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

- **Повреждении в гене фенилаланингидроксилазы (*PAH*)**
- **98%**

Атипичная

- **Повреждения в генах синтеза и обмена тетрогидробиоптерина (BH4) (*PTS*, *QDPR* и др.)**
- **2%**

Phenylalanine hydroxylase (PAH) mutation map

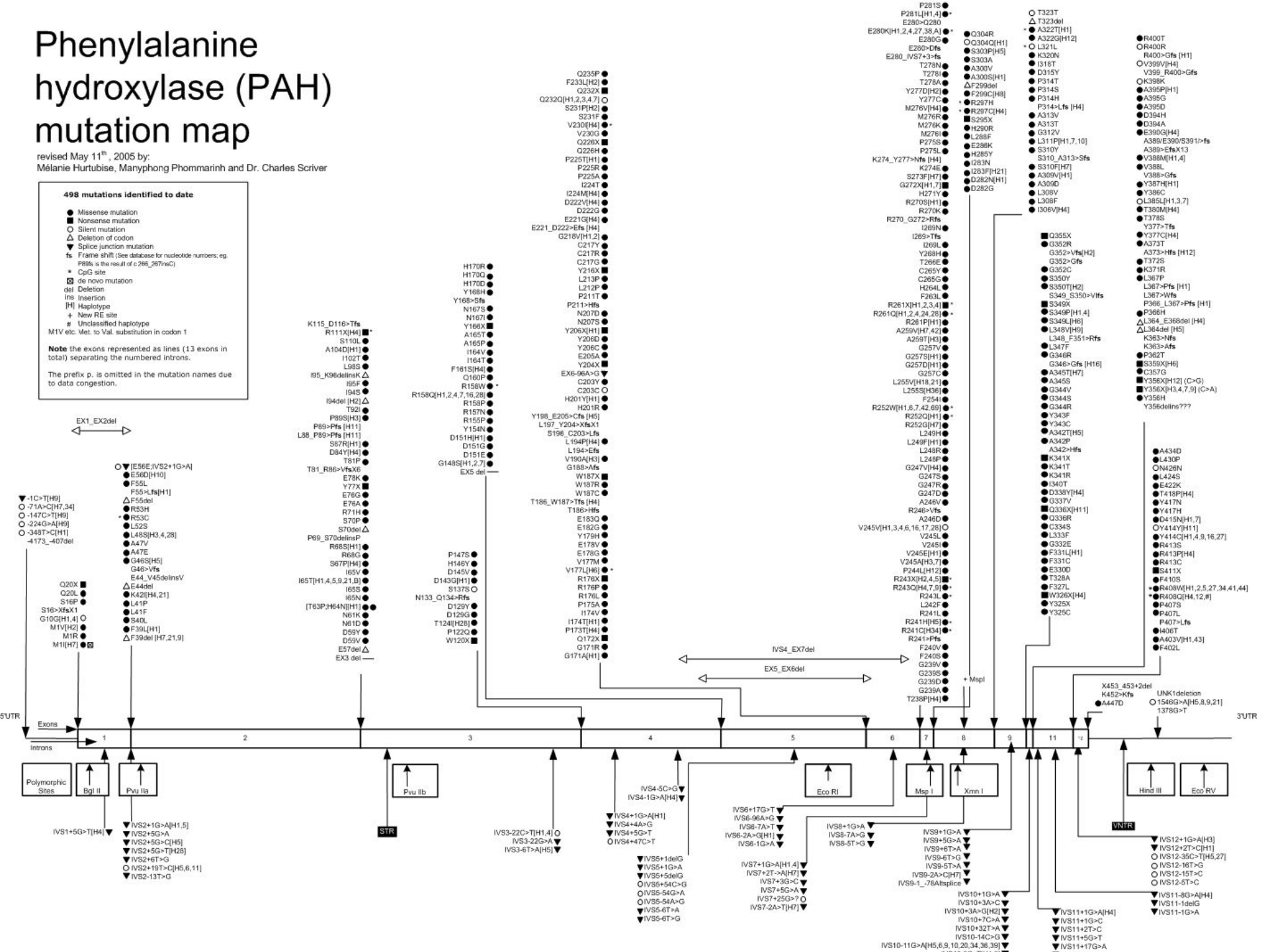
revised May 11th, 2005 by:
Mélanie Hurtubise, Manyphong Phommarinh and Dr. Charles Scriver

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. P89fs is the result of c.266_267insC)
- * 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

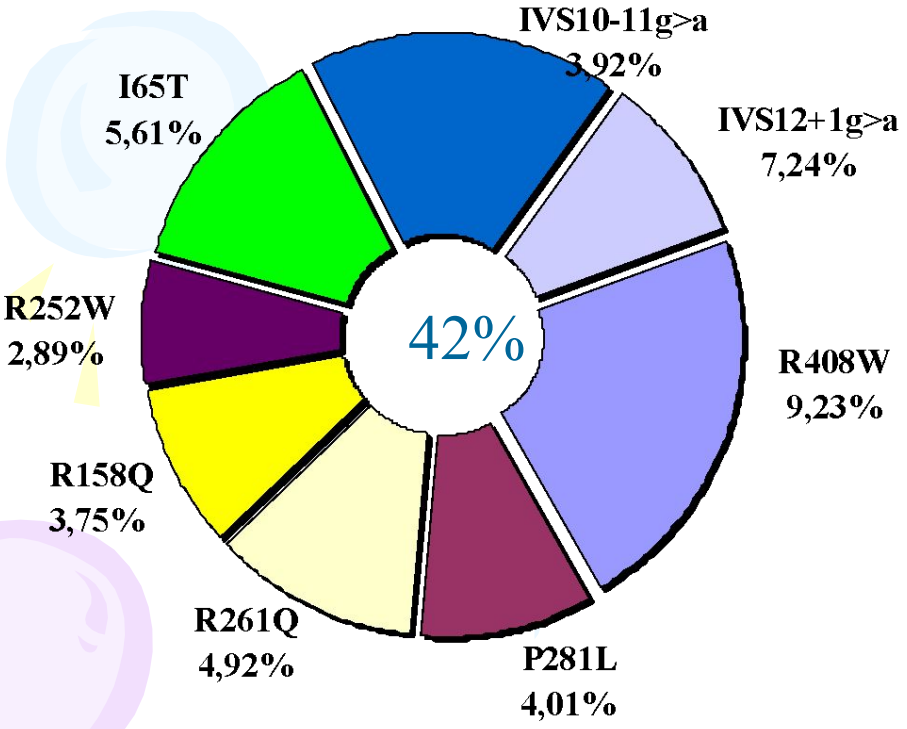
Note the exons represented as lines (13 exons in total) separating the numbered introns.

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

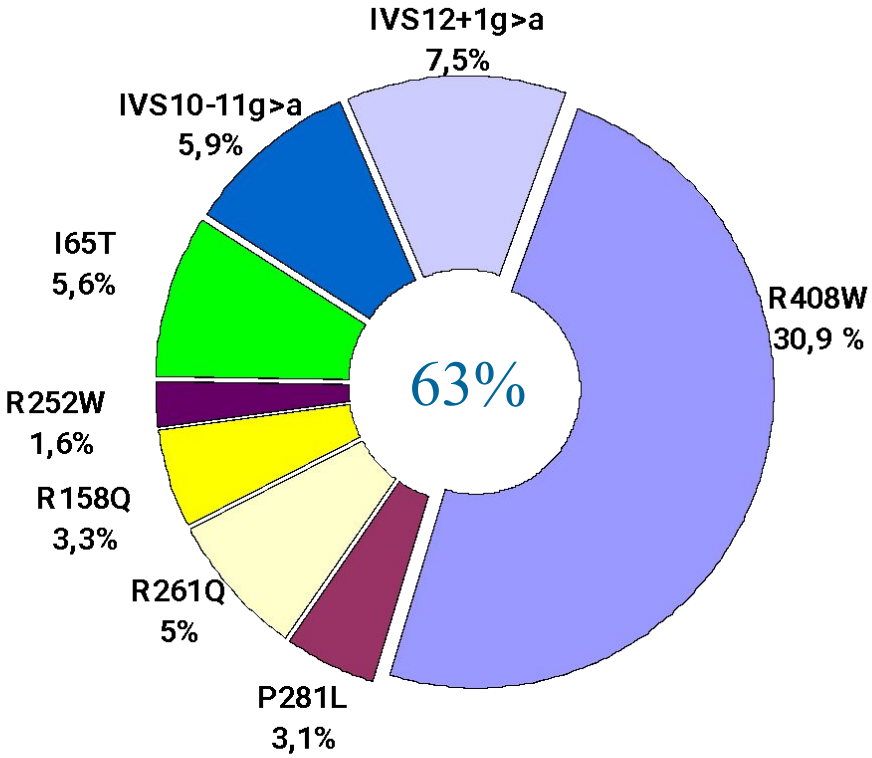


Частота встречаемости наиболее частых мутаций среди больных

в мире
(http://data.mch.mcgill.ca/pahdb)

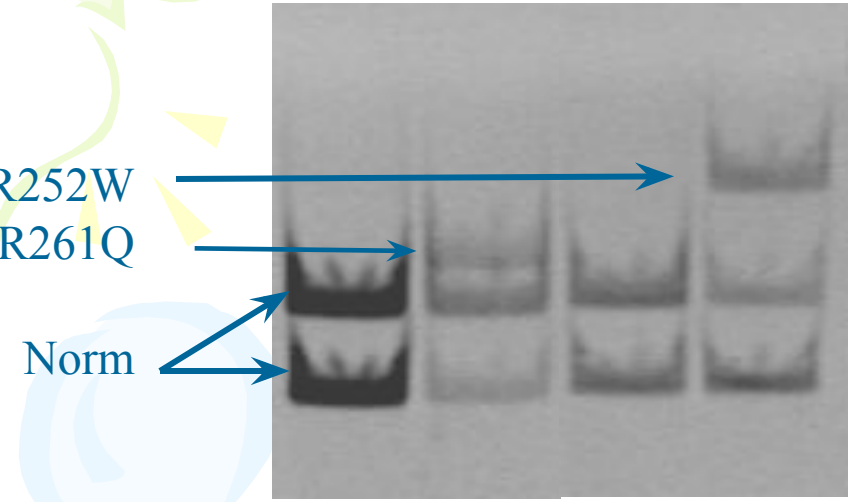


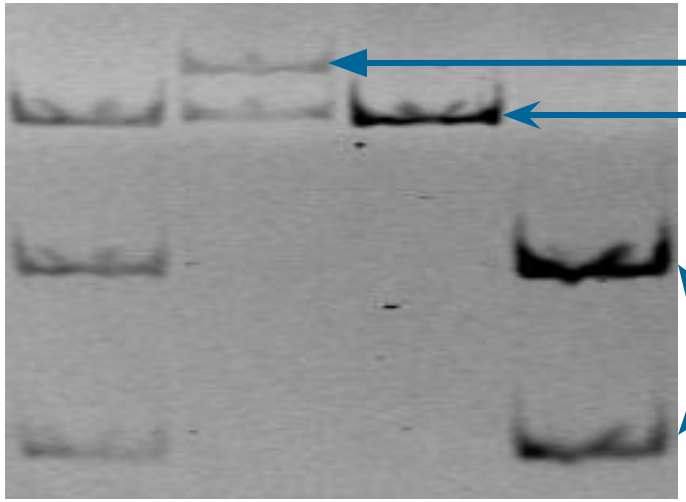
в Европейских популяциях (Zschocke J., 2003)



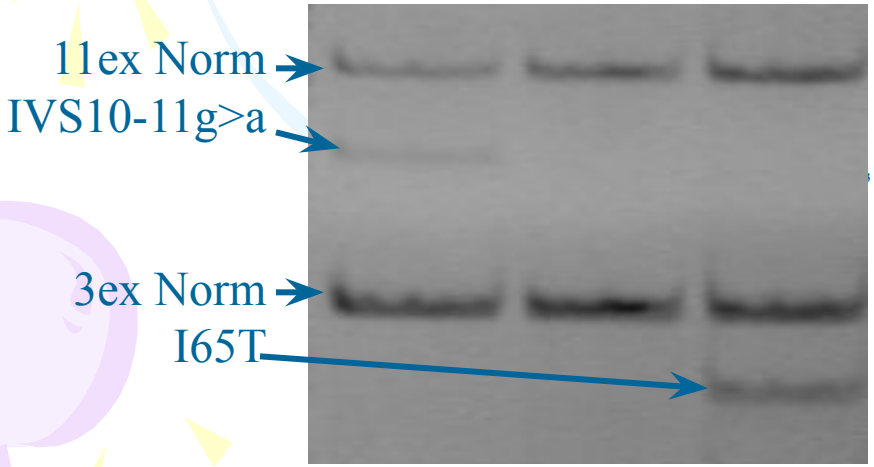
Система регистрации наиболее частых мутаций

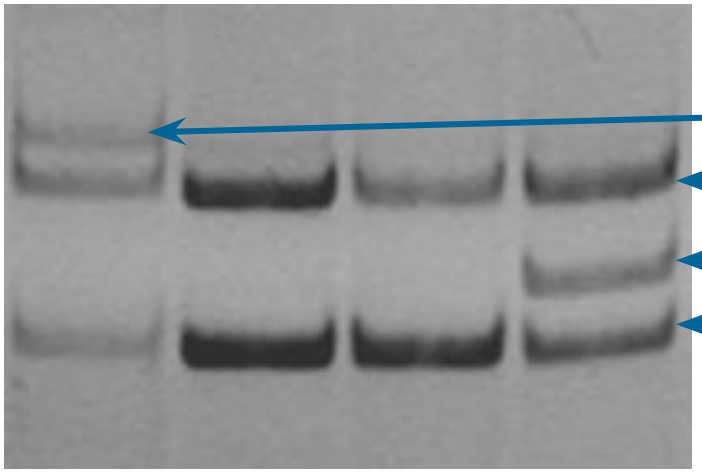
А) одна пара праймеров и две эндонуклеазы рестрикции





Б) две пары праймеров и одна эндонуклеаза рестрикции

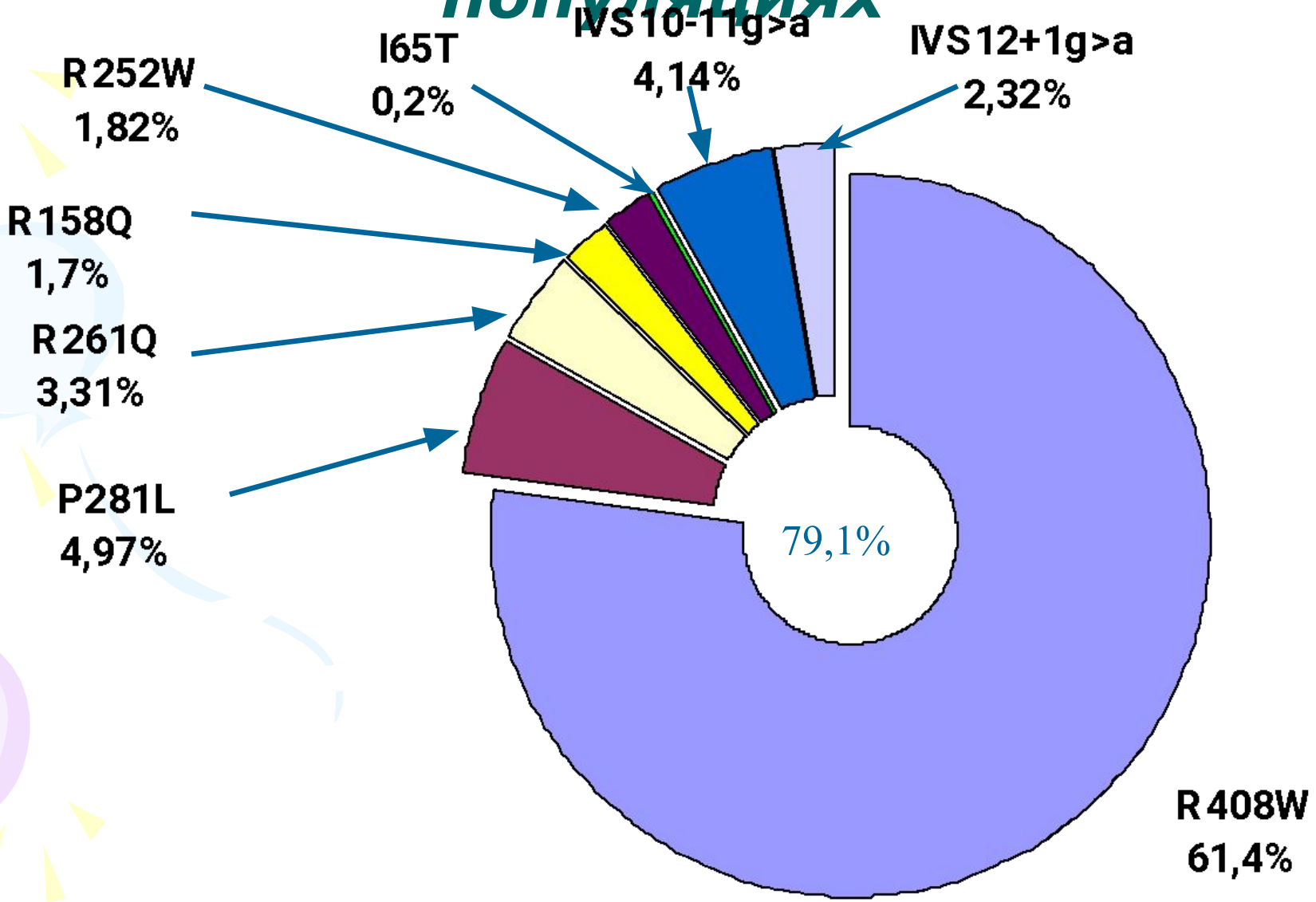




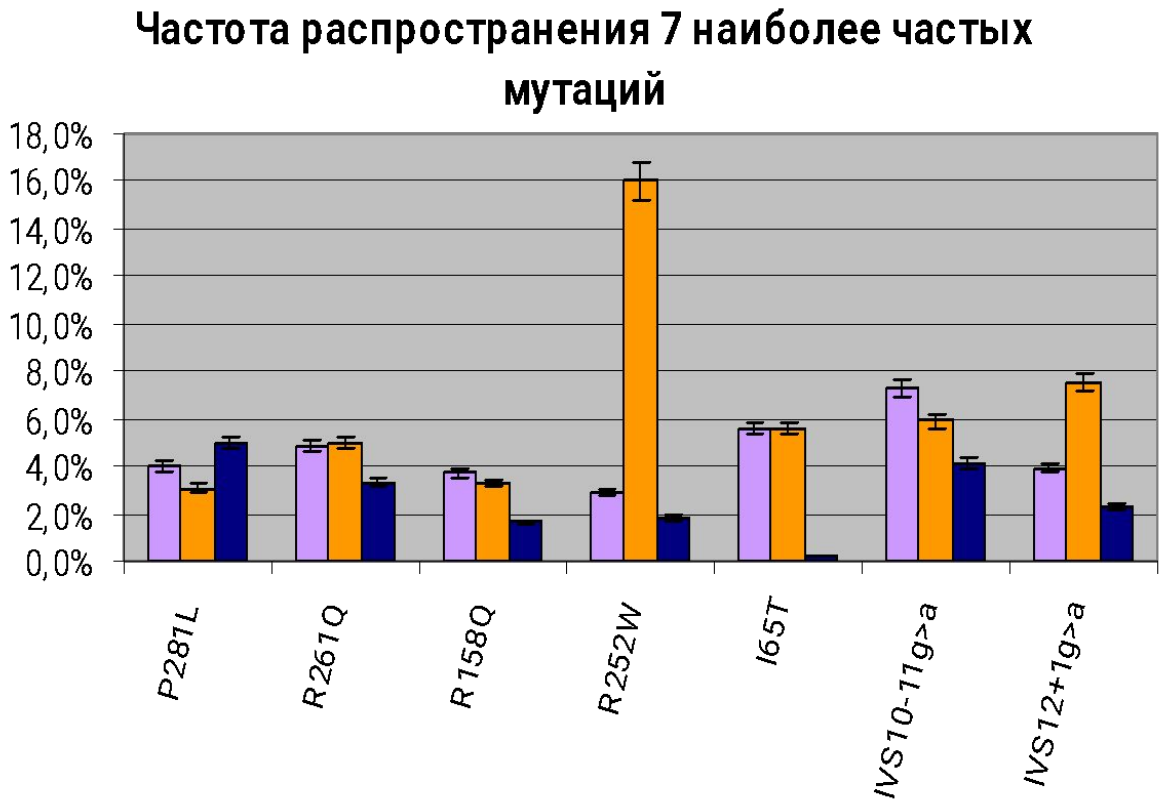
Структура выборки (N=302)

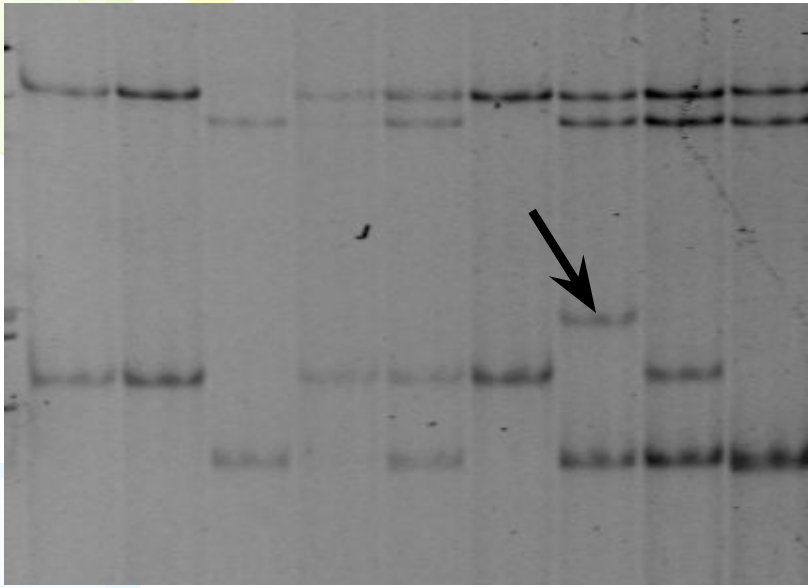
•Воронежская область	•46 человек
•Свердловская область	•33 человека
•Самарская область	•23 человека
•Курская область	•23 человека
•Вологодская область	•20 человек
•Архангельская область	•24 человека
•Удмуртия	•28 человек
•Московская область	•47 человек
•Пациенты научно-консультативного отделение ГУ МГНЦ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

Частота встречаемости наиболее частых мутаций в Российских популяциях



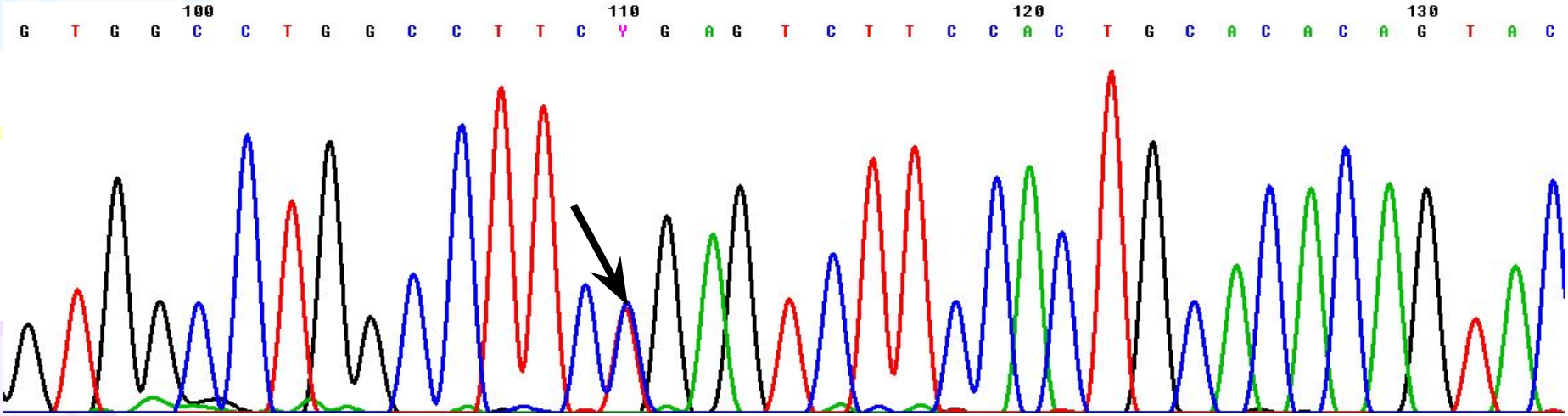
Частота распространения наиболее частых мутаций в мире, в Европейских популяциях и в исследуемых российских популяциях больных ФКУ





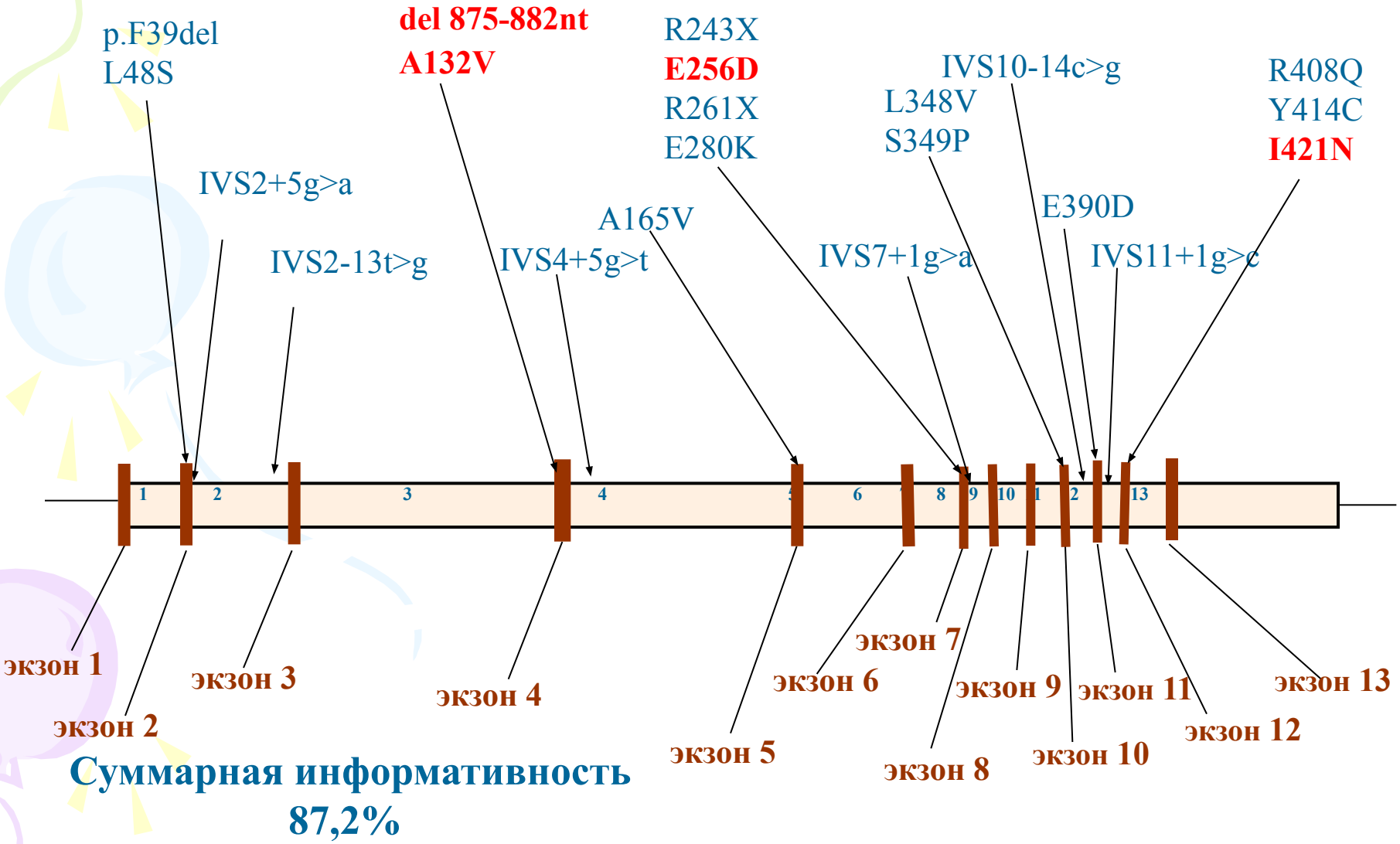
SSCP-анализ экзона 7 гена *PAH*

Стрелкой обозначено изменение электрофоретической Подвижности соответствующее мутации R261X.



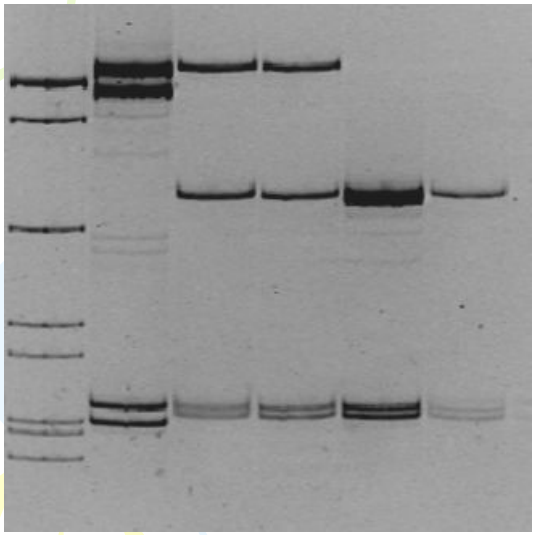
Фрагмент сиквенса экзона 7 гена *PAH*, образца ДНК больного ФКУ из Воронежской области. Замена G на T в 781 основании гена *PAH* приводящая к преждевременному стоп кодону в 261 кодоне (Arg261Stop). **Стрелкой обозначена мутация R261X.**

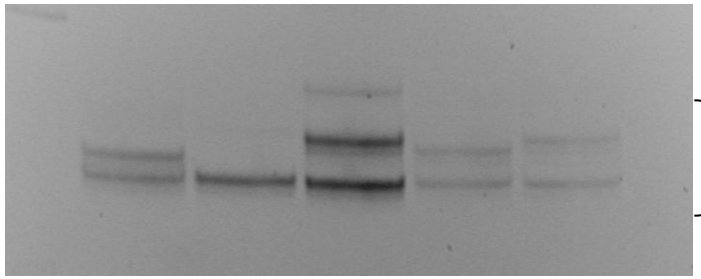
Структура гена PAH и локализация обнаруженных мутаций в гене PAH

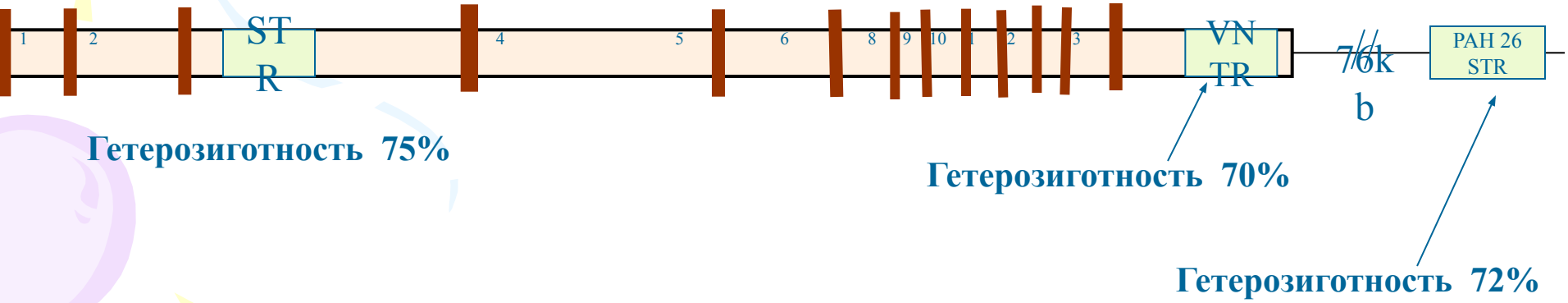


Суммарная информативность 87,2%

Полиморфные маркеры внутри и непосредственной близости от гена PAH



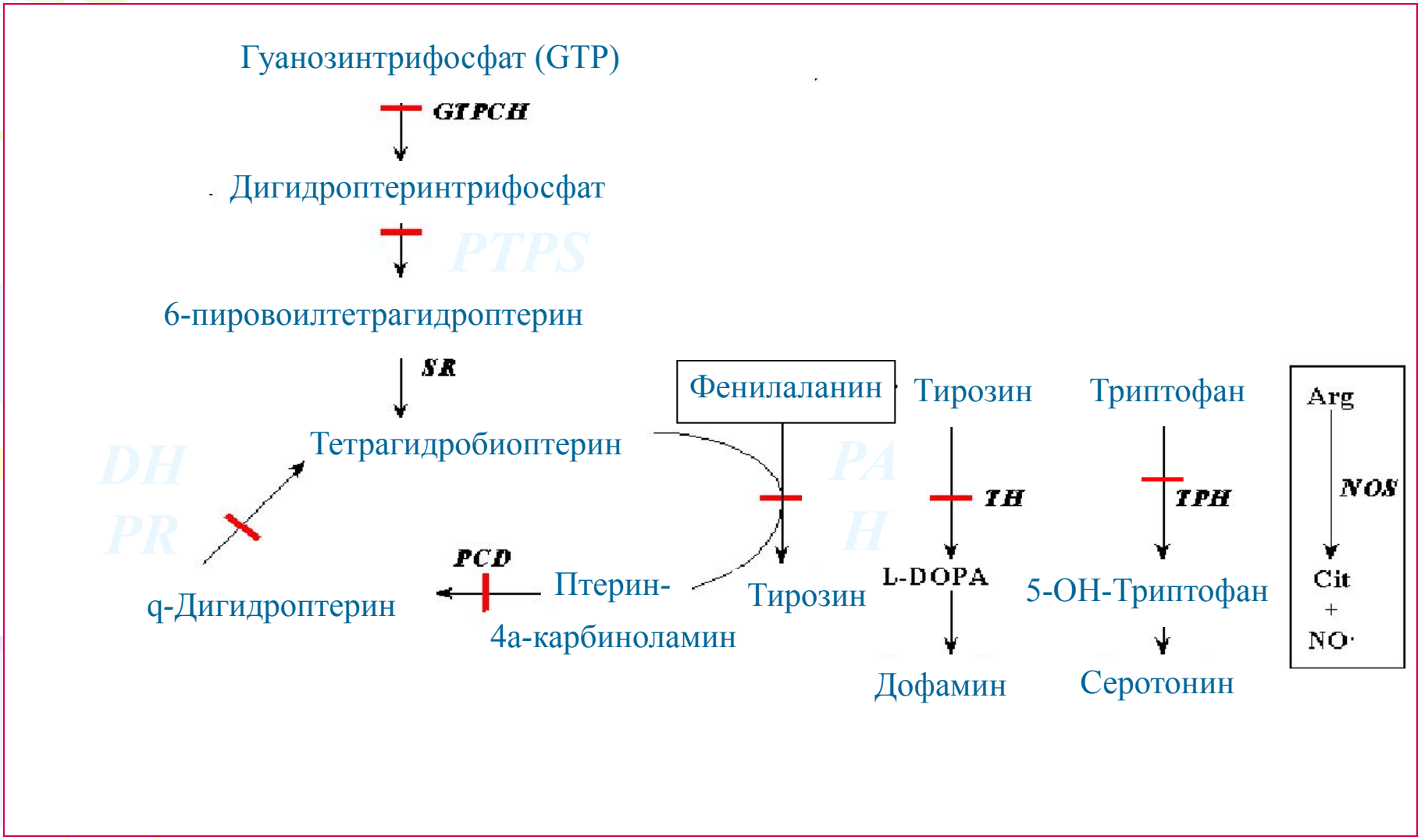


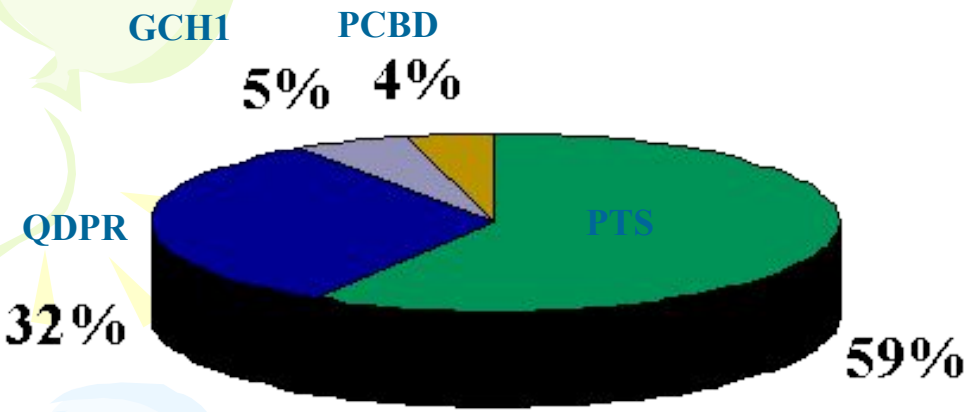


Исследование в гене *PAH*

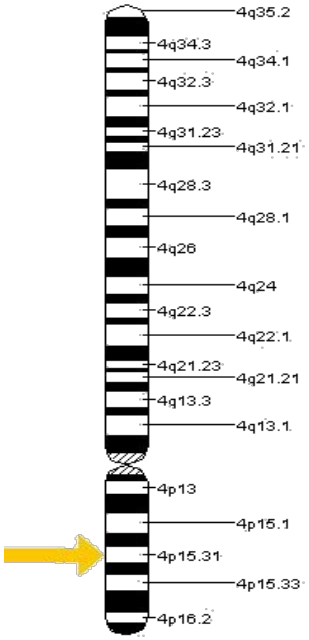
	Количество человек
Обнаружены обе мутации в гене *PAH*	233
Обнаружены одна мутация в гене *PAH*	58
Мутаций в гене *PAH* не обнаружены	11

Синтез и метаболизм тетрагидробиоптерина

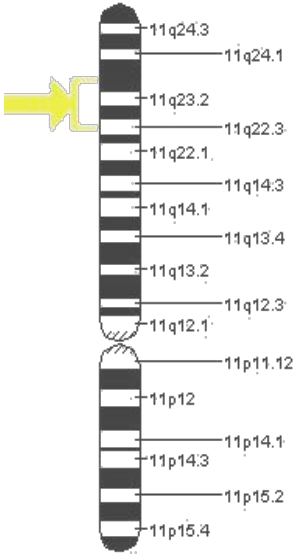




Ген *QDPR* локализован на хромосоме 4 в районе p15.3

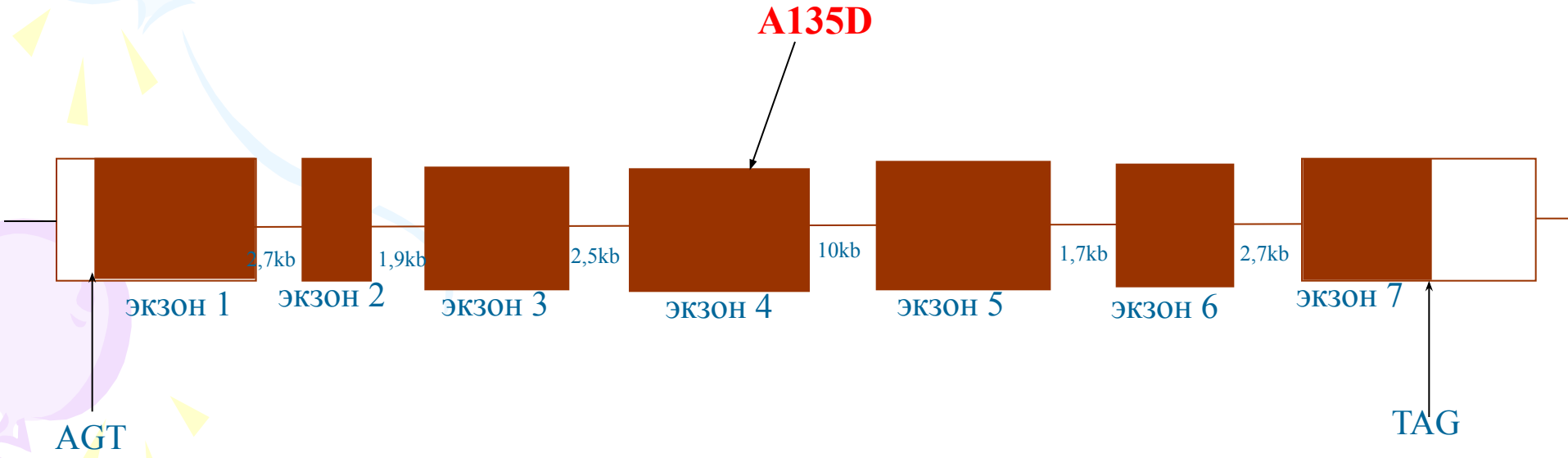


Ген *PTS* расположен хромосоме 11 в районе q22.3-23.3

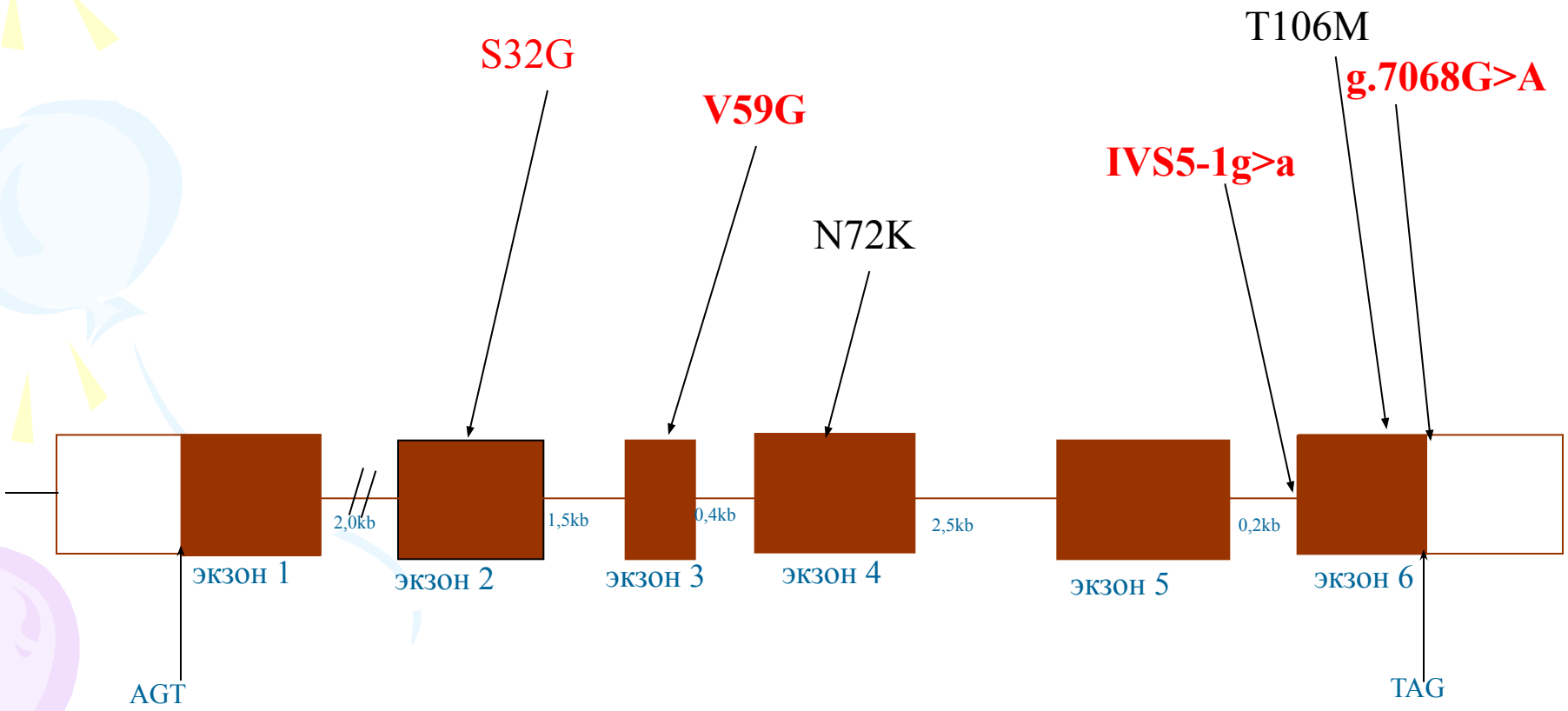


Структура гена QDPR и локализация обнаруженных мутаций в гене QDPR

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



Структура и локализация обнаруженных мутаций в гене PTS



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

Диета с пониженным содержанием ФА

Комбинированное лечение

- диета с пониженным содержанием ФА
- медиаторы
- ВН4

Больной ВН4-зависимой формой ГФА

Умственная отсталость и тяжелые неврологические нарушения

Отсутствие неврологической симптоматики

Практическое применение

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

- **216 диагностики гетерозиготного носительства мутаций в гене *PAH*:**
  - **162 диагностики провели для индивидов, не имеющих в семье больного ФКУ (планирование беременности):обнаружено 4 гетерозиготных носителя мутаций в гене *PAH***
  - **54 диагностики в семьях больных ФКУ: обнаружено 26 гетерозиготных носителя мутаций в гене *PAH***

- **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 *PAH***

Практическое применение

Методом SSCP-анализа с последующим секвенированием проведена

- **Диагностика недостаточности тетрагидробиоптерина:**
  - **Подтвержден диагноз «BH4 – зависимая форма ГФА», найдены мутации в гене *PTS***

Схема молекулярно-генетической диагностики гиперфенилаланинемии