

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *PAH* С ПРИМЕНЕНИЕМ КОМБИНАЦИИ ТЕХНОЛОГИЙ ПЦР «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ» И ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ МОСКОВСКОГО РЕГИОНА

А. И. Никифорова¹✉, Д. Д. Абрамов¹, В. В. Кадочникова¹, Г. Ю. Зобкова¹, К. А. Огурцова², Н. О. Брюханова², Е. А. Шестопалова², Т. О. Кочеткова³, Е. С. Шубина³, А. Е. Донников^{1,3}, Д. Ю. Трофимов^{1,3}

¹ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва

²Морозовская детская городская клиническая больница, Москва

³Лаборатория молекулярно-генетических методов, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

Определена частота встречаемости мутаций в гене фенилаланингидроксилазы (*PAH*) у неродственных детей ($n = 71$) с диагнозом «фенилкетонурия», наблюдавшихся в Морозовской детской городской клинической больнице (г. Москва) в 2015–2016 гг. Для выявления частых вариантов мутаций в гене *PAH* была применена оригинальная технология определения нуклеотидных замен на основе ПЦР в режиме «реального времени» (real-time PCR), выполнено дополнительное исследование гена методом целевого секвенирования нового поколения (NGS). Эффективность диагностирования методом ПЦР при выявлении носительства патогенного аллеля в выборке составила 83 %. При проведении комбинированной диагностики мутации в двух аллелях были выявлены в 66 случаях из 71. Всего определено 26 патогенных мутаций в гене *PAH*, наиболее часто представлены мутации p.R408W (47,9 %) и p.R261Q (9,9 %). Распространенные в России IVS10nt546, IVS12+1G>A, p.R158Q, p.Y414C, IVS4+5G>T выявлены с частотами от 4,2 до 2,8 %. Суммарная частота встречаемости половины определенных вариантов мутаций составила менее 10 %. По итогам секвенирования гена *PAH* обнаружен ряд ранее не описанных для Московского региона мутаций различного функционального типа: p.D222Terfs, p.R111Ter, p.F161S, p.G188D, p.R270K, p.L311P, p.F55L, p.F55Leufs, IVS1+5G>T, IVS8-7A>G. Мутации p.D222Terfs и p.R111Ter (с частотами 2,1 % каждая) являются потенциальными кандидатами на включение в состав скрининговой панели. Полученные данные могут быть использованы для разработки схем генодиагностики фенилкетонурии.

Ключевые слова: фенилкетонурия, ген фенилаланингидроксилазы, *PAH*, генетическая диагностика

✉ **Для корреспонденции:** Никифорова Алёна Игоревна
Каширское ш., д. 24, г. Москва, 115478; nikiforova@dna-technology.ru

Статья получена: 07.08.2017 **Статья принята к печати:** 16.08.2017

DETERMINING THE FREQUENCY OF *PAH* MUTATIONS IN MOSCOW REGION RESIDENTS WITH PHENYLKETONURIA USING A COMBINATION OF REAL-TIME PCR AND NEXT-GENERATION SEQUENCING

Nikiforova AI¹✉, Abramov DD¹, Kadochnikova VV¹, Zobkova GU¹, Ogurtsova KA², Brjuhanova NO², Shestopalova EA², Kochetkova TO³, Shubina ES³, Donnikov AE^{1,3}, Trofimov DY^{1,3}

¹DNA-Technology LLC, Moscow, Russia

²Morozovskaya Children's City Clinical Hospital, Moscow, Russia

³Laboratory of Molecular Genetic Methods, Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

The present study aimed to determine frequencies of mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (*PAH*) in unrelated children ($n = 71$) diagnosed with phenylketonuria, who presented to Morozovskaya Children's City Clinical hospital (Moscow) over the period from 2015 to 2016. The patients were tested for the most common *PAH* mutations using the original real-time PCR-based technique for the identification of nucleotide variants; additionally, next generation sequencing (NGS) was performed on the unidentified genotypes. The original PCR-based technique allowed us to effectively identify 83 % of the pathogenic allelic variants in the sample. Using the combination approach (real-time PCR + NGS), we found mutations in both alleles of *PAH* in 66 of total 71 patients. Altogether, 26 pathogenic *PAH* mutations were identified, the most common being p.R408W (47.9 %) and p.R261Q (9.9 %). Frequencies of mutations common for the Russian population, such as IVS10nt546, IVS12+1G>A, p.R158Q, p.Y414C, and IVS4+5G>T, ranged from 4.2 to 2.8 %. Half of the identified variants accounted for the total frequency of < 10 %. Sequencing of *PAH* revealed a few functional mutations previously unreported for Moscow region residents, including p.D222Terfs, p.R111Ter, p.F161S, p.G188D, p.R270K, p.L311P, p.F55L, p.F55Leufs, IVS1+5G>T, and IVS8-7A>G. It could be reasonable to include mutations p.D222Terfs and p.R111Ter (carrier frequency of 2.1 %) in PCR testing panels. The data obtained in our study can also be used in the development of genetic tests for phenylketonuria.

Keywords: phenylketonuria, phenylalanine hydroxylase gene, *PAH*, real-time PCR genotyping

✉ **Correspondence should be addressed:** Alyona Nikiforova
Kashirskoe shosse, d. 24, Moscow, Russia, 115478; nikiforova@dna-technology.ru

Received: 07.08.2017 **Accepted:** 16.08.2017

Патогенные мутации в гене фенилаланингидроксилазы (*PAH*) являются причиной тяжелого заболевания — фенилкетонурии (ФАГ-зависимой ФКУ, фенилкетонурии I типа). Данное заболевание имеет аутосомно-рецессивный тип наследования и входит в число распространенных наследственных заболеваний, рекомендовано ВОЗ для ранней диагностики у новорожденных. В России средняя частота фенилкетонурии составляет 1 : 7000 [1]. Заболевание обусловлено недостаточной активностью фермента печени фенилаланингидроксилазы (ФАГ), отвечающего за превращение фенилаланина (ФА) в тирозин. В результате нарушения работы ФАГ в организме повышается уровень содержания ФА и его производных, снижается уровень содержания тирозина, нарушается обмен других аминокислот [1, 2]. При отсутствии лечения признаки поражения ЦНС появляются в первом полугодии жизни. Своевременная диагностика и терапия позволяют избежать драматических последствий фенилкетонурии.

С целью ранней диагностики ФКУ у всех новорожденных в РФ биохимическими методами определяют уровень содержания ФА в крови [1, 2]. При выявлении гиперфенилаланинемии (ГФА), т. е. при содержании ФА выше 2 мг/дл (0,12 ммоль/л), проводится повторная и дифференциальная диагностика форм заболевания. Генетическая диагностика больных ФКУ выполняется с целью уточнения клинического диагноза, определения варианта генотипа по гену *PAH*. Мутации гена *PAH* в зависимости от их локализации и функционального типа по-разному влияют на свойства фермента ФАГ [1, 3–6]. Тяжелые формы заболевания обусловлены изменениями в последовательности гена *PAH*, приводящими к нарушению синтеза белка или образованию фермента с нулевой остаточной активностью. Мутация p.R408W/c.1222C>T — наиболее распространенная среди населения России [1, 3, 6–10] — является примером «тяжелой» мутации гена *PAH*, в гомозиготном состоянии p.R408W/c.1222C>T приводит к синтезу ФАГ с минимальной остаточной активностью. Недавно было установлено, что препараты из группы синтетических аналогов тетрагидробиоптерина (природного кофермента ФАГ, НВ₄), применяемые при терапии НВ₄-зависимых форм ГФА, понижают уровень содержания ФА в крови пациентов с классической формой заболевания, но при условии сохранения остаточной активности фермента. Медикаментозное лечение в этом случае позволяет смягчить клинические проявления заболевания, расширить диету пациента. Таким образом, генетическая диагностика больных ФКУ является условием выбора стратегии индивидуальной терапии.

Существуют различные подходы генетической диагностики ФКУ. В целях выявления частых мутаций в гене *PAH* применяют методы выборочной диагностики, основанные на различных вариантах ПЦР и ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция с последующим анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов) [6–8]. Перспективными являются разработки на основе метода мультиплексной лигазозависимой амплификации зондов (multiplex ligation-depend probe amplification, MLPA) [9], а также ПЦР в режиме «реального времени» (real-time PCR), в частности, на основе метода примыкающих проб (adjacent probes) [10]. Данные подходы позволяют проводить единовременную идентификацию десятков вариантов изменений последовательности гена. Тем не менее генетическая эффективность методов выборочной генетической диагностики, как правило, не превышает 70–80 % [7, 8]. Поиск редких мутаций (с частотой встре-

чаемости менее 1 %) и новых вариантов гена эффективно осуществляется с помощью методов секвенирования [3, 4, 6, 11], обеспечивающих максимальную информативность при исследовании целевого региона последовательности гена. Актуальной проблемой является разработка и внедрение в практику рутинного применения отечественных решений для диагностирования ФКУ и других форм ГФА с использованием технологий секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS).

Целью настоящей работы стало определение мутаций в гене *PAH* у 71 ребенка из Московского региона с диагнозом «классическая фенилкетонурия» или «гиперфенилаланинемия». Для выявления частых вариантов мутации в гене была применена оригинальная технология определения нуклеотидных замен на основе метода real-time PCR с анализом кривых плавления, редкие и неучтенные генетические варианты в ПЦР-исследовании определяли методом таргетного секвенирования нового поколения (NGS).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовали дети (n = 71) с клиническим диагнозом «классическая фенилкетонурия» или «гиперфенилаланинемия» (69 и 2 пациента соответственно), наблюдавшиеся в Морозовской детской городской клинической больнице (г. Москва) в 2015–2016 гг. Диагнозы пациентов были установлены по результатам клинических наблюдений и данных биохимического анализа крови. Пациенты не состояли в родстве. На момент проведения исследования все пациенты были резидентами Московского региона. В этническом отношении исследованная группа больных более чем на 85 % была представлена русскими, около 15 % составили другие национальности, включая выходцев с Южного Кавказа, из Средней Азии, а также Восточной Азии (среди пациентов присутствовал этнический китаец). Исследование соответствовало требованиям Хельсинкской декларации 2003 г., родители дали письменное информированное согласие на участие детей в нем.

В исследовании использована цельная венозная кровь пациентов, из которой с помощью комплекта реагентов «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» («НПО ДНК-Технология», Россия) выделяли геномную ДНК. Полученные образцы ДНК сразу использовали для генотипирования или хранили при –20 °С.

Примененная технология ПЦР-генотипирования является модификацией метода примыкающих проб (adjacent probes, kissing probes) [12]. В основе технологии лежит использование двух типов сиквенс-специфичных олигонуклеотидных зондов, гибридизующихся на ДНК-матрицу при низкой температуре в непосредственной близости друг от друга. Один из зондов несет источник флюоресценции, другой — гаситель флюоресценции. Зонд с источником флюоресценции является типизирующим, для повышения надежности генотипирования одновременно используются два варианта типизирующих зондов (соответствующих вариантам полиморфизма), меченных разными флуорофорами. После проведения серии ПЦР — амплификации целевой последовательности ДНК — температура реакционной смеси понижается, в результате зонды гибридизуются на матрице. Генотипирование осуществляется при температурной денатурации дуплексов олигонуклеотидных зондов и фрагментов ДНК путем измерения уровня флюоресценции в режиме «реального времени». На рисунке представлены кривые, характерные для

определенных генотипов (подробно технология описана в работе Сергеева и соавт. [13])

Для проведения исследования были использованы ранее апробированные праймеры и зонды для определения 16 мутаций гена *PAH*: p.R408W, p.R261Q, p.R158Q, IVS10nt546/c.1066-11G>A, IVS12+1G>A, p.Y414C, IVS4+5G>T, p.R252W, p.L48S, p.R261Ter, p.P281L, p.G188D, p.E280K, p.F331S, p.P279L, IVS2+5G>C. В перечень выявляемых мутаций вошли 8 вариантов, наиболее распространенных в России и рекомендованных к диагностированию [1]. ПЦР и определение температуры плавления олигонуклеотидных зондов проводили с помощью детектирующего амплификатора DTprime («НПО ДНК-Технология», Россия) по описанной ранее методике [10]. Продолжительность исследования составила 1,5 ч.

Образцы ДНК пациентов с неустановленным в результате поиска частых мутаций вариантом генотипа были исследованы методом таргетного высокопроизводительного секвенирования по технологии Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, США). Панель целевых участков гена *PAH* покрывала области экзонов (покрытие кодирующей последовательности гена составило 100 %), экзон-интронные границы, частично нетранслируемые регуляторные области гена. Суммарная длина исследуемых участков гена *PAH* составила 3 337 п. н. Целевые фрагменты гена амплифицировали в условии мультиплексной ПЦР. Для проведения реакции амплификации использовали не менее 10 нг геномной ДНК. Лигирование адаптеров к продуктам амплификации проводили с использованием T4 ДНК лигазы (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Контроль качества приготовления библиотек фрагментов ДНК для NGS-секвенирования осуществляли с помощью системы Agilent 2100 Bioanalyzer и набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США). Секвенирование выполняли на приборе для проведения высокопроизводительного секвенирования Ion PGM System for Next-Generation Sequencing (Thermo Fisher Scientific) с использованием набора Ion PGM Template OT2 400 Kit того же производителя.

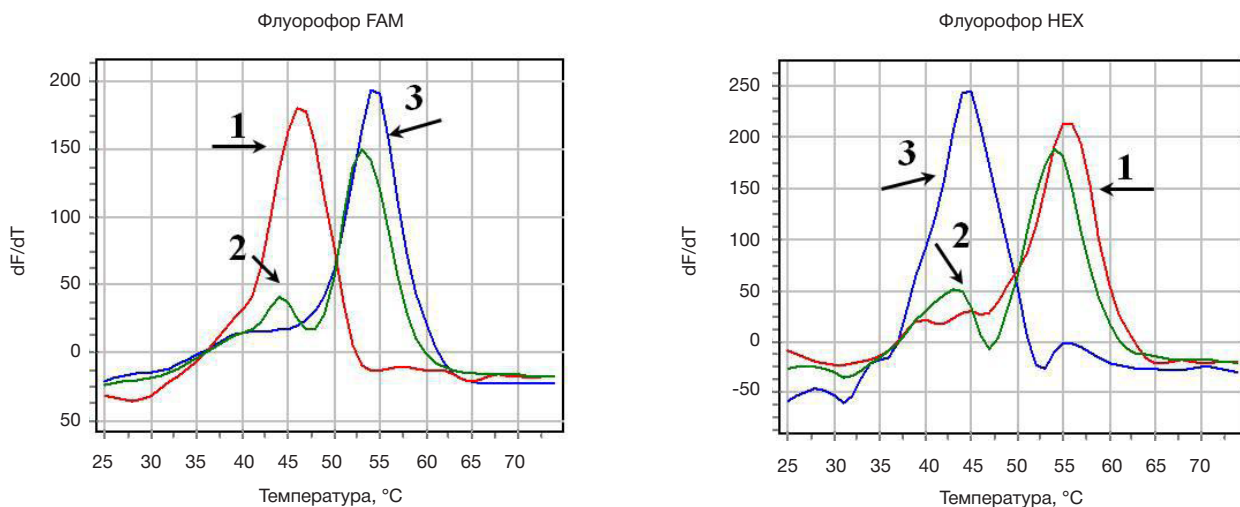
Первичный анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения Torrent Server 4.4.3. Выравнивание на референсный геном версии GRCh37/hg19 проводили с помощью программного модуля TMAP, для идентификации генетических вариантов был использован

программный модуль Torrent Variant Caller 4.4. (Все перечисленное программное обеспечение произведено Thermo Fisher Scientific) Последующий анализ проводили с помощью программных модулей, разработанных авторами. Среднее покрытие целевых фрагментов составило 7 300 прочтений, минимальное покрытие — 590, среднее количество прочтений на образец составило 95 500. Интерпретация патогенности генетических вариантов основана на анализе информации баз dbSNP Build 147, PAHvdb, BIOPKUdb [14] и данных литературы. В качестве подтверждающего метода проводили выборочное секвенирование ДНК по Сэнгеру на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), использовали реактивы и рекомендации производителя. Во всех случаях были получены идентичные результаты генотипирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе исследования генотипирование пациентов проводили методом поиска частых мутаций в гене *PAH* с применением технологии real-time PCR. Из 16 вариантов, определяемых методом ПЦР-генотипирования, были выявлены 13: p.R408W, p.R261Q, p.R158Q, p.L48S, p.G188D, p.Y414C, p.R252W, IVS4+5G>T, p.R261Ter, IVS10nt546/c.1066-11G>A, p.E280K, IVS12+1G>A, p.P281L (табл. 1). В 70,4 % случаев были идентифицированы мутации, затрагивающие оба аллеля гена *PAH*, у 25,4 % пациентов обнаружена мутация в одном из двух аллелей, в 4,2 % случаев патогенных мутаций обнаружено не было.

Для 21 одного случая с неустановленными изменениями в двух аллелях гена было выполнено исследование клинически значимых участков последовательности гена *PAH* методом высокопроизводительного секвенирования. В результате проведения секвенирования список патогенных вариантов гена *PAH* выборки был существенно расширен. Дополнительно обнаружены следующие варианты: p.D222Terfs, p.R111Ter, IVS11+1G>C, p.F161S, p.E390G, p.A300S, p.F55L, p.F55Leufs, p.R176Ter, p.L311P, p.R270K, IVS1+5G>T, IVS8-7A>G (табл. 1). Данные мутации описаны в мировой литературе, входят в реестр патогенных вариантов международной базы данных PAHvdb. Результаты исследования были подтверждены методом прямого секвенирования по Сэнгеру.



Кривые плавления для разных вариантов генотипа, полученные при определении мутации p.R408W/c.1222C>T. Кривые: 1 — гомозигота по мутации p.R408W/c.1222C>T; 2 — гетерозигота по мутации p.R408W/c.1222C>T, заметны характерные двойные пики на кривых плавления; 3 — гомозигота дикого типа

С помощью комбинированного подхода при проведении генетической диагностики *PAH* у 66 пациентов (93 % случаев) были выявлены 2 патогенные мутации, у 4 (5,6 %) пациентов — 1 мутация, у 1 (1,4 %) пациента мутаций не обнаружено.

Результаты по частотам встречаемости 26 патогенных вариантов выборки представлены в табл. 1. Мутации p.R408W и p.R261Q зарегистрированы с наибольшими частотами (соответственно выявлены у 54 и 12 пациентов в гомо- или гетерозиготном состоянии). Сравнительно частыми вариантами были IVS10nt546\с.1066-11G>A, IVS12+1G>A, p.R158Q, индивидуальные частоты встречаемости аллелей которых составили от 4,2 до 3,5 %, при этом данные мутации отмечены только в гетерозиготном состоянии. Половина патогенных вариантов, выявленных в исследованной выборке, зарегистрирована с суммарной частотой встречаемости менее 10 %. По итогам исследования описано 34 варианта генотипа гена *PAH*, у 21 пациента в одном или двух аллелях этого гена обнаружены мутации, при которых фермент ФАГ сохраняет более 10 % остаточной активности (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Частота встречаемости наиболее распространенной в России мутации p.R408W в исследованной нами выборке

больных ФКУ составила 47,9 %. Данный показатель близок к среднему значению по регионам [9], существенно ниже значений для Ростовской [15], Кемеровской [11], Новосибирской [3] областей и Дальнего Востока [7, 9] России. Мутация p.R261Q, вторая по встречаемости в выборке (9,9 %), входит список наиболее распространенных на территории России [1, 3, 6–8, 15], является преобладающей в Карачаево-Черкесской Республике [16]. Оба варианта распространены в Европе, мутация p.R408W более характерна для стран Восточной Европы, мутация p.R261Q — одна из наиболее частых в странах Южной Европы, распространена в Нидерландах и Швейцарии [5]. В отличие от p.R408W мутация p.R261Q относится к числу «мягких» мутаций гена *PAH*.

Сравнительно часто в генотипах были выявлены распространенные в России мутации IVS10nt546, IVS12+1G>A, p.R158Q, p.Y414C, IVS4+5G>T, p.L48S, p.R252W (индивидуальные частоты встречаемости аллелей составили от 4,2 до 2,1 %). Мутация p.P281L была идентифицирована в гетерозиготном состоянии у 1 пациента выборки русского происхождения. В некоторых регионах России мутация p.P281L является одной из наиболее частых [3, 15, 17].

Мутации p.D222Terfs, p.R111Ter были выявлены в 3 генотипах каждая (частота аллелей составила 2,1 %) в состоянии компаунда с другими мутациями. Генетический вариант p.D222Terfs представляет собой делецию двух

Таблица 1. Спектр и частоты встречаемости патогенных вариантов (мутаций) гена *PAH* среди пациентов Морозовской ДГКБ, n = 71

Патогенная мутация		Локализация мутации	Домен ФАГ	Частота встречаемости, %
<i>PAH</i>	ФАГ			
c.1222C>T	p.R408W	экзон 12	КАТ	47,9
c.782G>A	p.R261Q	экзон 7	КАТ	9,9
c.1066-11G>A	IVS10nt546	интрон 10	–	4,2
c.1315+1G>A	IVS12+1G>A	интрон 12	–	4,2
c.473G>A	p.R158Q	экзон 5	КАТ	3,5
c.1241A>G	p.Y414C	экзон 12	ТЕТ	2,8
c.441+5G>T	IVS4+5G>T	интрон 4	–	2,8
c.143T>C	p.L48S	экзон 2	РЕГ	2,1
c.754C>T	p.R252W	экзон 7	КАТ	2,1
c.664_665delGA	p.D222Terfs	экзон 6	КАТ	2,1
c.331C>T	p.R111Ter	экзон 3	КАТ	2,1
c.781C>T	p.R261Ter	экзон 7	КАТ	1,4
c.1199+1G>C	IVS11+1G>C	интрон 11	–	1,4
c.563G>A	p.G188D	экзон 6	КАТ	0,7
c.838G>A	p.E280K	экзон 7	КАТ	0,7
c.842C>T	p.P281L	экзон 7	КАТ	0,7
c.482T>C	p.F161S	экзон 5	КАТ	0,7
c.1169A>G	p.E390G	экзон 11	КАТ	0,7
c.898G>T	p.A300S	экзон 8	КАТ	0,7
c.165T>G	p.F55L	экзон 2	РЕГ	0,7
c.165delT	p.F55Leufs	экзон 2	РЕГ	0,7
c.526C>T	p.R176Ter	экзон 6	КАТ	0,7
c.932T>C	p.L311P	экзон 7	КАТ	0,7
c.809G>A	p.R270K	экзон 7	КАТ	0,7
c.60+5G>T	IVS1+5G>T	интрон 1	–	0,7
c.913-7A>G	IVS8-7A>G	интрон 8	–	0,7
Неустановленный вариант	–	–	–	4,2

Примечание. КАТ — каталитический домен ФАГ, РЕГ — регуляторный, ТЕТ — тетрамеризующий.

нуклеотидов GA в 664–665-м положениях, делеция приводит к сдвигу рамки считывания и синтезу более короткого белка. Данную мутацию ранее регистрировали в Европе [18]. Генетический вариант p.R111Ter представляет собой стоп-мутацию, также приводящую к синтезу укороченной молекулы ФАГ. Данная мутация сравнительно редко выявляется в странах Европы [5], но распространена среди больных ФКУ в КНР [19].

Мутации p.R261Ter и IVS11+1G>C представлены в выборке с частотой более 1 %. Мутация p.R261Ter была ранее зарегистрирована в различных регионах РФ [3, 11]. Нарушающая сплайсинг мутация IVS11+1G>C, редкая в РФ, ранее была выявлена у больных ФКУ в Кемеровской [11] и Ростовской [15] областях.

Другие мутации гена *PAH* (12 вариантов) были обнаружены в гетерозиготном состоянии по одному разу. Выявленные в выборке миссенс-мутации p.E280K, p.E390G, p.A300S и стоп-мутация p.R176Ter были ранее зарегистрированы в двух регионах РФ [3, 11]. Миссенс-мутация p.R270K ранее идентифицирована в Татарстане [20]. Мутация p.F161S впервые зарегистрирована в Северном Китае [21], по современным данным, выявляется среди больных ФКУ в КНР сравнительно редко [19]. Варианты p.L311P, p.F55L, p.F55Leufs, IVS1+5G>T, IVS8-7A>G описаны в европейских популяциях [18, 22–25]. Редкий вариант p.G188D ранее зарегистрирован в КНР [26].

Разнообразие вариантов аллелей гена *PAH* в выборке, установленное в результате проведения целевого

Таблица 2. Результаты генотипирования пациентов Морозовской ДГКБ, n = 71

Генотип		Число носителей генотипа	Остаточная активность ФАГ*, %	
аллель 1	аллель 2		мутация 1	мутация 2
p.R408W	p.R408W	14	2	2
p.R158Q	p.R408W	4	10	2
IVS10nt546	p.R408W	3	5	2
IVS12+1G>A	p.R408W	3	0	2
X	p.R408W	3	–	2
p.Y414C	p.R408W	2	57	2
IVS4+5G>T	p.R408W	2	0	2
p.L48S	p.R408W	2	39	2
p.R252W	p.R408W	2	0	2
p.R261Ter	p.R408W	2	0	2
p.R111Ter	p.R408W	2	0	2
p.D222Terfs	p.R408W	1	0	2
p.G188D	p.R408W	1	Нет данных	2
p.E280K	p.R408W	1	2	2
p.F55Leufs	p.R408W	1	0	2
p.L311P	p.R408W	1	1	2
p.R270K	p.R408W	1	11	2
IVS1+5G>T	p.R408W	1	0	2
IVS8-7A>G	p.R408W	1	0	2
p.R261Q	p.R408W	7	44	2
p.R261Q	p.R261Q	2	44	44
IVS10nt546	p.Y414C	1	5	57
IVS10nt546	IVS4+5G>T	1	5	0
IVS10nt546	p.L48S	1	5	39
IVS12+1G>A	p.R111Ter	1	0	0
IVS12+1G>A	p.R158Q	1	0	10
IVS12+1G>A	IVS4+5G>T	1	0	0
IVS11+1G>C	p.F161S	1	0	7
IVS11+1G>C	p.R261Q	1	0	44
p.D222Terfs	p.Y414C	1	0	57
p.D222Terfs	p.R252W	1	0	0
p.R261Q	p.F55L	1	44	Нет данных
p.R261Q	p.R176Ter	1	44	0
p.E390G	p.A300S	1	62	31
p.P281L	X	1	2	–
X	X	1	–	–

Примечание. X — неустановленный патогенный вариант.

* — приводится на основе данных базы BIOPKUdb [14].

секвенирования гена, сопоставимо с данными литературы по Ростовской [15], Новосибирской [3] и Кемеровской [11] областям. Частоты встречаемости аллелей с «тяжелыми» и «мягкими» мутациями составили 73,8 и 20,4 % соответственно. Показатель встречаемости в генотипах пациентов «мягких» мутаций согласуется с данными Гундоровой и соавт. по Москве и Московской области на 2017 г. [9], полученное значение превышает усредненные показатели по регионам.

В исследовании представлен пилотный опыт применения адаптированной технологии real-time PCR определения нуклеотидных замен на основе метода примыкающих проб для выявления частых мутаций гена *PAH* в выборке больных ФКУ Московского региона. Метод не представляет сложности в использовании (все реакции и регистрация флуоресцентного сигнала выполняются на одном приборе отечественного производства), позволяет одновременно осуществлять диагностирование образца на наличие широкого ряда генетических вариантов за сравнительно короткие сроки. Технология перспективна для проведения как научных исследований, так и для внедрения в практику рутинного медицинского диагностирования. По итогам исследования выборки диагностическая эффективность метода в отношении выявления носительства патогенного аллеля превысила 80 %. Список определяемых мутаций в гене *PAH*, включивший 16 вариантов, не окончательный, преимуществом технологии является возможность оперативного введения новых вариантов в состав диагностической панели.

Мутации с низкой частотой встречаемости в популяции не диагностируются методами выборочной генодиагностики. Спектр редких вариантов в конкретной популяции может быть достаточно широким, на сегодняшний день в гене *PAH* описано более 800 вариантов, при этом только несколько из них выявляются с частотой более 1 %. Применение целевого высокопроизводительного секвенирования при исследовании выборки позволило дополнительно идентифицировать 12,6 % патогенных аллелей. Были выявлены не описанные в России на момент проведения исследования мутации: p.D222Terfs, p.R111Ter, p.F161S, p.G188D, p.L311P, p.F55L, p.F55Leufs, IVS1+5G>T, IVS8-

7A>G. Отметим, что варианты p.D222Terfs и p.R111Ter являются потенциальными кандидатами на включение в состав панели ПЦР-скрининга для проведения генотипирования в Московском регионе (мутации обнаружены у 3 разных пациентов русской национальности). В 7 % случаев нам не удалось обнаружить патогенные изменения в обоих аллелях гена *PAH*. Эти случаи требуют дополнительных генетических тестов, прежде всего, более глубокого исследования гена *PAH*, а также проведения диагностики с *PAH*-независимыми формами ФКУ, на долю которых приходится до 2–3 % случаев заболевания [1, 4].

ВЫВОДЫ

В результате исследования выборки неродственных больных с фенилкетонурией, наблюдавшихся в Морозовской ДГКБ (г. Москва) в 2015–2016 гг., выявлено широкое разнообразие патогенных мутаций, а также вариантов генотипов по гену *PAH*. Применение ПЦР для определения нуклеотидных замен в гене *PAH* в рамках исследования на 16 типах мутаций гена позволило идентифицировать 83 % патогенных аллелей в выборке. Технологический потенциал метода real-time PCR делает возможным его применение в практике для рутинного диагностирования частых мутаций в гене *PAH* у больных ФКУ и выявления носительства патогенных мутаций. Мутация p.R408W представляет мажорный вариант, полученное значение аллельной частоты по данной мутации соответствует современным данным для Москвы и Московской области. Выявленный спектр частых мутаций выборки совпадает с данными по России. Процент аллелей с «мягкими» мутациями в выборке больных ФКУ превышает средние значения по России. Мутации p.D222Terfs и p.R111Ter, выявленные в нескольких независимых случаях, являются потенциальными кандидатами на включение в состав панели тестов ПЦР-скрининга при проведении генотипирования в Московском регионе. В результате использования метода целевого высокопроизводительного секвенирования выявлен ряд не описанных ранее для региона мутаций различного функционального типа: p.D222Terfs, p.R111Ter, p.F161S, p.G188D, p.R270K, p.L311P, p.F55L, p.F55Leufs, IVS1+5G>T, IVS8-7A>G.

Литература

1. Клинические рекомендации по диагностике и лечению фенилкетонурии и нарушений обмена тетрагидробиоптерина. М.: Академиздат; 2014. 70 с.
2. Бушуева Т. В. Современный взгляд на проблему фенилкетонурии у детей: диагностика, клиника, лечение. *Вопр. соврем. педиатр.* 2010; 9 (1): 157–60.
3. Baturina OA, Tupikin AE, Lukjanova TV, Sosnitskaya SV, Morozov IV. *PAH* and QDPR Deficiency Associated Mutations in the Novosibirsk Region of the Russian Federation: Correlation of Mutation Type with Disease Manifestation and Severity. *J Med Biochem.* 2014; 33 (4): 333–40.
4. Blau N, Shen N, Carducci C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014 Jul; 14 (6): 655–71.
5. Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat.* 2003 Apr; 21 (4): 345–56.
6. Амелина М. А., Зинченко Р. А., Степанова А. А., Гундорова П., Поляков А. В., Амелина С. С. Изучение взаимосвязи генотипов (*PAH*) и фенотипов у больных фенилкетонурией Ростовской области. *Мед. ген.* 2016; 15 (6): 3–10.
7. Касимов Д. А., Сикора Н. В., Чешева Н. Н. Результаты исследования детей на фенилкетонурию в Хабаровском крае. *Здравоохранение Дальнего Востока.* 2014; 3 (61): 26–8.
8. Аничкина А. А., Гаврилюк А. П., Тверская С. М., Поляков А. В. Анализ наиболее часто встречающихся мутаций в гене фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией. *Мед. ген.* 2003; 2 (4): 175–81.
9. Гундорова П., Степанова А. А., Бушуева Т. В., Беяшова Е. Ю., Зинченко Р. А., Амелина С. С. и др. Генотипирование больных фенилкетонурией из различных регионов Российской Федерации с целью определения чувствительности к препаратам ВН4. *Генетика.* 2017; 53 (6): 732–9.
10. Абрамов Д. Д., Кадочникова В. В., Якимова Е. Г., Белоусова М. В., Маерле А. В., Сергеев И. В. и др. Высокая частота носительства в российской популяции мутаций гена *CFTF*, ассоциированных с муковисцидозом, и мутаций гена *PAH*, ассоциированных с фенилкетонурией. *Вестн. РГМУ.* 2015; (4): 32–5.
11. Батурина О. А., Бондарь А. А., Тупикин А. Е., Жабин С. Г., Морозов И. В. Анализ мутаций гена фенилаланингидроксилазы

- у больных фенилкетонурией Кемеровской области и Республики Саха. Цитол. и ген. 2012; 46 (4): 40–7.
12. Косфиади И. А., Ребриков Д. В. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. Генетика. 2006; 42 (1): 22–32.
 13. Сергеев И. В., Хайтов М. Р., Трофимов Д. Ю., Абрамов Д. Д., Грудакова Е. Г., Гончарова Е. В. и др. Разработка методов для проведения широкомасштабных исследований полиморфизма генов, регулирующих различные компоненты иммунного ответа. Физиол. и патол. иммун. системы. 2009; 13 (4): 21–6.
 14. Blau N, Yue W, Perez B, database managers. PAHvdb: Phenylalanine Hydroxylase Gene Locus-Specific Database [Интернет]. [Дата обращения: 14 августа 2017 г.]. Доступно по: <http://www.biopku.org/pah/home.asp>
 15. Амелина М. А., Степанова А. А., Поляков А. В., Амелина С. С., Зинченко Р. А. Спектр и частота встречаемости мутаций в гене PAH у больных фенилкетонурией Ростовской области. Мед. ген. 2015; 14 (8): 30–6.
 16. Гундорова П., Степанова А. А., Макаов А. Х., Зинченко Р. А., Абайханова З. М., Поляков А. В. Особенности спектра мутаций в гене PAH у больных фенилкетонурией из Карачаево-Черкесской Республики. Генетика. 2016; 52 (12): 1448–57.
 17. Зинченко Л. В., Матулевич С. А., Кучер А. Н. Территориальная распространенность и этническое разнообразие мутаций гена фенилаланин-гидроксилазы в Краснодарском крае. Кубанск. науч. мед. вестн. 2006; (3–4): 39–42.
 18. Guldborg P, Henriksen KF, Güttler F. Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99 % of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. Genomics. 1993 Jul; 17 (1): 141–6.
 19. Liu N, Kong XD, Zhao DH, Wu QH, Li XL, Guo HF, et al. Prenatal diagnosis of Chinese families with phenylketonuria. Genet Mol Res. 2015 Nov 19; 14 (4): 14615–28.
 20. Kuzmin AI, Eisensmith RC, Goltsov AA, Sergeeva NA, Schwartz EI, Woo SL. Complete spectrum of PAH mutations in Tataria: presence of Slavic, Turkic and Scandinavian mutations. Eur J Hum Genet. 1995; 3 (4): 246–55.
 21. Li J, Eisensmith RC, Wang T, Lo WH, Huang SZ, Zeng YT, et al. Identification of three novel missense PKU mutations among Chinese. Genomics. 1992 Jul; 13 (3): 894–5.
 22. Zekanowski C, Cabalska B, Borsuk P, Bal J. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in mild hyperphenylalaninemia: a novel mutation in exon 3. Hum Mutat. 1997; 10 (3): 258–9.
 23. Eigel A, Dworniczak B, Kalaydjieva L, Horst J. A frameshift mutation in exon 2 of the phenylalanine hydroxylase gene linked to RFLP haplotype 1. Hum Genet. 1991 Oct; 87 (6): 739–41.
 24. Lichter-Konecki U, Konecki DS, DiLella AG, Brayton K, Marvit J, Hahn TM, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency caused by a single base substitution in an exon of the human phenylalanine hydroxylase gene. Biochemistry. 1988 Apr 19; 27 (8): 2881–5.
 25. Pérez B, Desviat LR, Ugarte M. Analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in the Spanish population: mutation profile and association with intragenic polymorphic markers. Am J Hum Genet. 1997 Jan; 60 (1): 95–102.
 26. Song F, Qu YJ, Yang YL, Jin YW, Zhang YM, Wang H, et al. [The mutant spectrum of phenylalanine hydroxylase gene in Northern Chinese]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2007 Jun; 24 (3): 241–6. Chinese.

References

1. Klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu fenilketonurii i narusheniy obmena tetragidriopterina. Moscow: Akademizdat; 2014. 70 p. Russian.
2. Bushuyeva TV. [Phenylketonuria in children: diagnostics, clinic, treatment]. Voprosy sovremennoy pediatrii. 2010; 9 (1): 157–60. Russian.
3. Baturina OA, Tupikin AE, Lukjanova TV, Sosnitskaya SV, Morozov IV. PAH and QDPR Deficiency Associated Mutations in the Novosibirsk Region of the Russian Federation: Correlation of Mutation Type with Disease Manifestation and Severity. J Med Biochem. 2014; 33 (4): 333–40.
4. Blau N, Shen N, Carducci C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. Expert Rev Mol Diagn. 2014 Jul; 14 (6): 655–71.
5. Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. Hum Mutat. 2003 Apr; 21 (4): 345–56.
6. Amelina MA, Zinchenko RA, Stepanova AA, Gundorova P, Polyakov AV, Amelina SS. [Examine the relationship genotypes (PAH) and phenotype in patients with phenylketonuria Rostov region]. Meditsinskaya genetika. 2016; 15 (6): 3–10. Russian.
7. Kasimov DA, Sikora NV, Checheva NN. [Incidence and structure of phenylketonuria in children of Khabarovsk territory]. Zdravookhranenie Dal'nego Vostoka. 2014; 3 (61): 26–8. Russian.
8. Anichkina AA, Gavriluc AP, Tverskaya SM, Polyakov AV. [Analysis of most prevalent mutations of PAH gene in phenilketonuria patients]. Meditsinskaya genetika. 2003; 2 (4): 175–81. Russian.
9. Gundorova P, Stepanova AA, Bushueva TV, Belyashova EYu, Zinchenko RA, Amelina SS, et al. Genotyping of Patients with Phenylketonuria from Different Regions of Russia for Determining BH4 Responsiveness. Russ J Genet. 2017; 53 (6): 712–8.
10. Abramov DD, Kadochnikova VV, Yakimova EG, Belousova MV, Maerle AV, Sergeev IV, et al. [High carrier frequency of CFTR gene mutations associated with cystic fibrosis, and PAH gene mutations associated with phenylketonuria in Russian population]. Bulletin of RSMU. 2015; (4): 32–5. Russian.
11. Baturina OA, Bondar AA, Tupikin AE, Zhabin SG, Morozov IV. Analysis of phenylalanine hydroxylase gene mutations in phenylketonuria patients from Kemerovo oblast and the Sakha Republic. Cytol Genet. 2012 Jul; 46 (4): 227–32. DOI: 10.3103/S0095452712040032.
12. Kofiadi IA, Rebrikov DV. Methods for detecting single nucleotide polymorphisms: Allele-specific PCR and hybridization with oligonucleotide probe. Russ J Genet. 2006 Jan; 42 (1): 16–26.
13. Sergeev IV, Khaitov MR, Trofimov DYU, Abramov DD, Grudakova EG, Goncharova EV, et al. Razrabotka metodov dlya provedeniya shirokomasshtabnykh issledovaniy polimorfizma genov, reguliruyushchikh razlichnye komponenty immunnogo otveta. Fiziologiya i patologiya immunnogo sistema. 2009; 13 (4): 21–6. Russian.
14. Blau N, Yue W, Perez B, database managers. PAHvdb: Phenylalanine Hydroxylase Gene Locus-Specific Database [Internet]. [cited 2017 Aug 14]. Available from: <http://www.biopku.org/pah/home.asp>
15. Amelina MA, Stepanova AA, Polyakov AV, Amelina SS, Zinchenko RA. [Spectrum and frequency of mutations in PAH gene in patients with phenylketonuria from Rostov region]. Meditsinskaya genetika. 2015; 14 (8): 30–6. Russian.
16. Gundorova P, Stepanova AA, Makaov AKH, Zinchenko RA, Abaykhanova ZM, Polyakov AV. Mutation spectrum of the PAH gene in phenylketonuria patients in the Karachay-Cherkess Republic (Russia). Russ J Genet. 2016; 52 (12): 1282–90.
17. Zinchenko LN, Matulevich SA, Kucher AN. [Territorial and ethnic specificity of mutations in a gene phenylalanin-hydroxylase in Krasnodar territory]. Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik. 2006; (3–4): 39–42. Russian.
18. Guldborg P, Henriksen KF, Güttler F. Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99 % of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. Genomics. 1993 Jul; 17 (1): 141–6.
19. Liu N, Kong XD, Zhao DH, Wu QH, Li XL, Guo HF, et al. Prenatal

- diagnosis of Chinese families with phenylketonuria. *Genet Mol Res.* 2015 Nov 19; 14 (4): 14615–28.
20. Kuzmin AI, Eisensmith RC, Goltsov AA, Sergeeva NA, Schwartz EI, Woo SL. Complete spectrum of PAH mutations in Tataria: presence of Slavic, Turkic and Scandinavian mutations. *Eur J Hum Genet.* 1995; 3 (4): 246–55.
 21. Li J, Eisensmith RC, Wang T, Lo WH, Huang SZ, Zeng YT, et al. Identification of three novel missense PKU mutations among Chinese. *Genomics.* 1992 Jul; 13 (3): 894–5.
 22. Zekanowski C, Cabalska B, Borsuk P, Bal J. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in mild hyperphenylalaninemia: a novel mutation in exon 3. *Hum Mutat.* 1997; 10 (3): 258–9.
 23. Eigel A, Dworniczak B, Kalaydjieva L, Horst J. A frameshift mutation in exon 2 of the phenylalanine hydroxylase gene linked to RFLP haplotype 1. *Hum Genet.* 1991 Oct; 87 (6): 739–41.
 24. Lichter-Konecki U, Konecki DS, DiLella AG, Brayton K, Marvit J, Hahn TM, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency caused by a single base substitution in an exon of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry.* 1988 Apr 19; 27 (8): 2881–5.
 25. Pérez B, Desviat LR, Ugarte M. Analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in the Spanish population: mutation profile and association with intragenic polymorphic markers. *Am J Hum Genet.* 1997 Jan; 60 (1): 95–102.
 26. Song F, Qu YJ, Yang YL, Jin YW, Zhang YM, Wang H, et al. [The mutant spectrum of phenylalanine hydroxylase gene in Northern Chinese]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2007 Jun; 24 (3): 241–6. Chinese.