

Nataļja Proņina

FENILKETONŪRIJAS UN  
HIPERFENILALANINĒMIJAS  
MOLEKULĀRI ĢENĒTISKO  
PAMATU IZPĒTE LATVIJĀ

Promocijas darba kopsavilkums

Specialitāte – medicīniskā ģenētika

Darba vadītāja:

*Dr. med. asoc. prof. Rita Lugovska*



*Ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu*

Rīga, 2012

Promocijas darbs izstrādāts: BKUS Medicīniskā ģenētikas klīnika

Darba zinātniskais vadītājs:

*Dr. med.* asoc. prof. **Rīta Lugovska**,  
BKUS Medicīniskā ģenētikas klīnika

Oficiālie recenzenti:

*Dr. habil. biol.*, asoc. prof. **Īzaks Rašals**,  
Latvijas Universitātes Bioloģijas institūts

*Dr. biol.*, prof. **Edvīns Miklaševičs**, P.Stradiņa KUS,  
RSU Mikrobioloģijas katedra

*Ph.D., M.D.*, asoc. prof. **Jūratē Kasnauskienē**, Cilvēka un  
medicīniskās ģenētikas katedra, Viļņas Universitāte, Lietuva

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2012. gada 29. jūnijā plkst.15:00  
Rīgas Stradiņa universitātes \_\_\_\_\_ Promocijas padomes atklātā  
sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:  
[www.rsu.lv](http://www.rsu.lv)



Promocijas darbs veikts ar Eiropas sociālā fonda projekta “Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu

Promocijas padomes sekretārs:

*Dr.habil.med.*, prof. **Līga Aberberga-Augškalne**

# SATURS

SAĪSINĀJUMI	4
KOPSAVILKUMS	5
1. IEVADS	7
Pētījuma mērķis	10
Pētījuma uzdevumi	10
Pētījuma zinātniskā novitāte	11
Pētījuma praktiskā novitāte	11
2. MATERIĀLS UN METODES	12
2.1. Pētījuma objekts	12
2.2. Genoma DNS izdalīšana	12
2.3. R408W mutācijas noteikšana <i>FAH</i> gēnā	12
2.4. Denaturējošā gradienta gela elektroforēze (DGGE) un <i>FAH</i> gēna eksonu tiešās sekvenēšanas analīze	13
2.5. <i>FAH</i> gēna minihaplotipu analīze	13
2.6. Rezultātu apstrādē izmantotās programmas	13
3. REZULTĀTI	16
3.1. <i>FAH</i> gēna mutāciju spektrs Latvijas FKU pacientiem	17
3.2. Latvijas FKU pacientu genotipi	19
3.2.1. Genotipa un fenotipa korelācija Latvijas FKU pacientiem	21
3.2.2. Klusās mutācijas <i>FAH</i> gēnā	23
3.3. <i>FAH</i> gēna minihaplotipu analīze	25
3.4. <i>FAH</i> gēna mutācijas R408W izplatības analīze	30
4. DISKUSIJA	32
4.1. <i>FAH</i> gēna mutācijas Latvijas FKU pacientu hromosomās	32
4.2. Genotipa un fenotipa korelācija Latvijas FKU pacientiem	44
4.3. Minihaplotipu analīze <i>FAH</i> gēna normālajās un mutantajās alēlēs	46
4.4. Īvākā metode <i>FAH</i> gēna mutāciju diagnostikai Latvijā	47
5. SECINĀJUMI	49
6. PUBLIKĀCIJAS	50
7. VĒRES	52

## SAĪSINĀJUMI

ANOVA	– dispersiju analīze starp grupām
SV	– skaitliskā vērtība
BH4	– tetrahidrobiopterīns
CBR1	– kofaktoru saistošais rajons
CD	– katalītiskais domēns
cDNA	– klonēta dezoksiribonukleīnskābe
DGGE	– denaturējošā gradienta gela elektroforēze
DNS	– dezoksiribonukleīnskābe
HFA	– hiperfenilalaninēmija
FAH	– ferments fenilalanīnhidroksilāze
<i>FAH</i>	– fenilalanīnhidroksilāzes gēns
PCR	– polimerāzes ķēdes reakcija
Phe	– fenilalanīns
FKU	– fenilketonūrija
<i>PolyPhen</i>	– polimorfisma fenotipēšana ( <i>Polymorphism Phenotyping</i> )
RF	– relatīvais biežums
RFLP	– restrikcijas fragmentu garuma polimorfisms
STR	– īsie tandēmu atkārtojumi
VNTR	– variabls tandēmu atkārtojumu skaits

## KOPSAVILKUMS

Fenilketonūrija (FKU) ir biežākā iedzimtā aminoskābju vielmaiņas patoloģija Eiropā. Tās cēlonis ir autosomāli recesīvi pārmantots aknu enzīma fenilalanīna hidroksilāzes (FAH), kas katalizē neatgriezenisku fenilalanīna pārvēršanos tirozīnā, defekts. Paaugstinātais fenilalanīna līmenis ietekmē enerģijas produkciju, olbaltumu sintēzi un neiromediatoru homeostāzi augošās smadzenēs un izraisa svarīgāko FKU izpausmi – garīgu atpalicību.

Kopš gēna atklāšanas 1986. gadā ir atklātas vairāk nekā 560 dažādas slimību izraisošas mutācijas fenilalanīna hidroksilāzes gēnā (*FAH*). Dažādas mutācijas nosaka dažādu enzīma atlieku aktivitāti, kas ļauj genotipu izmantot, lai prognozētu iespējamo bioķīmisko fenotipu vairākumam pacientu.

Pētījuma mērķis bija noskaidrot mutāciju spektru *FAH* gēnā Latvijas FKU un hiperfenilalaninēmijas pacientiem un izveidot tā noteikšanas metodi Latvijā.

Latvijas FKU pacientiem raksturīgas 20 dažādas mutācijas *FAH* gēnā. Visbiežāk sastopamā mutācija ir R408W, kuru atrod 73% FKU pacientu hromosomās, tai raksturīga augstas pakāpes homozigotāte *FAH* lokusā Latvijā ( $j=0,514$ ). Pārējo 19 mutāciju biežums mutantajās alēlēs svārstās no 0,7% līdz 5,7%. Vairākums no mutācijām (12/20) ir smagas un izraisa klasisku FKU fenotipu, ko novēro 91% pacientu.

Pacientu genotipa izmeklēšana sniedz papildu informāciju par iespēju izmantot šaperonu terapiju. Atbilstoši pētījuma rezultātiem 13 no 70 (18%) Latvijas FKU pacientiem varētu būt efektīva šaperonu terapija ar sapropterīna dihidrochlorīdu, savukārt atlikušajiem 57 (81%) ar homozigotu R408W mutāciju vai kompaunda heterozigotiskiem pacientiem ar smagām mutācijām abās alēlēs jāturpina zema fenilalanīna diēta kā vienīgā efektīvā terapijas forma.

Minihaplotipu izpēte atklāja 16 dažādus minihaplotipus saistībā ar *FAH* gēna mutācijām un 20 dažādus minihaplotipus normālajās *FAH* alēlēs.

Vidējā heterozigotātes iespēja bija aptuveni 76% mutantajās un 92% normālajās alēlēs, kas parāda normālo alēļu lielāku dažādību. Statistiskā analīze parādīja ticamu atšķirību divu minihaplotipu izplatībā starp mutantām un normālām alēlēm 3/238 ( $p=0,0000572$ ) un 8/230 ( $p=0,0133$ ), savukārt trīs 3/242, 7/246 un 8/234 parādīja statistiski ticamu tendenci ( $p < 0,10$ ) izplatības atšķirībai starp mutantām un normālām alēlēm.

Pētījumā izmantotā trīs posmu *FAH* gēna mutāciju noteikšanas metode ir efektīvākā ikdienas diagnostikai Latvijas FKU/HFA pacientiem ar analīzes sistēmas jutību 99%.

## 1. IEVADS

Metabolās slimības ir iedzimtas dzīvību apdraudošas ģenētiskās slimības, kuru iemesls ir fermenta vai tā aktivētāja trūkums vai darbības traucējumi. Lielākā daļa metabolo slimību tiek kvalificētas kā iedzimti metabolisma traucējumi, tādi kā aminoskābju vai organisko skābju vielmaiņas patoloģijas, urīnvielas cikla traucējumi, galaktozēmija, primārā laktātacidoze, glikogēna un lizosomālās uzkrāšanās slimības, peroksisomālās un mitohondriālās oksidācijas disfunkcijas (Villas-Boas, 2007).

Iedzimto metabolisma traucējumu sastopamība variē no 1 : 10 000 līdz ļoti reti sastopamām patoloģijām ar incidenci 1 : 100 000, kam nepieciešama īpaša aprūpe (Hannigan, 2007).

Fenilketonūrija (FKU) ir biežākā iedzimtā aminoskābju vielmaiņas patoloģija Eiropā ar sastopamību 1 uz 10 000 dzīvi dzimušo. FKU ir pirmā vielmaiņas traucējumu patoloģija, kas tika identificēta kā garīgas atpalcības iemesls, un pirmā centrālās nervu sistēmas ģenētiskā slimība, kurai ir iespējama efektīva ārstēšana (diēta), kā arī pirmā patoloģija, kas veiksmīgi tiek diagnosticēta, veicot jaundzimušo skrīningu.

Fenilketonūrijas bioķīmisko un molekulāri ģenētisko pamatu izpratne ir svarīga inovatīvu ārstēšanas metožu ieviešanai, kas ļauj ievērojami uzlabot pacientu dzīves kvalitāti.

Neārstētai FKU ir raksturīgi šādi klīniskie simptomi: augšanas aizture, mikrocefālija, krampji, attīstības aizture un smaga garīga atpalcība. Tomēr jaundzimušo skrīninga programmas ieviešana un agrīna ārstēšanas sākšana ļauj bērniem ar FKU diagnozi dzīvot samērā normālu dzīvi.

Fenilalanīnhidroksilāzes gēns (*FAH*) (OMIM 261600) tika klonēts 1983. gadā (<http://www.pahdb.mcgill.ca>) (Woo, 1983). Lielākā daļa pētījumu par *FAH* gēna mutācijām dažādās populācijās tika veikta 20. gs. 90. gados.

Lielāko daļu no FKU veidiem, kā arī hiperfenilalaninēmiju izraisa mutācijas *FAH* gēnā (12q23.2). Pašlaik ir zināmas vairāk nekā 560 slimību izraisošas mutācijās. Lielākā daļa no tām ir punktveida aminoskābju aizvietošanas (*missense*) mutācijas. Tās savā starpā atšķiras ar fermentam raksturīgo atlieku aktivitāti, padarot genotipu par svarīgu prognostisku instrumentu pacienta iespējamās FKU klīniskas formas noteikšanā.

Lai gan diēta ar zemu fenilalanīna saturu joprojām ir efektīvākais un plaši izmatotais terapijas veids, tam ir savi trūkumi. Ārstēšanas mērķis ir saglabāt asins fenilalanīna (Phe) līmeni normas robežās, izslēdzot no uztura ar proteīniem bagātos produktus un aizstājot tos ar organismam nepieciešamo aminoskābju maisījumiem. Aminoskābju maisījumiem savukārt ir specifiska garša, kas ne vienmēr ir patīkama. Diētas ievērošanu ietekmē dažādi faktori, tostarp emocionālie, psiholoģiskie, kā arī kultūras un etniskie faktori. Diētas neievērošana ir bieži sastopama, īpaši pusaudžu vecumā un arī pieaugušo cilvēku dzīvē. Visu šo iemeslu dēļ mūsdienās interese par FKU biežāk tiek vērsta uz jaunu terapijas veidu izstrādi, bet tā joprojām ir cieši saistīta ar FKU bioķīmiskajiem un molekulārajiem aspektiem.

Šaperonu terapija ar sapropterīna hidrochlorīdu (eksogēnais tetrahydrobiopterīns) ir jauns terapijas veids, kas ir efektīvs pacientiem ar tetrahydrobiopterīn-(BH4)-jutīgu FKU formu. To var izmantot atsevišķi vai kopā ar standarta diētas terapiju. Šaperonu terapijas efektivitāte ir atkarīga no *FAH* fermenta atlieku aktivitātes, kas savukārt ir atkarīga no konkrētām mutācijām *FAH* gēnā. Tādā veidā genotips sniedz papildu informāciju par pacienta iespējamo FKU klīnisko formu un palīdz izvēlēties efektīvāko ārstēšanas taktiku (Blau, 2010).

Populāciju pētījumi ir atklājuši vismaz 87 dažādus haplotipus, kas ir saistīti ar *FAH* gēna mutācijām, bet tikai daži no tiem ir bieži sastopami. Haplotipi 1. līdz 4. ir atrasti apmērām 80% no mutantajām hromosomām un galvenokārt tiek izmantoti mutāciju izcelsmes noteikšanai.



FKU pirmsdzemdību diagnostikai, retu mutāciju, kā arī mutāciju nesēju noteikšanai pacientu ģimenēs lielāku informāciju sniedz ar *FAH* gēna mutācijām saistītie minihaplotipi (VNTR un STR satelītu sistēmu kombinācija). Tiesa gan, minihaplotipu pētījumi bieži vien skar tikai populācijā biežāk sastopamās mutācijas, līdz ar to informācija par retām alēlēm raksturīgiem minihaplotipiem nav pieejama.

Mutācija R408W ir biežāk sastopamā *FAH* gēna mutācija FKU pacientiem. Austrumeiropas populācijās tā ir cieši saistīta ar RFLP 2. haplotipu, trīs kopiju VNTR alēli un 238bp STR alēli (RFLP2/VNTR3/STR238). Tāpēc mūsu pētījumā ir paredzama šīs mutācijas augsta sastopamība.

Lielai daļai Latvijas pacientu ir raksturīga smaga (klasiska) FKU klīniskā forma, kas, iespējams, ir saistīta ar smagu (nulles) mutāciju izplatību populācijā.

## **PĒTĪJUMA MĒRĶIS:**

Izpētīt fenilketonūrijas un hiperfenilalaninēmijas molekulāri ģenētiskos pamatus Latvijas pacientiem un izveidot *FAH* gēna mutāciju noteikšanas metodi Latvijas populācijā.

## **PĒTĪJUMA UZDEVUMI:**

1. Noteikt *FAH* gēna mutāciju spektru Latvijas FKU/HFA pacientiem un viņu vecākiem.
2. Noteikt minihaplotipu saistību ar mutācijām *FAH* gēnā pacientiem ar FKU/HFA un viņu vecākiem.
3. Salīdzināt minihaplotipu izplatību mutantajās un normālajās *FAH* gēna alēlēs.
4. Novērtēt genotipa un fenotipa korelāciju pacientiem ar FKU/HFA.
5. Salīdzināt mutācijas R408W sastopamību Latvijas FKU pacientu hromosomās ar šīs mutācijas sastopamību citās Eiropas valstīs.
6. Analizēt pētījumā izmantoto *FAH* gēna mutāciju noteikšanas metodi tās ieviešanai rufinā diagnostikā Latvijas populācijā.

## **Promocijas darba aizstāvamās tēzes:**

- Prevalējošā *FAH* gēna mutācija Latvijas FKU pacientiem ir R408W, tā ir viena no biežākajām FKU izraisošajām mutācijām Eiropā, bet visbiežāk ir sastopama Austrumeiropas populācijās.
- Pētījumā izmantotā 3 etapu diagnostikas metode ir efektīvākā *FAH* gēna mutāciju noteikšanai Latvijas FKU pacientiem.

## **Pētījuma zinātniskā novitāte**

Šis pētījums ir pirmais pētījums Baltijas reģionā, kas nosaka visu FKU populācijā sastopamo mutāciju saistību ar minihaplotipiem, ieskaitot reti sastopamas un jaunas mutācijas.

Trīs jaunas mutācijas tika atrastas *FAH* gēnā Latvijas FKU pacientiem, divas no tām tiek uzskatītas par slimību izraisošām, bet trešā par vieglu mutāciju, kas izraisa vieglu hiperfenilalaninēmiju.

R408W mutācijas saistība ar Austrumeiropai raksturīgo minihaplotipu 3/238 apliecina mutācijas Baltijas tautu-slāvu izcelsmi.

## **Pētījuma praktiskā novitāte**

Pacientu genotipu analīze sniedz papildu informāciju par fenilketonūrijas klīnisko fenotipu un palīdz izvēlēties efektīvāko terapijas veidu.

Minihaplotipu analīzes rezultāti ir noderīgi pirmsdzemdību diagnostikai, mutāciju nesēju skrīningam un retu mutāciju noteikšanai Latvijas FKU pacientu hromosomās.

## 2. MATERIĀLS UN METODEDES

### 2.1. PĒTĪJUMA OBJEKTS

FKU pacienti tika diagnosticēti, īstenojot jaundzimušo fenilketonūrijas skrīninga programmu Latvijā. Pacientu ārstēšana un kontrole tiek veikta Medicīniskās ģenētikas klīnikā Rīgā.

Asins paraugi DNS analīzei tika iegūti no pacientiem un viņu pirmās pakāpes radniekiem. Pētījumā netika iesaistīti pacienti ar transitīvu FKU formu un pacienti ar vieglu hiperfenilalaninēmiju, kam nav nepieciešama ārstēšana, bet tika iekļauti pacienti ar neskaidriem vai robežlīnijas parametriem, lai noskaidrotu viņu statusu.

Kontroles grupas DNS paraugi tika iegūti no 100 brīvprātīgajiem no jauktas populācijas. Kontroles paraugi tika izmeklēti, lai izslēgtu bieži sastopamu populācijai specifisku polimorfismu.

Pētījums tika veikts saskaņā ar Helsinku konvenciju un ar Centrālās medicīnas ētikas komitejas atļauju.

### 2.2. GENOMA DNS IZDALĪŠANA

Genoma DNS tika izdalīta no perifērām asinīm, izmantojot reaģentu komplektu *Genomic DNA Purification Kit* (*Fermentas*, Lietuva).

### 2.3. MUTĀCIJAS R408W NOTEIKŠANA *FAH* GĒNĀ

R408W mutācija *FAH* gēnā ir punktveida mutācija C→T, kuras rezultātā notiek aminoskābju maiņa 1222. pozīcijā (tripletā CGG→TGG). Mutācijas diagnostika ir balstīta uz restrikcijas fermenta *StyI* jauna restrikcijas saita izveidi gēna 12. eksonā (MOLGENT, 1999–2002).

## **2.4. DENATURĒJOŠĀ GRADIENTA GELA ELEKTROFORĒZE (DGGE) UN FAH GĒNA TIEŠĀS SEKVENĒŠANAS ANALĪZE**

DGGE analīzi izmantoja, lai noteiktu mutācijas/-ju atrašanās vietu *FAH* gēnā pacientiem, kuriem netika atrasta R408W mutācija vai šī mutācija tika atrasta tikai vienā gēna alēlē (Guldberg and Güttler, 1994). Eksoni, kas DGGE rezultātā veidoja heterodupleksus, tika sekvenēti ar ABI PRISM™ 310, izmantojot *BigDye Terminator* sekvenēšanas protokolu atbilstoši ražotāja instrukcijām (*Applied Biosystems*).

## **2.5. FAH GĒNA MINIHAPOLOTIPU ANALĪZE**

Minihaplotipu analīze (VNTR un STR alēļu kombinācija) tika veikta, izmantojot PCR, tai sekojošu produktu elektroforētisku sadalīšanu uz 6% poliakrilamīda gela VNTR fragmentiem un kapilāru elektroforēzi STR fragmentu sadalīšanai.

VNTR sistēmai ir raksturīgi seši dažādi fragmentu garumi: 380, 470, 500, 530, 560 un 650 bp, kas atbilst attiecīgi 3, 6, 7, 8, 9, un 12 atkārtojumu kopijām.

Atbilstošo STR fragmentu garumi (226 bp, 230 bp, 234 bp, 238 bp, 242 bp, 246 bp, 250 bp, 254 bp un 258 bp) tika aprēķināti, izmantojot *GeneScan™ ROX 2500™* standartu.

## **2.6. REZULTĀTU APSTRĀDEI IZMANTOTĀS PROGRAMMAS**

Polimorfismu fenotipu noteikšana *in silico* (datora simulācija). Jaunas *FAH* gēna mutācijas, kas atrastas Latvijas FKU pacientu hromosomās, analizēja

ar *PolyPhen* programmu, lai iegūtu informāciju par to iespējamo ietekmi uz fermenta struktūru un funkcijām (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>).

*PolyPhen* aprēķina starpību starp standarta un polimorfu alēļu variantiem, ko izsaka absolūtos skaitļos. Skaitliski lielākās vērtības var norādīt, ka pētītais polimorfisms ir reti novērojams vai nekad netika novērots olbaltumvielu saimē.

*PolyPhen* analīzes rezultāti tiek izteikti kā:

- „ticami patogēns”, tas ir, ar augstu ticamību vajadzētu ietekmēt proteīnu funkciju vai struktūru;
- „iespējami patogēns”, proti, tam vajadzētu ietekmēt proteīnu funkciju vai struktūru;
- „labdabīgs”, visticamāk, neizpaužas fenotipiski;
- „nav zināms” – retos gadījumos datu trūkums neļauj programmai veikt prognozi.

Homozigotātes koeficients ( $j$ ) FAH lokusam rēķināts pēc formulas  $j = \sum x_i^2$ , kur  $x_i$  ir alēles  $i$  sastopamība.

Šī vērtība ir pacientu ar divām identiskām alēlēm teorētiskā sastopamība. Homozigotātes koeficienta vērtība atspoguļo mutāciju neviendabīgumu konkrētajā lokusā (Guldberg, 1996).

Heterozigotātes koeficients FKU minihaplotipiem rēķināts pēc formulas  $1 - \sum p_i^2$ . (Daiger, 1989).

Datu statistiskai analīzei izmantoja datorprogrammas Statistica7.0 apakšnodaļas: *Vispārējais lineārais/nelineārais modelis (general linear/non-linear models)* ar vienvirziena ANOVA, binominālo sadalījumu un logaritmisko funkciju.

$\chi^2$  metode izmantota R408W mutācijas sastopamības salīdzināšanai dažādās populācijās ar ticamības intervālu (CI)  $\pm 95\%$ .

Minihaplotipu salīdzināšanai normālajās un mutantajās hromosomās ar “0” and “1” parametriem izmantoja  $\chi^2$  metodi ar 2x2 kontingences tabulām.

Absolūto alēļu biežumu populācijā izrēķināja pēc Hārdija-Veinberga formulas:  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

(<http://www.changbioscience.com/genetics/hardy.html>).

$\chi^2$  metode izmantota absolūto un relatīvo *FAH* alēļu biežumu salīdzināšanai, kā arī lai salīdzinātu divas FKU fenotipu klasifikācijas metodes (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>).

Izmantoto metožu jutīgums aprēķināts saskaņā ar Almena un Blenda izstrādāto metodiku (1994).

### 3. REZULTĀTI

Pētījumā piedalījās 74 FKU pacienti no 70 neradniecīgām Latvijas ģimenēm un 110 viņu pirmās pakāpes radnieki. Lielākajai daļai pacientu – 81,5% (57/70) – FKU tika diagnosticēta, īstenojot jaundzimušo fenilketonūrijas skrīninga programmu, pārējiem 18,5% (13/70) diagnoze bija noteikta novēloti laika periodā no 1 līdz 5 gadu vecumam. Vecākais pacients ir dzimis 1967. gadā, jaunākais 2011. gadā. Seši pacienti ir dzimuši, pirms skrīninga programma tika sākta visā valstī.

Izmantojot Phe līmeni pirms ārstēšanas kā sākotnējo parametru FKU klīnisko formu klasifikācijā (Kayaalp, 1997), 64,3% (45/70) pacientu konstatēta smaga FKU klīniskā forma (Phe > 1200 µmol/L), 22,9% (16/70) – viegla FKU (Phe 360–1200 µmol/L), 5,7% (4/70) – viegla hiperfenilalaninēmija (Phe < 360 µmol/L), un 7,1% (5/70) pacientu Phe līmenis nebija zināms. Kombinējot Phe līmeni pirms ārstēšanas un Phe toleranci (Guttler, 1980), 91,4% (64/70) pacientu tika klasificēta smaga FKU, 5,7% (4/70) viegla FKU un 2,9% (2/70) viegla hiperfenilalaninēmija (1. tabula).

1. tabula

**FKU klīnisko formu klasifikācija Latvijas pacientiem**

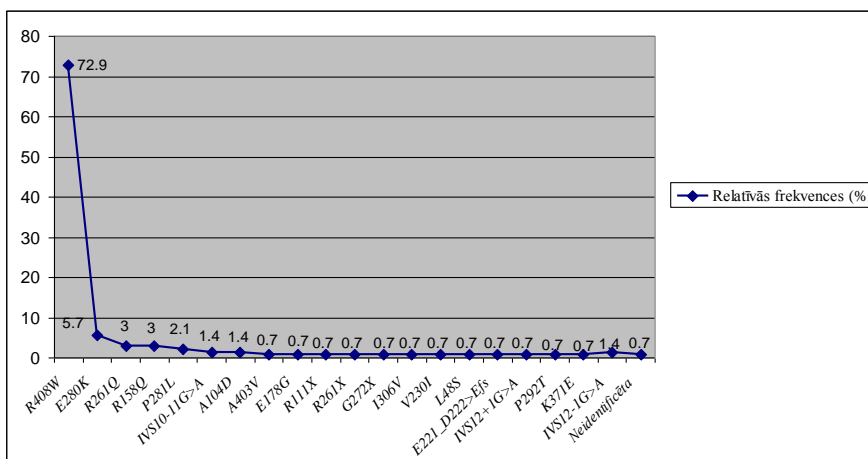
<b>FKU klīniskā forma</b>	<b>Phe līmenis pirms ārstēšanas</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>Phe tolerance</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Smaga	> 1200 µmol/L (>20 mg%)	45	64,3	250–350 mg	64	91,4
Viegla FKU	360–1200 µmol/L (6–20 mg%)	16	22,9	350–600 mg	4	5,7
Viegla hiperfenilalaninēmija	< 360 µmol/L (< 6 mg%)	4	5,7	< 600 mg	2	2,9
Neklasificēta	Nav zināms	5	7,1	—	—	—



### 3.1. FAH GĒNA MUTĀCIJU SPEKTRS LATVIJAS FKU PACIENTIEM

Mutāciju analīze atklāja 20 dažādas FAH gēna mutācijas 140 Latvijas FKU pacientu hromosomās: 13 *missense* (kodonu nomaiņas) mutācijas, 3 *nonsense* (stopkodonu veidojošas) mutācijas, 3 *splicing* (splaisa saita) mutācijas un vienu mazu delēciju. Mutācijas atrastas 8 dažādos gēna eksonos (2., 3., 5., 6., 7., 8., 9., 11. un 12.), divas mutācijas atrastas 12. intronā un viena 10. intronā.

Visbiežāk sastopamā mutācija R408W ir atrasta 73% no visām mutantām alēlēm (1. attēls). Nākamā biežākā mutācija E280K konstatēta 5,7% no visām FKU pacientu hromosomām. Sastopamība pārējām piecām mutācijām (R261Q, R158Q, P281L, IVS10-11G> un A104D) svārstījās no 1,4% līdz 3%.



1. attēls. FAH gēna mutāciju spektrs Latvijas FKU pacientiem.

Divpadsmit mutācijas tika atrastas tikai vienā hromosomā, kas atbilst 0,7%. Trīs jaunas FAH gēna mutācijas (P292T, K371E un IVS12-1G>) iepriekš netika atrastas citās populācijās. Divas no tām tika atrastas tikai vienā hromosomā, bet trešā tika identificēta divās neradniecīgās FKU pacientu

hromosomās. Nevienai no trim mutācijām nebija iespējams veikt *in vitro* ekspresijas analīzi. Jauna mutācija tika uzskatīta par slimību izraisītu, ja:

- 1) tā nebija klusā mutācija vai bija potenciāla splaisīga saita mutācija;
- 2) *FAH* gēna kodējošajā rajonā netika atrasta neviena cita mutācija;
- 3) mutantā alēle tika mantota no viena no vecākiem, kuram nav atrastas citas FKU mutācijas;
- 4) mutācija nebija iepriekš noteikta ne normālajās, ne mutantajās hromosomās (Zschocke, 1999). Lai izslēgtu populācijai specifisku bieži sastopamu polimorfismu, 100 kontrolparaugos no brīvprātīgiem fenotipiski veselīem indivīdiem no jauktās populācijas tika pārbaudīta trīs jaunatklāto mutāciju esamība. *FAH* gēna mutācijas, kas atrastas Latvijas FKU pacientiem, ir apkopotas 2. tabulā.

2. tabula

### *FAH* gēna mutācijas Latvijas FKU pacientiem

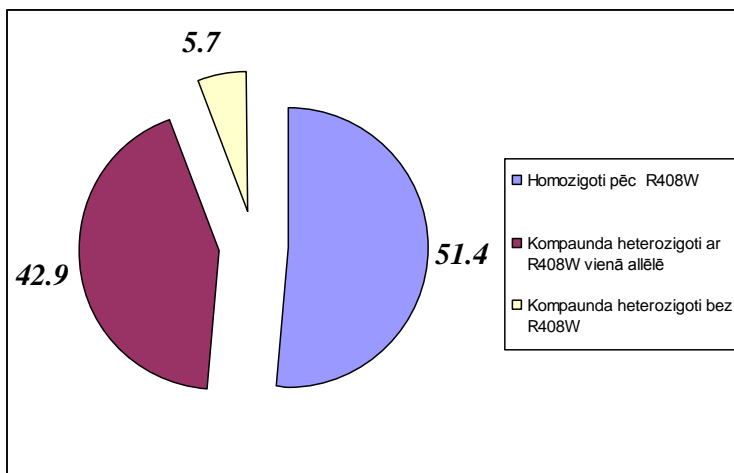
Nr.	Mutācija	Sistemātiskais nosaukums	Ex/In	Mutācijas veids	Skaits	RF %
1.	R408W	c.1222C>T	Ex 12	<i>Missense</i>	102	72,9
2.	E280K	c.838G>A	Ex 7	<i>Missense</i>	8	5,7
3.	R261Q	c.782G>A	Ex 7	<i>Missense</i>	4	3,0
4.	R158Q	c.473G>A	Ex 5	<i>Missense</i>	4	3,0
5.	P281L	c.842C>T	Ex 7	<i>Missense</i>	3	2,1
6.	IVS10-11G>A	c.1066-11G>A	I10	Splaisīga	2	1,4
7.	A104D	c.311C>A	Ex 3	<i>Missense</i>	2	1,4
8.	A403V	c.1208C>T	Ex 12	<i>Missense</i>	1	0,7
9.	E178G	c.533A>G	Ex 6	<i>Missense</i>	1	0,7
10.	R111X	c.331C>T	Ex 3	<i>Nonsense</i>	1	0,7
11.	R261X	c.781C>T	Ex 7	<i>Nonsense</i>	1	0,7
12.	G272X	c.814G>T	Ex 7	<i>Nonsense</i>	1	0,7
13.	I306V	c.916A>G	Ex 9	<i>Missense</i>	1	0,7
14.	V230I	c.688G>A	Ex 6	<i>Missense</i>	1	0,7
15.	L48S	c.143T>C	Ex 2	<i>Missense</i>	1	0,7
16.	E221_D222>Efs	c.663_664delAG	Ex 6	Delēcija	1	0,7
17.	IVS12+1G>A	c.1315+1G>A	I12	Splaisīga	1	0,7
18.	P292T*	c.874C>A	Ex 8	<i>Missense</i>	1	0,7
19.	K371E*	c.1111A>G	Ex 11	<i>Missense</i>	1	0,7
20.	IVS12-1G>A*	c.1316-1G>A	I12	Splaisīga	2	1,4
21.	Neidentificēta	-	-	-	1	0,7
<b>Kopā</b>					<b>140</b>	<b>100</b>

\* jaunatklātas mutācijas.

Izmantoto metožu jutība tika aprēķināta kā proporcija starp alēlēm ar zināmu FAH gēna mutāciju un kopējo alēļu skaitu. Izmantojot šos aprēķinus, noteiktā FAH gēna mutāciju noteikšanas metožu jutība ir 99,28%.

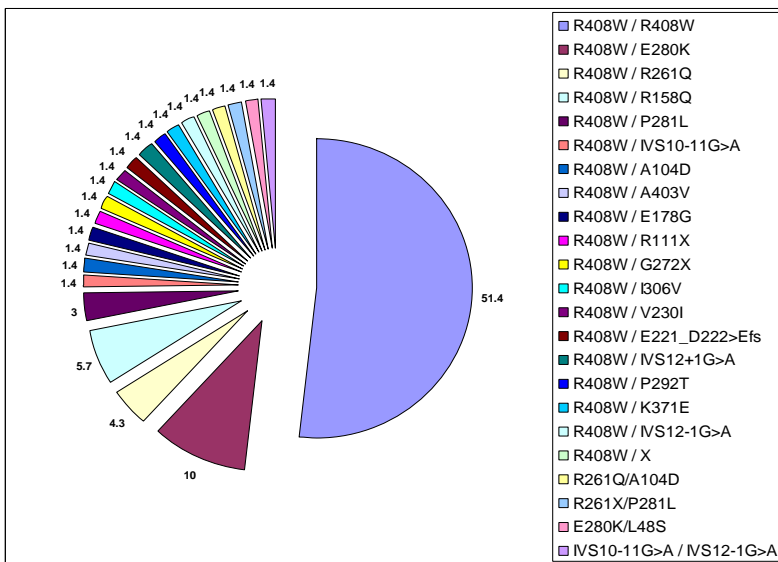
### 3.2. LATVIJAS FKU PACIENTU GENOTIPI

Prevalējošais genotips Latvijas FKU pacientiem ir R408W/R408W. Trīsdesmit seši (51,4%) no 70 neradniecīgajiem FKU pacientiem ir homozigoti pēc R408W mutācijas, pārējie 34 pacienti ir kompaunda heterozigotiski. FAH lokusa homozigotātes koeficients ( $j$ ) Latvijas FKU populācijā ir 0,514. Lielākajai daļai pacientu, kas ir kompaunda heterozigotiski, vienā alēlē ir atrasta R408W mutācija (42,9%), tikai četriem pacientiem (5,7%) nav atrasta R408W mutācija (2. attēls).



2. attēls. Genotipu sadalījums Latvijas FKU pacientiem (%).

Visi Latvijas FKU pacientiem raksturīgie genotipi un to biežums ir parādīts 3. attēlā.



**3. attēls.** Latvijas FKU pacientu raksturīgie genotipi un to relatīvais biežums.

Hārdija-Veinberga likums izmantots, lai noteiktu, vai FKU populācija ir līdzsvarā. R408W mutāciju skaits mūsu pētījumā ( $n = 102$ ) tika izmantots, lai aprēķinātu absolūto biežumu FKU genotipiem.

Saskaņā ar Hārdija-Veinberga likumu R408W homozigotu absolūtajam biežumam Latvijas FKU populācijā ir jābūt 53,1% un kompaunda heterozigotu absolūtajam biežumam – 39,6%. Mūsu pētījumā netika atrasti citi homozigotu pacienti, kuru absolūtajam biežumam, pēc Hārdija-Veinberga likuma, ir jābūt ap 7%.

Statistiskā analīze parādīja, ka šīs atšķirības starp genotipu relatīvo un absolūto biežumu nav statistiski ticamas ( $p = 0,8312$ ,  $\chi^2$  ir vienāds ar 0,370 ar 2 b.p.), kā mēs paredzējām. Tas nozīmē, ka Latvijas FKU populācija ir Hārdija-Veinberga līdzsvarā.

### 3.2.1. Genotipa un fenotipa korelācija Latvijas FKU pacientiem

Pamatojoties uz standarta FKU fenotipu klasifikācijas metodi pēc Phe līmeņa serumā pirms ārstēšanas un Phe tolerances, Latvijas FKU pacienti tika iedalīti 3 kategorijās: 64 (91,4%) pacienti ar smagu FKU, četri pacienti (5,7%) ar vieglu FKU un divi pacienti (2,9%) ar vieglu hiperfenilalaninēmiju (3.tab.).

3. tabula

#### Genotipa un fenotipa korelācija Latvijas FKU pacientiem

Nr.	Genotips	Pacienti	RF%	Klīniskā forma
1.	R408W/R408W	36	51,4	Smaga FKU
2.	R408W/E280K	7	10,0	Smaga FKU
3.	R408W/R261Q	3	4,3	Smaga FKU
4.	R408W/R158Q	4	5,7	Smaga FKU
5.	R408W/P281L	2	3,0	Smaga FKU
6.	R408W/IVS10-11G>A	1	1,4	Smaga FKU
7.	R408W/A104D	1	1,4	Smaga FKU
8.	R408W/R111X	1	1,4	Smaga FKU
9.	R408W/E221_D222>Efs	1	1,4	Smaga FKU
10.	R408W/IVS12+1G>A	1	1,4	Smaga FKU
11.	R408W/E178G	1	1,4	Viegla FKU
12.	R408W/A403V	1	1,4	Viegla FKU
13.	R408W/G272X	1	1,4	Viegla FKU
14.	R408W/I306V	1	1,4	Viegla FKU
15.	R408W/V230I	1	1,4	Viegla hiperfenilalaninēmija
16.	R408W/ <b>K371E</b>	1	1,4	Viegla hiperfenilalaninēmija
17.	R408W/ <b>P292T</b>	1	1,4	Smaga FKU
18.	R408W/ <b>IVS12-1G&gt;A</b>	1	1,4	Smaga FKU
19.	R408W/X	1	1,4	Smaga FKU
20.	R261Q/A104D	1	1,4	Smaga FKU
21.	R261X/P281L	1	1,4	Smaga FKU
22.	E280K/L48S	1	1,4	Smaga FKU
23.	IVS10-11G>A/ <b>IVS12-1G&gt;A</b>	1	1,4	Smaga FKU
	<b>Kopā</b>	<b>70</b>	<b>100</b>	

Saskaņā ar daudzcentru pētījumu (Guldberg, 1998) 10 no 17 *FAH* gēna mutācijām, kas atrastas Latvijas FKU pacientu hromosomās, ir klasificētas kā smagas vai klasiskas FKU mutācijas, viena kā vidēji smaga FKU mutācija, divas kā vieglas FKU un 4 kā vieglu hiperfenilalaninēmiju izraisošas mutācijas. Atbilstoši Guldberg *et al.* (1998) piedāvātajam modelim FKU fenotips tiek izteikts kā abu mutāciju skaitlisko vērtību (SV) summa. Savukārt mutāciju skaitliskā vērtība ir atkarīga no mutāciju smaguma pakāpes (4. tabula).

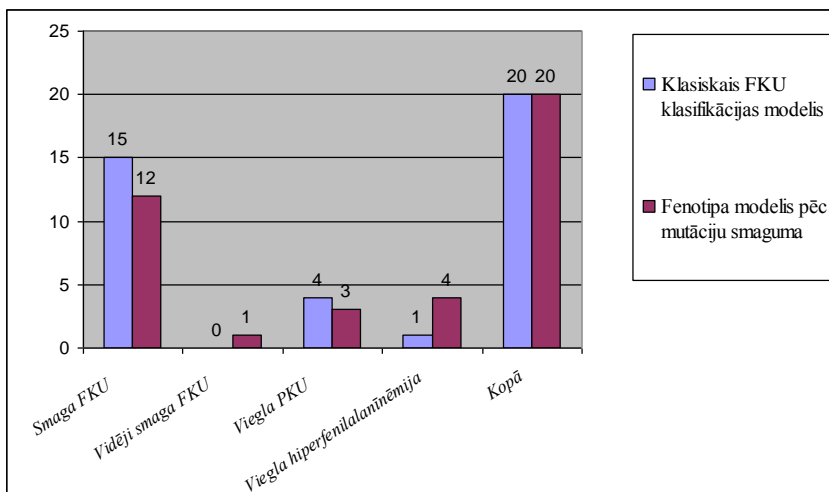
4. tabula

#### Genotipa un fenotipa korelācija atbilstoši skaitlisko vērtību modelim

Nr.	Genotips	SV <sub>1</sub> +SV <sub>2</sub>	SV summa	Klīniskā forma
1.	R408W/R408W	1+1	2	Smaga FKU
2.	R408W/E280K	1+1	2	Smaga FKU
3.	R408W/R261Q	1+2	3	Vidēji smaga FKU
4.	R408W/R158Q	1+1	2	Smaga FKU
5.	R408W/P281L	1+1	2	Smaga FKU
6.	R408W/IVS10-11G>A	1+1	2	Smaga FKU
7.	R261X/P281L	1+1	2	Smaga FKU
8.	R408W/R111X	1+1	2	Smaga FKU
9.	R408W/E221_D222>Efs	1+1	2	Smaga FKU
10.	R408W/IVS12+1G>A	1+1	2	Smaga FKU
11.	R408W/IVS12-1G>A*	1+1	2	Smaga FKU
12.	IVS10-11G>A/IVS12-1G>A	1+1	2	Smaga FKU
13.	R408W/G272X	1+1	2	Smaga FKU
14.	R408W/A104D	1+4	5	Viegla FKU
15.	R261Q/A104D	2+4	6	Viegla FKU
16.	E280K/L48S	1+4	5	Viegla FKU
17.	R408W/I306V	1+8	9	Viegla hiperfenilalaninēmija
18.	R408W/V230I	1+8	9	Viegla hiperfenilalaninēmija
19.	R408W/E178G	1+8	9	Viegla hiperfenilalaninēmija
20.	R408W/A403V	1+8	9	Viegla hiperfenilalaninēmija

\* Jaunatklātā splaisa saita mutācija tiek uzskatīta par smagas FKU izraisošu, un tai piešķirta SV=1.

Abu FKU klīnisko fenotipu klasifikācijas metožu salīdzinājums ir parādīts 4. attēlā.



**4. attēls.** FKU klīnisko fenotipu klasifikācijas metožu salīdzinājums Latvijas FKU pacientiem.

Statistiskā analīze parādīja, ka atšķirība starp abu klasifikācijas metožu rezultātiem nav statistiski ticama ( $p=0,2276$ ,  $\chi^2$  vienāds ar 4,333 ar 3 b.p.)

### 3.2.2. Klusās mutācijas *FAH* gēnā

Deviņas dažādas klusās jeb sinonīmās mutācijas dažādās kombinācijās ir atrastas Latvijas FKU pacientu hromosomās (5. tabula). Visbiežāk sastopami ir divi polimorfismi:  $IVS2+19T \rightarrow C$  (atrasts 11 pacientiem) un  $IVS4+47C \rightarrow T$  (atrasts 8 pacientiem). Klusās mutācijas tika atrastas 18 kompaunda heterozigotiskiem pacientiem, veicot tiešās sekvenēšanas analīzi *FAH* gēna eksoniem, kas DGGE rezultātā veidoja heterodupleksus.

**Klusās mutācijas, kas atrastas Latvijas FKU pacientiem**

<b>Nr.</b>	<b>Genotips</b>	<b>Klusā mutācija</b>	<b>Ex/In</b>
1.	R408W/E221_D222>Efs	IVS3-22C->T IVS4+47C->T V245V	Ex 4 Ex 4 Ex 7
2.	R408W/E280K	IVS2+19T->C	I2/Ex 2
3.	R408W/E280K	IVS2+19T->C	Ex 2
4.	R408W/IVS12+1G>A	Q232Q	Ex 6
5.	R111X/R408W	IVS2+19T->C	Ex 2
6.	R408W/E280K	IVS2+19T->C IVS4+47C->T	Ex 2 Ex 4
7.	R408W/E280K	IVS2+19T->C IVS4+47C->T	Ex 2 Ex 4
8.	R408W/IVS10-11G>A	IVS2+19T->C	Ex 2
9.	R408W/E280K	IVS2+19T->C IVS4+47C->T	Ex 2 Ex 4
10.	R408W/E280K	IVS2+19T->C	Ex 2
11.	IVS10-11G>A/IVS12-1G>A	IVS2+19T->C IVS3-22C->T IVS5-54A->G	Ex 2 Ex 4 Ex 6
12.	R408W/I306V	IVS3-22C->T IVS4+47C->T Q232Q V245V IVS9+43G->T	Ex 4 Ex 4 Ex 6 Ex 7 Ex 9
13.	R408W/V230I	IVS3-22C->T Q232Q V245V	Ex 4 Ex 6 Ex 7
14.	R408W/K371E	IVS4+47C->T Q232Q V245V IVS9+43G->T	Ex 4 Ex 6 Ex 7 Ex 9
15.	E280K/L48S	IVS2+19T->C IVS3-22C->T Q232Q V245V	Ex 2 Ex 4 Ex 6 Ex 7



## 5. tabulas turpinājums

16.	R408W/P292T	-71A->C IVS4+47C->T Q232Q IVS9+43G->T L385L	5'UTR Ex 4 Ex 6 Ex 9 Ex 11
17.	R408W/E280K	IVS2+19T->C IVS4+47C->T	Ex 2 Ex 4
18.	X/R408W	IVS3-22C->T Q232Q V245V IVS9+ 43G>T	Ex 4 Ex 6 Ex 7 Ex 9

### 3.3. *FAH* GĒNA MINIHAPOLOTIPU ANALĪZE

VNTR un STR sistēmu analīzes rezultāti tika izmantoti *FAH* gēna minihaplotipu veidošanai. FKU pacientu hromosomu minihaplotipu noteikšanai izmantoti 34 kompaunda heterozigotisku pacientu un viņu vecāku DNS paraugi, kā arī divu R408W homozigotu pacientu paraugi.

Sešpadsmit dažādi ar Latvijas FKU pacientu hromosomām saistīti minihaplotipi ir atrasti *FAH* gēnā (6. tabula). Prevalējošais minihaplotips 3/238 ir saistīts ar mutāciju R408W, kas ir tipiski Austrumeiropas populācijā.

Pieci no 16 minihaplotipiem, kas tika identificēti Latvijas FKU pacientu hromosomās, bija saistīti ar vairāk nekā vienu mutāciju (7. tabula). Savukārt vairākas FKU mutācijas, ieskaitot biežāko R408W mutāciju un mutācijas E280K, R261Q, R158Q un P281L, bija saistītas ar vairāk nekā vienu minihaplotipu, kas var liecināt par mutāciju dažādu izcelsmi (6. tabula).

**FAH gēna mutāciju saistība ar minihaplotipiem  
Latvijas FKU populācijā**

<i>Nr.</i>	<i>Mutācija</i>	<i>Alēļu skaits</i>	<i>Minihaplotips</i>	<i>Alēles</i>
<b>1.</b>	R408W	34	3/238	<b>28</b>
			3/242	<b>3</b>
			3/234	<b>2</b>
			8/238	<b>1</b>
<b>2.</b>	E280K	8	9/250	<b>7</b>
			9/246	<b>1</b>
<b>3.</b>	R261Q	4	3/238	<b>2</b>
			8/238	<b>2</b>
<b>4.</b>	R158Q	4	3/238	<b>2</b>
			3/234	<b>1</b>
			7/234	<b>1</b>
<b>5.</b>	P281L	3	7/242	<b>2</b>
			8/242	<b>1</b>
<b>6.</b>	IVS10-11G>A	2	7/250	<b>2</b>
<b>7.</b>	A104D	2	8/242	<b>2</b>
<b>8.</b>	A403V	1	8/246	<b>1</b>
<b>9.</b>	E178G	1	7/242	<b>1</b>
<b>10.</b>	R111X	1	8/250	<b>1</b>
<b>11.</b>	R261X	1	7/238	<b>1</b>
<b>12.</b>	G272X	1	9/234	<b>1</b>
<b>13.</b>	I306V	1	3/234	<b>1</b>
<b>14.</b>	V230I	1	3/246	<b>1</b>
<b>15.</b>	L48S	1	3/234	<b>1</b>
<b>16.</b>	E221_D222>Efs	1	3/242	<b>1</b>
<b>17.</b>	IVS12+1G>A	1	8/242	<b>1</b>
<b>18.</b>	<b>P292T</b>	1	8/226	<b>1</b>
<b>19.</b>	<b>K371E</b>	1	3/238	<b>1</b>
<b>20.</b>	<b>IVS12-1G&gt;A</b>	2	7/242	<b>2</b>
<b>21.</b>	Neidentificēta m.	1	3/234	<b>1</b>
	<b>Kopā</b>	<b>72</b>		<b>72</b>

**FAH minihaplotipi, kas saistīti ar vairāk nekā vienu mutāciju**

Nr.	Minihaplotips	Mutācija	Alēles
1.	3/238	R408W	28
		R261Q	2
		R158Q	2
		K371E	1
2.	3/242	R408W	3
		E221_D222>Efs	1
3.	3/234	R408W	2
		R158Q	1
		I306V	1
		L48S	1
		Neidentificēta m.	1
4.	7/242	P281L	2
		E178G	1
		IVS12-1G>A	2
5.	8/238	R408W	1
		R261Q	2
6.	8/242	A104D	2
		P281L	1
		IVS12+1G>A	1

Normālu *FAH* hromosomu minihaplotipi tika analizēti FKU pacientu vecāku alēlēs. Lielākā daļa minihaplotipu tika atrasta gan mutantajās, gan normālajās alēlēs. Latvijas *FAH* alēlēs ir atrastas dažādas STR alēles. STR alēļu sadalījums no mazākās 226bp alēles līdz lielākajai 250bp alēlei tika novērots abu veidu hromosomās. Alēles 254bp un 258bp mūsu pētījumā netika atrastas. VNTR alēle 12 tika atrasta tikai normālajās *FAH* hromosomās.

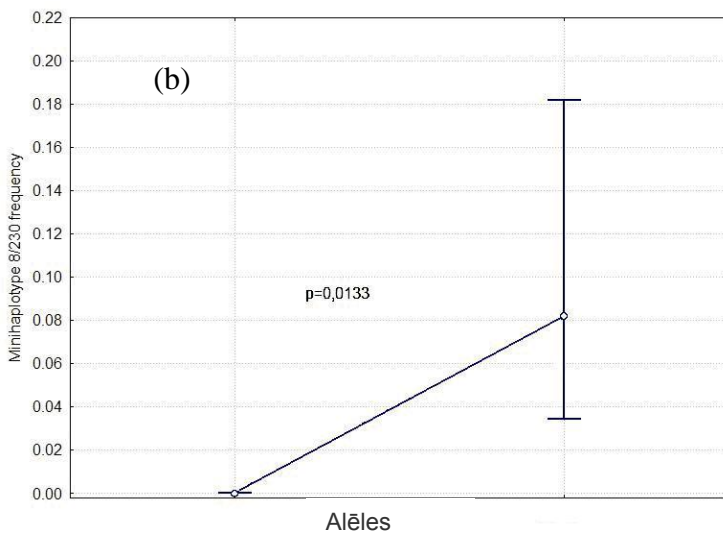
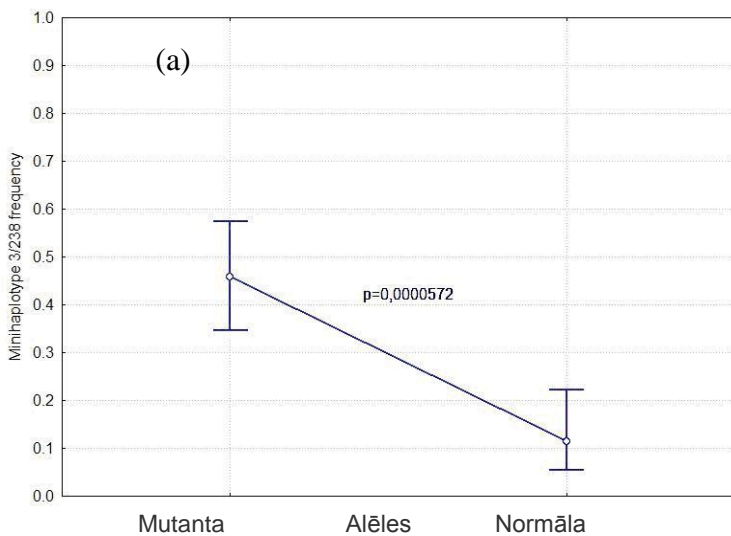
Visbiežāk sastopamais minihaplotips starp mutantajām hromosomām ir 3/238 prevalējošās R408W mutācijas dēļ. Normālajās FKU pacientu hromosomās biežāk sastopamais minihaplotips ir 3/242 (8. tabula).

Minihaplotipu heterozigotātes koeficients bija zemāks mutantajās hromosomās (76%), salīdzinot ar normālajām hromosomām (92%).

**Minihaplotipu biežums normālajās un mutantajās hromosomās**

Nr.	Minihaplotips	Biežums		$p_i^2$	
		Mutantās alēles	Normālās alēles	Mutantās alēles	Normālās alēles
1.	3/234	0,0833	0,0492	0,00693	0,00242
2.	3/238	0,4583	0,1147	0,21	0,013156
3.	3/242	0,0556	0,1475	0,0031	0,02176
4.	3/246	0,0139	0,0164	0,00019	0,00027
5.	7/230	—	0,0164	—	0,00027
6.	7/234	0,0139	0,0327	0,00019	0,00107
7.	7/238	0,0139	0,0164	0,00019	0,00027
8.	7/242	0,0694	0,0492	0,0048	0,00242
9.	7/246	—	0,0492	—	0,00242
10.	7/250	0,0278	—	0,00077	—
11.	8/226	0,0139	0,0164	0,00019	0,00027
12.	8/230	—	0,082	—	0,0067
13.	8/234	—	0,0492	—	0,00242
14.	8/238	0,0416	0,0984	0,00173	0,00968
15.	8/242	0,0556	0,082	0,0031	0,0067
16.	8/246	0,0139	0,0655	0,00019	0,00429
17.	8/250	0,0139	0,0164	0,00019	0,00027
18.	9/234	0,0139	0,0164	0,00019	0,00027
19.	9/246	0,0139	0,0164	0,00019	0,00027
20.	9/250	0,0972	0,0492	0,00945	0,00242
21.	12/230	—	0,0164	—	0,00027
	<b>Kopā</b>	<b>1,0000</b>	<b>1,0000</b>	$\Sigma_m = 0,2414$	$\Sigma_n = 0,077616$
		<b>1 – <math>\Sigma</math></b>		<b>0,7586</b>	<b>0,9224</b>

Statistiski ticama atšķirība starp mutantajām un normālajām hromosomām tika novērota minihaplotipu 3/238 un 8/230 izplatībā (5. attēls (a) un (b)).



**5. attēls.** Statistiskās analīzes rezultāti minihaplotipu 3/238 (a) un 8/230 (b) izplatībai mutantajās un normālajās *FAH* alēlēs.

Minihaplotipu 3/242, 7/246 un 8/234 izplatības statistiskā analīze uzrādīja tendenci ( $p < 0,10$ ) uz statistiski ticamu atšķirību minēto minihaplotipu sadalījumā abos hromosomu veidos.

### 3.4. FAHGĒNA R408W MUTĀCIJAS IZPLATĪBAS ANALĪZE

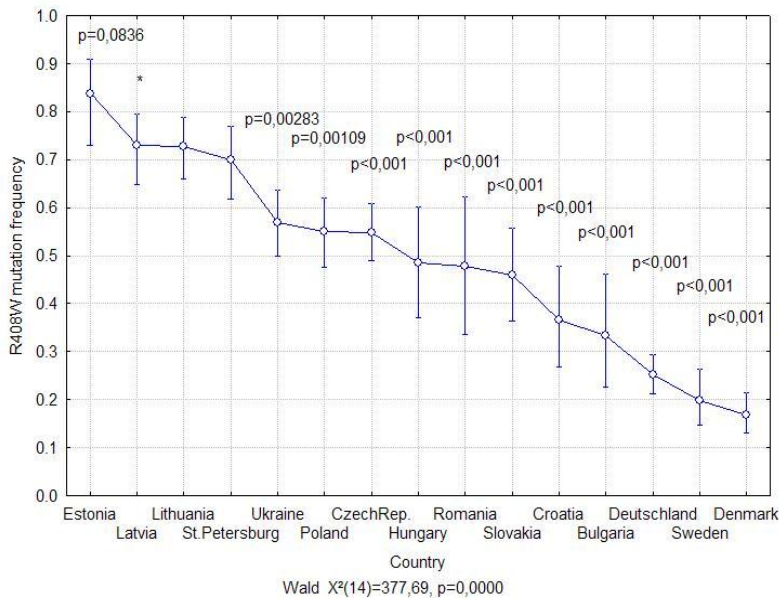
FAH gēna mutācijas R408W sastopamība ir līdzīga Latvijas, Lietuvas un Sanktpēterburgas FKU populācijās. Mutācijas visaugstākā sastopamība ir konstatēta Igaunijā (Lilleväli, 1996). R408W mutācijas izplatības statistiskā analīze uzrādīja statistiski ticamas atšķirības starp mutācijas relatīvo biežumu Latvijā un citās Eiropas populācijās (9. tabula). Statistiskās analīzes rezultāti apstiprina mutācijas R408W Baltijas tautu-slāvu izcelsmi un cilvēku migrācijas nozīmi mutācijas izplatībā citās populācijās (6. attēls).

9. tabula

#### Mutācijas R408W sastopamības salīdzinājums starp Latvijas FKU populāciju un citām Eiropas populācijām.

Valsts/populācija	Biežums (%)	Analizēto alēļu skaits	Atsauces	P <sup>#</sup>
Igaunija	84	68	Lilleväli, 1996	0,0836
Latvija	73	140	Present study	*
Lietuva	73	184	Kasnauskiene, 2003	—
Sanktpēterburga	70	140	Baranovskaya, 1996	—
Ukraina	57	202	Nechyporenko and Livshits, 2002	0,00283
Polija	55	182	Zschocke, 2003	0,00109
Čehija	55	266	Kozak, 1997	< 0,001
Ungārija	49	70	Zschocke, 2003	< 0,001
Rumānija	48	44	Zschocke, 2003	< 0,001
Slovākija	46	98	Kadasi, 1995	< 0,001
Horvātija	37	79	Zschocke, 2003b	< 0,001
Bulgārija	34	60	Zschocke, 2003	< 0,001
Vācija	25	438	Zschocke, 1999	< 0,001
Zviedrija	20	176	Svensson, 1993	< 0,001
Dānija	17	308	Guldberg, 1993a	< 0,001

<sup>#</sup> p vērtība ir dota relatīvā biežuma salīdzināšanai starp divām populācijām.



**6. attēls.** Statistiskās analīzes rezultāti R408W mutācijas relatīvo frekvenču salīdzināšanai starp Latvijas populāciju (\*) un citām Eiropas populācijām.

## 4. DISKUSIJA

Fenilketonūrija ir biežākā aminoskābju metabolisma patoloģija Eiropā. FKU ir pirmā vielmaiņas traucējumu patoloģija, kas tika identificēta kā garīgas atpalcības iemesls un pirmā centrālās nervu sistēmas ģenētiskā slimība, kurai ir iespējama efektīva ārstēšana (diēta), kā arī pirmā patoloģija, kas veiksmīgi tiek diagnosticēta, veicot jaundzimušo skrīningu.

Fenilketonūrijas bioķīmisko un molekulāri ģenētisko pamatu izpratne, kā arī inovatīvās ārstēšanas metodes, kas tika izstrādātas pēdējo 60 gadu laikā, vēlāk tika izmantotas arī citu metabolo slimību ārstēšanā, kas būtiski samazināja saslimstību ar šīm patoloģijām un uzlaboja pacientu dzīves kvalitāti.

*PAH* gēns tika klonēts 1983. gadā (Woo, 1983). Ir pagājuši gandrīz 30 gadi, kopš FKU pacientiem un viņu ģimenēm tika veikti pirmie molekulārie testi. Lielākā daļa pētījumu par *FAH* gēna mutācijām dažādās populācijās tika veikta 90. gados, un to rezultātā tika izveidota *FAH* gēna mutāciju datu bāze (PAHdb).

Mūsdienās lielāka uzmanība tiek pievērsta jaunu ārstēšanas metožu izstrādei, bet tas joprojām ir cieši saistīts ar slimības bioķīmiskajiem un molekulārajiem aspektiem.

### 4.1. *FAH* GĒNA MUTĀCIJAS LATVIJAS FKU PACIENTU HROMOSOMĀS

Mutācija R408W ir biežāk sastopamā FKU mutācija Eiropā, un mūsu pētījumā tā tika atrasta 73% no visām mutantajām hromosomām. Līdzīgs mutācijas biežums ir vērojamas Lietuvas un Sanktpēterburgas FKU populācijās, bet visaugstākā sastopamība R408W mutācijai ir Igaunijā (84%). Statistiskā analīze neuzrādīja statistiski ticamas atšķirības mutācijas R408W izplatībā starp Latvijas, Lietuvas, Igaunijas un Sanktpēterburgas FKU populā-



cijām. Tik izteikta mutācijas prevalence ir izskaidrojama ar šīs mutācijas Baltijas tautu-slāvu izcelsmi, ko apliecina arī mūsu pētījuma rezultāti. R408W mutācijas sastopamība samazinās, pieaugot ģeogrāfiskajam attālumam no rajoniem ar visaugstāko mutācijas relatīvo biežumu ( $p < 0,001$ ), kas liecina, ka mutācija ir ienākusi citās populācijās ar salīdzinoši nesēnām cilvēku migrācijām visā Eirāzijas kontinentā.

Mūsu pētījumā netika veikta R408W mutācijas haplotipu analīze, jo būtiskas atšķirības no citām Austrumeiropas populācijām nebija gaidāmas. Tādējādi mēs pieņemām, ka R408W ir raksturīgs 2. haplotips, kas ir tipisks šai mutācijai blakusesošajās populācijās. Veiktā minihaplotipu analīze atklāja R408W mutācijas saistību ar minihaplotipu VNTR3/STR238 82% no izmeklētajām alēlēm. Šis rezultāts arī pierāda, ka mūsu pieņēmums par mutācijas saistību ar 2. haplotipu ir pareizs, jo Austrumeiropas populācijās šī mutācija ir cieši saistīta ar RFLP 2., 3. haplotipa kopiju VNTR alēli (VNTR 3) un 238-bp STR alēli. Tomēr trīs R408W alēles (9%) bija atrastas saistībā ar minihaplotipu 3/242, divas alēles (6%) saistībā ar minihaplotipu 3/234 un viena alēle (3%) – ar minihaplotipu 8/238. Igaunijas un Lietuvas FKU populācijās R408W mutācija bija atrasta saistībā ar Austrumeiropai raksturīgu minihaplotipu attiecīgi 98% un 68% no visām R408W alēlēm. Minihaplotips 3/242 saistībā ar R408W ir atrasts Polijas FKU populācijā 6 mutantajās hromosomās (6,5%) un vienā hromosomā Igaunijas FKU populācijā. “Ķeltu” alēle VNTR8/STR242, kas ir visbiežāk sastopama Ziemeļrietumeiropas populācijās, netika atklāta Latvijas FKU pacientu hromosomās.

Mutācija R408W bija atrasta saistībā ar minihaplotipiem 8/230, 8/246, 9/242 un 9/246 citās Eiropas populācijās, bet tikai dažās hromosomās. Mutācijas saistība ar dažādām VNTR un STR alēlēm ir sastopama dažādās populācijās un atspoguļo tandēmu atkārtojumu daudzveidību. Citi mehānismi, kas noved pie minihaplotipu daudzveidības, ir ciltstēva efekts un atkārtotās mutācijas. R408W mutācijas kodons satur metilcitozīnu, kas deaminācijas

procesā pārvēršas timīnā (c.1222C>T). Mutācijas CpG dinukleotīdos rodas biežāk salīdzinājumā ar CG dinukleotīdiem. Tas daļēji izskaidro arī R408W mutācijas augstu relatīvo biežumu Eiropas FKU populācijās (<10%).

Mutācijas saistība ar vairākiem minihaplotipiem var liecināt arī par mutācijas seno izcelsmi.

FKU Latvijā ir homogēna. *FAH* lokusa homozigotātes indekss ir vienāds ar 0,514. Visaugstākais *FAH* lokusa homozigotātes indekss ( $j=1$ ) ir novērots Jemenas ebrejiem, kuriem visos FKU gadījumos ir atrasta liela delēcija, kas ietver 3. eksonu (Avigad, 1990). Pacientu un viņu ģimeņu analīze norādīja, ka mutācija cēlusies Sanā, Jemenas austrumdaļā, apmēram 18. gadsimtā (Killeen, 2008).

*FAH* lokusa homozigotātes indekss citās Austrumeiropas populācijās arī ir relatīvi augsts: Igaunijā – 0,62 (Lilleväli, 1996), Lietuvā – 0,54 (Kasnauskiene, 2003), Polijā – 0,35 (Jaruzelska, 1993), Dienvidpolijā – 0,44 (Zygulska, 1991). Homozigotātes indekss ir zemāks etniski jauktās populācijās, piemēram, Vācijā –  $j = 0,08$  (Zschocke and Hoffmann, 1999). Vācija Eiropas vēsturē ir bijusi daudzu cilvēku migrāciju krustcelēs, mūsdienās apmēram 20% no valsts iedzīvotājiem ir imigranti no dažādām valstīm, bet vislielāko etnisko grupu veido imigranti no Turcijas.

Homozigotātes indekss būtu jāņem vērā, izvēloties *FAH* gēna mutāciju noteikšanas metodi konkrētajā populācijā. Augsts homozigotātes indekss var atvieglot genotipa noteikšanu un palielināt atklāto mutāciju skaitu.

Salīdzinoši augsts homozigotu līmenis ietekmē arī FKU klīnisko fenotipu daudzveidību populācijā. R408W ir smaga mutācija, kas gandrīz pilnībā nomāc fermenta aktivitāti un izraisa smagu FKU klīnisko formu. Ņemot vērā, ka 36 (51,4%) no 70 neradniecīgajiem FKU pacientiem ir homozigoti pēc R408W mutācijas, tas izskaidro smagas FKU klīniskās formas prevalenci Latvijas pacientiem. Pārējiem 34 (48,6%) pacientiem, kas ir kompaunda heterozigotiski ar R408W mutāciju vienā alēlē, slimības smaguma pakāpe ir atkarīga

no mutācijas otrā *FAH* gēna alēlē. Tikai četriem Latvijas FKU pacientiem nav atrasta R408W mutācija.

Nākamā biežāk sastopamā *FAH* gēna mutācija Latvijas populācijā ir E280K (5,7%), kas arī ir smaga mutācija un samazina fermenta aktivitāti līdz ~0,9%. Glu280 atrodas *FAH* konservatīvajā rajonā (no His263 līdz His289) tuvu fermenta aktivācijas centram un veido savienojumus ar Arg158 un His146. Mutācija 280. kodonā būtiski ietekmē fermenta aktivācijas centra elektrostātisko potenciālu (Jennings, 2000).

Septiņas no astoņām (7/8) E280K alēlēm ir atrastas kompaunda heterozigotiskiem pacientiem kopā ar R408W mutāciju. Šiem pacientiem ir raksturīga smaga FKU klīniskā forma fermenta zemās aktivitātes dēļ.

Glu280 kodons satur metilcitozīnu. Mutācija E280K ir atrasta saistībā ar 3 minihaplotipiem, kas var liecināt par mutācijas atkārtotas rašanās mehānismu. Latvijas FKU pacientu hromosomās šī mutācija ir cieši saistīta ar minihaplotipu 9/250 (7 no 8 alēlēm) un ar 9/246 vienā alēlē. Citās populācijās mutācijai raksturīgie minihaplotipi bija 7/246 (Vācija), 8/238 un 8/246 (Ziemeļīrija), 9/234 (Spānija). Mutācija E280K ir sastopama dažādās Eiropas FKU populācijās, bet mazam hromosomu skaitam.

Mutāciju R261Q un R158Q sastopamība Latvijas populācijā ir 3%. Mutācija R158Q ir bieži sastopama FKU mutācija Eiropā ar sastopamību līdz 10% no visām mutantām hromosomām. Kā jau minēts, Arg158 veido saites ar Glu280 un Tyr268. Abas šīs saites ir svarīgas fermenta aktivācijas centra konservatīvās struktūras saglabāšanai. Arginīna aizvietošana ar glutamīnu maina aktivācijas centra struktūru, ietekmējot fermenta aktivitāti. R158Q mutācija ir klasificēta kā smaga ar *FAH* atlieku aktivitāti ~10% (Jennings, 2000). Tomēr R158Q ir viena no mutācijām, kas bieži ir aprakstīta pacientiem ar dažādām slimības smaguma pakāpēm. Potenciāls iemesls variablai genotipa un fenotipa korelācijai var būt saistīts ar mutantā proteīna bioloģiskajām un funkcionālajām īpatnībām. Ir aprakstīti FKU pacienti, kam ārstēšanas laikā ir

raksturīga zema Phe tolerance, kaut arī Phe līmenis pirms ārstēšanas nebija krasi paaugstināts. R158Q tiek uzskatīta par biopterīnjutīgu mutāciju. Mūsu pētījumā mutācija R158Q ir atrasta tikai kombinācijā ar R408W alēli, un visiem 4 pacientiem ir klasificēta smaga FKU klīniska forma.

Minihaplotipu analīze uzrādīja mutācijas saistību ar 3 dažādiem minihaplotipiem: 3/238 (2 alēles), 3/234 (viens alēle) un 7/234 (viens alēle). Citās populācijās raksturīgākais minihaplotips bija 3/234 (Vācija, Itālija un Ziemeļrija). Arg158 arī satur CpG dinukleotīdu, kas var būt iespējams iemesls minihaplotipu daudzveidībai, bet dati nav pietiekami, lai to apstiprinātu.

Mutācija R261Q pieder pie vidēji smagām mutācijām ar fermenta atlieku aktivitāti >30%. Tā ir bieži sastopama Eiropas populācijās ar visaugstāko sastopamību Šveicē – virs 30%. Arg261 atrodas kofaktora piesaistīšanas domēnā (*cofactor binding domain* – CBR1), kur veido ūdeņraža saites ar Gln304 un Thr238. Šīs saites nodrošina fermenta aktivācijas centra stabilitāti, bet mutācijas rezultātā tā tiek destabilizēta. Dažādos pētījumos par R261Q alēli ir atrodama pretrunīga informācija, jo dažos gadījumos tā tiek uzskatīta par BH4 jutīgu gan kombinācijā ar smagu (nulle) mutāciju, gan kombinācijā ar citu vieglāku mutāciju, bet citos gadījumos tiek atzīta par smagu mutāciju bez atbildes uz BH4 slodzi.

Trim Latvijas FKU pacientiem R261Q ir atrasta kombinācijā ar smagu R408W mutāciju otrā alēlē, bet vienam pacientam – kombinācijā ar mutāciju A104D. Visiem pacientiem ir klasificēta smaga FKU klīniskā forma.

Latvijas R261Q alēlēm ir atrasti divi raksturīgi minihaplotipi – 3/238 un 8/238 divās alēlēs katrs. Citās Eiropas populācijas biežāk sastopamie minihaplotipi bija 8/238 (Vācija un Itālija), kā arī 3/246, 7/242, 8/234, 8/242 un 8/246. Mutācijas saistību ar vairākiem minihaplotipiem dažādās populācijās var izskaidrot gan ar CpG dinukleotīdu aminoskābes kodona sastāvā, gan ar mutācijas iespējamiem seniem izcelsmiem.

Mutācija P281L *FAH* gēnā ir visbiežāk sastopama Islandē – 19%, Horvātijā un Grieķijā atbilstoši 11% un 10%. Citās Eiropas populācijās relatīvais biežums nepārsniedz 6% no visām mutantām hromosomām. P281L ir atrasta trīs Latvijas FKU pacientu hromosomās (2,1%). Mutācija pieder pie smagām mutācijām, jo atlieku fermenta aktivitāte ir zemāka par 1%. Tas ir izskaidrojams ar proflīna atrašanās vietu. Pro281 atrodas tuvu dzelzs atomam fermenta aktivācijas centrā, un aminoskābes maiņa ietekmē fermenta aktivācijas centra konformāciju.

Latvijas FKU pacientiem P281L mutācija ir atrasta kombinācijā ar R408W alēli vienam pacientam un R261X alēli diviem pacientiem. Visiem pacientiem ir smaga FKU klīniskā forma, kas korelē ar atrasto mutāciju bioķīmisko fenotipu.

Biežāk sastopamie minihaplotipi P281L mutācijai ir 7/242 un 8/242, kas ir atrasti arī Latvijas P281L alēlēs. Itālijas FKU populācijā P281L ir atrasta saistībā ar minihaplotipiem 8/238, 8/234 un 3/234, Polijā ar 3/242. Mutācijas izplatība dažādās populācijās var tikt izskaidrota ar atkārtotas rašanās mehānismu metilcitozīna deaminācijas rezultātā un liecina par iespējamu mutācijas seno izcelsmi.

Mutācija IVS10-11G>A ir sastopama vairāk nekā 30% no visām *FAH* hromosomām Vidusjūras reģionā, īpaši Turcijā. Mutācija ir klasificēta kā smaga, jo ir splaisinga saita mutācija, kuras rezultātā veidojas saīsinātais proteīns, kas ir neaktīvs un nespēj veikt savas funkcijas.

Mūsu pētījumā šī mutācija ir atrasta divās FKU pacientu hromosomās ar relatīvo biežumu 1,4%. Abiem pacientiem ir smaga slimības klīniskā forma, jo *FAH* otrā alēlē ir atrastas R408W un IVS12-1G>A mutācijas, kas abas ir nulles mutācijas un pilnībā nomāc fermenta aktivitāti.

Abas Latvijas IVS10-11G>A alēles ir atrastas saistībā ar minihaplotipu 7/250, kas ir prevalējošs šai mutācijai. Minihaplotips 7/230 ir raksturīgs Spānijas čigāniem, čehiem, angļiem un vāciešiem, kam ir FKU. IVS10-11G>A

tiek uzskatīta par senu mutāciju, kas ir radusies pirms pēdējā leduslaikmeta beigām un izplatījies Vidusjūras baseinā neolīta periodā (Cali, 1997). Ziemeļeiropas populācijās, piemēram, Vācijā, tā ir parādījusies neseno migrāciju rezultātā.

Mutācijai A104D ir raksturīga atlieku fermenta aktivitāte < 25%, un tā izraisa vieglu FKU fenotipu. Latvijas FKU populācijā šī mutācija ir atrasta ar relatīvo biežumu 1,4%, kas atbilst divām hromosomām. A104D mutācija ir sastopama Eiropas centrālajā un ziemeļu daļā ar salīdzinoši zemu sastopamību. Mutācija atrodas fermenta regulējošajā domēnā un tiek klasificēta kā BH4 jutīga.

A104D alēle ir atrasta diviem kompaunda heterozigotiskiem pacientiem kombinācijā ar R408W un R261Q mutācijām. Pacientiem ir raksturīga smaga FKU klīniskā forma, lai gan ir A104D bioķīmiskais fenotips un R261Q mutācijas iespējama BH4 jutība. Mūsu rezultāti apliecina, ka šajā gadījumā nav noteiktas korelācijas starp genotipu un BH4 jutību.

Informācija par A104D alēles raksturīgiem minihaplotipiem ir atrodama tikai Vācijas FKU populācijas pētījumos, kur tā ir saistīta ar 8/242 un 8/246 minihaplotipiem. Latvijā abas alēles ir atrastas saistībā ar 8/242 minihaplotipu. Mutācija ir reti sastopama Eiropas FKU populācijās, iespējams tāpēc, ka alanīna kodonā nav hipermutagēna CpG dinukleotīda.

Trīs *FAH* gēna mutācijas, kuru rezultātā veidojas stopkodons un tiek pārtraukta proteīna sintēze, ir atrastas Latvijas FKU pacientu hromosomās: R111X, R261X un G272X ar sastopamību 0,7%. Visas trīs alēles ir klasificētas kā smagas ar FAH atlieku aktivitāti <1%. Mutācija R111X atrodas proteīna regulējošajā domēnā (3. eksonā), bet mutācijas R261X un G272X – katalītiskajā domēnā (7. eksonā). Mutāciju rezultātā veidojas saīsinātais proteīns, kas nespēj pildīt savas funkcijas.

R261X, līdzīgi kā R261Q mutācijas rezultātā, arginīna aizvietošana ar stopkodonu destabilizē fermenta aktivācijas centra struktūru.

Glu272 atrodas aminoskābju rindā pirms aktivācijas centra histidīniem, kas saista dzelzs atomu, mutācijas rezultātā fermentam zūd katalītiskā aktivitāte.

Mutācijas R111X rezultātā netiek sintezētas 2/3 no FAH polipeptīda. Eiropas populācijās šīs mutācijas sastopamība ir ap 1–2%, tāpat kā R261X. R111X ir atrasta arī Turcijas, Itālijas, Sicīlijas un Austrālijas FKU pacientiem. G272X mutācija ir viena no biežākajām Norvēģijā (16%).

Mutācijas G272X un R111X ir atrastas kombinācijā ar R408W mutāciju pacientiem ar smagu FKU fenotipu. Mutācija R261X kombinācijā ar citu smagu mutāciju P281L un smagu FKU fenotipu.

Latvijas FKU pacientu hromosomās R111X, R261X un G272X ir atrastas saistībā ar attiecīgi 8/250, 7/238 un 9/234 minihaplotipiem.

Minihaplotipi 3/238 un 3/246 ir raksturīgi R261X alēlei Vācijas FKU pacientu hromosomās, bet 7/242 (biežāk sastopams), 3/238 un 3/242 Itālijas FKU pacientiem. Ņemot vērā, ka aminoskābes kodons ietver CpG dinukleotīdu, iespējams, ka šī mutācija ir radusies neatkarīgi dažādās populācijās.

Minihaplotipu analīzes dati par G272X mutāciju ir pieejami tikai Vācijas FKU populācijā, kur G272X alēle ir saistīta ar 8/226 minihaplotipu. Nav informācijas par minihaplotipu pētījumiem attiecībā uz R111X alēli.

Mūsu pētījumā ir atrastas četras *FAH* gēna mutācijas, kas izraisa vieglu hiperfenilalaninēmiju – A403V, E178G, I306V un V230I ar fermenta atlieku aktivitāti attiecīgi 32%, 39%, 39% un 63%. Katra no šīm mutācijām ir atrasta tikai vienā hromosomā. A403V, E178G un V230I alēles ir BH4 jutīgas.

Mutācija A403V ir sastopama Dienvideiropā, un Spānijā tās relatīvais biežums sasniedz 14% no visām FKU alēlēm.

Ala403 atrodas spirāles Cα12 beigās tuvu Ala309 Cα8 spirālē. Alanīns vai citas nelielas aminoskābes atlikums var būt svarīgs spirāles cilpu ciešās struktūras saglabāšanai, tāpēc alanīna aizvietošana ar lielāku aminoskābes atlikumu nekā valīns var sekmēt mazāk stabila proteīna veidošanos, jo, veidojoties

lielākām sānu ķēdēm, mainīsies proteīna konformācija. Tādējādi mutācijas rezultātā nerodas krasas izmaiņas kofaktora piesaistīšanas vietā, tas izskaidro alēles A403V atbildes reakciju uz biopterīnu.

Mutācija V230I iespaido proteīna funkcijas līdzīgi kā A403V alēle, jo notiek mazākā hidrofobā valīna aizvietošana ar lielāku izoleicīnu, kas ietekmē proteīna konformāciju.

Mutācija E178G nav bieži sastopama Eiropā. Glu178 atrodas katalītiskajā domēnā (CD), un tā aizvietošana ar mazāku aminoskābi maina proteīna telpisko izvietojumu tieši katalītiskā domēna rajonā. Tādā veidā tiek traucēts proteīna aktivācijas mehānisms, un tas ietekmē fermenta atbilstošo funkciju.

Izoleicīna aizvietošana ar valīnu 306. kodonā (I306V mutācija) destabilizē proteīnu, izveidojot dobumu aktivācijas centra tuvumā. Jo lielāks ir izveidojies dobums, jo lielāks negatīvais efekts būs vērojams.

Visas minētās vieglu hiperfenilalaninēmiju izraisošās mutācijas ir atrastas kombinācijā ar R408W mutāciju, kas raksturo pacientu genotipu kā funkcionāli hemizigotu. Tomēr trim pacientiem ir raksturīga viegla FKU klīniskā forma, un tikai vienam ir viegla hiperfenilalaninēmija (V230I/R408W), kurai nav nepieciešama ārstēšana.

Mutācijas A403V, E178G, I306V un V230I ir atrastas attiecīgi saistībā ar šādiem minihaplotipiem: 8/246, 7/242, 3/234 un 3/246.

A403V alēles saistība ar tādu pašu minihaplotipu ir atrasta Polijas, Itālijas un Spānijas populācijās, bet tikai dažās hromosomās. Mutācijas cieša saistība ar minihaplotipu 8/242 ir konstatēta Vācijas FKU populācijā, tas arī ir biežāk sastopams gan Itālijas, gan Polijas FKU pacientiem.

Minihaplotipu analīzes rezultāti V230I mutācijai ir pieejami tikai Vācijas FKU pacientiem, kam šī alēle ir saistīta ar 3/242 minihaplotipu. Nav datu par mutāciju E178G un I306V raksturīgiem minihaplotipiem citām FKU populācijām.



Mutācija L48S ir bieži sastopama Eiropas dienvidu daļā. Šī alēle ir prevalējošā Serbijas (21%) un Dienviditālijas (11%) FKU pacientiem. L48S ir viegla mutācija, kas tiek uzskatīta par biopterīnjutīgu, bet bieži saistīta ar pretrunīgiem genotipa un fenotipa korelācijas datiem. Leu48 atrodas regulējošajā domēnā un mutācijas rezultātā tiek aizvietots ar polāro serīnu. Mainoties sānu ķēdes polaritātei, proteīns tiek destabilizēts. Mūsu pētījumā L48S mutācija ir atrasta tikai vienā FKU pacienta hromosomā kombinācijā ar E280K alēli pacientam ar smagu FKU klīnisko formu, lai gan L48S alēles bioķīmiskais fenotips ir viegls.

Latvijas FKU populācijā L48S ir saistīta ar minihaplotipu 3/234, kas ir prevalējošais šai alēlei arī Vācijas un Itālijas FKU pacientu hromosomās. Minihaplotipi 3/230, 3/238 un 8/238 ir arī atrasti saistībā ar L48S mutāciju Itālijas FKU populācijā – katra tikai vienā hromosomā.

Tikai viena delēcija ir atrasta Latvijas FKU pacientiem – E221\_D222>Efs, kas ir rāmja nobīdes mutācija, rezultātā veidojas himēproteīns. Nav datu par FAH atlieku aktivitāti, bet mutācija tiek klasificēta kā smaga. Kombinācijā ar R408W alēli fenotipiski izpaužas kā smaga FKU klīniskā forma.

Latvijas FKU populācijā E221\_D222>Efs ir atrasta saistībā ar minihaplotipu 3/242. Vācijas FKU populācijā šai mutācijai raksturīgi minihaplotipi 3/238 un 3/242 ir atrasti katrs vienā alēlē.

IVS12+1G>A mutācija ir viena no trim splaisinga saita mutācijām, kas atrasta FKU pacientiem. Mutācijas rezultātā veidojas saīsinātais proteīns, kam C terminālajā daļā trūkst 52 aminoskābju atlikumi (atlikumi 401–452). Veiktās *in vitro* ekspresijas analīzes pierādīja, ka saīsinātais proteīns, ko veido aminoskābju atlikumi no 1. līdz 400., ir nestabils, jo 409.–422. aminoskābju atlikumi ir iesaistīti proteīna dimēru un domēnu savstarpējā mijiedarbībā. Kopā ar R408W alēli mutācija IVS12+1G>A izpaužas smagā FKU klīniskā formā.

IVS12+1G>A ir bieži sastopama Skandināvijā ar augstāku sastopamību Dānijā (37%). Latvijā tā ir atrasta tikai vienā hromosomā (0,7%) saistībā ar minihaplotipu 8/242, kas ir vienīgais zināmais šīs mutācijas minihaplotips, kas ir atrasts arī Vācijas, Itālijas un Ziemeļīrijas populācijās.

Trīs mutācijas (P292T, K371E un IVS12-1G>A), kas ir atrastas mūsu pētījumā, ir jaunas un līdz šim netika atrastas citās populācijās. Divas no tām (P292T un K371E) ir atrastas tikai vienā hromosomā katra, bet mutācija IVS12-1G>A ir atrasta diviem neradniecīgiem FKU pacientiem. Nevienai no trim mutācijām nebija iespējams veikt *in vitro* ekspresijas analīzi, bet neviena no tām netika atrasta 100 fenotipiski veseliem indivīdiem (200 hromosomās) no jautās populācijas. Pacientiem ar jaunatklātajām mutācijām tika sekvenēti visi *FAH* gēna 13 eksoni, bet citas FKU izraisošas mutācijas netika atrastas. Trim pacientiem jaunās mutācijas ir iedzimtas no viena no vecākiem, vienam pacientam ar IVS12-1G>A alēlei vecāku paraugi nebija pieejami.

P292T (c.874C>A) ir *missense* mutācija, kuras rezultāta notiek aminoskābju maiņa *FAH* gēna 8. eksonā. Hidrofobais prolīns tiek mainīts pret hidrofilo treonīnu 292. kodonā. Alēlei raksturīgais minihaplotips – 8/226. Pacienta Phe līmenis pirms ārstēšanas liecināja par smagu FKU klīnisko formu (~25 mg%). P292T ir atrasta kombinācijā ar R408W mutāciju, un, ņemot vērā, ka FKU klīniskā forma ir atkarīga no gēna alēļu kombinācijas, mēs pieņemam, ka šī mutācija ir saistīta ar zemu fermenta FAH atlieku aktivitāti. *PolyPhen* analīzes rezultāti raksturoja P292T alēli kā “ticami patogēnu”, kas ietekmē fermenta struktūru un funkcijas.

Mutāciju R408W pacients ir mantojis no mātes, bet tēva hromosomā netika atrasta ne P292T mutācija, ne kāda cita FKU izraisošā mutācija. Paternitātes tests uzrādīja paternitātes varbūtību 99,99%, kas ļauj izdarīt secinājumus, ka šī mutācijas ir *de novo*. FKU risks nākamajam bērnam šajā ģimenē ir zems. Šis gadījums pierāda visas *FAH* gēna kodējošās daļas analīzes

nepieciešamību, kā arī vecāku paraugu izmeklēšanas svarīgumu nākamā bērna riska aprēķināšanai.

Jaunatklātā 1111A>G arī ir *missense* mutācija *FAH* gēna 11. eksonā, kuras rezultātā lizīns tiek aizstāts ar glutamīnskābi 372. kodonā. Abi aminoskābju atlikumi ir polāri. Mutācija ir atrasta pacientam un viņa tēvam saistībā ar minihaplotipu 3/238. Jaundzimušo skrīninga un atkārtoto analīžu rezultāti nepārsniedza 2,7 mg% Phe serumā, kas atbilst vieglai hiperfenilalaninēmijai. Pacienta genotips ir R408W/K371E, kas liecina par pietiekamu *FAH* fermenta atlieku aktivitāti un mutācijas K371E vieglu bioķīmisko fenotipu. Šos secinājumus apstiprina arī *PolyPhen* analīzes rezultāti, kas raksturo šo mutāciju kā labdabīgu. Pacienta genotipu var raksturot kā funkcionāli hemizigotu. K371E alēle netika atrasta kontrolgrupas fenotipiski veselīem indivīdiem. Mutācija ir atrasta saistībā ar minihaplotipu 7/242 abās *FAH* gēna hromosomās.

Jaunatklātā splaisinga saita mutācija c.1316-1G>A skar konservatīvu AG dinukleotīdu uz 12. introna un 13. eksona robežas. Ņemot vērā tās atrašanās vietu, var domāt, ka mutācijas rezultātā veidojas saīsinātais proteīns, kam trūkst vismaz 14 aminoskābju atlikumu karboksilgalā. Mutācija ir atrasta diviem neradniecīgiem pacientiem ar smagu FKU klīnisko formu.

Vienam no diviem pacientiem mutācija c.1316-1G>A ir atrasta kombinācijā ar R408W alēli, bet otram kombinācijā ar citu splaisinga saita mutāciju IVS10-11G>A. Abiem pacientiem ir raksturīga smaga FKU klīniskā forma.

Viena alēle mūsu pētījumā ir palikusi neidentificēta. Ir iespējams, ka tā ir liela delēcija, kuras noteikšanai ir nepieciešamas citas diagnostikas metodes.

Bez slimību izraisošām mutācijām FKU pacientiem ir atrastas 9 klusās mutācijas dažādās kombinācijās. Trīs no tām atradās eksonos, bet 6 – intronos. Atklāto polimorfismu skaits ir atkarīgs no praimeriem, ko izmanto sekvenēšanas analīzei. Izmaiņas, kas atrodas intronos, var palikt nepamanītas, jo tālāk no eksona/introna robežas tās atrodas DNS secībā.

Saskaņā ar Hārdija-Veinberga likumu Latvijas FKU populācija atrodas līdzsvarā, ko apstiprina statistiskās analīzes rezultāti. Populācijā atrastu genotipu relatīvais biežums būtiski neatšķiras no aprēķinātā absolūtā biežuma ( $p = 0,8312$ ). Mūsu pētījumā netika atklāti citi homozigotiski pacienti (bez R408W), kam atbilstoši Hārdija-Veinberga likumam būtu jābūt ap 7%. Tas skaidrojams ar populācijā iespējamiem indivīdiem ar abām vieglām FKU mutācijām, kas nodrošina pietiekamu fermenta atlieku aktivitāti, lai uzturētu Phe normas robežās.

## 4.2. GENOTIPA UN FENOTIPA KORELĀCIJA LATVIJAS FKU PACIENTIEM

Apkopojot rezultātus par novērotajām mutācijām Latvijas FKU pacientu hromosomās, varam secināt, ka vairākums mutāciju (12/20) ir smagas un izraisa smagu FKU klīnisko fenotipu. Divas mutācijas izraisa vieglu FKU, bet piecas – vieglu hiperfenilalaninēmiju, tikai vienai ir raksturīgs vidēji smags FKU fenotips. Tātad lielākajai daļai pacientu ar smagu vai klasisku FKU cēlonis ir smaga mutācija *FAH* gēnā. Mēs salīdzinājām divas dažādas metodikas FKU klīniskajā klasifikācijā un nekonstatējām ticamu atšķirību ( $p = 0,2276$ ). Tradicionālā FKU klasifikācija ir balstīta uz Phe līmeni plazmā pirms terapijas sākšanas un Phe toleranci. Otrs modelis balstās uz mutācijai piešķirto skaitlisko vērtību fenotipa noteikšanas sistēmā. FKU fenotips tiek izteikts kā abu mutāciju skaitlisko vērtību (SV) summa, kas ir atkarīga no mutāciju smaguma pakāpes. Mūsu pētījumā vairākums FKU pacientu atbilda šai klasifikācijai, bet tika novērotas dažas novirzes. Tas galvenokārt bija vērojams mutācijām ar atlieku *in vitro* aktivitāti. FKU fenotipa variācijas var iespaidot daudzi faktori, piemēram, individuālas atšķirības absorbcijas līmenī zarnās, uzņemtā fenilalanīna saistīšanās līmenim aknās, tā iekļaušanās pakāpei olbaltumvielās, Phe spējai šķērsot hematoencefālisko barjeru. Mutācijas, kas

atrodas tuvu kofaktora piesaistes vietai, ietekmē enzīma aktivitāti, kā arī *FAH* gēna mijiedarbību ar citiem lokusiem.

Uz SV noteikšanu balstītā sistēma ir atkarīga no mutāciju spektra attiecīgajā populācijā. Tā var būt ļoti noderīga populācijā ar prevalējošām “nulles” mutācijām.

Pašreizējā FKU pacientu ārstēšana ir orientēta uz stingru diētu ar samazinātu Phe daudzumu un nepieciešamību lietot speciālu pārtiku, kas nodrošina nepieciešamo aminoskābju uzņemšanu un enerģijas nodrošinājumu no taukiem un oglehidrātiem. FKU diētas pielāgošana un ievērošana ir grūta, un aminoskābju maisījumiem ir specifiska un brīžiem nepatīkama garša. Diētu nepieciešams ievērot visu mūžu (Anonymous, 2001), bet diētas pārkāpumi ir samērā bieži, īpaši pusaudžiem un pieaugušajiem pacientiem. Hiperfenilalaninēmija pieaugušajiem bieži saistīta ar uzmanības traucējumiem, mainīgu garastāvokli un zemām darbaspējām. Hroniski paaugstināts Phe līmenis var izraisīt neurodeģeneratīvas pārmaiņas smadzeņu baltajā vielā, kas izpaužas ar krampjiem un gaitas traucējumiem. Neārstēta mātes hiperfenilalaninēmija grūtniecības laikā ir teratogēna un var izraisīt iedzimtas anomālijas, kā mikrocefāliju, garīgu atpalicību un iedzimtas sirdskaites.

Nav cita efektīva un salīdzinoši vienkārša terapijas veida, kas varētu aizstāt diētu, tomēr šajā jomā visu laiku tiek veikti pētījumi. Lai gan šaperonu terapija ar tetrahidrobiopterīnu ir efektīva daļai pacientu, kam ir BH4 jutīga hiperfenilalaninēmija, kas ir aprakstīta kā *FAH* deficīts, kuru izraisa specifiskas mutācijas *FAH* gēnā.

Izvērtējot datus, kas apkopoti BIOPKU datubāzē, mēs varam pieņemt, ka aptuveni 18% (13/70) no Latvijas pacientiem ar *FAH* deficītu varētu būt jutīgi pret BH-4 terapiju. Septiņām no 20 Latvijas FKU pacientiem atklātajām mutācijām raksturīga fermenta *FAH* atlieku aktivitāte (10–39%): mutācijai R158Q – 10%, A104D – 26%, A403V – 32% un mutācijām R261Q, I306V, E178G un L48S – 39%.

Joprojām nav noteiktu datu par BH-4 jutību pacientiem, kam ir p.L48S, p.R158Q un p.R261Q. Šī atšķirība dotos liecina par stingras korelācijas trūkumu starp genotipu un BH-4 jutību. Ja aminoskābju atlikums ir iesaistīts divu blakusesošu subvienību mijiedarbībā, otrai gēna alēlei varētu būt liela nozīme, nosakot reakciju uz BH4.

Genotipu var uzskatīt par saistītu ar BH-4 jutību, ja viena no alēlēm satur BH-4 jutīgu mutāciju ar pietiekamu FAH atlieku aktivitāti. Starp 70 Latvijas FKU pacientiem 13 varētu būt raksturīga BH-4 jutīga FKU: trīs pacienti ar genotipu R408W/R261Q, četri ar genotipu R408W/R158Q un pieci ar genotipiem R408W/A104D, R408W/A403V, R408W/E178G, R408W/I306V, R261Q/A104D un E280K/L48S. Divpadsmit pacientiem ir nulles mutācija gēna otrā alēlē. Liels skaits pacientu ar BH-4 jutīgu FKU (<75%) ir vērojami Eiropas dienvidu reģionos augstas BH-4 jutīgo mutāciju sastopamības dēļ. R408W un citu nulles mutāciju augstās prevalences dēļ Baltijas valstīs pacientu skaits ar BH-4 jutīgu FKU ir salīdzinoši zems.

Lai gan nav stingras korelācijas starp genotipu un BH4 jutību, mutāciju analīze sniedz noderīgu informāciju par pacienta iespējamo FKU klīnisko formu atkarībā no mutācijām raksturīgās fermenta atlieku aktivitātes, tādā veidā palīdzot izvēlēties efektīvāko ārstēšanas taktiku.

### **4.3. MINIHAPLOTIPU ANALĪZE *FAH* GĒNA NORMĀLAJĀS UN MUTANTAJĀS ALĒLĒS**

Minihaplotipu analīze atklāja 16 dažādas VNTR/STR kombinācijas, kas saistītas ar *FAH* gēna mutācijām un 20, kas ir raksturīgas normālajām *FAH* hromosomām. Visbiežāk sastopamais ar mutācijām saistītais minihaplotips bija 3/238, kas saistīts ar prevalējošo R408W alēli. Normālajās hromosomās visbiežāk sastopamais minihaplotips bija 3/242. Mūsu rezultāti sakrīt ar iepriekšējo pētījumu rezultātiem, kas liecina, ka dažādu Eiropas populāciju baltās

rases pārstāvjiem STR 238bp alēle ir biežāk sastopama mutantajām hromosomām, bet alēles 242bp un 246bp – normālajām. Pretēji – VNTR alēļu izplatība Latvijas FKU populācijā atšķiras no vispārāzīta uzskata, ka VNTR alēle ar 8 atkārtojumiem ir prevalējošā (~60%) gan normālajās, gan mutantajās hromosomās. Šī atšķirība ir skaidrojama ar mutācijas R408W augsto sastopamību Latvijas populācijā un tai raksturīgo Austrumeiropas minihaplotipu 3/238. Savukārt VNTR8 alēles izplatība starp normālajām hromosomām atbilst vispārāzītajam viedoklim. Statistiskā analīze apstiprina būtiskas atšķirības minihaplotipu 3/238 ( $p=0,0000572$ ) un 8/230 ( $p=0,0133$ ) izplatībā starp normālajām un mutantajām *FAH* gēna alēlēm.

Statistiskā analīze uzrādīja tendenci ( $p<0,10$ ) uz statistiski ticamām atšķirībām minihaplotipu 3/242, 7/246 un 8/234 izplatībā starp normālajām un mutantajām *FAH* gēna alēlēm. Ir nepieciešams lielāks paraugu skaits un plašāks pētījums, lai apstiprinātu vai arī atspēkotu šo tendenci.

Minihaplotipu vidējais heterozigotātes indekss ir 76% mutantajām un 92% normālajām hromosomām, kas liecina par normālo alēļu lielāku daudzveidību. Minihaplotipu saistība ar konkrētām mutācijām ierobežo to izplatību un padara tos noderīgus pirmsdzemdību diagnostikai un mutāciju nesēju noteikšanai ģimenēs, kurās ir FKU pacienti.

#### **4.4. EFEKTĪVĀKĀ METODE *FAH* GĒNA MUTĀCIJU DIAGNOSTIKAI LATVIJĀ**

Trīs posmu *FAH* gēna mutāciju noteikšanas metode, kas balstās uz populācijas mutāciju spektru un homozigotātes koeficientu, ir efektīvākā Latvijas FKU pacientu ikdienas diagnostikai. Pirmajā posmā tiek veikta biežāk sastopamās mutācijas R408W noteikšana ar RFLP metodi, kas ļauj identificēt abas alēles ~50% un vienu alēli 43% FKU pacientu. Otrajā posmā denaturējošā gela gradienta elektroforēze tiek izmantota, lai noteiktu citu gēna mutāciju

iespējamo atrašanās vietu. Trešajā posmā atkarībā no DGGE rezultātiem (cik un kādi gēna eksoni veido heterodupleksus) tiešās sekvenēšanas analīze vai minihaplotipu analīze tiek izmantota *FAH* gēna reto mutāciju diagnostikai. Prenatālās diagnostikas gadījumā vai gadījumā, ja ir nepieciešams ātri sniegt informāciju par *FAH* gēna mutācijām, minihaplotipu analīzi varētu izmantot pēc DGGE un pirms tiešās sekvenēšanas analīzes. Piemēram, 7. eksonā ir atrodamas gan slimību izraisošās, gan klusās mutācijas. Tādā gadījumā minihaplotipu analīze var nodrošināt ātrāku rezultātu un sniegt informāciju par indivīda ģenētisko statusu.

Ņemot vērā, ka diagnostikas metodes mērķis ir atklāt pēc iespējas lielāku mutāciju skaitu, izmantoto metožu jutība, kas mūsu pētījumā sasniedz 99%, apliecina, ka izvēlēta pieeja ir efektīvākā Latvijas FKU populācijas gadījumā.



## 5. SECINĀJUMI

1. Latvijas FKU pacientu hromosomās tika identificētas divdesmit (20) dažādas *FAH* gēna mutācijas – visbiežākā R408W mutācija ar RF 73% no visām hromosomām; pārējo 19 mutāciju sastopamība variē 0,7–5,7% robežās.
2. Noteikti minihaplotipi (VNTR/STR) visām 20 *FAH* gēna mutācijām; novērota cieša saistība mutācijai R408W ar Austrumeiropai raksturīgo VNTR3/STR238 minihaplotipu, mutācijai E280K ar VNTR9/STR250 minihaplotipu.
3. Minihaplotipu sistēmas heterozigotātes līmenis ir zemāks mutantām alēlēm (0,76) salīdzinājumā ar normālām (0,92) alēlēm, norādot uz normālo alēļu lielāku daudzveidību.
4. Liels pacientu skaits (91,4%) Latvijas FKU populācijā ar smagu FKU klīnisko formu ir saistīts ar “nulles” mutāciju prevalenci (60%) un augstu *FAH* lokusa homozigotātes koeficientu ( $j = 0,514$ ).
5. *FAH* gēna R408W mutācijas izplatības analīze apstiprina šīs alēles Baltijas tautu-slāvu izcelsmi un ienākšanu citās populācijās ar salīdzinoši nesēnām cilvēku migrācijām visā Eirāzijas kontinentā.
6. Pētījumā izmantotā trīs posmu *FAH* gēna mutāciju noteikšanas metode ir efektīvākā ikdienas diagnostikai Latvijas FKU/HFA pacientiem ar analīzes sistēmas jutību 99%.

## 6. PUBLIKĀCIJAS

1. Pronina N, Giannattasio S, Lattanzio P, Lugovska R, Vevere P, Kornejeva A. The molecular basis of phenylketonuria in Latvia. *Hum Mutat.*, 2003 Apr., V. 21, (4), pp. 398-399.
2. Natalija Pronina, Rita Lugovska, Parsla Vevere. Mutational spectrum in Latvian patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *RSU Research articles in medicine and pharmacy*, 2008, pp.76-79.
3. Natalija Pronina, Rita Lugovska. Association between minihaplotypes and mutations at the PAH locus in Latvian phenylketonuria patients. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B*, Vol. 65 (2011), No. 3/4 (674/675), pp. 73–79.
4. Natalija Pronina, Rita Lugovska. Three novel mutations in the Phenylalanine Hydroxylase Gene (PAH) observed in Latvian patients with Phenylketonuria. Pieņemts publicēšanai *RSU Research articles in medicine and pharmacy 2011*.

### TĒZES UN UZSTĀŠANĀS:

1. V. Kucinskas, V. Jurgelevicius, D. Stepanoviciute, S. Giannattasio, P. Lattanzio, E. Marra, R. Lugovska, N. Pronina, J. Zschocke. Molecular Genetic Testing in Phenylketonuria; Model to Assess The Quality Control System For Monogenic Diseases. Abstr.10th International Congress of Human Genetics, 2001, Vienna. *European Journal of Human Genetics*, 2001, V. 9, Suppl. 1, p. 299.
2. N. Pronina, R. Lugovska, P. Vevere, A. Kornejeva. Mutation analysis of PAH gene among Latvian patients. Abstr. European Human Genetics Conference, May 25-28, 2002, Strasbourg, France. *European Journal of Human Genetics*. 2002, V.10, Supp 1, p. 239.

3. N. Pronina, S. Giannattasio, P. Lattanzio, R. Lugovska. The molecular basis of phenylketonuria in Latvia. Abstr. European Human Genetics Conference, May 3-6, 2003, Birmingham, England. European Journal of Human Genetics. 2003, V.11, Supp 1, p.171.
4. Pronina N., Lugovska R., Muceniece Z., Olhovaya O., Krumina Z., Lace B., Balode I. Experience of molecular diagnostics for genetic disorders in Latvia. Abstr. European Human Genetics Conference, May 7-10, 2005, Prague, Czech Republic. European Journal of Human Genetics. 2005, V.13, Supp 1, p.286.
5. Pronina N., Lugovska R., Sterna O., Daneberga Z., Vevere P. Investigation of phenotype-genotype correlations for patients with PKU in Latvia. Journal of Inherited Metabolic Disease. Abstracts. Vol. 30, Suppl.1, 2007, pp. 9.
6. Pronina N., Lugovska R., Sterna O., Daneberga Z. Phenotype-genotype correlations for patients with PKU in Latvia. European Journal of Human Genetics Vol 15 Supp. 1, 2007, pp. 219.
7. Lugovska R., Krumina Z., Lace B., Vevere P., Pronina N., Daneberga Z.,Kornejeva A. Newborn screening and diagnosis of inborn errors of metabolism in Latvian children. Laboratorine Medicina (ISSN 1392-6470), 2008, Vol. 10, Special Suppl, p. 15.
8. N. Pronina, R. Lugovska. Identification of three novel single nucleotide changes in the *PAH* gene observed in Latvian patients with phenylketonuria. European Journal of Human Genetics Vol 19 Supp. 2, 2011, pp. 435.
9. Pronina N., Lugovska R. The role of genotyping to patients with phenylketonuria. Uzstāšanās RSU Zinātniskajā konferencē, 14.-17. aprīlis, 2011.g.

## 7. VĚRES

1. Altman, D.G., Bland, J.M. (1994). Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ*. 11;308(6943), 1552.
2. Avigad, S., Cohen, B. E., Bauer, S., Schwartz, G., Frydman, M., Woo, S.L., Niny, Y., Y. Shiloh. (1990). A single origin of phenylketonuria in Yemenite Jews. *Nature*. 344, 168-70.
3. Baranovskaya, S., Shevtsov, S., Maksimova, S., Kuzmin, A., Schwartz, E. (1996). The mutations and VNTRs in the phenylalanine hydroxylase gene of phenylketonuria in St Petersburg. *J. Inherit. Metab. Dis.* 19, 705-709.
4. Blau, N., Bonafé, L., Blaskovics, M.E. (2003). Disorders of phenylalanine and tetrahydrobiopterin metabolism. In: N. Blau, M. Duran, M.E. Blaskovics, K.M. Gibson, Scriver CR. (Eds). *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York; 2nd Edition, p.89-106.
5. Cali, F., Dianzani, I., Desviat, L.R., Perez, B., Ugarte, M., Ozguc, M., Seyrantepe, V., Shiloh, Y., Giannattasio, S., Carducci, C., Bosco, P., De Leo, G., Piazza, A., Romano, V. (1997). The STR252-IVS10nt546- VNTR7 phenylalanine hydroxylase minihaplotype in five Mediterranean samples. *Hum. Genet.* 100(3-4), 350-355.
6. Daiger, S.P., Chakraborty, R., Reed, L., Fekete, G., Schuler, D., Berenssi, G., Nasz, I., Brdicka, R., Kamaryt, J., Pijakkova, A., Moore, S., Sullivan S., Woo, S.L.C. (1989). Polymorphic DNA Haplotypes at the Phenylalanine Hydroxylase (PAH) Locus in European Families with Phenylketonuria (PKU). *Am. J. Hum. Genet.* 45, 310-318.
7. Guldberg, P., Guttler, F. (1994). "Broad-range" DGGE for single-step mutation scanning of entire genes: application to human phenylalanine hydroxylase gene. *Nucleic Acids Res.* 22, 880-881.
8. Guldberg, P., Henriksen, K.F., Guttler, F. (1993a). Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics.* 17, 141-146.

9. Guldberg, P., Levy, H. L., Hanley, W. B., Koch, R., Matalon, R., Rouse, B. M., Trefz, F., de la Cruze, F., Henriksen, K. F., and F. Güttler (1996). Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: report from the maternal PKU collaborative study. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 84-94.
10. Guldberg, P., Rey, F., Zschocke, J., Romano, V., François, B., Michiels, L., Ullrich, K., Hoffmann, G.F., Burgard, P., Schmidt, H., Meli, C., Riva, E., Dianzani, I., Ponzzone, A., Rey, J., Güttler, F. (1998). A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 71-79.
11. Hannigan, S. (2007). *Inherited metabolic diseases: a guide to 100 conditions.* Radcliffe Publishing, pp.167.
12. Jaruzelska, J., Matuszak, R., Lyonnet, S., Rey, F., Rey, J., Filipowicz, J., Borski, K., Munnich, A. (1993). Genetic background of clinical homogeneity of phenylketonuria in Poland. *J. Med. Genet.* 30, 232-234.
13. Kadasi, L., Polakova, H., Ferakova, E., Hudecova, S., Bohusova, T., Szomolayova, I., Strnova, J., Hruskovic, I., Moschonas, N.K., Ferak, V. (1995). PKU in Slovakia: mutation screening and haplotype analysis. *Hum. Genet.* 95, 112-114.
14. Kasnauskienė, J., Giannattasio, S., Lattanzio, P., Cimbalistienė, L., Kucinskas, V. (2003). The molecular basis of phenylketonuria in Lithuania. *Hum. Mutat.* 21(4), 398-401.
15. Killeen, A.A., Rubin, E., Strayer, D.S. (2008). Developmental and genetic diseases. In McDonald J.M., Michalopoulos G.K., Trojanowski J.Q., Ward P.A. (Ed.), *Rubin's pathology* (pp.177-229). Lippincott Williams & Wilkins.
16. Kozak, L., Blazkova, M., Kuhrova, V., Pijackova, A., Ruzickova, S., Stastna, S. (1997). Mutation and haplotype analysis of phenylalanine hydroxylase alleles in classical PKU patients from the Czech Republic: identification of four novel mutations. *J. Med. Genet.* 34, 893-898.
17. Lillevali, H., Ounap, K., Metspalu, A. (1996). Phenylalanine hydroxylase gene mutation R408W is present on 84% of Estonian phenylketonuria chromosomes. *Eur. J. Hum. Genet.* 4, 296-300.

18. MOLGENT. (1999-2002). FP 4 European Commission Project INCO-Copernicus “Molecular genetic testing in phenylketonuria: a model to assess the quality control system for monogenic disease”. European Commission. An overview of Public Health Research projects 1994-2002. (<http://ec.europa.eu/research/biosociety/pdf/health.pdf>). p.67.
19. Nechyporenko, M.V., Livshits, L.A. (2002). Molecular and genetical study of phenylketonuria in Ukraine (abstract). *Eur. J. Hum. Genet.* 10(1), 236.
20. PolyPhen analysis tool. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>.
21. Svensson, E., von Döbeln, U., Eisensmith, R.C., Hagenfeldt, L., Woo, S.L. (1993). Relation between genotype and phenotype in Swedish phenylketonuria and hyperphenylalaninemia patients. *Eur. J. Pediatr.* 152, 132–139.
22. Villas-Bôas, S.G., Nielsen, J., Smedsgaard, J., Hansen, M.A.E. (2007). Metabome analysis: an introduction. Wiley-Interscience, pp.311.
23. Woo, S.L.C., Lidsky, A., Guttler, F., Chandra, T., Robson, K. (1983). Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature.* 306, 151-155.
24. Zschocke, J. (2003). Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum. Mutat.* 21, 345–356.
25. Zschocke, J., Hoffmann, G.F. (1999). Phenylketonuria mutations in Germany. *Hum. Genet.* 104(5), 390-398.
26. Zschocke, J., Hoffmann, G.F. (1999). Phenylketonuria mutations in Germany. *Hum. Genet.* 104(5), 390-398.
27. Zschocke, J., Knauer, A., Sarnavka, V., Fumic, K., Mardesic, D., Hoffmann, G.F., Baric, I. 2003(b). The molecular basis of phenylalanine hydroxylase deficiency in Croatia. *Hum. Mutat.* 21, 399.
28. Zygulska, M., Eigel, A., Aulehla-Scholz, C., Pietrzyk, J.J., Horst J. (1991). Molecular analysis of PKU haplotypes in the population of southern Poland. *Hum Genet.* 86(3), 292-294.
29. Güttler, F. (1980). Hyperphenylalaninemia diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. *Acta Pediat. Scand.* 280: 1–80.

30. Kayaalp, E., Treacy, E., Waters, P.J., Byck, S., Nowacki, P., Scriver, C.R. (1997). Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype–phenotype correlations. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 1309–1317.

## PATEICĪBAS

Izsaku pateicību savai darba vadītājai asoc. prof. *Ritai Lugovskai* par darba vadīšanu un iespēju to izstrādāt viņas vadītajā Medicīniskās ģenētikas klīnikā.

Vēlos izteikt dziļu pateicību Dr. *Serdžo Džanatazio (Sergio Giannatasio)* par iespēju gūt pieredzi minihaplotipu analīzē Mitochondriju un enerģijas metabolisma pētniecības centrā (*Centro di Studio sui Mitochondri e Metabolismo Energetico*, CSMME), kā arī viņa kolēģiem laboratorijā: *Paolo Latancio*, *Ersīlijai Marra (Ersilia Marra)*, *Salvatore Passarellam*.

Pateicos Prof. *Johanesam Čokem (Johannes Zschocke)* par sadarbību Eiropas Komisijas FP 4 *INCO-Copernicus* projektā “*Molecular genetic testing in phenylketonuria: a model to assess the quality control system for monogenic disease*” (MOLGENT, 1999-2002).

Paldies par atbalstu arī visam Medicīniskās ģenētikas klīnikas kolektīvam, bet īpaši DNS laboratorijas personālam: *Kristīnei Morozovai*, *Olgai Šternai*, *Zandai Danebergai* un *Oksanai Osipovai*.

Paldies arī RSU Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas kolektīvam par dziļu emocionālo atbalstu un līdzdalību darba tapšanā.

Paldies *Normundam Jurkam* par palīdzību pētījuma datu statistiskajā apstrādē un interpretācijā.

Darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda (ESF) atbalstu.