

Результаты использования новых медицинских технологий «Детекция основных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции» и «Детекция десяти дополнительных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции» в ДНК-диагностике фенилкетонурии

Гундорова П., Степанова А.А., Шагина О.А., Поляков А.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»,
Москва, 115478, ул. Москворечье, д.1, e-mail: polyakov@med-gen.ru

В работе представлены результаты молекулярно-генетического обследования 180 пробандов с диагнозом «фенилкетонурия», направленных в лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» в период с 10.01.2015 по 01.02.2016. Для ДНК-диагностики использовались внедренные в практическую деятельность ФГБНУ «МГНЦ» новые медицинские технологии. Установлено, что использование данных технологий делает более эффективным медико-генетическое консультирование отягощенных семей, позволяет с наименьшими временными и материально-техническими затратами провести ДНК-диагностику фенилкетонурии, в том числе диагностику носительства для родственников пробанда и пренатальную диагностику в отягощенных семьях.

Ключевые слова: фенилкетонурия, ДНК-диагностика, медицинская технология, мультиплексная лигазная реакция

Введение

Фенилкетонурия (ФКУ, МIM# 261600) — наиболее частое врожденное нарушение метаболизма аминокислот среди европейцев, основным клиническим симптомом которого является нарушение психоречевого и физического развития и, как следствие, слабоумие, ведущее к тяжелой психической инвалидности. Различают следующие клинические формы: классическая, среднетяжелая, легкая ФКУ, легкая гиперфенилаланинемия (ГФА). В 98% случаев заболевания развивается из-за дефицита фермента фенилаланингидроксилазы (ФАГ, EC 1.14.16.1), осуществляющего превращение фенилаланина. Фенилаланин (ФА) — незаменимая аминокислота, которая поступает с белками пищи и претерпевает ряд превращений в организме здорового человека. Основная его часть в результате реакции гидроксирования окисляется в другую аминокислоту — тирозин с помощью фенилаланингидроксилазной системы печени. При нарушении работы фермента ФАГ происходит накопление ФА, а также его производных (фенилпировиноградная, фенилмолочная, фенилуксусная кислоты и др.) в клетках, что оказывает токсическое воздействие на головной мозг, и путем угнетения ряда ферментов приводит к вторичному нарушению обмена других важнейших аминокислот [1].

Частота ФКУ среди новорожденных по данным массового скрининга в различных странах составляет в среднем 1:10000, однако значительно варьирует в зави-

симости от популяции: от 1:2600 в Турции до 1:100000 в Японии [2—5]. Средняя частота встречаемости фенилкетонурии в РФ составляет 1:7000 новорожденных [6].

Более 500 различных мутаций в гене, кодирующем ФАГ (*PAH*) были идентифицированы и описаны в базе данных консорциума по изучению ФКУ [7], как являющиеся причиной заболевания. Наличие существенной генетической гетерогенности ФКУ открывает возможности для многочисленных комбинаций мутаций у больных, что вносит свой вклад в клинический полиморфизм. Мутации различаются по проявлению активности фермента, порождая диапазон клинических фенотипов от тяжелой ФКУ до гиперфенилаланинемии (ГФА), которая не требует диетотерапии. Кроме того, другие гены могут влиять на транспорт ФА в пределах мозга и через гематоэнцефалический барьер [8].

Измерение концентрации ФА в крови, которое проводится детям на неонатальном скрининге, не позволяет дифференцировать ФКУ и гиперфенилаланинемии, вызванные мутациями в генах синтеза и обмена тетрагидриоптерина, при том, что лечение этих нозологических форм существенно различается. ДНК-диагностика необходима для подтверждения диагноза фенилкетонурии, вызванной мутациями гена *PAH*, ее результаты также могут быть использованы для определения чувствительности пациента к препаратам тетрагидриоптерина [4, 6].

Мажорной мутацией в гене *PAH* для жителей России является миссенс-мутация экзона 12 — R408W(p.Arg408Trp), аллельная частота которой составляет около 50%. Однако детекции лишь одной этой мутации недостаточно для проведения адекватной ДНК-диагностики и осуществления медико-генетического консультирования. Частота мутаций в гене *PAH* характеризуется значительными межпопуляционными различиями, разработка системы, которая охватывала бы широкий спектр мутаций, необходима в такой многонациональной стране, как Россия [9].

Высокая частота ФКУ, генетическая гетерогенность заболевания и тяжесть клинических проявлений без своевременного начатого лечения диктуют необходимость определения генетической природы этого заболевания

в каждом конкретном случае. Сравнительно большой размер гена *PAH* и наличие частых мутаций, характерных для различных популяций, обуславливают необходимость разработки диагностических тест-систем, позволяющих с наименьшими материально-техническими и временными затратами исследовать мутации, на долю которых приходится наибольшее число случаев ФКУ.

Материалы и методы

В период с 10.01.2015 по 01.02.2016 в лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» были направлены образцы биологического материала 180 неродственных больных с целью диагностики ФКУ.

Таблица 1

Олигонуклеотиды, применявшиеся для детекции мутаций гена *PAH* в технологии МТ_ФКУ9

| Название олигонуклеотида | Последовательность олигонуклеотидов (5' → 3') |
|--------------------------|--|
| MLPIVS4 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC CATCCTACGGGCCATGGAC |
| MLPIVS4 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GCTCATCCTACGGGCCATGGAA |
| MLPIVS4 R | TCACAGGGTGGTCAGCATCC GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLPR158 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GGCAATGTCAGCAAAGTCTTCC |
| MLPR158 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GTAGGCAATGTCAGCAAAGTCTTCT |
| MLPR158 R | GTCTTGACGGTACACAGGATCTTTTCTTG GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLRR252 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GCTGGCCTGCTTTCCTCTC |
| MLRR252 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC CAGGCTGGCCTGCTTTCCTCTT |
| MLRR252 R | GGGATTTCTTGGGTGGCCTGAAACATTATCTTTAATTTACTATTTAATTTCTTG GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLPR261 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GATGACTGTGTGCAGTGGAAGACTC |
| MLPR261 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GCTGATGACTGTGTGCAGTGGAAGACTT |
| MLPR261 R | GGAAGGCCAGGCCACCCATTTTCTTTTCTTTTG GATGCGATCCGATGCCTTCAT |
| MLPP281 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC CAAGCCCATGTATACCTCCGAACC |
| MLPP281 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GACCAAGCCCATGTATACCTCCGAACT |
| MLPP281 R | GTGAGTACTGTCTCCAGCTACCAGTTTCTTATCTTACTTTTG GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLPIVS10 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC CTGATCCTGATTTAACAGTGATAATAACTTTTCACTTG |
| MLPIVS10 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GAATACTGATCCTGATTTAACAGTGATAATAACTTTTCACTTA |
| MLPIVS10 R | GGGCCTACAGTACTGCTTATCAGAGAAGTTTCAATTATCTTTG GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLPR408 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GGAACCTTGTGCCCACAATACCTC |
| MLPR408 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC CTTAGGAACCTTGTGCCCACAATACCTT |
| MLPR408 R | GGCCCTTCTCAGTTCGCTACG GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLPIVS12 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GCTTAAGATTTTGGCTGATTCCATTAACAG |
| MLPIVS12 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GTCAGCTTAAGATTTTGGCTGATTCCATTAACAA |
| MLPIVS12 R | TAAGTAATTTACACCTTACGAGGCCACTCGAAACTAATTTACTTAACTTATAACTATG GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLP5DEL F | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GTT CCAGGAGCTGGAAGGGTCAT |
| MLP5DEL LINKER 1 | GGTTAGAACCTTCCCACATGGAAGAT |
| MLP5DEL LINKER 2 | CTGTATAGTGCATTATCTGTGTGTGTGTTCC |
| MLP5DEL R | CATTCTGTCAAGTTCCTGTTTAC GATGCGATCCGATGCCTTCATG |

ДНК была выделена из цельной крови, забранной в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА с помощью набора реактивов для выделения Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) по протоколу производителя.

Для диагностики фенилкетонурии, обусловленной мутациями в гене *PAH* у российских больных в практику ФГБНУ «МГНЦ» были внедрены две медицинские технологии: «Детекция основных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции» (медицинская технология МТ_ФКУ9) и «Детекция десяти дополнительных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции» (медицинская технология МТ_ФКУ10). В основу данных технологий положена мультиплексная проба-зависимая лигазная реакция с последующей амплификацией (Multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA), представленная впервые в 2002 г. компанией-разработчиком MRC-Holland [10, 11].

Последовательности олигонуклеотидов, входящих в реакции, выбирали согласно базе данных GeneBank. В медицинской технологии МТ_ФКУ9 использованы последовательности гена *PAH*, фланкирующие мутации EX5del4154ins268 (с.442_509del), IVS12+1G>A (с.1315+1G>A), IVS10-11G>A (с.1066-11G>A), R252W (с.754C>T), P281L (с.842C>T), R261Q (с.782G>A), R158Q (с.473G>A), R408W (с.1222C>T), IVS4+5G>T (с.441+5G>T) (табл. 1).

В медицинской технологии МТ_ФКУ10 использованы последовательности гена *PAH*, фланкирующие мутации L48S(с.143T>C), A403V (с.1208C>T), Y414C (с.1241A>G), E280K (с.838G>A), E390G (с.1169A>G), R243Q (с.728G>A), R243X (с.727C>T), R261X (с.781C>T), IVS2+5G>A (с.168+5G>A), IVS2+5G>C (с.168+5G>C) (табл. 2).

Длина амплифицированных фрагментов системы МТ_ФКУ9 составляет от 83 до 149 п.н., системы МТ_ФКУ10 — от 80 до 144 п.н.

Таблица 2

Олигонуклеотиды, применявшиеся для детекции мутаций гена *PAH* в технологии МТ_ФКУ10

| Название олигонуклеотида | Последовательность олигонуклеотидов (5' → 3') |
|--------------------------|--|
| MLP48 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GTTTAA CTCACCTCAAAGAAGAAGTTGGTGCATT |
| MLP48 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GATA CACTCAAAGAAGAAGTTGGTGCATC |
| MLP48IVS2 L | GGCCAAAGTATTGCGCTTATTTGAGGTCA |
| MLPIVS2 RN | GTGCTACAATCATGTTTGTCTTGGATAATG GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLPIVS2 RM | ATGCTACAATCATGTTTGTCTTGGATAATGTC TC GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLPIVS2 RMC | CTGCTACAATCATGCTTGTCTTGGATAA ATTTATTTTC GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLP243 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GCACTGGTTTCCGCCTCC |
| MLP243 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC CTTGCACTGGTTTCCGCCTCT |
| MLP243 RN | GACCTGTGGCTGGCCTGC GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLP243 RM | AACCTGTGGCTGGCCTGCTTTC TC GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLP261 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GGGTGGCCTGGCCTTCC |
| MLP261 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC CTTGGGTGGCCTGGCCTTCT |
| MLP261 R | GAGTCTTCCACTGCACACAGTACATC TTC GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLP280 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GTTATCTTT CAAGCCCATGTATACCCCCG |
| MLP280 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GTTATCTTTAT CCAAGCCCATGTATACCCCCA |
| MLP280 R | AACCGTGAGTACTGTCTCCAGC TTTATTAC GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLP390 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC T CAGCCCCTCTATTACGTGGCAGA |
| MLP390 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GCCCCTCTATTACGTGGCAGG |
| MLP390 NN | CTCCATGCCAACAGTCGACATC T CAGCCCCTGTATTACGTGGCAGA |
| MLP390 MN | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GCCCCTGTATTACGTGGCAGG |
| MLP390 R | GAGTTTAAATGATGCCAAGGAGAAAGTAAG TC GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLP403 N | CTCCATGCCAACAGTCGACATC GTGGTTTTGGTCTTAGGAACTTTGC |
| MLP403 M | CTCCATGCCAACAGTCGACATC TT CTGTGGTTTTGGTCTTAGGAACTTTGT |
| MLP403414 L | TGCCACAATACCTCGGCCCTTCTCAGTTCGCT |
| MLP414 RN | ACGACCCATACACCCAAAGGATT GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLP414 RM | GCGACCCATACACCCAAAAG GATGCGATCCGATGCCTTCATG |
| MLP414 RMN | GCGACCCATACACCCAAA GATGCGATCCGATGCCTTCATG |

Лигазную реакцию проводили на программируемом термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия) с использованием ДНК-лигазы Pfu («Stratagene»).

Лигирование проводили в 5 мкл реакционной смеси, содержащей 1x реакционный буфер (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,1% Igepal, 0,01 mM ATP, 1 mM DTT), 28 специфичных проб, 0,04 единицы активности термофильной ДНК-лигазы, 0,1–1 мкг геномной ДНК.

Лигазную реакцию осуществляли в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 мин, затем лигирование при 59°C — 3 часа.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на программируемом термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия) с использованием ДНК-полимеразы Biotaq («БиоМастер») и пары универсальных праймеров (табл. 3).

ПЦР проводили по следующей схеме: в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 1x реакционный буфер (67 mM Tris-HCl, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Twin-20), 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого

дезоксинуклеозидтрифосфата, 1,5 единицы термофильной ДНК-полимеразы, добавляли 5 мкл лигата.

ПЦР проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 мин, затем 25 циклов смены температур: 94°C — 2 с, температура отжига праймеров 66°C — 2 с, элонгация цепи 72°C — 2 с; заключительная элонгация 72°C — 7 мин. Для проведения ПЦР использовали режим точной регуляции.

Продукт реакции детектировался методом вертикального электрофореза в 8% ПААГ (соотношение акриламида/бисакриламида 19/1). Результаты электрофореза визуализировали после окрашивания геля раствором бромистого этидия с помощью документирующей системы GelDoc фирмы BIO-RAD (США) в УФ-излучении с длиной волны 312 нм. Электрофореграмма представляет из себя полосы, соответствующие различным нормальным или мутантным аллелям гена. По наличию/отсутствию полос с длинами, соответствующих нормальной/мутантной последовательности судили о наличии/отсутствии конкретной мутации в генотипе пробанда (табл. 4, 5).

Таблица 3

Универсальные праймеры и условия амплификации, применяемые в технологиях МТ_ФКУ9 и МТ_ФКУ10

| Последовательность праймеров, 5' → 3' | t отжига |
|---|----------|
| F: CTC CATGCCAACAGTCGACATC R: CATGAAGGCATCGGATCGCATC | 66°C |

Таблица 4

Интерпретация результатов ДНК-диагностики ФКУ, полученных с использованием медицинской технологии МТ_ФКУ9

| Детектируемая мутация | Положение нуклеотида | Длина фрагмента | Интерпретация |
|----------------------------|----------------------|------------------|---------------|
| EX5del4154ins268 | с.442_509del | 149 | Мутация |
| | N | Не детектируется | Норма |
| IVS12+1G>A (с.1315+1G>A) | с.1315+1A | 139 | Мутация |
| | с.1315+1G | 135 | Норма |
| IVS10-11G>A (с.1066-11G>A) | с.1066-11A | 131 | Мутация |
| | с.1066-11G | 126 | Норма |
| R252W (с.754C>T) | с.754T | 121 | Мутация |
| | с.754C | 118 | Норма |
| P281L (с.842C>T) | с.842T | 114 | Мутация |
| | с.842C | 111 | Норма |
| R261Q (с.782G>A) | с.782A | 107 | Мутация |
| | с.782G | 104 | Норма |
| R158Q (с.473G>A) | с.473A | 100 | Мутация |
| | с.473G | 97 | Норма |
| R408W (с.1222C>T) | с.1222T | 93 | Мутация |
| | с.1222C | 89 | Норма |
| IVS4+5G>T (с.441+5G>T) | с.441+5T | 86 | Мутация |
| | с.441+5G | 83 | Норма |

Интерпретация результатов ДНК-диагностики ФКУ, полученных с использованием медицинской технологии МТ_ФКУ10

| Детектируемая мутация | Положение нуклеотида | Длина фрагмента | Интерпретация |
|-----------------------|----------------------|-----------------|---------------|
| IVS2+5G>C | с.168+5C | 144 | Мутация |
| IVS2+5G>A | с.168+5A | 140 | Мутация |
| [L48S]+[IVS2+5] | с.168+5G; с.143T | 136 | Норма |
| L48S | с.143C | 132 | Мутация |
| A403V | с.1208T | 128 | Мутация |
| [A403V]+[Y414C] | с.1208C; с.1241A | 124 | Норма |
| Y414C | с.1241G | 120 | Мутация |
| E280K | с.838A | 107 | Мутация |
| | с.838G | 104 | Норма |
| E390G | с.1169A | 100 | Норма |
| | с.1169G | 97 | Мутация |
| R261X | с.781T | 93 | Мутация |
| | с.781C | 90 | Норма |
| R243Q | с.728A | 86 | Мутация |
| R243X | с.727T | 83 | Мутация |
| [R243Q]+[R243X] | с.728G; с.727C | 80 | Норма |

Результаты и обсуждение

Всем 180 пробандам был проведен поиск мутаций в гене *PAH* с применением новых медицинских технологий. На рис. 1 и 2 представлены электрофореграммы, визуализирующие результаты детекции мутаций с использованием медицинских технологий МТ_ФКУ9 и МТ_ФКУ10. В системы были включены мутации, встречающиеся с наибольшими частотами у больных ФКУ, проживающих на территории РФ [9]. С целью повышения информативности технологий был проведен ретроспективный анализ результатов прямого автоматического секвенирования гена *PAH* у пробандов, обратившихся в лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» в период с 2005 по 2014 гг. По результатам анализа в технологию МТ_ФКУ9 была добавлена мутация EX5del4154ins268 (с.442_509del), а в технологию МТ_ФКУ10 мутации IVS2+5G>C, A403V и R243Q, которые неоднократно встретились у российских больных.

При использовании технологии МТ_ФКУ9 мутации были выявлены у 163 пробандов на 252 хромосомах. Диагноз подтвержден на молекулярно-генетическом уровне (выявлены две мутации гена *PAH*) у 89 больных, еще у 74 пробандов была обнаружена одна мутация. Таким образом, информативность диагностики ФКУ с использованием МТ_ФКУ9 составила 70% (выявлено аллелей с мутацией из общего числа исследуемых хромосом больных). Информативность данной системы оказалась несколько ниже ожидаемой на основании данных о частотах встречаемости мутаций у жителей центрального региона РФ [9]. Это может быть связано с тем, что

диагностика проводилась пробандам различных национальностей из различных регионов России. Известно, что для рецессивных заболеваний спектры и частоты мутаций в различных популяциях могут существенно варьировать, что связано, как правило, с локальными эффектами основателя [12].

Всем пробандам, у которых мутации не были детектированы на обеих хромосомах, было проведено дальнейшее исследование с использованием медицинской технологии МТ_ФКУ10. В итоге диагностики с использованием МТ_ФКУ9 и МТ_ФКУ10 у 117 больных были

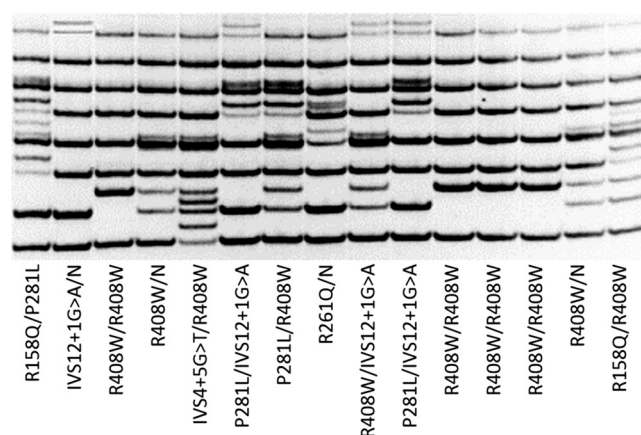


Рис. 1. Поиск мутаций гена *PAH* с использованием медицинской технологии МТ_ФКУ9. Генотипы, зарегистрированные в образцах, указаны под дорожками. Длины фрагментов, соответствующих нормальным и мутантным аллелям указаны в табл. 4.

Результаты ДНК-диагностики ФКУ с использованием медицинских технологий МТ_ФКУ9 и МТ_ФКУ10

| Технология | Мутация | Частота у больных центрального региона РФ (по данным [9]) | Частота выявления в данном исследовании | Информативность системы в данной работе |
|---------------------|---------------------------------|---|---|---|
| Технология МТ_ФКУ9 | EX5del4154ins268 (с.442_509del) | 0 | 0,003 | 70% |
| | IVS12+1G>A | 0,023 | 0,033 | |
| | IVS10-11G>A | 0,041 | 0,022 | |
| | R252W | 0,018 | 0,017 | |
| | P281L | 0,052 | 0,050 | |
| | R261Q | 0,033 | 0,053 | |
| | R158Q | 0,017 | 0,025 | |
| | R408W | 0,614 | 0,486 | |
| | IVS4+5G>T | 0,015 | 0,011 | |
| Технология МТ_ФКУ10 | IVS2+5G>C | 0 | 0,006 | 9,4% |
| | IVS2+5G>A | 0,005 | 0,003 | |
| | L48S | 0,008 | 0,017 | |
| | A403V | 0 | 0,011 | |
| | Y414C | 0,005 | 0,008 | |
| | E280K | 0,002 | 0,008 | |
| | E390G | 0,002 | 0,011 | |
| | R261X | 0,007 | 0,008 | |
| | R243Q | 0 | 0,008 | |
| R243X | 0,008 | 0,014 | | |
| ИТОГО | | 0,850 | 0,794 | 79,4% |

детектированы две мутации, еще в 52 случаях — одна мутация. Всего у 11 пробандов при использовании МТ_ФКУ9 и МТ_ФКУ10 мутаций выявить не удалось. Суммарная информативность медицинских технологий для молекулярно-генетической диагностики фенилкетонурии составила 79%. Хотя бы одна мутация была детектирована у 94% пробандов (табл. 6).

Был показано, что добавление в системы детекции четырех мутаций EX5del4154ins268 (с.442_509del), IVS2+5G>C, A403V и R243Q, повысило информативность ДНК-диагностики на 3%, т.е. позволило выявить мутацию гена *PAH* на 10 хромосомах больных.

Наиболее часто у больных встречалась мутация R408W(с.1222C>T), она была выявлена на 175 хромосомах (49%). С частотой 5% были выявлены мутации R261Q (с.782G>A)и P281L (с.842C>T) на 19 и 18 хромосомах. На долю мутаций IVS12+1G>A (с.1315+1G>A), R158Q (с.473G>A) и IVS10-11G>A (с.1066-11G>A) пришлось 3,3%, 2,5% и 2,2% соответственно. Все остальные мутации встретились менее чем на 2% хромосом. Необходимо отметить, что все входящие в медицинские технологии МТ_ФКУ9 и МТ_ФКУ10 мутации были зарегистрированы хотя бы у одного пробанда.

В результате работы было установлено, что новые медицинские технологии для диагностики фенилкетонурии обладают высокой информативностью. Высокая точность детекции мутаций обусловлена применением высокоспецифичного фермента ДНК-лигазы для детекции изменений нуклеотидной последовательности.

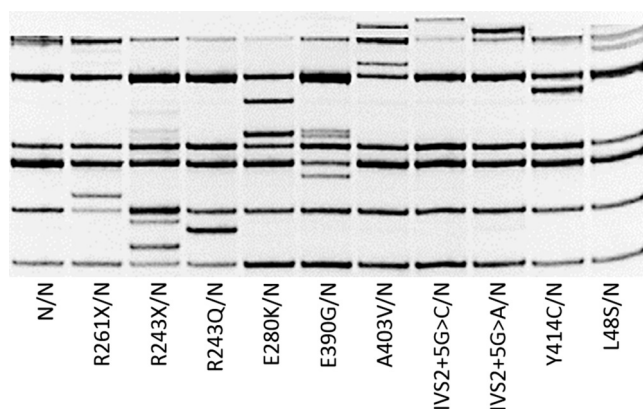


Рис. 2. Поиск мутаций гена *PAH* с использованием медицинской технологии МТ_ФКУ10.

Генотипы, зарегистрированные в образцах, указаны под дорожками. Длины фрагментов, соответствующих нормальным и мутантным аллелям, указаны в табл. 5.

Применение в диагностике ФКУ технологии «Детекция основных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции» и позволяет выявить мутацию не менее чем на 70% хромосом больных, а дополнительное использование технологии «Детекция десяти дополнительных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции» позволяет повысить информативность молекулярно-генетической диагностики заболевания до 79%.

Использование данных протоколов информативно для жителей центрального региона РФ, в то время как в некоторых республиках могут преобладать другие мутации гена *PAH*. Необходимость исследования спектра мутаций при частых рецессивных болезнях в различных регионах РФ и создание регион-адаптированных диагностических протоколов фенилкетонурии остается актуальной научной и практической задачей.

Впервые в России разработаны и внедрены в практику новые методики детекции мутаций гена *PAH*, ответственного за развитие фенилкетонурии, на основе мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции с последующей амплификацией.

Показаниями к использованию данных технологий являются:

1. Диагностика фенилкетонурии;
2. Прогнозирование тяжести течения заболевания;
3. Оптимизация диетотерапии в зависимости от агрессивности мутаций;
4. Диагностика гетерозиготного носительства ФКУ у родственников больного;
5. Проведение пренатальной диагностики;
6. Скрининг гетерозиготного носительства у доноров, участвующих в программе ЭКО.

Противопоказания для использования технологий МТ_ФКУ9 и МТ_ФКУ10 отсутствуют.

Использование данных технологий делает более эффективным медико-генетическое консультирование отягощенных семей, позволяет с наименьшими временными и материально-техническими затратами провести ДНК-диагностику фенилкетонурии, в том числе диагностику носительства для родственников пробанда и пренатальную диагностику в отягощенных семьях. Использование мультиплексной лигазной реакции позволяет наиболее точно и специфично детектировать все выбранные мутации в одной пробирке, что снижает стоимость анализа, время ожидания результата, трудоемкость исследования и вероятность случайных ошибок.

Знание генотипа пациента в настоящее время необходимо для подбора оптимальной симптоматической и патогенетической терапии фенилкетонурии.

Список литературы

1. Scriver CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet.* 1999 Jul;15(7):267-72.
2. Ozalp I, Coekun T, Tokatli A et al. Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future. *Turk J Pediatr.* 2001 Apr-Jun;43(2):97-101.
3. DiLella AG, Kwok SC, Ledley FD, et al. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry.* 1986 Feb 25; 25(4):743-9.
4. Wang L, Gamez A, Sarkissian CN et al. Structure-based chemical modification strategy for enzyme replacement treatment of phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2005 Sep-Oct;86(1-2):134-40. Epub 2005 Jul 11.
5. Aoki K, Wada Y. Outcome of the patients detected by newborn screening in Japan. *Acta Paediatr Jpn.* 1988 Aug; 30(4):429-34.
6. Новиков П.В., Николаева Е.А., Поляков А.В., Куцев С.И., Намазова-Баранова Л.С., Боровик Т.Э., Бушуева Т.В., Ладодо К.С., Кузенкова Л.М., Матулевич С.А., Голихина Т.А., Денисенкова Е.В., Бакулина Е.Г., Назаренко Л.П., Лязина Л.В., Романенко О.П. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению фенилкетонурии. — М., 2015. — С.6.
7. <http://www.pahdb.mcgill.ca> — PAH db World Wide Website — официальный сайт международного консорциума по изучению фенилкетонурии. Ссылка активна на 18.03.2016
8. 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.
9. Степанова АА, Тверская СМ, Зинченко РА, Поляков АВ. Молекулярно-генетическое исследование гена фенилаланин-гидроксилазы в группе российских больных фенилкетонурией. *Медицинская генетика.* 2006; 5 (2): 32-39.
10. Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis.* 2008 Dec; 29(23):4627-36.
11. Степанова АА, Соколова МС, Тверская СМ, Поляков АВ. Использование метода аллель специфичного лигирования с последующей амплификацией для регистрации наиболее частых мутаций в гене PAH. *Медицинская генетика.* 2010; 9(11): 22-26.
12. Зинченко РА, Гинтер ЕК. Особенности медико-генетического консультирования в различных популяциях и этнических группах. *Медицинская генетика.* 2008; 7(10): 20-29

Информация о конфликте интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Results of the new medical technologies

«Detection of major *PAH* gene point mutations by multiplex ligase reaction»
and «Detection of ten additional mutations in *PAH* gene by multiplex ligase reaction»
application in the DNA-diagnostics of phenylketonuria

Gundorova P., Stepanova A.A., Shchagina O.A., Polyakov A.V.

Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics»,
115409, Moscow, Moskvorechie 1, e-mail: polyakov@med-gen.ru

The molecular genetic study of 180 probands with phenylketonuria, directed to the DNA-diagnostics laboratory of FSBI «RCMG» in the period from 10.01.2015 to 01.02.2016. New medical technologies embedded into practice FSBI «RCMG» were used for DNA diagnostics. It was found that the application of these technologies makes the medical and genetic counseling of families more effective. It allows to make a diagnosis in a short time and with less logistical costs. Also it is used for carrier diagnostics for the relatives of the proband and prenatal diagnosis in burdened families.

Keywords: phenylketonuria, DNA diagnostics, medical technology, multiplex ligase reaction