гомозиготном состоянии. По величине остаточной активности эта мутация является мягкой (44%), но ее наличие ведет к формирования достаточно тяжелого фенотипа у больных ФКУ. Но такие пациенты могут оказаться чувствительными к препаратам BH4, ввиду наличия остаточной активности фермента. Представленный анализ показывает, что потенциальная чувствительность к препаратам BH4 и степень клинических проявлений не всегда соотносятся между собой.

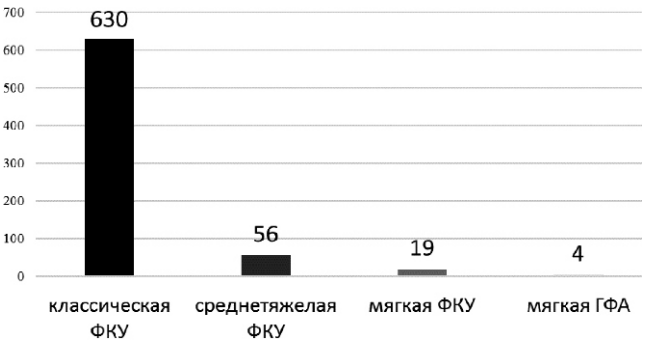

Рис. 5. Клинические проявления пациентов с двумя тяжелыми мутациями (N = 709).

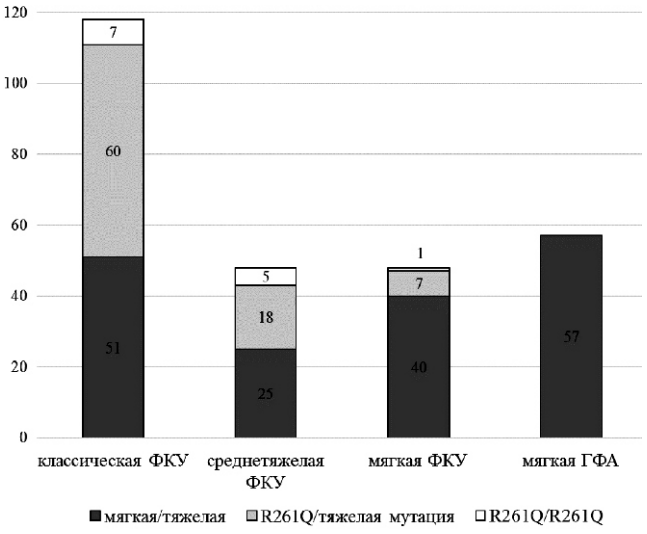

Рис. 6. Клинические проявления пациентов с хотя бы одной мягкой мутацией в гене *PAH* (N = 271). Группы пациентов с мутацией R261Q в гетерозиготном и гомозиготном состоянии выделены отдельно.

Обсуждение

Частота мутации R408W

Во многих регионах РФ проводится молекулярно-генетическая диагностика больных ФКУ путем поиска 8 частых мутаций гена *PAH* (R158Q, IVS4+5G>T, R252W, R261Q, P281L, IVS10-11G>A, R408W, IVS12+1G>A) или только наиболее распространенного патогенного варианта R408W. В этом случае у около 50% пациентов можно выявить оба патогенных варианта и подтвердить диагноз. Пациенты из Приморского края, Башкортостана, Санкт-Петербурга и Ленинградской области, Свердловской области, Татарстана, Ханты-Мансийского АО в подавляющем большинстве были первоначально генотипированы в регионах, а в настоящее исследование попали только те, у которых не были выявлены обе мутации при анализе 8 частых мутаций. В Волгограде, Воронеже, Иркутске, Крыму, Нижнем Новгороде, Ростове, Чувашии, Краснодаре, Саратове и Челябинске часть пациентов также была предварительно генотипирована. Не менее 20% пробандов из выборки были предварительно генотипированы, на одном или на обоих аллелях у них не были обнаружены патогенные варианты. Соответственно те пациенты, у которых были выявлены обе мутации при анализе ДНК в регионах не попали в настоящее исследование. Таким образом, исследуемая выборка является смещенной — реальная суммарная частота 25 частых мутаций должны быть выше.

В первую очередь это отражается на средней частоте мутации R408W. В регионах, где пациенты предварительно были генотипированы, мы отмечаем более низкие частоты этого патогенного варианта: Татарстан, Свердловск, Саратов, Ростов, Краснодарский край, Ростов, Воронеж, Санкт-Петербург, Иркутск, Волгоград. Очевидно, что с учетом полных данных о генотипах пациентов из указанных регионов, аллельная частота мутации R408W должна быть выше. Учитывая, что для анализа в лабораторию не была направлена часть пациентов, гомозиготных по мутации R408W, а пациенты с мутацией R408W в гетерозиготном состоянии и без выявленных мутаций были направлены, можно использовать соотношение Харди—Вайнберга для расчета реального числа гомозигот. В уравнении $Np^2 + 2Npq + Nq^2 = N$: Np^2 — число гомозигот по R408W принимаем за неизвестное значение, 2Npq — число гетерозигот по R408W равное 602, Nq^2 — число пациентов без R408W равное 303, N — объем исследуемой выборки равный 1254, q = 1 - p. Решая квадратное уравнение 2*1254*p*(1 - p) = 602, получаем p = 0,599 — реальная доля аллелей с мутацией R408W в выборке.

Вычисляем аллельную частоту мутации R408W, которая равна 59,9%. Число гомозигот по R408W $Np^2 = 450$, при этом в исследуемой выборке всего 349 человек с генотипом R408W/R408W. Таким образом, материал от 101 пациента с генотипом R408W/R408W не поступил в лабораторию.

Полученная расчетная аллельная частота мутации R408W 60% согласуется с данными наиболее ранних исследований, в которых удавалось получить максимальный охват пациентов из каждого региона [27]. В более поздних работах [22] была зарегистрирована частота близкая к 50%, вероятно по тем же причинам, что и в данной работе. Тем не менее, стоит отметить, что частота всех мутаций, сильно варьирует от региона к региону. Например, в Кировской области аллельная частота R408W превысила 70%, а в некоторых регионах, население которых в основном составляют локальные этносы, мутация R408W не встречается вовсе [28].

Пациенты с причиной заболевания не в гене PAH

Для исследования был собран материал от пациентов с входящими диагнозами ФКУ и ГФА. Так как клинически не всегда удается отличить ВН4-дефицитные ГФА от фенотипов, причиной которых являются мутации в гене *PAH*, мы предполагаем наличие в исследуемой выборке пациентов с мутациями в других генах. Наиболее вероятно, что они находятся среди пациентов без выявленных частых мутаций гена *PAH*. Используя соотношение Харди—Вайнберга, можно рассчитать число пациентов, у которых на обоих аллелях находятся редкие мутации гена *PAH*. Разница этой величины и количества пациентов без выявленных мутаций в выборке равна числу пациентов, причиной заболевания у которых являются мутации в генах синтеза и обмена ВН4 или гене *DNAJC12*. В уравнении $Np^2 + 2Npq + Nq^2 = N$: Np^2 — число пациентов с двумя выявленными мутациями, равное 944, 2Npq — число пациентов с одной выявленной мутацией, равное 277, Nq^2 — число пациентов без выявленных мутаций, принятое за неизвестное, N — объем исследуемой выборки. Решая уравнение $9*944*p*(1 - p)/p^2 = 277$, получаем $p = 0,872$. Пересчитав объем выборки с учетом $p = 0,872$, получаем $N = 1241$. Таким образом, в выборке присутствуют 13 человек (1%) с мутациями в других генах. В мире частота ГФА с причиной не в гене *PAH* встречается в 2% случаев [12]. Частота этих нозологических форм в России до сих пор не установлена, но по результатам расчетов, представленных в данной работе и пилотном исследовании [22], частота этих нозологических форм среди российских больных сопоставима со средней мировой. Вариант неверного клинического диагноза в данном случае практически исключен, так как отбор пробандов для исследования проводился по строгим критериям. Реальная суммарная аллельная частота 25 мутаций равна 87,2%, в отличие от наблюдаемой 86,3%.

Для установления молекулярной причины заболевания у пациентов без выявленных частых мутаций гена РАН наиболее эффективно использовать секвенирование всей группы генов, мутации в которых приводят к развитию ГФА, методом NGS (next generation sequencing или ВПС — высокопроизводительное секвенирование).

Заключение

В рамках программы генотипирования пациентов с диагнозами *фенилкетонурия* и *гиперфенилаланинемия* была выполнена уникальная по масштабу, охвату и объему работа. Данные, полученные в ходе исследования, используются врачами в регионах РФ для терапии и семейного консультирования пациентов. Данные генотипирования способствовали запуску нагрузочных тестов с сапроптерином в ряде регионов РФ. В будущем этот процесс должен перейти в тестирование всех новорожденных с ФКУ, выявленных на скрининге, на чувствительность к данному препарату.

Собран значительный объем информации, позволяющий оценить ситуацию в различных регионах РФ, выявить закономерности и региональные различия. В среднем по выборке можно заключить, что среди российских больных преобладает наиболее тяжелая клиническая форма заболевания — классическая ФКУ, что объясняется высокой суммарной аллельной частотой тяжелых мутаций в гене *PAH*. Наиболее распространенным вариантом является R408W — мутация, которая вносит существенный вклад в долю тяжелых патогенных вариантов, нечувствительных к терапии сапроптерином.

Актуальной задачей является сбор полных данных о распространенности мутаций гена *PAH* и генов, ответственных за развитие других видов ГФА. Учитывая большое число больных ФКУ и ГФА в России и то, что они представляют множество разнообразных этнических групп, эта информация внесет существенный вклад в накопленные мировым сообществом знания о ФКУ.

Список литературы

1. van Wegberg AMJ, MacDonald A, Ahring K, et al. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. Orphanet J Rare Dis. 2017; 12(1):162. doi: 10.1186/s13023-017-0685-2

2. Новиков ПВ, Ходунова АА. Первые итоги расширенного неонатального скрининга на наследственные болезни обмена веществ в Российской Федерации. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2012; 57(5):5-12.

3. Knappskog PM, Flatmark T, Aarden JM, et al. Structure/function relationships in human phenylalanine hydroxylase. Effect of terminal deletions on the oligomerization, activation and cooperativity of substrate binding to the enzyme. Eur J Biochem. 1996; 242(3):813-21.

4. Patel D, Kopec J, Fitzpatrick F, et al. Structural basis for ligand-dependent dimerization of phenylalanine hydroxylase regulatory domain. Sci Rep. 2016; 6(23748. doi: 10.1038/srep23748

5. Underhaug J, Aubi O, Martinez A. Phenylalanine hydroxylase misfolding and pharmacological chaperones. Curr Top Med Chem. 2012; 12(22):2534-45.

6. Bonafe L, Thony B, Penzien JM, et al. Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. Am J Hum Genet. 2001; 69(2):269-77. doi: 10.1086/321970

7. van Spronsen FJ, Himmelreich N, Rufenacht V, et al. Heterogeneous clinical spectrum of DNAJC12-deficient hyperphenylalaninemia: from attention deficit to severe dystonia and intellectual disability. J Med Genet. 2017; doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104875

8. Blau N, Martinez A, Hoffmann GF, et al. DNAJC12 deficiency: A new strategy in the diagnosis of hyperphenylalaninemias. Mol Genet Metab. 2018; 123(1):1-5. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.11.005

9. Straniero L, Guella I, Cilia R, et al. DNAJC12 and dopa-responsive nonprogressive parkinsonism. Ann Neurol. 2017; 82(4):640-646. doi: 10.1002/ana.25048

10. de Sain-van der Velden MGM, Kuper WFE, Kuijper MA, et al. Beneficial Effect of BH4 Treatment in a 15-Year-Old Boy with Biallelic Mutations in DNAJC12. JIMD Rep. 2018; doi: 10.1007/8904_2017_86

11. Anikster Y, Haack TB, Vilboux T, et al. Biallelic Mutations in DNAJC12 Cause Hyperphenylalaninemia, Dystonia, and Intellectual Disability. Am J Hum Genet. 2017; 100(2):257-266. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.01.002

12. Blau N, Shen N, Carducci C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. Expert Rev Mol Diagn. 2014; 14(6):655-71. doi: 10.1586/14737159.2014.923760

13. Kure S, Hou DC, Ohura T, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. J Pediatr. 1999; 135(3):375-8.

14. Muntau AC, Roschinger W, Habich M, et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. N Engl J Med. 2002; 347(26):2122-32. doi: 10.1056/NEJMoa021654

15. Levy HL, Milanowski A, Chakrapani A, et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. Lancet. 2007; 370(9586):504-10. doi: 10.1016/s0140-6736(07)61234-3

16. Muntau AC, Leandro J, Staudigl M, et al. Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators. J Inherit Metab Dis. 2014; 37(4):505-23. doi: 10.1007/s10545-014-9701-z

17. Gersting SW, Kemter KF, Staudigl M, et al. Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability. Am J Hum Genet. 2008; 83(1):5-17. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.05.013

18. Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, et al. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. Mol Genet Metab. 2011; 104 Suppl(S2-9. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.08.017

19. Blau N, Yue W, Perez B. PAHvdb. http://www.biopku.org/pah/

20. Zurfluh MR, Zschocke J, Lindner M, et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. Hum Mutat. 2008; 29(1):167-75. doi: 10.1002/humu.20637

21. Danecka MK, Woidy M, Zschocke J, et al. Mapping the functional landscape of frequent phenylalanine hydroxylase (PAH) genotypes promotes personalised medicine in phenylketonuria. J Med Genet. 2015; 52(3):175-85. doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102621

22. Гундорова П, Степанова АА, Бушуева ТВ, et al. Генотипирование больных фенилкетонурией из различных регионов РФ с целью определения чувствительности к препаратам BH4. Генетика. 2017; 53(6):732-739.

23. Гундорова П, Степанова АА, Щагина ОА, et al. Результаты использования новых медицинских технологий «Детекция основных точковых мутаций гена РАН методом мультиплексной лигазной реакции» и «Детекция десяти дополнительных точковых мутаций гена РАН методом мультиплексной лигазной реакции» в ДНК-диагностике фенилкетонурии. Медицинская генетика. 2016; 15(2):29-36.

24. Dobrowolski SF, Heintz C, Miller T, et al. Molecular genetics and impact of residual in vitro phenylalanine hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish PKU population. Mol Genet Metab. 2011; 102(2):116-21. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.11.158

25. Heintz C, Cotton RG, Blau N. Tetrahydrobiopterin, its mode of action on phenylalanine hydroxylase, and importance of genotypes for pharmacological therapy of phenylketonuria. Hum Mutat. 2013; 34(7):927-36. doi: 10.1002/humu.22320

26. Trefz F, Lichtenberger O, Blau N, et al. Tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in neonates with hyperphenylalaninemia: a semi-mechanistically-based, nonlinear mixed-effect modeling. Mol Genet Metab. 2015; 114(4):564-9.

27. Степанова АА, Тверская СМ, Зинченко РА, et al. Молекулярно-генетическое исследование гена фенилаланингидроксиласы в группе российских больных фенилкетонурией. Медицинская генетика. 2006; 5(2):32-39.

28. Гундорова П, Степанова АА, Макаов РА, et al. Особенности спектра мутаций в гене РАН у больных фенилкетонурией из Карачаево-Черкесской Республики. Генетика. 2016; 52(12):1448-1457. doi: 10.7868/S0016675816110047