



# **INSTYTUT MATKI I DZIECKA**

## **ZAKŁAD GENETYKI MEDYCZNEJ**

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Tadeusz Mazurczak

UL. KASPRZAKA 17A, 01-211 WARSZAWA

Tel: (022) 632-96-57; Tel/fax: (022) 632 62 24

e-mail: [genetyka@imid.med.pl](mailto:genetyka@imid.med.pl)

---

TADEUSZ MAZURCZAK, CEZARY ŻEKANOWSKI, MARIA NOWACKA, JERZY BAL

### **ZASADY DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ DZIEDZICZNEJ HIPERFENYLOALANINEMII**

### **CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA ZMIAN W GENACH KODUJĄCYCH HYDROKSYLAZĘ FENYLOALANINOWĄ ORAZ SYNTAZĘ TETRAHYDROBIOPTERYNOWĄ W POPULACJI POLSKIEJ**

**EKSPERTYZA NAUKOWA  
WYKONANA DLA MINISTERSTWA ZDROWIA**

---

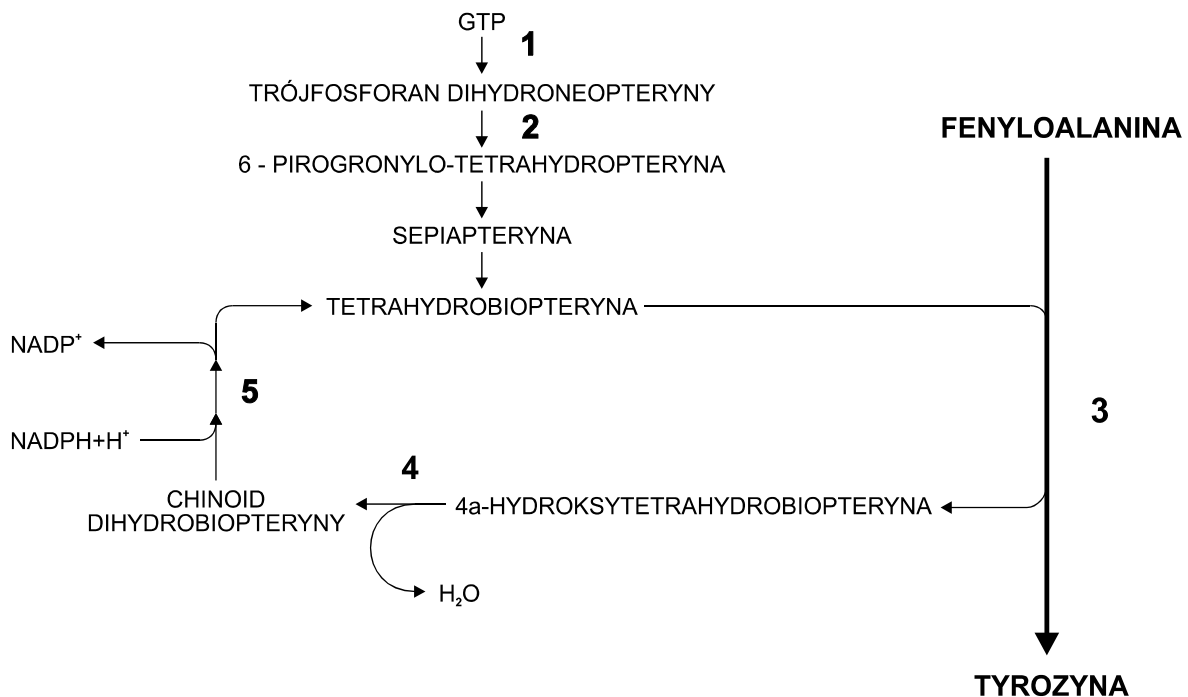
Warszawa 2000

## Spis treści

1.	Metaboliczna różnorodność hiperfenyloalaninemii	3
1.1.	Molekularne podłoże klinicznej heterogenności HPA	4
1.1.1.	Deficyt <i>PAH</i>	5
1.1.2.	Deficyt <i>PTS</i>	6
2.	Podłoże molekularne HPA w populacji polskiej	7
2.1.	Mutacje w genie <i>PAH</i>	7
2.2.	Mutacje w genie <i>PTS</i>	8
3.	Korelacje genotyp-fenotyp	11
3.1	Mutacja a fenotyp kliniczny	11
3.2	Genotyp a poziom rozwoju umysłowego	14
4.	Zasadność stosowania diagnostyki molekularnej HPA w praktyce klinicznej	15
5.	Podsumowanie	17
6.	Poradnictwo genetyczne – aspekty etyczne i prawne badań molekularnych	18
7.	Diagnostyka molekularna HPA – model postępowania diagnostycznego	20
8.	Piśmiennictwo uzupełniające	21
9.	Publikacje Zakładu Genetyki Medycznej i Kliniki Pediatrii Instytutu Matki i Dziecka z zakresu badań nad HPA	22
10.	Aneksy	24
10.1.	Izolacja i oczyszczanie kwasów nukleinowych	24
10.2.	Identyfikacja mutacji	24
10.2.1.	Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)	24
10.2.2	Sekwencjonowanie DNA	25
10.3.	Badanie ekspresji mutacji <i>in vitro</i>	25

## 1. Metaboliczna różnorodność hiperfenyloalaninemii

Dziedziczna hiperfenyloalaninemia (HPA) obejmuje grupę chorób powodowanych uszkodzeniem jednego ze składników systemu katabolizmu fenyloalaniny. Wspólną cechą HPA jest trwale podwyższone stężenie fenyloalaniny we krwi i płynach ustrojowych. W prawie 98% przypadków defekt dotyczy hydroksylazy fenyloalaninowej (PAH), a w pozostałych enzymów związanych z biosyntezą lub metabolizmem kofaktora reakcji przekształcania fenyloalaniny w tyrozynę. Wszystkie postaci HPA dziedziczone są w sposób autosomalny recesywny.



Ryc.1

Schemat enzymatycznego systemu hydroksylacji fenyloalaniny. Hiperfenyloalaninemia może być powodowana defektem hydroksylazy fenyloalaninowej (3) albo enzymów uczestniczących w syntezie i odnawianiu aktywnej formy kofaktora (tetrahydrobiopteryny), m.in. reduktazy dihydrobiopterynowej (5), cyklohydrolazy I GTP (1), syntazy 6-pirogronylo-tetrahydrobiopterynowej (2) lub dehydratazy pteryno-4-karbinoloaminowej (4).

Tetrahydrobiopteryna (BH<sub>4</sub>) jest kofaktorem nie tylko hydroksylazy fenyloalaninowej, lecz również hydroksylazy 3-tyrozynowej oraz hydroksylazy 5-tryptofanowej, które są kluczowymi enzymami szlaków biosyntezy neurotransmiterów (dopaminy i serotoniny). Stąd defekt enzymów związanych z utrzymywaniem właściwego poziomu BH<sub>4</sub> prowadzi do hiperfenyloalaninemii której towarzyszy deficyt amin biogennych.

Hiperfenyloalaninemia jest chorobą o znacznej heterogenności objawów klinicznych, od postaci ciężkich np. klasycznej fenylketonurii (PKU) czy centralnej postaci niedoboru syntazy 6-pirogronylotetrahydrobiopterynowej (PTPS), do form przejściowych i łagodnych np. łagodnej PKU, łagodnej HPA czy obwodowej postaci deficytu PTPS. Rozróżnienie postaci HPA jest istotne ponieważ formy łagodne nie wymagają leczenia lub wymagają leczenia w ograniczonym zakresie. Łagodne postaci HPA występują około 4-5 razy rzadziej, w porównaniu z klasyczną PKU.

Podstawowym, noworodkowym testem przesiewowym w kierunku HPA był do 1998 roku test Guthriego. Obecnie stosuje się test kolorymetryczny, umożliwiający precyzyjne oznaczenia stężenia fenylalaniny we krwi. Jednoczesne oznaczenie poziomów fenylalaniny i tyrozyny możliwe jest np. metodą fluorymetryczną. Nieprawidłowy wynik wymaga dalszej diagnostyki różnicującej dwie zasadnicze postaci HPA. Na deficyt  $BH_4$  wskazuje pozytywny wynik testu doustnego obciążenia kofaktorem. Dalsza diagnostyka wymaga oznaczenia stężenia biopteryny i neopteryny w moczu oraz w miarę możliwości w płynie mózgowo-rdzeniowym, dla dokładnego wskazania defektywnego enzymu oraz postaci choroby.

Ostateczne ustalenie rozpoznania deficytu DHPR wymaga oznaczenia aktywności reduktazy w erytrocytach.

Objawom choroby zapobiega się poprzez stosowanie diety niskofenyloalaninowej o różnym zakresie (deficyt PAH), przez doustne podawanie  $BH_4$  (deficyt GTP-CH lub PTPS) lub łączne stosowanie diety i uzupełnianie kofaktora (defekt reduktazę tetrahydrobiopterynową, DHPR). W deficytach  $BH_4$ , w celu przywrócenia równowagi neurotransmiterów podaje się również prekursory dopaminy i serotoniny.

### *1.1. Molekularne podłoże klinicznej heterogenności HPA*

U podstaw dziedzicznej HPA leży uszkodzenie genów kodujących enzymy systemu hydroksylacji fenylalaniny. Znana jest zarówno lokalizacja chromosomowa, jak sekwencja wszystkich genów, których mutacje powodują HPA. U podstaw heterogenności form klinicznych HPA leży heterogenność na poziomie molekularnym. Zidentyfikowano szereg mutacji w genach kodujących hydroksylazę fenylalaninową (PAH), cyklohydrolazę I GTP (GTPCH), syntazę 6-pirogronylotetrahydrobiopterynową (PTS) oraz reduktazę tetrahydrobiopterynową (DHPR). Wiele z mutacji, zwłaszcza w

genie *PAH* i *PTS*, powiązано z konkretnymi fenotypami biochemicznymi i klinicznymi chorych. Diagnostyka molekularna (analiza DNA) obok weryfikacji rozpoznania klinicznego i biochemicznego stanowi dodatkowe narzędzie ułatwiające lekarzowi wybór i planowanie optymalnego dla danego chorego sposobu leczenia. Jest również podstawą poradnictwa genetycznego w rodzinach ryzyka HPA w tym określania, wśród krewnych probanda, nosicielstwa zmutowanego genu.

W obrębie HPA powodowanej mutacjami w genie *PAH* wyróżnić można trzy zasadnicze postaci kliniczne: klasyczną PKU, łagodną PKU oraz łagodną HPA (Tabela 1).

### 1.1.1. Deficyt PAH

Do połowy 2000 roku zidentyfikowano ponad 400 mutacji w genie *PAH*. Różne mutacje w różnym stopniu ograniczają aktywność hydroksylazy fenyloalaninowej, można wyróżnić jednak w ich obrębie trzy grupy: mutacje silne (S), łagodne (Ł) i pośrednie (P). Obydwa zmutowane allele *PAH* kodują podjednostki hydroksylazy, które wspólnie tworzą aktywny katalitycznie tetramer. Heterogenność postaci klinicznej HPA zależy zatem również od tego, które mutacje spotykają się u chorego.

Tabela 1  
Uproszczona klasyfikacja hiperfenyloalaninemii wynikającej z defektu genu *PAH*

postać choroby (rozpoznanie)	aktywność PAH w biopsjach wątroby (% poziomu normalnego)	stężenia fenyloalaniny w osoczu krwi ( $\mu\text{mole/l}$ )
klasyczna PKU	<1	>1200
łagodna PKU	1-3	600-1200
łagodna HPA	3-6	<600

Przedstawiony podział mutacji w genie *PAH* ma jednak charakter bardziej kliniczny i biochemiczny niż molekularny. Zbyt mało na razie wiadomo o funkcjonalnej strukturze hydroksylazy fenyloalaninowej by na podstawie lokalizacji mutacji w genie i rodzaju powodowanego przez nią podstawienia aminokwasowego wnioskować o efektach fenotypowych. Opublikowane w zeszłym roku dane krystalograficzne dotyczące domeny regulacyjnej i katalitycznej szczurzej PAH w powiązaniu z mapami krystalogra-

ficznymi fragmentów ludzkiej hydroksylazy, umożliwiają rozpoczęcie systematycznych badań w tym zakresie.

O efekcie fenotypowym mutacji wnioskować można także pośrednio, na podstawie porównania sekwencji hydroksylaz aminokwasów aromatycznych z różnych organizmów. Mutacje położone w obszarach nie konserwowanych ewolucyjnie powodują zwykle łagodne postaci HPA. Nie jest to jednak regułą: na przykład mutacja łagodna F55L (patrz niżej) dotyczy reszty konserwowanej ewolucyjnie od *Cenorabditis .elegans*, przez *Drosophila melanogaster* i szczura, do człowieka.

Konieczne jest zatem zastosowanie badania ekspresji mutacji w różnych układach *in vitro* oraz analizy fenotypów chorych z identycznymi lub podobnymi mutacjami. Integracja wszystkich elementów pozwoli dopiero zbudować funkcjonalną mapę hydroksylazy fenyloalaninowej.

### 1.1.2. Deficyt PTPS

W obrazie klinicznym deficytu PTPS wyróżnia się dwie skrajne postaci. Postać "typową" lub "centralną", w której pojawiają się objawy związane z zakłóceniem hydroksylacji fenyloalaniny w wątrobie oraz zaburzenia neurologiczne, związane z zakłóceniem syntezy neurotransmiterów. W postaci "obwodowej" (łagodnej) objawy ze strony centralnego układu nerwowego są słabo nasilone lub nie występują w ogóle. Obecnie przyjmuje się, że istnieje wiele stadiów pośrednich między postacią centralną a obwodową.

Podobnie jak w deficycie hydroksylazy fenyloalaninowej, również w tym przypadku przyczyną różnorodności objawów jest wielość mutacji oraz tetrameryczna budowa enzymu. Dotychczas zidentyfikowano ponad 40 mutacji w genie *PTS*. Liczba chorych z określonym genotypem w *locus PTS* pozostaje nadal niewielka, dlatego nie ustalono zbyt wielu związków między konkretnymi mutacjami a fenotypem klinicznym chorych. Badania ekspresji mutacji *in vitro* wskazują jednak, że niektóre mutacje pozostawiają znaczącą aktywność resztkową enzymu (np. A16C, V56M).

## 2. Podłoże molekularne HPA w populacji polskiej

### 2.1. Mutacje w genie PAH

Stosując techniki rutynowego wykrywania mutacji przebadano próbki DNA pochodzące od 89 dzieci z klasyczną PKU. Analizowano obecność mutacji występujących w Europie najczęściej (Tabela 2). Badania prowadzono również na preparatach DNA pochodzących od grupy 22 dzieci z łagodną PKU oraz od 79 dzieci z łagodną HPA. W tych grupach mutacji poszukiwano stosując technikę sekwencjonowania DNA (Tabela 3 i 4).

Tab. 2.

Mutacje zidentyfikowane w grupie 89 chorych z klasyczną postacią PKU (n = 178 alleli). W nawiasach podano względne częstości zmutowanych alleli po uwzględnieniu danych uzyskanych wcześniej (Jaruzelska i wsp. 1993, 1995)

mutacje	położenie	częstość (%)	uwagi
R408W	E12	55.6 (59.3)	PCR-RFLP
R158Q	E5	6.74 (3.37)	ACRS
IVS10	I10	5.0 (5.0)	ACRS
IVS12	I12	2.8 (3.9)	ACRS
R261Q	E7	2.2 (1.6)	PCR-RFLP
G272X	E7	1.68 (1.34)	PCR-RFLP
R252W	E7	1.1 (1.3)	PCR-RFLP
P281L	E7	0.56 (0.28)	ACRS
		<b>Σ = 75.68</b>	

U około 60% chorych z klasyczną PKU określono pełne genotypy w *locus PAH*. U 36% zidentyfikowano tylko jedną mutację, w większości (24%) R408W. W pozostałych przypadkach nie znaleziono mutacji.

U prawie wszystkich chorych z łagodną postacią PKU i z łagodną HPA zidentyfikowano pełne genotypy w genie *PAH*.

W populacji polskiej w grupie chorych z klasyczną PKU mutacja R408W występuje z częstością ok. 55%, w grupie łagodnej HPA z częstością ok. 32% a w przypadku łagodnej PKU z częstością ok. 25%. Mutacja R408W określana jest jako „silna”. Odpowiada za całkowity brak aktywności hydroksylazy, i zapewne nieobecność białka PAH *in vivo*, co ułatwia i czyni ją bardziej obiektywną w ocenie „siły” mutacji rzadkich i nowych. Analogicznie traktować można stosunkowo częste w

badanej grupie mutacje splicingowe (np. IVS10, IVS12) i terminacyjne (R261X, G272X). Fenotyp kliniczny chorych niosących jedną z wymienionych mutacji „silnych” zależy zatem jedynie od mutacji w drugim allelu.

Tab. 3.  
Mutacje zidentyfikowane w grupie 22 chorych z łagodną postacią PKU (n = 44 allele)

mutacje	położenie	częstość (%)	uwagi
R408W	E12	25	
E390G	E11	13.6	
Y414C	E12	9.1	
A104D	E3	9.1	
R241H	E7	6.8	
IVS10	I10	6.8	
R243Q	E7	4.5	
L48S	E2	2.3	
F55fs	E2	2.3	
*R68G	E3	2.3	
R68S	E3	2.3	
*I95F	E3	2.3	
IVS4	I4	2.3	
R158Q	E5	2.3	
*D222G	E6	2.3	pośrednia?
*Q226H	E6	2.3	
R261Q	E7	2.3	pośrednia?
ΔT322	E9	2.3	
V388m.	E11	2.3	
		<b>Σ = 100</b>	

mutacje „pośrednie” zaciemniono, \* -mutacje zidentyfikowane po raz pierwszy w badanej grupie (R68G = c.202A→G; I95F = c.283A→T D222G = c.665 A→G; Q226H = c.226G→C; IVS4 = c.442-1g→a; IVS10 = c.1066-11g→a)

## 2.2. Mutacje w genie *PTS*

W grupie chorych z deficytem PTPS zidentyfikowano 5 różnych mutacji w genie *PTS*. Dwie z nich, D136V i N36K, znaleziono łącznie w  $\frac{3}{4}$  wszystkich zmutowanych alleli. Cztery spośród zidentyfikowanych mutacji to mutacje nowe, wykryte po raz pierwszy w badanej grupie chorych. U wszystkich chorych udało się określić pełny genotyp *PTS* (Tabela 5, Rycina 4).

Wśród sześciu chorych trzech noszą dwie różne mutacje w obu allelach genu *PTS*. Prezentują oni postać „ostrą” (centralną) deficytu PTPS. Dwaj chorzy homozygotyczni pod względem mutacji D136V wykazuje natomiast łagodną postać choroby.



Tab. 4.

Mutacje zidentyfikowane w grupie 79 chorych z łagodną postacią HPA (n = 158 alleli)

mutacja	położenie	częstość (%)	uwagi
R408W	E12	32.3	
A403V	E12	10.1	
A300S	E8	9.5	
I306V	E9	7.6	
R297H	E8	5.7	
F55L	E2	3.2	
V245A	E7	3.2	
IVS10	I10	3.2	
R158Q	E5	2.5	
T380M	E11	1.9	
D415N	E12	1.9	
F55fs	E2	1.3	
D145V	E4	1.3	
P211T	E6	1.3	
R252W	E7	1.3	
R261Q	E7	1.3	pośrednia?
V388M	E11	1.3	pośrednia
IVS12	I12	1.3	
L48S	E2	0.6	pośrednia
*IVS2	I2	0.6	
*R71H	E3	0.6	
R87S	E3	0.6	
*P89S	E3	0.6	
*IVS4	I4	0.6	
*D222G	E6	0.6	pośrednia?
V230I	E6	0.6	
R243Q	E7	0.6	
R261X	E7	0.6	
G272X	E7	0.6	
P281L	E7	0.6	
K320N	E9	0.6	
A322T	E9	0.6	
delT323	E9	0.6	
Y414C	E12	0.6	pośrednia
		<b>Σ = 100</b>	

mutacje „łagodne” zacięziono, a „pośrednie” zaznaczono. \* -mutacje zidentyfikowane po raz pierwszy w badanej grupie (R71H = c.212G→A; P89S = c.265C→T; IVS4 = c.441+5g→t; IVS2 = c.168+5g→a; IVS12 = c.1315+1g→a)

Znany jest przypadek chorego z centralną postacią deficytu PTPS o genotypie T67M/D136V. Zaobserwowano u niego niestabilność enzymu, powstającego na matrycy zmutowanych w różny sposób alleli. Jednocześnie z badań *in vitro* wiadomo, że

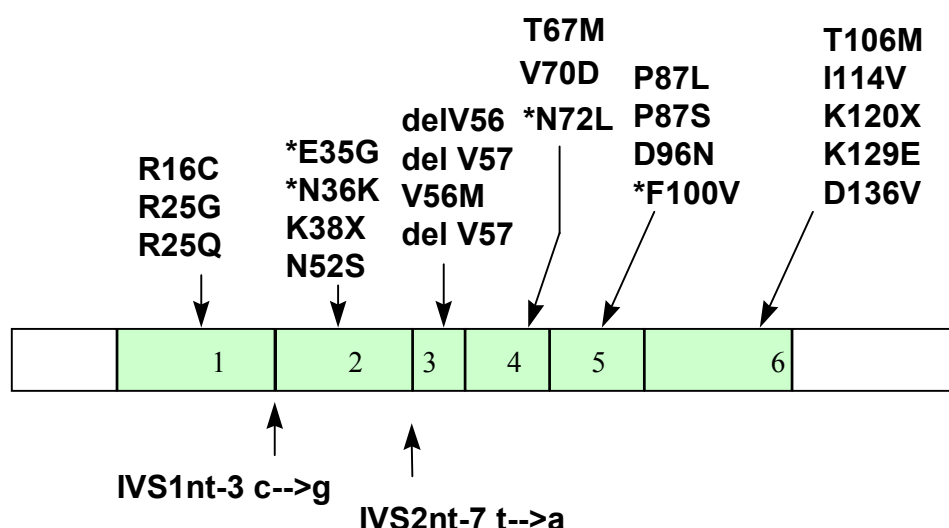
obie mutacje analizowane w układzie ekspresji *in vitro* prowadzą do powstania syntazy zachowującej umiarkowaną aktywność resztkową. Zaproponowano więc, że mutacje te prowadzą do powstania podatnych na degradację *in vivo* form enzymu.

Tab. 5.  
Mutacje w genie PTS zidentyfikowane u sześciu chorych z deficytem PTPS

mutacja	położenie	częstość (%)	uwagi
D136V	E6	50	łagodna w układzie homozygotycznym
*N36K	E2	25	
*E35G	E2	8.3	
*N72L	E4	8.3	łagodna?
*F100L	E5	8.3	

\* -mutacje zidentyfikowane po raz pierwszy w badanej grupie (E35G = c.104 A→G; N72L = c.216 T→A ; F100V = c.298 T→G)

Identyfikacja w badanej grupie dwu chorych homozygotycznych pod względem mutacji D136V wykazujących postać obwodową defektu syntazy, sugeruje iż niestabilność enzymu zaobserwowana u chorego T67M/D136V wynikać może z faktu zaburzonego współdziałania, w różny sposób zmutowanych podjednostek syntazy (efekt negatywnego dominowania). Hipotezę tę może zweryfikować dopiero oznaczenie aktywności PTPS w hodowli fibroblastów.



Ryc. 4.  
Najczęściej występujące mutacje w genie PTS. \* -mutacje zidentyfikowane po raz pierwszy w badanej grupie

### 3. Korelacje fenotyp-genotyp

#### 3.1. Mutacja a fenotyp kliniczny

Zasadnicze zależności pomiędzy rodzajem mutacji, a fenotypem klinicznym przedstawia Tabela 5. Korelacje pomiędzy genotypem i fenotypem są istotne dla rutynowej diagnostyki molekularnej. Noworodek, u którego zidentyfikowano dwie mutacje „silne”, nawet jeśli wyjściowe poziomy feniloalaniny sugerowałyby będą łagodną postacią hiperfeniloalaninemii, będzie w przyszłości prezentował klasyczną postać PKU. Z drugiej strony identyfikacja u probanda mutacji łagodnej stanowi podstawę do postawienia rozpoznania łagodnej HPA. Znalezienie mutacji pośredniej sugeruje łagodną HPA lub łagodną PKU.

Tab. 5.  
Zasadnicze korelacje pomiędzy rodzajem mutacji w *locus PAH* a postacią kliniczną HPA

Mutacje	postać HPA
S + S	klasyczna PKU
S + P.	łagodna PKU
P + P	łagodna HPA, rzadziej łagodna PKU
S + Ł	łagodna HPA
P + Ł, Ł + Ł	łagodna HPA lub fenotyp prawidłowy

S – mutacja „silna”, P – mutacja „pośrednia”, Ł – mutacja „łagodna”

W obrębie klasycznej PKU nie znaleziono dotąd istotnych klinicznie korelacji pomiędzy genotypem a fenotypem klinicznym. Wyjątek może stanowić wspomniana mutacja R261Q, którą w różnych populacjach powiązano z zasadniczo prawidłowym poziomem intelektualnym, mimo wysokich stężeń feniloalaniny. Znane przypadki chorych wykrywane są najczęściej przypadkowo, na podstawie wystąpienia fenylketonurii matczynej u potomstwa kobiety pozornie zdrowej, która nie została zidentyfikowana w teście pourodzeniowym.

Zarówno łagodna HPA, jak łagodna PKU powodowane były we wszystkich przypadkach przez różne mutacje, w dwu allelach genu *PAH*. Jedną z mutacji była „silna”, druga „słaba” lub „pośrednia”. Jedynym wyjątkiem była chora o genotypie V388M/V388M. Mutacja V388M jest mutacją pośrednią, stąd fenotyp kliniczny określono jako łagodną HPA. Chora nie stosowała diety, a średnie poziomy feniloalaniny były stosunkowo wysokie. Rozwój intelektualny był prawidłowy.

W badanej grupie chorych, stosując ocenę siły mutacji *in vivo*, jako łagodne określono mutacje F55L, P211T, V230I, R297H. Mutacje te odnotowywano w piśmiennictwie jako mutacje „łagodne”, „pośrednie” lub niekiedy „silne” (P211T). Mutacja K320N zidentyfikowana została u chorego niosącego w drugim allelu mutację zmieniającą ramkę odczytu (F55fs), co pozwala na określenie jej jako mutacji „łagodnej”. Podobnie sytuacja przedstawia się z mutacjami R71H i P89S, związanymi z mutacją R408W.

Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że mutacje położone pomiędzy pozycjami 71 i 94 eksonu 3 genu *PAH* związane są z łagodną HPA. Jest to zgodne z doniesieniami, że inne mutacje z tego regionu np. E76A, T81P, D84Y,  $\Delta$ I94 powodują także łagodną HPA. Podstawienia położone poza granicami wyznaczonymi kodonami 71 i 94, odpowiedzialne są za łagodną PKU (np. I65T, S70P, A104D). Obserwacja ta może być istotna klinicznie w przypadku zidentyfikowania u noworodka nieznanej dotychczas mutacji w eksonie 3.

Grupa mutacji pośrednich i łagodnych jest istotna, z diagnostycznego punktu widzenia (Tabele 2-4, Rycina 2 i 3). Zaprezentowane powiązania mutacji w genie *PAH* z fenotypami klinicznymi są zasadniczo zgodne z zależnościami znajdowanymi w innych populacjach. Uzupełniają również dane o korelacjach pomiędzy genotypem w *locus PAH* a fenotypem HPA opublikowane dla populacji kilku krajów europejskich oraz USA i Kanady.

Zaobserwowano kilka rozbieżności w stosunku do opublikowanych przez zespół kuratorów *PAH Mutation Analysis Consortium Database* wyników analizy korelacji genotyp-fenotyp w hiperfenyloalaninemii.

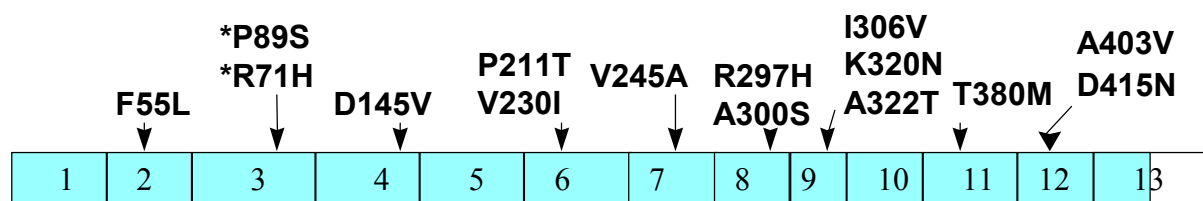
Mutacja R241H w badanej grupie chorych związana jest wyłącznie z łagodną PKU, charakteryzującą się dużą tolerancją pokarmową fenyloalaniny. Wynik ten jest o tyle nieoczekiwany, jako że mutację tę w Polsce uznano początkowo za mutację powodującą klasyczną PKU, a aktywność resztkową enzymu szacowano na ok. 1%. W populacji sycylijskiej natomiast mutacja R241H powoduje zarówno klasyczną jak łagodną PKU, w połączeniu z mutacjami silnymi.

Podobnie mutację V388M uznano na podstawie analizy badanej grupy chorych za mutację pośrednią. Chora, z prawidłowym rozwojem umysłowym, o genotypie V388M/V388M została zdiagnozowana biochemicznie i klinicznie jako łagodna HPA.

Chory V388M/E390G prezentuje natomiast fenotyp łagodnej PKU i pozostaje na diecie z częściowo ograniczoną podażą fenyloalaniny. Mutacji V388M nie znaleziono natomiast przeszukując, techniką przesiewową, ekson 11 genu *PAH* w grupie ponad 60 chorych z klasyczną PKU.

Mutację P211T zidentyfikowano jako łagodną, powodującą w powiązaniu z mutacją R408W łagodną postać HPA. Mutacja była do tej pory wiązana z klasyczną PKU.

Jako mutacje łagodne określono także mutacje A403V, A300S, F55L, które w innych populacjach wiązane były bądź z łagodną PKU, bądź z łagodną HPA. Mutacje Y414C i E390G uznano za mutacje pośrednie. Mutację R158Q określono jako mutację silną, która jednak w układzie homozygotycznym powoduje zwiększoną tolerancję pokarmową fenyloalaniny.



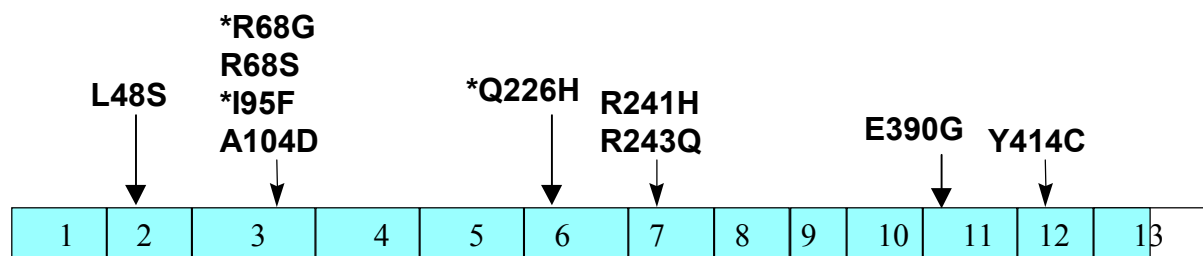
Ryc. 2.

Mutacje w genie *PAH* związane z łagodną HPA, zidentyfikowane w badanej grupie chorych.

\* -mutacje zidentyfikowane po raz pierwszy w badanej grupie

Wykazano również, że mutacje R68G i R68S nie zmieniają aktywności *PAH*, zarówno w postaci białka fuzyjnego *PAH-MBP* w układzie bakteryjnym, jak hydroksylazy ekspresowanej w układzie ssaczym. Ponadto białka w obu układach *in vitro* powstawały w ilościach prawidłowych oraz wykazywały prawidłową immunoreaktywność. Wyniki oznaczeń *in vitro* przy zastosowaniu standardowego stężenia fenyloalaniny i niefizjologicznych stężeń kofaktora mogą różnić się znacznie od aktywności w warunkach fizjologicznych. Ponieważ mutacja R408W całkowicie znosi aktywność hydroksylazy, można przyjąć, iż w przypadku genotypów R68G/R408W i R68S/R408W fenotyp chorych zależy wyłącznie od mutacji w kodonie 68. Może to oznaczać, iż mutacje te wpływają na stabilność białka *in vivo* lub na regulacyjne funkcje hydroksylazy. Ponieważ kilkudniowe przetrzymywanie *PAH-MBP* z obiema mutacjami nie zmniejszyło aktywności hydroksylazy, można przypuszczać że mutacje te nie zwiększają agregacji *PAH*. Zjawisko takie obserwowano np. dla mutacji

F39L, K42I, L48S czy I65T. Bardzo prawdopodobne jest natomiast zakłócenie funkcji regulacyjnych hydroksylazy przez mutacje w kodonie 68, jako że ekson 3 koduje część domeny uczestniczącej w modulowaniu aktywności PAH.



Ryc. 3.

Mutacje w genie PAH związane z łagodną PKU, zidentyfikowane w badanej grupie chorych.

\* -mutacje zidentyfikowane po raz pierwszy w badanej grupie

Podobną sytuację zaobserwowano w przypadku mutacji A403V, która w identycznym układzie bakteryjnym wydawała się być zmianą milczącą, nie wpływającą na aktywność enzymu. Dopiero znalezienie wielu chorych z mutacją A403V w grupie chorych z łagodną HPA potwierdziło, że jest ona mutacją odpowiedzialna za kliniczny fenotyp łagodnej HPA.

### 3.2. Poziom rozwoju umysłowego a genotyp HPA

Znając rodzaj mutacji można przewidywać fenotyp metaboliczny oraz kliniczny chorego. Najtrudniejszym zadaniem jest przewidywanie w oparciu o diagnozę molekularną dynamiki rozwoju intelektualnego czy emocjonalnego u chorych z klasyczną i łagodną PKU.

W przypadku łagodnej HPA nie występują zasadniczo zaburzenia w sferze poznawczej czy emocjonalnej. W przypadku obu postaci fenyloketonurii zależności te nie są jasne. Wynika to przede wszystkim z złożonego charakteru umysłowości człowieka i niewielkiego rozeznania w biochemicznych mechanizmach szkodliwego wpływu podwyższonych stężeń fenyloalaniny w organizmie. Wydaje się, że w fenyloketonurii genotyp wpływa na występujące zawsze, niezależnie od stosowanej diety, wahania poziomu fenyloalaniny w krótszych odcinkach czasu. Przypuszcza się, że wahania te wpływają w największym stopniu na obraz neurologiczny chorych.

Wahania poziomu fenyloalaniny są mniejsze u chorych z łagodną formą PKU, a być może również w przypadku pewnych genotypów klasycznej PKU (np. związanych z mutacją R261Q, zwłaszcza w układzie homozygotycznym). Zbyt mało jednak nadal wiadomo o mechanizmach prowadzących do uszkodzenia mózgu w wyniku wysokich stężeń fenyloalaniny we krwi.

W badanej grupie chorych z klasyczną PKU znaleziono trzy osoby o genotypie R261Q/R408W. Wszystkie one wykryte zostały w teście Guthriego i stosowały, choć niekonsekwentnie, dietę niskofenyloalaninową. We wszystkich przypadkach rozwój umysłowy był prawidłowy. Wydaje się, że być może obecność mutacji R261Q umożliwia łatwiejszy wpływ dodatkowych czynników modyfikujących, polepszających rozwój umysłowy. Charakterystyczne, iż mutację R261Q w układzie homozygotycznym lub w kombinacji z innymi silnymi mutacjami znajdowano w wielu przypadkach fenyloketonurii matczynej.

Podobną sytuację obserwowano także np. u chorego z genotypem A104D/R243Q, gdzie pomimo nieprawidłowo prowadzonej diety od 2 roku życia i wysokich poziomów fenyloalaniny, rozwój umysłowy był całkowicie prawidłowy.

Ostatnio publikowane wyniki badań z zastosowaniem protonowego rezonansu magnetycznego ( $^1\text{H-NMR}$ ) sugerują, że pomiędzy ludźmi istnieją różnice w kinetyce przyswajania, metabolizmu fenyloalaniny i jej przenikania przez barierę krew-mózg. W rezultacie wewnątrzmożgowe stężenia fenyloalaniny u chorych z PKU mogą być bardzo różne, mimo takich samych stężeń fenyloalaniny we krwi i takich samych genotypów w *locus PAH*.

#### **4. Zasadność stosowania diagnostyki molekularnej HPA w praktyce klinicznej**

Diagnostyka molekularna jest szczególnie istotna w przypadku rodzin ryzyka, w których zidentyfikowano różne postaci HPA, np. łagodną HPA i łagodną PKU u rodzeństwa. Znalezienie mutacji pozwoli wyjaśnić czy np. jest to wynikiem odziedziczenia mutacji związanej z równymi postaciami HPA, lub też czy jeden z rodziców jest niesie dwie mutacje łagodne, powodujące bezobjawową HPA. Rozróżnienie to jest istotne z punktu widzenia poradnictwa genetycznego. Diagnostyka molekularna oparta na sekwencjonowaniu oferuje w tym wypadku szybkie (tydzień) i pewne roz-

poznanie konkretnej postaci HPA, umożliwiające szybkie wprowadzenie odpowiedniej diety i udzielenie porady rodzicom.

Wczesna identyfikacja mutacji „pośrednich” (np. R241H) może być szczególnie użyteczna klinicznie. Niekiedy bowiem podwyższenie stężenia fenyloalaniny we krwi dzieci z łagodną PKU następuje powoli, tak że diagnoza kliniczna zostaje postawiona dopiero pod koniec pierwszego roku życia lub jeszcze później. Możliwe są także sytuacje odwrotne, gdy u noworodka występują stężenia fenyloalaniny charakterystyczne dla PKU, w ciągu kilku miesięcy ustalają się na poziomie charakterystycznym dla łagodnej HPA. Możliwe jest także, że wstępne rozpoznanie łagodnej HPA nie uzyska potwierdzenia molekularnego, a dalsza obserwacja kliniczna wskazuje na przejściową, niedziedziczną HPA. Znane są także przypadki przejściowo podwyższonych poziomów fenylalaniny u nosicieli jednej mutacji w genie *PAH*. Podobne przypadki opisano także w niniejszej pracy.

Zasadność stosowania diagnostyki molekularnej w niejednoznacznych klinicznie przypadkach HPA potwierdza przykład, w którym udało się zweryfikować błędne rozpoznanie kliniczne<sup>1</sup>. Chora CE (lat 19) została zdiagnozowana w okresie noworodkowym jako klasyczna postać PKU i leczona dietą niskofenyloalaninową. W wieku 17 lat pojawiły się problemy neurologiczne. Diagnostyka molekularna wykazała, że HPA powodowana jest mutacjami w genie *PTS* (N36K/N72L). Nie wykonano oznaczenia poziomu pteryn w płynie mózgowo-rdzeniowym chorej, co pozwoliłoby postawić definitywne rozpoznanie obwodowej („łagodnej”) postaci deficytu PTPS. Jednak brak degradacji psychicznej i zaburzeń neurologicznych, aż do wieku kilkunastu lat sugeruje postać łagodną. Ponieważ mutacja N36K wraz z mutacją D136V została zidentyfikowana u chorych z postacią centralną deficytu PTPS (tab. 7), można przypuszczać, że mutacja N72L jest mutacja „łagodną”.

W niektórych przypadkach diagnostyka molekularna umożliwia wykluczenie wystąpienia klasycznej PKU w rodzinie. Na przykład dzieci nosiciela mutacji słabej, niezależnie od rodzaju mutacji odziedziczonej ewentualnie od drugiego rodzica, będą wykazywały łagodną postać HPA. Identyfikacja mutacji łagodnej w tym samym przypadku sugerowała będzie łagodną PKU lub łagodna HPA.

---

<sup>1</sup> aktualnie w przypadku HPA zdiagnozowanym w okresie noworodkowym, w Instytucie Matki i Dziecka prowadzona jest pełna diagnostyka różnicowa



Wskazaniem do diagnostyki molekularnej z wykorzystaniem sekwencjonowania może być także podejrzenie w okresie noworodkowym postaci łagodnej PKU, w której identyfikacja mutacji może dostarczyć informacji istotnych np. do określenia sposobu prowadzenia diety niskofenyloalaninowej.

Analiza DNA wydaje się stosowna również w przypadku HPA powodowanej deficytem enzymów innych niż DHPR. Dla deficytu PTPS i GTP-CH na przykład opisano korelacje pomiędzy genotypem a przebiegiem choroby, istotne dla strategii leczenia chorych. Zbyt niska liczba zidentyfikowanych genotypów, zwłaszcza w przypadku defektu cyklohydrolazy, nie pozwala jednak na pewne wnioski.

## 5. Podsumowanie

Celem badań molekularnych (analizy DNA) w diagnostyce medycznej chorób dziedzicznych jest weryfikacja rozpoznania klinicznego jak też identyfikacja nosicieli zmutowanego genu wśród krewnych probanda. W sytuacji możliwości określenia korelacji pomiędzy typem defektu molekularnego a cechami klinicznymi, wynik diagnostyki molekularnej może być bezpośrednio wykorzystany w terapii danej choroby. W niektórych przypadkach określenie badanego genotypu jest podstawą oferowania rodzinie ryzyka genetycznego badania prenatalnego.

Otrzymane wyniki oznaczania mutacji w genach *PAH* i *PTS* oprócz znaczenia czysto poznawczego, posłużyły do wprowadzenia nowoczesnych metod diagnostyki molekularnej i stworzeniu referencyjnego laboratorium diagnostycznego chorób genetycznych. Z perspektywy prowadzonych badań pokusić się można o odpowiedź na pytanie: w jakich sytuacjach stosować należy diagnostykę molekularną i jakie mutacje identyfikować. Odpowiedź na to pytanie zależy od użyteczności klinicznej wyniku diagnostyki, istnienia konkurencyjnych metod biochemicznych czy możliwości finansowania diagnostyki molekularnej.

Obecnie pourodzeniowa diagnostyka HPA oparta jest na tanim, prostym i stosunkowo precyzyjnym teście kolorymetrycznym. Cena pojedynczego wyniku wynosi 11 zł. W przypadkach dzieci z podwyższonym poziomem fenyloalaniny we krwi wykonywane są dodatkowe badania: fluorometryczne określenie stężenia fenyloalaniny i tyrozyny, oznaczenie profilu pteryn w moczu, test obciążenia tetrahydrobiopteryną oraz oznaczanie aktywności reduktazy dihydrobiopterynowej. Koszt dodatko-

wych badań jest mniej więcej rząd wielkości wyższy, pozwala jednak zdiagnozować konkretną postać HPA.

Ze względu na ekspresję genu *PAH* przede wszystkim w wątrobie, nie wykonuje się rutynowo bezpośredniego oznaczania aktywności hydroksylazy fenyloalaninowej u chorych. Badanie wymaga biopsji wątroby oraz prowadzenia oznaczenia natychmiast po uzyskaniu bioptatu (ze względu na dużą niestabilność białka *PAH*).

Niekiedy jednak dokładne określenie postaci HPA może być trudne: w okresie noworodkowym postaci łagodne naśladują klasyczną PKU lub niekiedy odwrotnie. Pewne rozpoznanie postawione być może metodami klasycznymi niekiedy po kilkunastu miesiącach obserwacji.

Podstawą rozpoznania wszystkich form HPA w badaniu rutynowym pozostaje badanie biochemiczne. W przypadku weryfikacji rozpoznania klinicznego badania molekularne mają jedynie charakter pomocniczy. Wydaje się, że jednak, że również w tych przypadkach można się spodziewać wzrostu zainteresowania analizą molekularną. Szczególnie w sytuacjach diagnostycznie wątpliwych oraz obserwowanego w coraz większym stopniu udziału innych genów odpowiedzialnych za modyfikację ekspresji genów *PAH* czy *PTS*.

Użyteczność diagnostyki molekularnej w prognozowaniu i leczeniu łagodnych postaci HPA przedstawiono wyżej (por. rozdział 4). Pamiętać jednak należy, że w większości przypadków diagnostyka molekularna opiera się w tym przypadku na sekwencjonowaniu odpowiednich fragmentów DNA. Koszt pojedynczego badania sięga szacunkowo 600-900 zł.

## **6. Poradnictwo genetyczne – aspekty etyczne i prawne badań molekularnych**

Rodziny z rozpoznaniem HPA są rodzinami ryzyka genetycznego. Rodzice chorego dziecka są nosicielami zmutowanego genu a prawdopodobieństwo powtórzenia się choroby u kolejnego dziecka jest wysokie i wynosi 25%. Wynika to z toku dziedziczenia choroby.

Wśród zdrowych krewnych probandów diagnostyka molekularna jest jedynym pewnym sposobem identyfikacji nosicieli jednej kopii zmutowanego genu *PAH* czy *PTS*. Istniejące testy biochemiczne pozostawiają stosunkowo duży margines wyników

niepewnych, są ponadto skomplikowane i wymagają dokładnej standaryzacji. Ze względu na dużą liczbę mutacji, z punktu widzenia technicznego identyfikowanie mutacji u osób z populacji ogólnej (np. przyszłych małżonków osób z rodzin ryzyka HPA powinno być ograniczone do identyfikowania mutacji występujących w populacji polskiej najczęściej.

Analiza molekularna stwarza możliwość wykonywania badań przedurodzeniowych. W Polsce podobnie jak w innych krajach zachodnich rodzinom ryzyka HPA nie oferuje się jednak tej formy diagnostyki. Uzasadnione jest to przede wszystkim szybkim, skutecznym testem diagnostycznym w przesiewie noworodkowym oraz możliwością leczenia choroby.

Rozpoznanie hiperfenyloalaninemii podobnie jak rozpoznanie jakiegokolwiek choroby genetycznej u dziecka nakłada na lekarza obowiązek zapewnienia jego rodzicom uzyskania profesjonalnej porady genetycznej. Możliwość określenia genotypu probanda (identyfikacja mutacji w obu allelach) *PAH* czy *PTS* ma dużą wartość dla udzielenia właściwej porady.

Obowiązek udzielenia porady genetycznej wynika nie tylko z medycznej wiedzy lekarza o istocie i charakterze defektu genetycznego odpowiedzialnego za chorobę. Jest elementem profilaktyki pierwotnej chorób genetycznych, w której informacja o ryzyku powtórzenia się choroby w rodzinie może mieć istotne znaczenie dla kształtowania planów prokreacyjnych konsultowanych osób. Wymiar etyczny problemu określa przyjęty w 1993 roku Kodeks Etyki Lekarskiej, w którym stwierdza się, że „lekarz ma obowiązek zapoznać pacjentów należących do grupy zwiększonego ryzyka z możliwościami diagnostycznymi i terapeutycznymi współczesnej genetyki lekarskiej...”.

Zasady poradnictwa genetycznego w przypadkach HPA nie różnią się od obowiązujących w tym zakresie w genetyce klinicznej. W tym miejscu należy zwrócić uwagę na fakt, że często informacje uzyskiwane w poradni genetycznej mogą stać się źródłem głębokich przeżyć dla konsultowanych rodzin. Dlatego też proces przekazywania treści porady genetycznej powinien uwzględniać szereg warunków i okoliczności wynikających z istoty i treści przekazywanych informacji.

Należy pamiętać, że podstawowym celem porady genetycznej jest dostarczenie konsultowanym wiedzy o rozpoznanej chorobie genetycznej, a także informacji o wielkości ryzyka ponownego jej wystąpienia w rodzinie. Warunkiem zaś udzielenia

porady genetycznej jest prawidłowe ustalenie rozpoznania choroby. W tym względzie określoną rolę w przypadkach HPA pełni diagnostyka molekularna choroby. Znaczenie analizy DNA w przypadkach HPA dla weryfikacji rozpoznania klinicznego oraz ustalenia etiologii choroby omówione zostało wcześniej. W tym miejscu należy podkreślić rolę i odpowiedzialność lekarza specjalisty w ustalaniu wskazań do przeprowadzenia badań molekularnych probanda (i / lub jego krewnych), jak też we właściwej interpretacji wyników analizy DNA. Odpowiedzialność ta wynika ze szczególnego charakteru badania jakim jest analiza DNA pacjenta. Ma ono określony wymiar etyczny i prawny. Jak wiadomo, DNA jest nie tylko nośnikiem informacji genetycznej organizmu ludzkiego, lecz jest także samym zapisem tej informacji. Podlega więc określonej ochronie prawnej. Odczytywanie informacji zawartej w DNA dla celów zdrowotnych (diagnostyki, profilaktyki i leczenia) jest działaniem dozwolonym a warunki prawne jakim podlegają badania genomu ludzkiego określają odpowiednie zapisy (rozdział IV) Konwencji Bioetycznej Rady Europy (Konwencja o Ochronie Praw Człowieka i Godności Istoty Ludzkiej Wobec Zastosowań Biologii i Medycyny, 1996 r.) Wynika z nich jednoznaczny obowiązek zapewnienia poradnictwa genetycznego tym osobom, u których przeprowadza się testy genetyczne. W przypadku osób niepełnoletnich, u których istnieje potrzeba wykonania testów genetycznych konieczne jest uzyskanie zgody od prawnych opiekunów. Oni też powinni uzyskać w trakcie porady genetycznej pełną interpretację wyników przeprowadzonych badań.

## **7. Diagnostyka molekularna HPA - model postępowania diagnostycznego**

- W przypadku mutacji powodujących klasyczną PKU analiza molekularna powinna polegać na identyfikacji mutacji w genie PAH występujących najczęściej. W identyfikacji mutacji stosuje się technikę PCR-RFLP (R408W, R272X, R261Q, R252W) oraz ACRS (IVS12, IVS10, P281L, R243X, R158Q). W pierwszej kolejności powinna być identyfikowana mutacja R408W, znajdująca w około 55% wszystkich zmutowanych alleli w grupie chorych z klasyczną postacią PKU w Polsce. U chorych, u których nie znaleziono mutacji R408W poszukiwane są następnie trzy mutacje: R158Q, IVS12 oraz IVS10, stanowiące łącznie ok. 14% zmutowanych alleli. Pozostałe mutacje (około 6% zmutowanych alleli) poszukiwane są w ostatniej kolejności. W praktyce w badaniu rutynowym powinno wykonać się próby identyfikacji czterech mutacji: R408W, R158Q, IVS12 oraz IVS10

- Przy identyfikacji mutacji w łagodnej PKU i łagodnej HPA (gen *PAH*) po próbie identyfikacji mutacji występujących w genie *PAH* najczęściej badanie powinno polegać na sekwencjonowaniu poszczególnych eksonów. Przyjęta kolejność analizy eksonów: 12, 11, 9, 8, 7, 2 > 6, 4, 3 > 10, 5, 1 odpowiada gradientowi częstości występowania mutacji.

- Identyfikacja mutacji w deficycie PTPS (gen *P TS*). W identyfikacji mutacji wykorzystano technikę bezpośredniego, cyklicznego sekwencjonowania fluorescencyjnego poszczególnych eksonów genu *P TS*.

Mimo postępu w sekwencjonowaniu DNA i dostępności tej techniki w wielu laboratoriach badawczych ten typ analizy powinien być wykonywany jedynie w laboratoriach referencyjnych.

## 8. Piśmiennictwo uzupełniające

1. Berlin CM, Levy HL, Hanley WB (1995) Delayed increase in blood phenylalanine concentration in phenylketonuric children initially classified as mild hyperphenylalaninemia. *Screening* 4: 35-39.
2. Desviat LR, Perez B, Ugarte M.(1996) Molecular basis of non-PKU hyperphenylalaninemia in Spain: prevalence of A403V, a mutation with high residual activity. *J Inher Metab Dis* 19: 227-230.
3. DiLella AG i wsp (1987) An amino acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. *Nature* 327: 333-336.
4. Erladsen H i wsp (1997) Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nature Struct Biol* 4: 995-1000.
5. Hanihara T i wsp (1997) 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase deficiency with generalized dystonia and diurnal fluctuation of symptoms: a clinical and molecular study. *Movement Disorders* 12: 408-411.
6. Hommes FA (1991) On the mechanism of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninemia. *Biochem Med. Metab Biol* 46, 277-287.
7. Francois B i wsp (1994) Heterogeneity of phenylketonuria in Belgium at the genotype-phenotype level. *J Inher Metab Dis* 17: 369-370.
8. Jaruzelska J i wsp (1993) Genetic background of clinical homogeneity of phenylketonuria in Poland. *J Med Genet* 30: 232-234.
9. Jaruzelska J (1995) Molekularne podłoże fenyloketonurii. Mutacje genu i zaburzenia dojrzewania pre-mRNA hydroksylazy fenyloalaninowej. Wyd. Naukowe UAM, Poznań.
10. Jennings IG, Cotton RGH, Kobe B (2000) Structural interpretation of mutations in phenylalanine hydroxylase protein aids genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Eur J Hum Genet* 8: 683-689.
11. Kayaalp E i wsp (1997) Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 61: 1309-1317.

12. Kleiman S i wsp (1993) Phenylketonuria: variable phenotypic outcome of the R261Q mutation and maternal PKU in the offspring of a healthy homozygote. *J Med Genet* 30: 284-288.
13. Kobe B i wsp (1999) Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *nature Struct Biol* 6: 442-448.
14. Koch R i wsp (1998) Mild hyperphenylalaninemia and heterozygosity of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol Genet Metab* 63: 148-150
15. Leandro P i wsp (2000) The V388M mutation results in a kinetic variant form of phenylalanine hydroxylase. *Mol Genet Metab* 69: 204-212.
16. Moller HE i wsp (1998) Blood-brain barrier phenylalanine transport and individual vulnerability in phenylketonuria. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 1184-1191.
17. Miller SA , Dykes D, Polesky HF - A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuci Acids Res* 17: 1784 (1988)
18. Moller HE, Ullrich K, Weglage J (2000) In vivo proton magnetic resonance spectroscopy in phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159 (Suppl 2): S121-S125.
19. Novotny EJ i wsp (1995) In vivo measurement of phenylalanine in human brain by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 37: 244-249.
20. Scriver CR i wsp (1995) The hyperphenylalaninemia of man and mouse. *Ann Rev Genet* 28: 141-165.
21. Ramus SJ i wsp (1993) Comparison of genotype and intellectual phenotype in untreated PKU patients. *J Med Genet* 30: 401-405.
22. Rivera I i wsp (2000) The correlation of genotype and phenotype in Portuguese hyperphenylalaninemic patients. *Mol Genet Metab* 69: 195-203.
23. Thony B Blau N (1997) Mutations in the GTP cyclohydrolase I and 6-pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase genes. *Hum Mutat*: 10, 11-20.
24. Waters PJ i wsp (1998) In vitro expression analysis of mutations in phenylalanine hydroxylase: linking genotype to phenotype and structure to function. *Hum Mutat* 11: 4-17.
25. Waters PJ i wsp (2000) Characterization of phenylketonuria missense substitution distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanisms and potential modulations of phenotype. *Mol Gen Metab* 69: 101-110.
26. Zschocke J, Hoffmann GF (2000) PAH gene mutations analysis in clinical practice – comments on mutation analysis anticipates dietary requirements in phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159 (Suppl 2): S154-S155.
27. Zschocke J i wsp (1994) Non-phenylketonuria hyperphenylalaninemia in Northern Ireland: frequent mutation allows screening and early diagnosis. *Hum Mutat* 4: 114-118.

## **9. Wybrane pozycje piśmiennictwa Zakładu Genetyki Medycznej i Kliniki Pediatrii Instytutu Matki i Dziecka z zakresu hiperfenyloalaninemi**

1. Bożkowa K., Cabalska B.: Zaburzenia przemiany aminokwasów aromatycznych w: Genetycznie uwarunkowane zaburzenia metaboliczne u dzieci, PZWL, Warszawa, 1983, 84-82.
2. Cabalska B.: Genetycznie uwarunkowane zaburzenia przemiany aminokwasów. (w) *Neurologia dziecięca* (red.) Chochańska M., PZWL 1983.
3. Cabalska B. i wsp.: Nietypowe postacie fenylketonurii. *Przegląd Pediatr.* 1991, 1(1), 53-61.

4. Cabalska B, Nowaczewska I, Skorkowska-Zieleniewska J (1991) Nietypowe postaci fenylketonurii. *Przegl Pediatr* 21, 53-56.
5. Cabalska B., Duczyńska N. i wsp.: Termination of dietary treatment in phenylketonuria, *Eur J. Pediatr.* 1993, 152, 1012-1020.
6. Cabalska B. i wsp. (1994): Łagodna hiperfenylalaninemia – częstość występowania, rozwój fizyczny i umysłowy pacjentów. *Ped. Pol.* 5, 339-345
7. Cabalska M.B., Nowaczewska I.: Longitudinal study on early diagnosis and treatment of phenylketonuria in Poland, *Eur. J. Pediatr.* 1996, 155 (suppl 1), 53-55.
8. Cabalska B (1998) Nietypowe postaci fenylketonurii. *Med Wieku Rozwoj* 2: 479-490.
9. Mańkowski T., Laskowska-Kłita T. i wsp.: Różnicowa diagnostyka fenylketonurii. Zastosowanie wysokorozdzielczej chromatografii cieczowej do oznaczania neopteryny i biopertyny w moczu, *Ped. Pol.* 1990, LXV, (5,6) 25-31.
10. Mańkowski T i wsp (1992) Fenylketonuria. Rozpoznawanie i Leczenie nietypowych postaci. Instytut Matki i Dziecka Warszawa.
11. Mańkowski T., Nowaczewska I. I wsp.: Diagnostyka różnicowa fenylketonurii, *Kinika* 1993, vol. 2, 10(14), 11-13.
12. Nowacka M, Żekanowski C, Mazurczak T, Cabalska B (1997) Ocena korelacji genotyp-fenotyp u dzieci z hiperfenylalaninemią. *Ped Pol Sup* 6, 51-57.
13. Nowaczewska I, Duczyńska N.: Oznaczanie aktywności reduktazy dwuhydropterydynowej dla diagnostyki nietypowych postaci fenylketonurii, *Ped. Pol.* 1990, 65, 1, 2, 1-4.
14. Żekanowski C, Nowacka M (1994) Molekularne podłoże fenylketonurii. *Ped Pol* 69, 359-367.
15. Żekanowski C, Żygulska M, Nowacka M, Horst J, Cabalska B, Mazurczak T (1994) Frequencies of the most common mutations responsible for phenylketonuria in Poland. *Mol Cell Probes* 8, 323-324.
16. Żekanowski C, Nowacka M, Bal J, Mazurczak T, Cabalska B (1995) Fenylketonuria. Instytut Matki i Dziecka
17. Żekanowski C, Cabalska B, Borsuk P, Bal J (1997) Molecular basis for phenotypic diversity of mild hyperphenylalaninemia in Poland. *Hum Mut* 10, 258-259.
18. Żekanowski C, Nowacka M (1997) Molekularne podłoże łagodnych postaci hiperfenylalaninemii. *Ped Pol* 72, 659-663
19. Żekanowski C, Nowacka M, Cabalska B, Bal J (1997) Molecular basis of mild hyperphenylalaninemia in Poland. *J Med Genet* 34, 1035-1036.
20. Żekanowski C, Nowacka M, Senddecka E, Słowik M, Cabalska B, Bal J (1998) Identification of mutations 6-pyruvyl-tetrahydrobiopterin synthase deficiency in Polish patients with variant hyperphenylalaninemia. *Molecular Diagnosis* 3, 237-239.
21. Żekanowski C, Nowacka M, Cabalska B, Senddecka E, Słowik M, Giżewska M, Filipowicz J, Mazurczak T, Bal J (1999) Mutacje powodujące dziedziczną hiperfenylalaninemię. *Medycyna Wieku Rozwojowego* 3, 55-67.
22. Żekanowski C, Nowacka M, Giżewska M, Filipowicz J, Cabalska B, Bal J (1999) Mutation in exon 3 of the PAH gene causing mild hyperphenylalaninemia. *Genetic Testing* 3(3), 297-299.
23. Żekanowski C, Perez B, Desviat LD, Wiszniewski W, Ugarte M (2000) In vitro expression analysis of R68G and R68S mutations in phenylalanine hydroxylase gene. *Acta Biochimica Polonica* 47(2) 365-369.

24. Żekanowski C, Jurkowska M, Bal J (2001) Association between minihaplotypes and mutations at the PAH locus in Polish hyperphenylalaninemic population. *Human Heredity* 51:117-120.

## 10. Aneksy

### 10.1. Izolacja i oczyszczanie kwasów nukleinowych

DNA izolowano z leukocytów krwi obwodowej metodą stopniowego wysalania białek komórkowych względnie stosowano dostępne handlowo zestawy (np. QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagene). Stężenie i czystość preparatów DNA w razie potrzeby oznaczano spektrofotometrycznie i elektroforetycznie. Niekiedy DNA dializowano metodą kroplową. Roztwór DNA nanoszono bezpośrednio na powierzchnię filtrów z PVDF o średnicy porów  $\leq 0.025 \mu\text{m}$  (Millipore).

### 10.2. Identyfikacja mutacji

Poszukiwanie mutacji znanych, często występujących oparte było z reguły o technikę PCR. Najczęściej, po powieleniu fragmentu genu obecność mutacji identyfikowano tnąc DNA właściwym enzymem restrykcyjnym (technika PCR-RFLP) względnie stosowano technikę ACRS ze zmodyfikowanymi starterami jeżeli mutacja nie zmienia układu naturalnie występujących miejsc restrykcyjnych. Produkty reakcji rozdzielano na 2% żelu agarozowym lub 3% żelu NuSieve 2.

Do przeszukiwania całej sekwencji kodującej genu stosowano także technikę RT-PCR. Mutacje rzadkie i nowe identyfikowano techniką bezpośredniego sekwencjonowania produktów PCR konkretnych rejonów badanego genu.

#### 10.2.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Eksony 7, 11 oraz 12 genu *PAH* powielano w warunkach standardowych (temperatura przyłączenia 56-58°C).

Do sekwencjonowania eksony genu *PAH* powielano stosując następujące warunki amplifikacji: 31 cykli, 94°C 30", 56°C 30", 72°C 45".

W przypadku identyfikacji mutacji w genie *PTS* eksony powielano w warunkach standardowych (31 cykli, 94°C 30", 58°C 30", 72°C 45"),



Sekwencje starterów do reakcji PCR i sekwencjonowania projektowano w oparciu o dostępne w bazach danych sekwencje DNA lub stosowano startery opisane w literaturze przedmiotu.

### 10.2.2. Sekwencjonowanie DNA

Powielone fragmenty genów *PAH* i *PTS* sekwencjonowano automatycznie stosując zestaw DNA Sequencing Kit (PE Biosystems) zasadniczo zgodnie z zaleceniami producenta, podwyższając jedynie temperaturę przyłączania startera do 58°C. Produkty PCR oddzielano od niewykorzystanych w reakcji starterów stosując technikę selektywnej adsorpcji na membranie z żelu krzemionkowego (QIAquick Spin PCR Purification Kit, Qiagen). Rozdział od niewykorzystanych fluorescencyjnych terminatorów przeprowadzono stosując ultrafiltrację żelową (Centri Sep, firmy PE Biosystems). Sekwencjonowanie DNA prowadzono na kapilarnym sekwenatorze ABI 310 (PE Biosystems). Przy analizie wyników wykorzystywano program Sequencing Analysis 3.0 oraz Sequence Navigator (Macintosh), będące częścią oprogramowania użytkowego ABI 310.

### 10.2.3. Badanie ekspresji *in vitro*

Badania ekspresji *in vitro* wykonywano w *Escherichia coli* stosując system ekspresji pMAL-2. Aktywność PAH oceniano poprzez przekształcenie znakowanej izotopowo fenyloalaniny do tyrozyny. Badania ekspresji prowadzono również w komórkach COS stosując ludzki ekspresyjny wektor pRc/CMV. Oba zastosowane układy analizy *in vitro* z powodzeniem wykorzystywano do badania aktywności resztkowej wielu mutacji w genie *PAH*.<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Żaden z istniejących układów badania aktywności *in vitro* nie może być uznany za absolutny wskaźnik wpływu mutacji w genie *PAH* na aktywność hydroksylazy. Podobnie aktywność PAH oznaczana *in vitro* nie zawsze w prosty sposób określa kliniczne znaczenie mutacji. Jeśli nawet pomiędzy wynikami uzyskiwanymi w różnych układach *in vitro* obserwuje się jakościowe podobieństwo, to mogą wystąpić zasadnicze różnice ilościowe w oznaczanej aktywności enzymu. W zaprezentowanej analizie nie oceniano zjawiska pozytywnego współdziałania monomerów hydroksylazy oraz parametrów kinetycznych reakcji. Należy pamiętać, że aktywność *in vitro* PAH jest zwykle wyższa, niż aktywność obserwowano w bioprotatach wątroby czy wyprowadzana z badań nad oksydacją <sup>13</sup>C-phenylalanine *in vivo*.