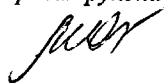


На правах рукописи



ОРАЗГАЛИЕВА МАДИНА ГИНИЯТОВНА

**АНАЛИЗ ГЕНА ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗЫ
У БОЛЬНЫХ ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ И В ПОПУЛЯЦИЯХ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

03.00.15 – генетика

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Уфа – 2005

Работа выполнена в лаборатории медицинской генетики Республиканского научно-исследовательского центра охраны здоровья матери и ребенка Министерства здравоохранения Республики Казахстан и в лаборатории молекулярной генетики человека отдела геномики Института биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор
Святова Гульнара Салаватовна

Научный консультант доктор биологических наук, профессор
Хуснутдинова Эльза Камилевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Спицын В.А.
доктор медицинских наук, профессор
Викторова Т.В.

Ведущая организация: Институт общей генетики им.
Н.И. Вавилова РАН

Защита диссертации состоится «23» декабря 2005 г.
в _____ часов на заседании Регионального диссертационного совета КМ
002.133.01 при Институте биохимии и генетики УНЦ РАН по адресу:
450054, Уфа, просп. Октября, 71.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Уфимского
научного центра РАН

Автореферат разослан «26» января 2005 г.

Ученый секретарь
Регионального диссертационного совета

Бикбулатова С.М.

2006-4
29914

2263788

3

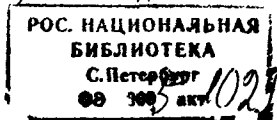
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Фенилкетонурия (ФКУ) - одно из наиболее распространенных тяжелых аутосомно-рецессивных заболеваний, обусловленное наследственным дефектом фермента фенилаланингидроксилазы (PAH). Вследствие накопления и токсического действия фенилаланина и его производных на ткани и, прежде всего, клетки головного мозга, заболевание характеризуется высокой степенью слабоумия и тяжелыми психическими расстройствами, развивающимися у больных при отсутствии бесфенилаланиновой диеты с первых дней жизни. С введением в практику здравоохранения различных стран мира массового обследования на ФКУ стало возможным изучить частоту и популяционно-генетические аспекты данного наследственного заболевания. Частота ФКУ среди новорожденных по данным массового скрининга в различных странах составляет в среднем 1:10 000, значительно варьируя в зависимости от популяции от 1:4170 до 1:80500 новорожденных (Özalp et al., 2001; Toshiyuki et al., 2001; Zschocke J., 2003).

Классическая фенилкетонурия вызвана мутациями в гене фенилаланингидроксилазы (PAH), локализуемом на длинном плече 12 хромосомы в области q22-q24 (Lidsky et al., 1985). В настоящее время в гене PAH выявлено более 490 различных мутаций (<http://www.pahdb/mcgill.ca>), являющихся причиной заболевания (Scriver et al., 2003).

Различные популяции мира имеют выраженную генетическую гетерогенность по частоте и характеру мутаций гена PAH (Rey et al., 1988; Scriver et al., 1989; Okano et al., 1990, 1998; Eisensmith et al., 1992; Барановская и др., 1995; Смагулова и др., 2000; Ахметова, 2004; Степанова, 2005), что находит отражение в особенностях клинического течения, диагностики и лечения фенилкетонурии. Поэтому в каждой конкретной популяции необходимо изучать свой спектр и частоты мутаций гена PAH для наиболее эффективной организации медико-генетической службы с целью ранней диагностики и профилактики этого тяжелого наследственного заболевания (Горбунова, Баранов, 1997).

В интронах гена PAH локализованы более 10 ПДРФ-локусов и высокополиморфные мини- и микросателлитные повторы (VNTR и STR), гаплотипы по которым отличаются высокой степенью гетерозиготности и выраженным неравновесием по сцеплению с определенными мутациями гена PAH (Eisensmith et al., 1992, 1995; Tighe O., 2003). Все это делает анализ поли-



морфных локусов гена высокоинформативным для проведения пренатальной диагностики и скрининга ФКУ в большинстве популяций. В то же время необходимо отметить, что популяционное разнообразие частот встречаемости аллелей полиморфных локусов гена *PAH* предполагает обязательное предварительное популяционно-генетическое изучение особенностей полиморфизма данных локусов в выборке здоровых индивидов - жителей исследуемого региона с учетом их этнической принадлежности.

Цель исследования: изучение мутаций и анализ полиморфных локусов в гене фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией, в семьях высокого риска и в популяциях Республики Казахстан.

Задачи:

1. Изучить распространенность фенилкетонурии в Республике Казахстан по данным ретроспективного анализа и массового неонатального скрининга.
2. Исследовать спектр мутаций в гене фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией из Республики Казахстан.
3. Провести анализ распределения частот аллелей и генотипов *VNTR*, *MspI(a)*, *STR* и *PvuII(a)* локусов гена фенилаланингидроксилазы в популяциях Казахстана.
4. Проанализировать распределение частот гаплотипов по локусам *VNTR*, *MspI(a)*, *STR* и *PvuII(a)* гена фенилаланингидроксилазы в неотягощенных ФКУ семьях.
5. Провести сравнительный анализ распределения частот аллелей и гаплотипов полиморфных ДНК-локусов *VNTR*, *MspI(a)*, *STR* и *PvuII(a)* на нормальных и мутантных хромосомах, оценить степень ассоциации мутаций гена фенилаланингидроксилазы с определенными аллелями и гаплотипами в семьях больных фенилкетонурией.
6. Разработать алгоритм молекулярно-генетической диагностики фенилкетонурии в Республике Казахстан.

Научная новизна: Впервые определена распространенность фенилкетонурии в различных этнических группах, проживающих в Казахстане, по данным ретроспективного анализа и массового неонатального скрининга. Впервые для популяций русских и казахов из Республики Казахстан проанализированы частоты и спектр наиболее распространенных диагностически значимых мутаций гена *PAH*. Впервые проведено исследование частот аллелей и гаплотипов полиморфных локусов *VNTR*, *MspI(a)*, *STR* и *PvuII(a)*

гена фенилаланингидроксилазы и определена степень их ассоциации с мутациями в гене *PAH* у больных ФКУ казахской и русской этнической принадлежности, проживающих в Казахстане, что позволило определить информативность и диагностическую ценность данных полиморфных локусов для косвенной ДНК-диагностики фенилкетонурии в РК.

Научно-практическая значимость: Полученные нами данные о распространенности ФКУ могут быть использованы для оценки генетического груза в Республике Казахстан. По результатам молекулярно-генетического анализа определена информативность отягощенных по ФКУ семей для пренатальной диагностики, сформирован контингент пациентов, нуждающихся в ее проведении. На основании результатов исследования спектра мутаций, частот аллелей и гаплотипов полиморфных ДНК-локусов *VNTR*, *MspI(a)*, *STR* и *PvuII(a)* гена *PAH* разработан алгоритм пре- и постнатальной диагностики и профилактики ФКУ в Республике Казахстан.

Положения, выносимые на защиту:

1. Частота и распространенность ФКУ в этнических группах русских и казахов.
2. Идентификация и частота 4 мутаций в гене *PAH* у больных ФКУ из Республики Казахстан.
3. Достоверные различия по распределению частот аллелей и генотипов полиморфных локусов *MspI(a)*, *VNTR* и *STR* гена *PAH* в популяциях русских и казахов между собой и с популяциями Европы и Азии.
4. Достоверные различия по распределению частот аллелей и гаплотипов полиморфных локусов *VNTR*, *MspI(a)*, *STR* и *PvuII(a)* гена *PAH* между нормальными и мутантными хромосомами в семьях больных фенилкетонурией из Казахстана.
5. Ассоциация обнаруженных мутаций гена *PAH* с определенными гаплотипами по полиморфным локусам *VNTR*, *MspI(a)*, *STR* и *PvuII(a)* гена *PAH*.
6. Информативность прямой и косвенной ДНК-диагностики для семей с ФКУ из Республики Казахстан.
7. Разработка алгоритма молекулярно-генетической диагностики фенилкетонурии в Республике Казахстан.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на Международной научной конференции «Актуальные проблемы акушерства, гинекологии и перинатологии»,

Алматы, 2003; на V Съезде Российского общества медицинских генетиков, Уфа, 2005; на семинаре отдела геномики Института биохимии и генетики УНЦ РАН. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 169 страницах машинописного текста и включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и обсуждение собственных исследований, заключение, выводы. Указатель литературы содержит 187 источников: 38 отечественных, 149 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 38 таблицами и 28 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования. Материалом для исследования послужили образцы ДНК больных с клиническим диагнозом фенилкетонурия, состоящих на учете в специализированных учреждениях здравоохранения Республики Казахстан (РК). Обследовано 25 больных фенилкетонурией из 20 семей. В качестве контроля была исследована выборка здоровых доноров - жителей Республики Казахстан, включающая 201 неродственных представителей казахской этнической принадлежности (выборка набиралась из представителей всех трех казахских жузов), 60 неродственных представителей русской этнической принадлежности. Для анализа распределения частот гаплотипов полиморфных локусов гена *PAH* на нормальных хромосомах было исследовано 30 русских и 30 казахских семей, проживающих на территории Республики Казахстан.

Методы исследования. Выделение ДНК из периферической крови исследуемых проводилось солевым методом с последующей фенол-хлороформной очисткой и тестированием на 3% агарозном геле с различными концентрациями фага λ , рестрицированного *Pst*I.

Для поиска мутаций *165T*, *IVS10nt546*, *R261Q*, *R261P*, *R252W*, *R252G*, *R252Q*, *R408W*, *IVS12nt1*, *R158Q*, *P281L* гена *PAH* использовали диагностический набор праймеров и рестриктаз PCU-8 производства ООО "Центр молекулярной генетики", г. Москва. Суммарная информативность данного набора для усредненной российской популяции составляет 79,8% от общего числа мутантных хромосом (Степанова А.А., 2005). Генотипирование аллелей полиморфных локусов *VNTR*, *MspI(a)*, *STR* и *PvuII(a)* гена *PAH* прово-

дили путем амплификации ДНК с применением специфичных олигонуклеотидных праймеров. Для локусов *MspI(a)* и *PvuII(a)* использовали ПДРФ-анализ специфичными рестриктазами производства НПО «Fermentas». Продукты амплификации и ПДРФ-анализа анализировали с помощью электрофореза в 7-8% ПААГ с последующим окрашиванием гелей бромистым этидием и визуализацией ДНК-фрагментов в УФ-свете.

Дальнейшее исследование образцов ДНК на наличие мутаций и полиморфизмов проводили методом анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (SSCP) (Orita et al., 1989). Определение последовательности нуклеотидов образцов ДНК, у которых были обнаружены изменения электрофоретической подвижности при SSCP-анализе, проводили с помощью секвенирования ДНК на автоматическом секвенаторе ABI Prism модель 310 (Applied Biosystems).

Статистическая обработка полученных данных. Математическую обработку результатов исследования проводили на ПЭВМ с использованием пакетов статистических программ "Statistica v.6.0", "Rows and Columns" (RXC), BIOSYS-1 (Swofford and Selinger, 1981) и с применением программного обеспечения Microsoft Excel'2000. Для расчета генетических расстояний между популяциями использовали метод Нея (Nei, 1983, 1987), основанный на частотах аллелей аутосомных локусов. Филогенетические деревья создавались при помощи стандартного алгоритма кластеризации программы Statistica 6.0. Величину аллельной ассоциации оценивали по коэффициенту стандартного неравновесия Δst (Krawczak et al., 1988).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые проведено комплексное изучение тяжелого наследственного заболевания – фенилкетонурии, в Республике Казахстан, включающее определение распространенности заболевания, спектра и частот мутаций, а также анализ полиморфизма ДНК локусов гена *PAH* для разработки алгоритма молекулярно-генетической диагностики ФКУ в Казахстане.

Распространенность фенилкетонурии в Республике Казахстан

С целью определения распространенности фенилкетонурии в Республике Казахстан были проанализированы данные массового неонатального

скрининга в г. Алматы, проводившегося с 1989 по 1996 годы. За эти годы в среднем 80-90% новорожденных было охвачено скринингом, частота ФКУ по данным массового скрининга новорожденных в г. Алматы составила 1:6980. В свою очередь, учитывая численность этнических групп г. Алматы по данным переписи населения 1999 г. и этническую принадлежность выявленных в г. Алматы больных ФКУ (13 из 20 семей), распространенность болезни в этнических группах составила: у русских - 1,56, у казахов - 0,69 на 100 000 населения (табл. 1).

Таблица 1

Частота встречаемости ФКУ в различных этнических группах г. Алматы

Этнические группы –	Казахи	Русские	Азербайджанцы	Уйгуры
Численность населения в г. Алматы	434397	510366	6529	60427
Количество выявленных семей с ФКУ	3	8	1	1
Количество больных ФКУ	3	10	2	1
Распространенность ФКУ на 100 000 населения	0,69	1,56	15,32	1,65
Частота встречаемости ФКУ	1:144 799	1: 63 796	1:6 529	1:60 427

Этнический состав выявленных семей составляет: 65% - русские, 25% - казахи, и по 5% - азербайджанцы и уйгуры. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что фенилкетонурия распространена в популяциях РК неравномерно и встречается в этнической группе русских чаще, чем у казахов. Малочисленность этнических групп азербайджанцев и уйгур в г. Алматы не дает возможности судить о реальной частоте ФКУ в этих популяциях.

Исследование мутаций в гене фенилаланингидроксилазы

Использование диагностического набора праймеров и рестриктаз PCU-8 для анализа 11 распространенных мутаций гена *PAH* и SSCP-анализа 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12 экзонов гена *PAH* с последующим секвенированием позволило выявить на 52,5% поврежденных хромосом четыре различные мутации (табл. 2) и один нейтральный полиморфизм.

Таблица 2.

Спектр мутаций гена *PAH* в этнических группах РК

Мутация гена <i>PAH</i>	Казахи		Русские		В общей выборке	
	Кол-во хромосом	Частота	Кол-во хромосом	Частота	Кол-во хромосом	Частота
<i>R408W</i>	2	0,200	11	0,423	13	0,325
<i>R261Q</i>	2	0,200	2	0,077	4	0,100
<i>IVS12nt1</i>	1	0,100	1	0,038	2	0,050
<i>IVS10nt546</i>	0	0	2	0,077	2	0,050
X	5	0,500	10	0,385	19	0,475
Всего	10		26		40	

Примечание: X – неизвестная мутация гена.

Наиболее распространенная мутация *R408W* обнаружена на 13 из 40 мутантных хромосом, что составляет 32,5% и существенно ниже, чем в популяциях России (Барановская, 1996; Смагулова, 2000; Ахметова, 2001). Вторая по частоте мутация *R261Q* была определена на 4 из 40 мутантных хромосом (10%). Мутации *IVS12nt1* и *IVS10nt546* обнаружены с одинаковой частотой (5%), на двух хромосомах каждая. На мутантных хромосомах у больных казахской этнической принадлежности с одинаковой частотой 0,20 выявлены мутации *R408W* и *R261Q*, и с частотой 0,10 - мутация *IVS12nt1*. Распределение частот мутаций у русских отличалось: самой распространенной была мутация *R408W* (0,42), частота у мутаций *R261Q* и *IVS10nt546* составила по 0,077, более редкой была мутация *IVS12nt1* (0,038). Большинство больных ФКУ оказались компаунд-гетерозиготами, несущими на одной хромосоме наиболее распространенную мутацию *R408W*, а на другой либо одну из обнаруженных мутаций, либо какую-то неизвестную мутацию. Кроме этого, выявлен полиморфизм *V245V* в 7 экзоне гена *PAH* (0,20), описанный ранее (Dworniczak et al., 1990), и не приводящий к изменению функций белка *PAH*. Наиболее распространенная в других популяциях мутация *R408W* также оказалась самой частой и для нашей выборки больных, ее частота (32,5%) была сходной со среднеевропейской (32,4%) (Zschocke J., 2003), однако значительно ниже средней для российских популяций (61,4%) (Степанова А.А., 2005). Мутации *R408W* и *R261Q* гена *PAH* в здоровой выборке казахов (контроль – 100 неродственных индивидов) не обнаружены, что свидетельствует о низкой частоте гетерозиготного носительства этих

мутаций в популяции казахов. Информативность использованного нами набора реактивов PCU-8 для определения мутаций в Казахстане составила 52,5%, что ниже, чем для российской популяции (79,8%) (Степанова А.А., 2005). В целом, популяция Республики Казахстан по спектру мутаций гена фенилаланингидроксилазы отличается от других популяций мира, что косвенно подтверждается большим количеством неидентифицированных нами мутаций.

Исследование полиморфных локусов *MspI(a)*, *PvuII(a)*, *VNTR* и *STR* гена *PAH* в популяциях Казахстана

Проведен анализ характера распределения частот аллелей, генотипов и гаплотипов полиморфных ДНК-локусов *VNTR*, *MspI(a)*, *STR* и *PvuII(a)* гена *PAH* в семьях с ФКУ, в двух основных этнических группах Казахстана - казахов и русских, а также в 30 семьях русской и 30 - казахской этнической принадлежности..

Анализ полиморфного локуса *MspI(a)* гена *PAH* в популяциях Казахстана

Наиболее распространенным генотипом в популяции казахов оказался *MspI(a)*A/*a* (0,58), а в популяции русских – генотип *MspI(a)*a/*a* (0,38). По распределению частот *MspI(a)* генотипов выборка русских достоверно отличалась от казахов ($\chi^2 = 15,8883$, $p = 0,000$) (табл. 3, рис. 1). Распределение частот генотипов локуса *MspI(a)* в популяции казахов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга, тогда как в популяции русских наблюдалось отклонение от равновесия ($p < 0,01$), связанное, по всей видимости, со стохастическими процессами в популяции. Анализ распределения частот *MspI(a)* аллелей гена *PAH* показал преобладание аллеля *MspI(a)*A* в популяции казахов, и, напротив, аллеля *MspI(a)*a* у русских (табл 3, рис. 1).

Таблица 3

Распределение частот *MspI(a)* аллелей и генотипов гена *PAH* в популяциях Казахстана. Проверка соответствия распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга (χ^2)

Популяции	N	Частота аллелей		Частота генотипов			χ^2
		*A	*a	*A/*A	*A/*a	*a/*a	
Казахи	100	0,57± 0,05	0,43± 0,05	0,28± 0,04	0,58± 0,05	0,14± 0,03	2,652 p=0,103
Русские	60	0,42± 0,06	0,58± 0,06	0,26± 0,06	0,36± 0,06	0,38± 0,06	8,337 p=0,004

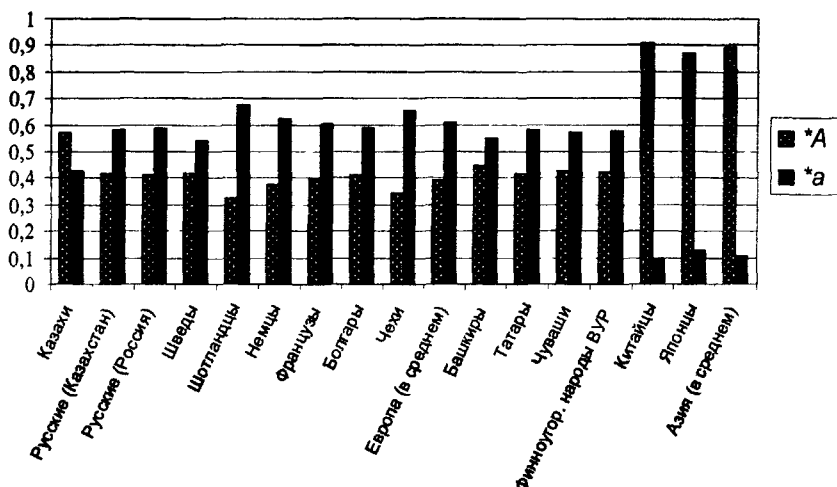


Рис. 1. Распределение частот *MspI(a)* аллелей гена *PAM* в популяциях Казахстана, Волго-Уральского региона (Ахметова, 2001), Европы и Азии (Daiger et al., 1989)

Выявлены достоверные различия по распределению частот *MspI(a)* аллелей гена *PAM* между популяциями казахов и русских ($\chi^2 = 4,50$, $p=0,0446$). Сравнительный анализ собственных результатов с литературными данными показал отсутствие разницы в распределении частот *MspI(a)* аллелей гена *PAM* между популяциями русских и другими европейскими популяциями и статистически значимые различия с популяциями Азии ($p<0,001$). Популяция казахов достоверно отличалась от финноугорских популяций Волго-Уральского региона (ВУР) – марийцев, мордвы, удмуртов ($p<0,05$), а также татар ($p<0,05$), популяций Европы ($\chi^2=6,49$, $p=0,0172$), и, еще в большей степени, от популяций Азии ($\chi^2=25,97$, $p<0,001$) (Daiger et al., 1989). (Ахметова, 2001).

Фактическая гетерозиготность по локусу *MspI(a)* оказалась выше в популяции казахов (57%), по сравнению с популяцией русских (36%), что, очевидно, связано с недостатком гетерозигот в данной этнической группе. Это согласуется с данными, полученными для популяций Волго-Уральского

региона, где фактическая гетерозиготность у башкир составляла 50%, а в популяции татар и русских соответственно 36% и 36,2%.

Анализ локуса *PvuII(a)* гена *PAH* в популяциях Казахстана

Наиболее частым в обеих исследованных выборках оказался генотип *PvuII(a)*A1/*A2* (табл. 4, рис 2). Распределение частот генотипов *PvuII(a)* гена *PAH* в выборке казахов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга, в выборке русских наблюдалось отклонение ($p < 0,05$), связанное, по-видимому, со стохастическими процессами в популяции. По распределению частот аллелей локуса *PvuII(a)* гена *PAH* между казахами и русскими достоверных различий не выявлено ($\chi^2 = 0,18$, $p = 0,7706$), преобладающим в обеих исследуемых выборках являлся аллель *PvuII(a)*A2*. Найдены достоверные различия обеих исследованных этнических групп по распределению частот аллелей локуса *PvuII(a)* с популяциями ФРГ, Болгарии, Чехословакии ($p < 0,05$), также с популяциями башкир и чувашей ($p < 0,01$) (Daiger et al., 1989; Ахметова В.Л., 2001). Достоверными оказались различия между выборкой казахов и Европы в целом ($p < 0,05$). Обе исследованные выборки достоверно отличались от популяций Азии ($p < 0,05$) (Daiger et al., 1989). Значение фактической гетерозиготности в популяции русских оказалось выше (61%), чем у казахов (57%).

Анализ полиморфного *VNTR* локуса гена *PAH* в популяциях Казахстана

Проведенный анализ распределения частот генотипов *VNTR*-локуса гена *PAH* показал, что на первом месте по частоте в обеих этнических группах находился генотип *VNTR*3/VNTR*8* (0,318 у казахов и 0,38 у русских).

Таблица 4

Распределение частот аллелей и генотипов локуса *PvuII(a)* гена *PAH* в популяциях Казахстана. Проверка соответствия распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга (χ^2)

Популяция	N	Частота аллелей		Частота генотипов			χ^2
		*A2	*A1	*A1/*A1	*A1/*A2	*A2/*A2	
Казахи	100	0,59± 0,05	0,41± 0,05	0,13± 0,03	0,57± 0,05	0,30± 0,04	2,354 p=0,125
Русские	60	0,62± 0,06	0,38± 0,06	0,07± 0,03	0,61± 0,06	0,32± 0,06	4,714 p=0,030

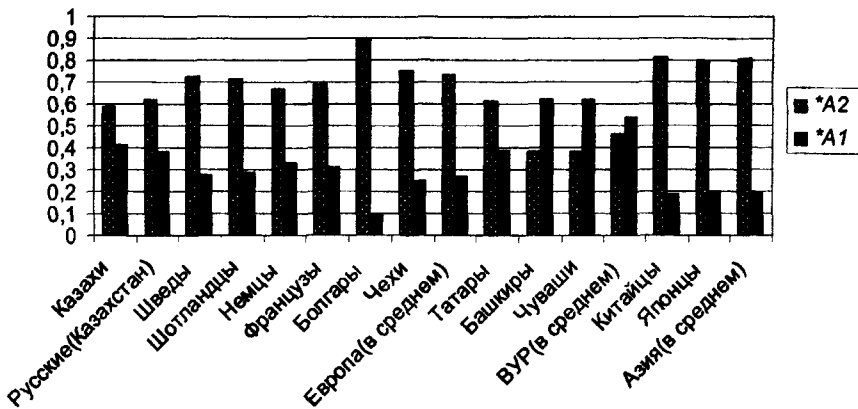


Рис. 2 Распределение частот *PvuII(a)* аллелей гена *PAH* в популяциях Казахстана и в популяциях Европы, Азии (Daiger et al., 1989) и Волго-Уральского региона (Ахметова В.Л., 2001)

На втором месте у казахов встречался генотип *VNTR*3/VNTR*3*, в то время как в русской популяции - генотип *VNTR*8/VNTR*8*. Достаточно распространенным в казахской популяции оказался генотип *VNTR*7/VNTR*8* (0,10), для русской популяции частоты всех остальных генотипов были менее 0,10. Найдены достоверные различия в распределении частот генотипов локуса *VNTR* гена *PAH* между изученными популяциями ($\chi^2=23,6995$, $p=0,0204$). В исследованных популяциях распределение частот *VNTR* генотипов находилось в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга.

Распределение частот *VNTR* аллелей гена *PAH* в популяциях изучаемого региона соответствовало бимодальному, с двумя пиками: первый - в 380 п.о. (*VNTR*3*), второй - в 530 п.о. (*VNTR*8*), причем, у казахов более выражен пик в 380 п.о. (0,45), а у русских - пик в 530 п.о. (0,41) (рис. 3).

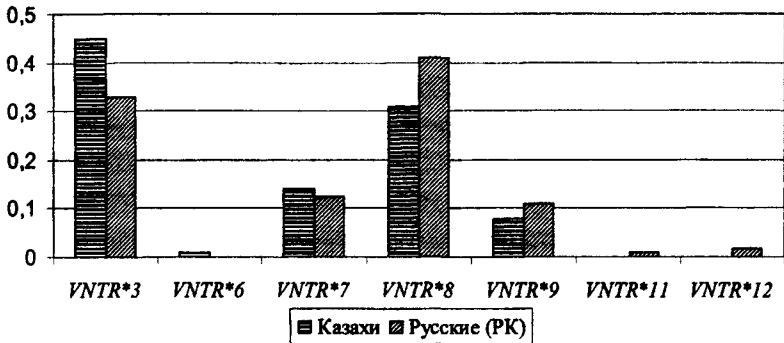


Рис.3 Распределение частот *VNTR* аллелей гена *PAH* в популяциях Казахстана

Согласно данным литературы, аллель *VNTR*3* с более высокой частотой встречался в азиатских популяциях, тогда как частота аллеля *VNTR*8* была выше в европейских популяциях (Eisensmith et al., 1994; Барановская, 1996). Возможно, что первый пик в 380 п.о. (*VNTR*3*) в изучаемых популяциях свидетельствует о влиянии монголоидного компонента на формирование генофонда народов данного региона, а второй пик в 530 п.о. (*VNTR*8*) служит одним из убедительных доказательств наличия существенной доли европеоидного компонента у изученных популяций. Между двумя исследованными популяциями Казахстана достоверных различий по распределению частот *VNTR* аллелей гена *PAH* выявлено не было. Сравнительный анализ с литературными данными позволил установить статистически значимые различия по распределению частот *VNTR* аллелей гена *PAH* между обеими изученными выборками и популяциями Китая ($p < 0,01$), Азии – узбеками ($p < 0,05$) и некоторыми популяциями Волго-Уральского региона – марийцами и удмуртами ($p < 0,001$) (Eisensmith et al., 1994; Барановская, 1996; Ахметова В.Л., 2001; Салимова, 2004). Кроме того, выявлены достоверные отличия для популяции казахов с популяциями Европы, мордвы и карачаевцами ($p < 0,05$), а для популяции русских с коми ($p < 0,05$). (Eisensmith et al., 1994; Ахметова В.Л., 2001; Салимова, 2004).

Значение фактической гетерозиготности по *VNTR* локусу гена *PAH* в популяции русских (78%), оказалось выше, чем в популяции казахов (66%).

Анализ полиморфизма STR локуса гена PAH в популяциях Казахстана

В результате изучения STR полиморфизма гена PAH в казахской и русской популяциях оказалось, что наиболее частым для казахов оказался STR-генотип *244/*248, (0,144), для русских – STR*240/*244 (0,15) (рис. 4). В исследованных популяциях было установлено соответствие характера распределения частот STR генотипов гена PAH равновесию Харди-Вайнберга. Выборка казахов достоверно отличалась от выборки русских из Казахстана по распределению частот STR генотипов гена PAH ($\chi^2=51,59$, $p=0,0008$).

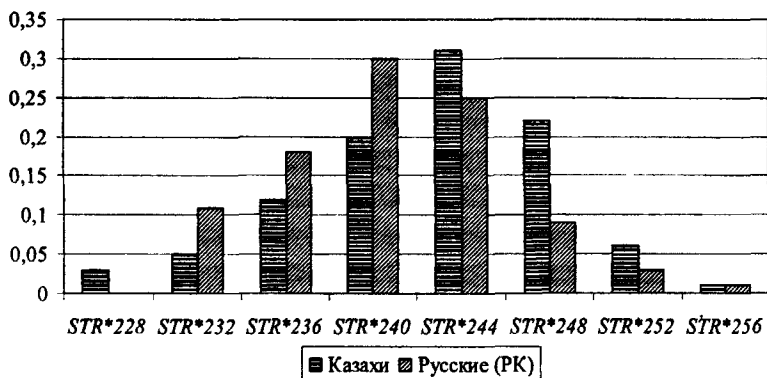


Рис.4. Распределение частот STR аллелей гена PAH в популяциях Казахстана

Распределение частот STR аллелей для казахской популяций можно охарактеризовать как одномодальное с пиком в 244 п.о. (0,31). Для русских этот аллель оказался на втором месте по частоте (частота 0,25), тогда как на первом месте определен аллель *240 (частота 0,3). На втором месте у казахов был аллель *248 (частота 0,22), который наиболее часто выявлялся, по данным литературы, у тюрко-язычных народов ВУР (от 0,13 у чувашей до 0,18 у башкир), в то время как для русских этот аллель оказался на 5 месте (0,09) (Ахметова, 2001). Сравнительный анализ распределения частот STR аллелей гена PAH показал наличие достоверных различий между изученными популяциями РК ($\chi^2=15,5$, $p=0,027$), а также между выборкой казахов, с одной стороны, и марийцами, мордвой, удмуртами и китайцами - с другой ($p<0,05$) (Goltsov et al., 1994; Барановская, 1996; Ахметова В.Л., 2001) (рис. 4). Для популяции русских статистически значимые отличия по распределению частот STR аллелей ге-

на *РАН* выявлены с чувашами, марийцами, удмуртами и китайцами $p < 0,05$) (Goltsov et al., 1994; Барановская, 1996; Ахметова В.Л., 2001).

Коэффициент фактической гетерозиготности составил, в среднем по исследованным популяциям, 79%, приближаясь к таковому в популяциях Европы (80%) и несколько превышая его значение в популяциях Азии (73%) (Goltsov et al., 1994).

Основываясь на результатах анализа частот *VNTR* и *STR* аллелей гена *РАН* в популяциях Казахстана, можно отметить, что в целом популяции данного региона занимают промежуточное положение между популяциями Европы и Китая. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными по гаплогруппам митохондриальной ДНК и аутосомным локусам о промежуточном положении генофонда народов данного региона между европеоидами и монголоидами (Бермишева, 2004, Абдуллаева А.М., 2004, Берзина Г.М., 2004).

Генетические расстояния и кластерный анализ популяций Казахстана по данным о полиморфизме *VNTR* и *STR* локусов гена *РАН*

Анализ степени родства и генетических расстояний по данным о полиморфизме *VNTR* и *STR* аллелей гена *РАН* показал генетическую близость тюрко-язычных народов (башкиры и казахи), а также существование генетической дифференциации популяций русских Республики Башкортостан и Казахстана. Полученные данные указывают на необходимость молекулярно-генетических исследований популяций Казахстана, а также подтверждают возможность использования полиморфных ДНК-локусов гена *РАН* для характеристики генетического положения народов изучаемого региона среди популяций мира (рис. 5).

Таким образом, высокие показатели гетерозиготности, а также установленная дифференциация популяций Казахстана по распределению частот *VNTR* и *STR* аллелей гена *РАН*, позволяют считать данные полиморфные ДНК-локусы высокоинформативными генетическими маркерами, пригодными и для характеристики генетической структуры популяций, и для косвенной ДНК-диагностики.

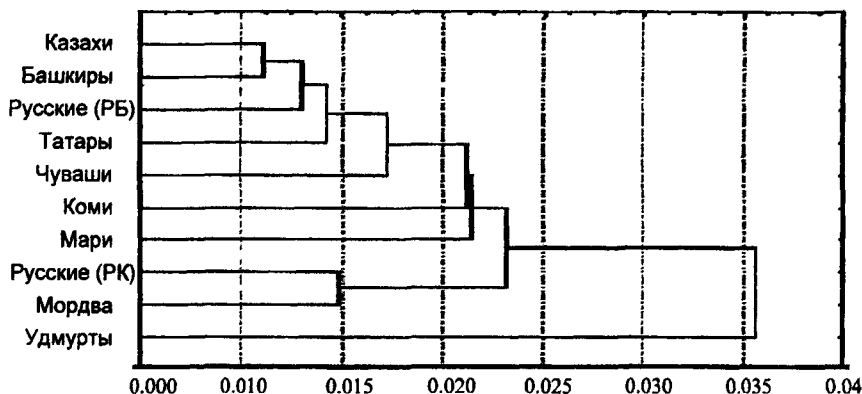


Рис. 5. Дендрограмма генетических взаимоотношений между популяциями Казахстана и Волго-Уральского региона по данным о полиморфизме *VNTR* и *STR* аллелей гена *PAH*

Анализ частот гаплотипов полиморфных *MspI(a)*, *PvuII(a)*, *VNTR* и *STR* локусов гена *PAH* в этнических группах из Казахстана

Проведенный анализ распределения частот ДНК-локусов гена *PAH* и составленных по ним *VNTR-MspI(a)-STR-PvuII(a)* гаплотипов в этнических группах Казахстана - русских и казахов (здоровые доноры, 60 полных семей, неотягощенных ФКУ: 30 казахской и 30 русской этнической принадлежности), не показал достоверных различий между данными группами ($\chi^2=78,48$ $p=0,423$), но выявил межэтнические различия по распределению частот аллелей между изученными группами и с популяциями ВУР, Европы и Азии.

Изучение полиморфных локусов *VNTR*, *MspI(a)*, *STR* и *PvuII(a)* гена *PAH* в семьях с ФКУ из Казахстана

Анализ распределения частот аллелей полиморфных локусов *VNTR*, *MspI(a)*, *STR* и *PvuII(a)* на нормальных и мутантных хромосомах

Анализ аллельного полиморфизма ДНК-локусов *MspI(a)*, *PvuII(a)*, *VNTR* и *STR* гена *PAH* у пациентов с ФКУ из Казахстана и членов их семей выявил достоверные различия в распределении частот аллелей между нормальными и мутантными хромосомами для всех четырех исследованных

локусов: *VNTR* ($\chi^2=13,8210$, $p=0,0028$), *STR* ($\chi^2=12,5094$, $p=0,0228$), *MspI(a)* ($\chi^2=18,47$, $p<0,001$), *PvuII(a)* ($\chi^2=6,45$, $p=0,016$) (рис.6).

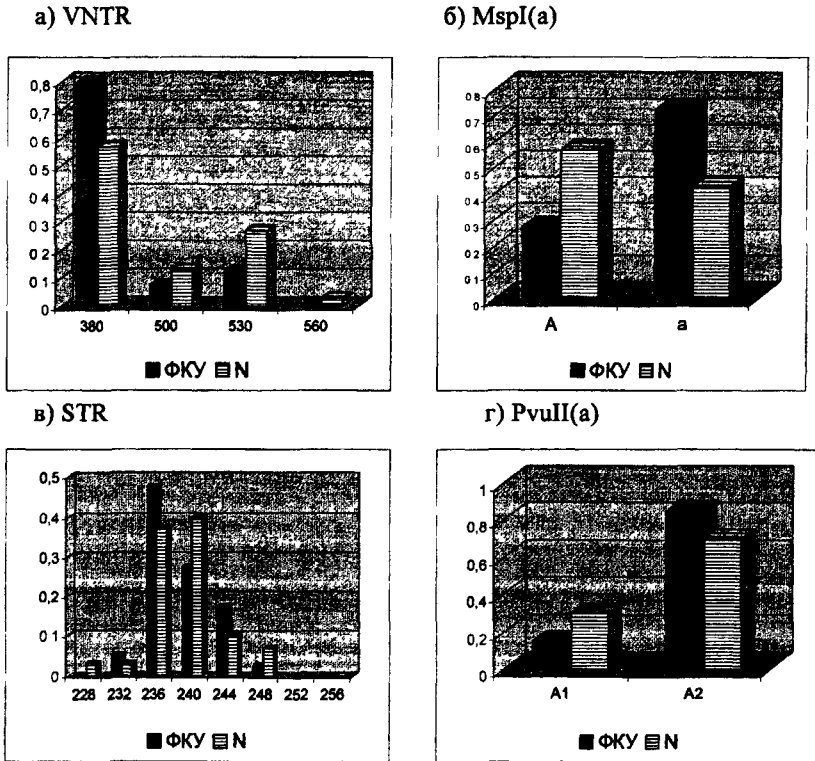


Рис. 6. Распределение частот аллелей полиморфных ДНК-локусов гена *PAH* на нормальных и мутантных хромосомах в семьях с ФКУ из Казахстана. По оси абсцисс указаны номера, по оси ординат - частоты аллелей.

При анализе полиморфизма *VNTR* системы выявлено, что аллель *VNTR**3 оказался преобладающим и на мутантных (0,8), и на нормальных (0,57) хромосомах (рис 6, а). Вторым по частоте встречаемости и на ФКУ-хромосомах, и на нормальных хромосомах определялся аллель *VNTR**8 (0,125 и 0,27 соответственно). На нормальных хромосомах в два раза чаще (0,13), чем на мутантных (0,075), наблюдался аллель *VNTR**7, а также аллель *VNTR**9 (0,03), который на мутантных хромосомах не обнаружен.

Исследование распределения частот полиморфных аллелей локуса *MspI(a)* гена *PAH* показало, что преобладающим на ФКУ-хромосомах оказался аллель *MspI(a)*a* (0,725), тогда как на нормальных хромосомах распределение частот аллелей *MspI(a)*A* и *MspI(a)*a* практически не отличалось (0,57 и 0,43, соответственно) (рис. 6, б).

Как видно на рисунке 6, в, аллель *STR*236* встречался на ФКУ-хромосомах (0,475) чаще, чем на нормальных (0,37). Кроме того, на мутантных хромосомах зарегистрированы аллели *STR*240* (0,275) и *STR*244* (0,175), а остальные аллели выявлялись редко. Среди нормальных хромосом наиболее распространенным оказался аллель *STR*240* (0,40) и относительно часто встречались аллели *STR*236* (0,37) и *STR*244* (0,10).

Характер распределения частот полиморфных аллелей ПДФ-локуса *PvuII(a)* гена *PAH* также несколько различался (рис. 6, г). Так, аллель *PvuII(a)*A2* на мутантных хромосомах обнаруживался с более высокой частотой 0,85 по сравнению с нормальными – 0,70. Аллель *PvuII(a)*A1* несли 0,30 нормальных хромосом, тогда как из мутантных хромосом только 0,15.

Как показал сравнительный анализ распределения частот *STR* аллелей гена *PAH*, между мутантными хромосомами больных из Казахстана и ФКУ-хромосомами больных из ВУР, Европы и Китая существовали достоверные различия ($p < 0,01$). Выявлены статистически значимые различия в распределении частот *VNTR* аллелей между мутантными хромосомами у больных ФКУ из Казахстана, с одной стороны, и Европы и Китая, с другой ($p < 0,01$) (Eisensmith et al., 1994; Ахметова, 2001). Распределение частот *MspI(a)* аллелей на изученных мутантных хромосомах достоверно отличалось от мутантных хромосом больных ФКУ из Азии ($\chi^2=97,18$, при $p < 0,01$), а также из Республики Башкортостан ($\chi^2=8,00$, при $p=0,0046$) (Daiger et al., 1989a, Ахметова, 2001). Статистически значимых различий по распределению частот *PvuII(a)* аллелей на мутантных хромосомах между изученной группой больных из Казахстана и аналогичными хромосомами в популяциях Европы, Азии и Волго-Уральского региона не выявлено ($\chi^2=1,7$; 1,14; 0,16, соответственно, при $p > 0,05$).

Анализ распределения частот гаплотипов гена фенилаланин-гидроксилазы на нормальных и мутантных хромосомах в семьях с ФКУ

Для членов каждой семьи с ФКУ были составлены гаплотипы по четырем полиморфным локусам *MspI(a)*, *PvuII(a)*, *VNTR* и *STR* гена *PAH*. В качестве контроля для сравнения были взяты частоты гаплотипов, определенные для 60 полных семей, неотягощенных ФКУ: 30 казахской и 30 русской этнической принадлежности. На 238 нормальных хромосомах было определено 79 различных гаплотипов, а на 40 мутантных хромосомах - 15 разных гаплотипов, один из которых (*VNTR*3/MspI(a)*A/ STR*228/PvuII(a)*A1*) не встречался на нормальных хромосомах. Различия в распределении частот гаплотипов на нормальных хромосомах от такового на мутантных хромосомах оказались статистически достоверными ($\chi^2=113,27$, $p<0,01$) (рис. 7).

Анализ ассоциации различных гаплотипов с мутациями гена *PAH*

Установлено выраженное неравновесие по сцеплению мутаций гена *PAH* с аллелем *VNTR*3* - $\Delta St=0,25$, *MspI(a)*a* - $\Delta St=0,3$, и с гаплотипом *VNTR*3/MspI(a)*a/STR*236/PvuII(a)*A2* ($\Delta St=0,39$). Для того, чтобы выяснить, какой вклад в определенную нами величину неравновесия по сцеплению между изученными локусами и заболеванием вносит наиболее частая мутация *R408W*, был определен стандартный коэффициент неравновесия по сцеплению в группе мутантных хромосом, несущих эту мутацию. Были выявлены следующие значения Δst по всем локусам: среднее для аллеля *VNTR*3* - 0,40 и для аллеля *STR*236* - 0,32, максимальное для аллеля *MspI(a)*a* - 0,63, и низкое для аллеля *PvuII(a)*A2* - 0,17. Также выявлена ассоциация мутации *R408W* с гаплотипом *VNTR*3/MspI(a)*a /STR*236/PvuII(a)*A2*, - $\Delta st=0,53$. В популяциях северо-западной Европы мутация *R408W* показала высокое неравновесие по сцеплению с гаплотипом 1 (аллель **a* по локусу *MspI(a)*, аллель **A2* по локусу *PvuII(a)*, аллелем *VNTR*8* и аллелем *STR*244*), а в Восточно-европейских странах, включая республики СНГ и Прибалтики, мутация *R408W* оказалась строго ассоциированной

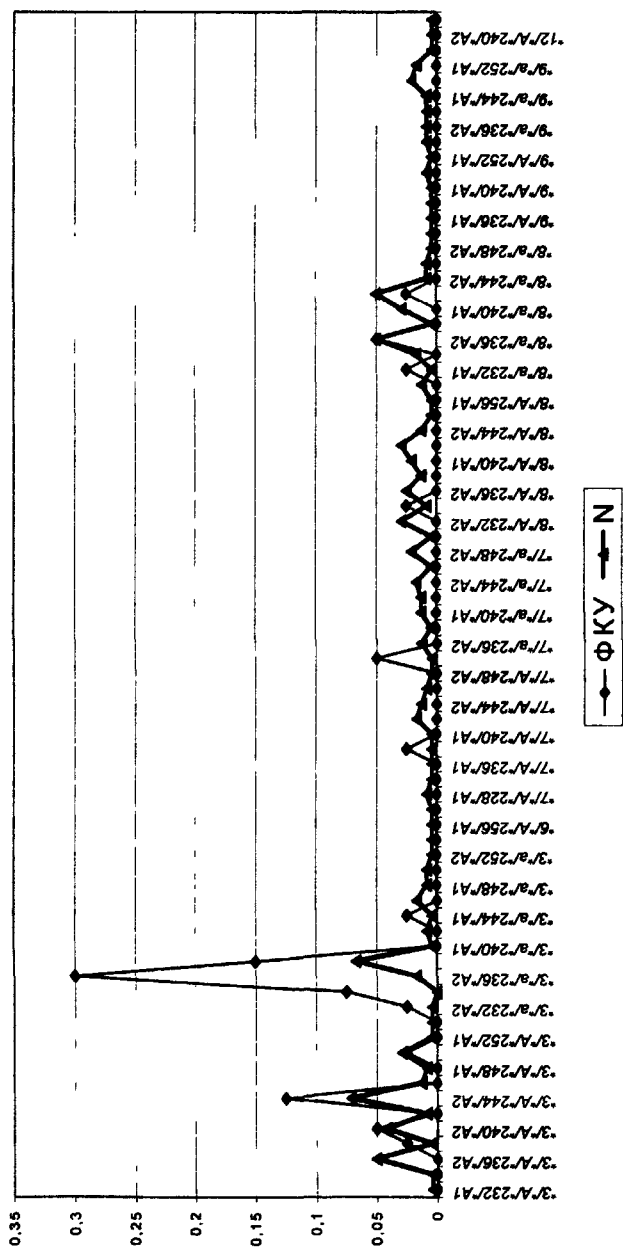


Рис. 7. Распределение частот VNTR-MspI(a)-STR-PviII(a) гаплотипов на нормальных и мутантных хромосомах в семьях с фенилкетонурией из Республики Казахстан

с гаплотипом 2 (аллель *a по локусу *MspI(a)*, аллель *A2 по локусу *PvuII(a)*, аллелем *VNTR *3* и аллелями *STR*232-248*). В нашей выборке больных ФКУ обнаружена ассоциация мутации *R408W* с гаплотипом 2, по всей видимости, означающая Балто-Славянское происхождение хромосом с этой мутацией у больных ФКУ из Казахстана (Tyfield et al., 1997, Eisensmith et al., 1992, Барановская, 1996).

По полученным данным, для семей с ФКУ из Казахстана информативность *VNTR*-системы для косвенной диагностики болезни составила 45,85%, *STR*-системы - 75%, *MspI(a)*-системы - 50%, *PvuII(a)*-системы - 45,8%. Общая информативность всех четырех изученных полиморфных локусов для семей с ФКУ составила 87,5%, из которых 75% приходится на полную информативность и 25% на частичную. Высокая информативность исследованных ДНК-локусов в сочетании с достаточно простыми методами их идентификации свидетельствуют о том, что данные полиморфные локусы могут быть использованы для установления гетерозиготного носительства у здоровых сибсов в семьях высокого риска и пренатальной диагностики ФКУ в Казахстане.

Алгоритм молекулярно-генетической диагностики фенилкетонурии в Республике Казахстан

Проведенное нами молекулярно-генетическое обследование 20 семей с фенилкетонурией, проживающих в Республике Казахстан, показало, что ДНК-диагностика прямым методом является полностью информативной для 35% изученных семей проживающих в РК, частично информативной - для 35%, абсолютно неинформативной - для 30%. В связи с этим, в таких семьях была проведена косвенная ДНК- диагностика заболевания с использованием внутригенных ДНК-локусов и составленных по ним гаплотипам. Во всех семьях при использовании прямого и косвенного подходов молекулярной диагностики были определены носители мутантных хромосом.

Общая информативность прямой ДНК-диагностики для больных ФКУ из Казахстана составила 52,5%, а косвенной ДНК-диагностики с помощью полиморфных локусов *MspI(a)*, *VNTR*, *STR* и *PvuII(a)* гена *PAH* - 87,5%. Информативность прямой и косвенной ДНК-диагностики для больных ФКУ из Республики Казахстан при совместном применении оказалась 100%, что свидетельствует о целесообразности использования данной молекулярно-генетической системы для ДНК-диагностики фенилкетонурии в Казахстане. Проведенное изу-

чение мутаций и гаплотипов полиморфных ДНК-локусов *MspI(a)*, *PvuII(a)*, *VNTR* и *STR* гена *PAH* дало возможность разработать алгоритм молекулярно-генетической диагностики ФКУ в Казахстане (рис. 8) и выявить в исследованных семьях носителей мутантных хромосом.



Рис. 8. Алгоритм молекулярно-генетической диагностики фенилкетонурии в Республике Казахстан

В общем плане молекулярно-генетических исследований, результаты данной работы расширили представление о структурно-функциональной организации генома человека и могут послужить теоретической и методической основой для точной диагностики моногенной наследственной патологии - фенилкетонурии.

ВЫВОДЫ

1. Частота ФКУ по данным массового скрининга новорожденных г. Алматы составляет 1:6980. Впервые определена распространенность заболевания в основных этнических группах Казахстана: 1,56 на 100 000 населения для русских и 0,69 на 100 000 для казахов.
2. В гене фенилаланингидроксилазы у больных ФКУ из Республики Казахстан идентифицировано 4 мутации - *R408W* (0,33), *R261Q* (0,10), *IVS10nt546* (0,05) и *IVS12nt1* (0,05), из них у больных ФКУ казахской этнической принадлежности - *R408W* (0,20), *R261Q* (0,20) и *IVS12nt1* (0,10), что свидетельствует об отличиях в спектре и частотах мутаций гена *PAH* в популяции казахов от изученных ранее популяций мира.
3. Установлены статистически значимые различия по распределению частот аллелей полиморфных ДНК-локусов *MspI(a)*, *VNTR* и *STR* гена фенилаланингидроксилазы этнических групп русских и казахов из Республики Казахстан между собой, а также с популяциями Европы и Азии.
4. Обнаружены достоверные различия по распределению частот аллелей и гаплотипов полиморфных ДНК-локусов *VNTR*, *MspI(a)*, *STR* и *PvuII(a)* гена *PAH* между нормальными и мутантными хромосомами в семьях больных фенилкетонурией из Республики Казахстан.
5. Выявлена ассоциация мутации *R408W* гена фенилаланингидроксилазы с гаплотипом *VNTR*3/MspI(a)*a/STR*236/PvuII(a)*A2* ($\Delta st=0,53$).
6. Показано, что информативность прямой ДНК-диагностики для семей с ФКУ из Республики Казахстан составляет 52,5%, косвенной диагностики с помощью полиморфных локусов *MspI(a)*, *VNTR*, *STR* и *PvuII(a)* гена *PAH* - 87,5%, их совместная информативность составляет 100%, что свидетельствует о целесообразности использования данной молекулярно-генетической системы для ДНК-диагностики фенилкетонурии в Казахстане.
7. Разработан алгоритм молекулярно-генетической диагностики фенилкетонурии в Республике Казахстан.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оразгалиева М.Г., Святова Г.С. Молекулярно-генетическая диагностика мутаций гена фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией популяции г. Алматы. // Сб. науч. статей Респуб. Науч.-практич. конференции "Актуальные проблемы перинатальной неврологии". - Алматы, 2003. С.114.
2. Оразгалиева М.Г. Современные аспекты классификации, клинической картины и диагностики фенилкетонурии. // Сб. статей к конф.«Актуальные проблемы акушерства, гинекологии и перинатологии». - Алматы, 2003. - С. 266-269.
3. Оразгалиева М.Г., Святова Г.С. Роль мутаций гена фенилаланингидроксилазы в диагностике ФКУ. // Сб. статей к конф.«Актуальные проблемы акушерства, гинекологии и перинатологии». - Алматы, 2003. - С. 269-271.
4. Оразгалиева М.Г., Святова Г.С. Изучение STR полиморфизма гена фенилаланингидроксилазы (PAH) в казахской популяции. // Сб. науч. трудов международной конференции «Здоровье детей – проблема и будущее нации». - АГИУВ, Алматы, 5-6 мая 2004 г. - С. 223-224.
5. Оразгалиева М.Г., Святова Г.С. STR полиморфизм гена фенилаланингидроксилазы (PAH) у казахов.// Сб. статей по матер. V конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» Томск, 20-21 мая 2004 г. - С. 211-212.
6. Оразгалиева М.Г., Святова Г.С. Частота мажорных мутаций гена фенилаланингидроксилазы в популяции г. Алматы. // Материалы III съезда ВОГиС (часть II) «Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития». - Москва, 6-12 июня 2004. - С. 88.
7. Оразгалиева М.Г., Святова Г.С., Ким Л.В. Распространенность мутации R408W гена фенилаланингидроксилазы в Казахстане. // Акушерство, гинекология и перинатология, - Алматы, № 3, 2005. - С. 71-73.
8. Оразгалиева М.Г., Святова Г.С., Хуснутдинова Э.К., Ахметова В.Л. Исследование мутаций гена фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией, проживающих в Казахстане. // Медицинская генетика. - 2005. - т.4, №8. - С. 383-385.
9. Оразгалиева М.Г., Святова Г.С. Анализ мутаций гена фенилаланингидроксилазы в популяции РК. // Сб. науч. трудов конференции «Пути повышения эффективности медицинской помощи детям». - АГИУВ, Алматы, 2005. - С. 180-183.
10. Оразгалиева М.Г., Святова Г.С. Спектр мутаций гена фенилаланингидроксилазы в популяции РК. // Медицинская генетика, Материалы V Съезда Российского общества медицинских генетиков (часть II) Уфа, 2005. - С. 243.
11. Оразгалиева М.Г., Святова Г.С., Хуснутдинова Э.К., Ахметова В.Л. Молекулярно-генетический анализ полиморфных локусов гена фенилаланингидроксилазы в популяциях Казахстана. // Здоровье и болезнь. - Алматы, 2005. - №9. - с. 87-90.
12. Оразгалиева М.Г., Святова Г.С., Хуснутдинова Э.К., Ахметова В.Л. Изучение полиморфных локусов гена фенилаланингидроксилазы в популяциях Казахстана. // Медицина и экология. - Караганда, 2005. - №4. - С.44-47.

Оразгалиева Мадина Гиниятовна

**Анализ гена фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией и
в популяциях Республики Казахстан**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Лицензия № 0177 от 10.06.96 г.

Подписано в печать 24.11.2005 г.

Отпечатано на ризографе.

Формат 60x84 ¹/₁₆. Усл.-печ. л. 1,6. Уч.-изд. л. 1,9

Тираж 100 экз. Заказ № 329.

450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
ГОУ ВПО «Башгосмедуниверситет РосЗДРАВА»

№ 25718

РНБ Русский фонд

2006-4

29914