

JADWIGA JARUZELSKA

Zakład Genetyki Człowieka PAN,  
Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań,

## FENYLOKETONURIA — OD GENOTYPU DO KLINIKI

### FENYLOKETONURIA (PKU) — GENETYCZNIE UWARUNKOWANY BŁOK METABOLIZMU

Hydroksylaza fenyloalaniny (PAH 4-monooksygenaza fenyloalaninowa EC 1.14.16.1) katalizuje w wątrobie reakcję hydroksylacji fenyloalaniny do tyrozyny przy udziale tetrahydrobiopteryny jako kofaktora. Obniżona aktywność lub brak aktywności tego enzymu prowadzi do hiperfenyloalaninemii — HPA (wzrostu stężenia fenyloalaniny) oraz ketopochodnych fenyloalaniny we krwi. Wysokie stężenie tych związków jest toksyczne dla mózgu i powoduje w konsekwencji głębokie upośledzenie umysłowe. Ten defekt metabolizmu wraz z towarzyszącymi mu objawami klinicznymi został wykryty w 1934 roku (FOELLING 1934) a w późniejszym czasie dokładniej scharakteryzowany biochemicznie pod nazwą fenyloketonuria (PKU), (JERVIS 1953). PKU jest chorobą o autosomalnym i recesywnym typie dziedziczenia (PENROSE 1935), jedną z najczęstszych genetycznie uwarunkowanych wad metabolizmu w populacjach europejskich (1 : 10000 urodzeń, w Polsce — 1 : 5000 urodzeń). Opracowanie i upowszechnienie diety ubogiej w fenyloalaninę znacznie złagodziło kliniczne skutki tego bloku metabolicznego (BICKEL i współaut. 1954). Z kolei, wprowadzenie testu przesiewowego, w którym jest oceniane stężenie fenyloalaniny we krwi noworodków, pozwoliło na bardzo wczesne wykrywanie defektu. Dzięki temu wprowadzenie diety ubogiej w fenyloalaninę jest możliwe w pierwszych dwóch tygodniach życia (GUTHRIE i SUSI 1963).

### HETEROGENNOŚĆ KLINICZNA PKU

Bardziej szczegółowe badania dzieci z pozytywnym wynikiem testu Guthrie'ego wykazały, iż w rzadkich przypadkach HPA nie jest spowodowana niedoborem PAH lecz uszkodzony jest inny enzym zaangażowany w reakcji hydroksylacji. Jest nim najczęściej reduktaza dwuhydropterydyny regenerująca kofaktor PAH (KAUFMAN i współaut. 1975). Niniejszy przegląd dotyczy wyłącznie niedoborów PAH. Wykazano, że HPA spowodowana niedoborem PAH i opisana wcześniej pod

nazwą PKU stanowi grupę zróżnicowanych klinicznie fenotypów o różnym stopniu tolerancji spożywanej z pokarmem fenyloalaniny. Ze względów praktycznych podzielono dzieci z HPA na trzy grupy. Pierwsza grupa to dzieci z PKU klasyczną (classical PKU), u których poziom fenyloalaniny we krwi przekracza 1200  $\mu\text{mol/L}$ , tolerancja fenyloalaniny w wieku 5 lat wynosi 10–20 mg/kg/dzień i aktywność PAH jest poniżej 1% poziomu prawidłowego. Do drugiej grupy zaliczono dzieci z łagodną PKU (mild PKU), u których poziom fenyloalaniny we krwi wynosi 600–1200  $\mu\text{mol/L}$ , tolerancja fenyloalaniny w wieku 5 lat wynosi 20–50 mg/kg/dzień i aktywność PAH jest od 1% do 3%. Wreszcie trzecia grupa dzieci z tak zwaną HPA przetrwała (persistent HPA), u których poziom fenyloalaniny we krwi wynosi 600  $\mu\text{mol/L}$  lub mniej, tolerancja fenyloalaniny 50–100 mg/kg/dzień i aktywność PAH waha się w granicach od 3% do 6%. Niezależnie od sposobu klasyfikacji niedoborów PAH jest bardzo istotna trafna ocena, czy dziecko o pozytywnym wyniku testu Guthriego wymaga diety dla prawidłowego rozwoju. Dieta uboga w fenyloalaninę jest odpowiednia, jeżeli u dziecka przy zachowaniu prawidłowego wzrostu i rozwoju stężenie fenyloalaniny w surowicy wynosi około 300  $\mu\text{mol/L}$ . Osiągnięcie tego celu wymaga stałej kontroli przez lekarza prowadzącego i bardzo częstych analiz stężenia fenyloalaniny we krwi (GUETTLER 1984).

#### PROBLEMY OPIEKI NAD DZIEĆMI Z PKU I POSZUKIWANIA NOWYCH FORM TERAPII

Wprowadzenie i upowszechnienie testu przesiewowego Guthriego wyeliminowało najpoważniejszy objaw kliniczny PKU, to znaczy głębokie upośledzenie umysłowe dziecka, jednak problem PKU nie został jeszcze w pełni rozwiązany. Pomimo leczenia dzieci obarczonych PKU od pierwszych tygodni życia, ich iloraz inteligencji IQ nie osiąga normy. Ponadto, obserwuje się u tych dzieci trudności w uczeniu się oraz problemy psychologiczne i emocjonalne w okresie dojrzewania. Dlatego obecnie panuje tendencja aby dietę, przynajmniej w części przypadków, stosować do końca życia. Osiągnięcie precyzji w przestrzeganiu diety jest jednak bardzo obciążające dla chorego dziecka oraz jego rodziców. Wreszcie, istotny problem stanowi tak zwana PKU matczyzna (maternal PKU). Dotyczy kobiet z PKU, które, aby urodziły zdrowe dziecko, powinny przed poczęciem ponownie dietę zastosować. Problemy związane z PKU zależą od populacji, w której występuje. Wskazuje na to między innymi zróżnicowana częstość PKU w populacjach europejskich i pozaeuropejskich. W niektórych krajach odbiega ona znacznie od średniej częstości europejskiej (1 : 10000). Na przykład w Turcji częstość występowania PKU wynosi aż 1 : 2600 urodzeń, natomiast w Szwecji 1 : 30000. W Polsce częstość PKU w ostatnich kilku latach wynosiła 1 : 5000 urodzeń (JARUZELSKA i współaut. 1991). Na obecnym poziomie wiedzy trudno wytłumaczyć tak duże różnice częstości. W Turcji jedną z przyczyn wysokiej częstości PKU jest znaczna liczba małżeństw krewniaczych (KONECKI i LICHTER-KONECKI 1991). Częstości poszczególnych fenotypów HPA są różne w różnych populacjach. Częsty w populacjach zachodniej i środkowo-wschodniej Europy jest trudniejszy w leczeniu fenotyp klasyczny, natomiast na południu Europy

przeważa fenotyp łagodny. Zanim bardziej skuteczna metoda leczenia PKU będzie w zasięgu lekarzy kliniki, ważną rolę będą odgrywały nadal działania prewencyjne. Stąd opracowanie masowych, precyzyjnych i jednoznacznych metod oznaczania nosicielstwa u dzieci posiadających rodzeństwo z PKU oraz oznaczanie nosicielstwa w populacji wydaje się mieć ważne znaczenie (LEVY 1989).

#### OCZEKIWANIA WOBEC BADAŃ GENU PAH

Sklonowanie cDNA PAH otworzyło nowy rozdział w historii badań PKU (Woo i współaut. 1983). PAH jest jednym z pierwszych sklonowanych genów warunkujących chorobę genetyczną człowieka. Opis sklonowania genu, jego struktury oraz zastosowanie markerów RFLPs genu w diagnostyce molekularnej PKU przedstawiono w poprzednich przeglądach (JARUZELSKA 1989, JARUZELSKA i SŁOMSKI 1990). Wobec problemów związanych z opieką nad rodzinami z PKU sklonowanie cDNA PAH stwarzało obiecujące perspektywy. Otwierało ono możliwości analizy sekwencyjnej nieprawidłowych alleli. Szerokie pod względem klinicznym i biochemicznym spektrum fenotypów w niedoborach PAH skłoniło do przypuszczeń, że odzwierciedla ono zróżnicowanie na poziomie molekularnym (SCRIVER i współaut. 1988). Oczekiwano, że analiza genu PAH chorych pozwoli odpowiedzieć na następujące pytania: i. Czy identyfikacja mutacji genu może być podstawą wykrywania nosicielstwa w populacji, to znaczy również u osób nie posiadających rodzeństwa z PKU. ii. Czy istnieje bezpośredni związek pomiędzy mutacją, a obserwowanym fenotypem klinicznym.

Innymi słowy, czy mutacja występująca u chorego determinuje przebieg choroby. Jeżeli tak jest, mutacje genu PAH mogłyby mieć znaczenie w prognozowaniu leczenia oraz służyć jako precyzyjne kryterium klasyfikacji HPA. Oczekiwano również, że analiza mutacji powodujących PKU może przyczynić się do lepszego poznania relacji struktura — funkcja genu. Uzyskanie tego rodzaju danych o charakterze podstawowym byłoby szczególnie ważne w perspektywie przyszłej terapii genowej PKU.

#### STRATEGIA BADAŃ MUTACJI W GENIE PAH

Sekwencjonowanie genu PAH było z początku bardzo czasochłonne ponieważ zawiera on aż 13 eksonów. Utrudnieniem była również znaczna rozpiętość intronów, z których największy ma długość ponad 23 kz (DILELLA i współaut. 1986b). Identyfikacja dwóch pierwszych mutacji w genie PAH IVS12nt1 oraz R408W wiązała się z zastosowaniem żmudnej strategii opartej na konstrukcji biblioteki cDNA PAH wątroby pacjenta (DILELLA i współaut. 1986a, 1987). Następnie poprzez screening za pomocą sondy cDNA PAH izolowano kłony zawierające kodujące sekwencje genu i poddawano je sekwencjonowaniu. Metody wykrywania mutacji od momentu sklonowania cDNA PAH do dnia dzisiejszego ewoluowały w szybkim tempie dzięki opracowaniu klonowania DNA przez zastosowanie łańcuchowej reakcji polimerazy (polymerase chain reaction PCR)

oraz technik pozwalających na wyselekcjonowanie eksonu zawierającego mutację. Najważniejsze z nich to: badanie konformacyjnego polimorfizmu pojedynczej nici (single strand conformational polymorphism SSCP), metoda chemicznego rozłamywania (chemical cleavage method CCM) oraz elektroforeza w żelu zawierającym gradient czynnika denaturującego (denaturing gradient gel electrophoresis DGGE). Ponadto znacznym postępem było zastosowanie analizy ektopowych transkryptów. Amplifikację 13 eksonów wraz z fragmentami sąsiadujących intronów przeprowadza się stosując intronowe primery. Uzyskane 13 produktów reakcji poddaje się selekcji, aby zidentyfikować ekson zawierający mutację. W analizie SSCP podstawą tej selekcji jest fakt, iż zmiana pojedynczego nukleotydu zdenaturowanego DNA modyfikuje ruchliwość elektroforetyczną jednoniciowego DNA w niedenaturujących żelach poliakryloamidowych. Detekcję radioaktywnych produktów w żelu przeprowadza się poprzez autoradiografię (LABRUNE i współaut. 1991). W zmodyfikowanej formie stosowano barwienie srebrem jako metodę detekcji rozdzielonych elektroforetycznie produktów PCR (DOCKHORN-DWORNICZAK i współaut. 1991). Technika CCM polega na chemicznej selekcji zmutowanego eksonu. W pierwszym etapie są generowane heterodupleksy pomiędzy radioaktywnie znakowanym fragmentem genu o prawidłowej sekwencji, a nie znakowanym odpowiadającym mu fragmentem genu pochodzącego od pacjenta. Uzyskany heterodupleks poddaje się chemicznej modyfikacji w dwóch niezależnych reakcjach. Działanie hydroksylaminą powoduje modyfikację cytozyny, jeżeli w przeciwnej nici występuje niekomplementarna zasada. Działanie czterotlenkiem osmu powoduje z kolei modyfikację tyminy w podobnej sytuacji. W ten sposób zmodyfikowane heterodupleksy są poddawane z kolei działaniu piperydyny przecinającej podwójną spiralę w miejscu, w którym występuje zmodyfikowana cytozyna lub tymina. Uzyskane produkty są analizowane elektroforetycznie w sekwencyjnych żelach z zastosowaniem markerów długości (COTTON i współaut. 1988, DIANZANI i współaut. 1991). Najbardziej efektywną techniką selekcji zmutowanych fragmentów genu *PAH* jest DGGE. Fragmenty DNA są poddawane migracji w żelach zawierających ciągły, wzrastający gradient denaturujący. W momencie osiągnięcia przez cząsteczkę DNA pozycji, w której czynnik denaturujący topi helikalną strukturę następuje opóźnienie migracji DNA. Obecność około 40-nukleotydowego fragmentu zawierającego GC (GC-clamp), wprowadzonego do badanego fragmentu DNA poprzez PCR powoduje, iż obydwie nici DNA, pomimo stopienia, pozostają z sobą połączone. Rozróżnienie DNA zawierającego zmianę sekwencji od DNA prawidłowego jest możliwe dzięki powstawaniu w PCR heterodupleksów pomiędzy prawidłową nicią a komplementarną nicią zawierającą mutację. Obecność niekomplementarnych nukleotydów w cząsteczce heterodupleksu obniża jego termostabilność w stosunku do odpowiadającej mu cząsteczki homodupleksu. Ze względu na to, że każda substytucja nukleotydu ma swoisty wpływ na termostabilność fragmentu DNA, charakteryzuje ją szczególny obraz w żelu. Wykrywalność mutacji techniką DGGE wynosi ponad 99% (GULDBERG i współaut. 1993, FODDE i LOSEKOOT 1994). Bardzo ważne w badaniach mutacji w różnych genach jest zjawisko tak zwanej „nieuprawnionej transkrypcji” lub innymi słowy „transkrypcji ektopowej”. Po raz pierwszy opisano je dla genu dystrofiny, ulegającemu specyficznej ekspresji w tkance mięśniowej (CHELLY i współaut. 1988). Stwier-

dzono mianowicie obecność niewielkich ilości transkryptu genu dystrofiny w fibroblastach oraz limfoblastach w ilości 1 cząsteczka mRNA/500–1000 komórek. Obecnie wiadomo, że zjawisko „nieuprawnionej transkrypcji” występuje w przypadku wielu genów o tkankowo specyficznej ekspresji. Przyczyna tego zjawiska nie jest dokładnie poznana. Aktywacja niektórych genów w różnicowaniu komórek jest związana z modyfikacjami struktury chromatyny oraz metylacji DNA. Zjawisko „nieuprawnionej transkrypcji” mogłoby mieć miejsce szczególnie w czasie replikacji DNA. Taka zależność pomiędzy nieuprawnioną transkrypcją a replikacją DNA tłumaczyłaby wyższy poziom nieuprawnionych transkryptów występujących w szybko proliferujących limfoblastach w stosunku do limfocytów lub innych komórek w fazie spoczynkowej (CHELLEY i współaut. 1989). „Nieuprawnione transkrypty” PAH wykryto w limfocytach krwi obwodowej a zgodnie z oczekiwaniem znacznie większy ich poziom występuje w limfoblastach uzyskanych przez transformację limfocytów krwi obwodowej wirusem Epsteina-Barra (EBV), (ABADIE i współaut. 1993). Daje to możliwość analizy cDNA PAH pacjentów, którego jedynym źródłem były dotychczas biopsaty wątroby. Analiza cDNA pacjenta jest korzystna z tego względu, iż pozwala na identyfikację mutacji nie tylko w eksonach lecz również w intronach. Mutacje w intronach mogą powodować nieprawidłowości w dojrzewaniu pre-mRNA i mieć drastyczny skutek dla ekspresji PAH. Natomiast w tradycyjnym podejściu polegającym na sekwencjonowaniu klonów genomowych mutacje w intronach mogą być niezauważone. Ponadto analiza transkryptów ektopowych jest szczególnie korzystna w PKU ze względu na liczne eksony PAH. Analiza polega na izolacji całkowitego komórkowego RNA z limfoblastów, odwrotnej transkrypcji oraz amplifikacji za pomocą 4 par primerów pozwalających na syntezę cDNA PAH w 4 nachodzących na siebie fragmentach. Uzyskane produkty PCR są poddawane sekwencjonowaniu (ABADIE i współaut. 1993). W sekwencjonowaniu DNA obserwuje się w ostatnich latach znaczny postęp. Przyczyną jest to, iż jest ono podstawowym narzędziem w projekcie dotyczącym poznania ludzkiego genomu (Human Genome Project). Technika ulega stopniowej automatyzacji. Jedną z jej często stosowanych odmian jest automatyczne sekwencjonowanie z zastosowaniem fluorochromowych znaczników. Znajduje ono szerokie zastosowanie w analizie sekwencji genu PAH.

#### ZMIENNOŚĆ W GENIE PAH

W 1991 roku w Montrealu powstała grupa koordynująca badania genu PAH (Gene Mutation Analysis Consortium). Dysponuje ona stale uzupełnianą bazą danych na temat mutacji oraz polimorfizmów w genie PAH. W ostatnim wydaniu Newsletter z grudnia 1993 rejestr zawierał 140 mutacji oraz 4 substytucje nie zmieniające sekwencji aminokwasów. Delecje należą do rzadkich w genie PAH. Zidentyfikowano 16 delecji; 3 obejmują 1 lub 2 eksony, 13 pozostałych to tak zwane mikrodelecje obejmujące od 1 do 20 nukleotydów. Niektóre mikrodelecje powodują przesunięcie ramy odczytu w genie. Zważywszy rzadkość delecji w tym genie interesujące było wykrycie dwóch częściowo nachodzących na siebie delecji w eksonie 11. Jednak na obecnym etapie badań nie można rozstrzygnąć, czy

jest to „gorące miejsce” mutacji (JARUZELSKA i współaut. 1992). Pozostałe 124 mutacje są substytucjami pojedynczych nukleotydów: 12 występuje w końcach 5' lub 3' intronów powodując zaburzenia w dojrzywaniu mRNA PAH, natomiast reszta — 112 to mutacje zmieniające sekwencje pojedynczych aminokwasów (missense mutations). W genie PAH występują ponadto 3 typy polimorfizmów: i. 8 RFLPs w intronach oraz w regionach oskrzydających 5' i 3' pozostające w ścisłym sprzężeniu z genem. Profil 8 RFLPs w danym allelu nazywa się haplotypem RFLP (JARUZELSKA 1989). ii. Minisatelitarny region warunkujący RFLP wykrywany przez HindIII. Region ten jest bogaty w pary AT (70%) i stanowi typową sekwencję o różnej liczbie tandemowych powtórzeń (variable number of tandem repeats VNTR) o wielkości 30 pz zlokalizowanych w odległości 3 kz od końcowego eksonu 3' genu. Allele tego VNTR segregują w sposób mendlowski a ponadto niektóre z nich występują w sprzężeniu z określoną mutacją powodującą PKU (GOLTSOV i współaut. 1992). iii. Region zawierający sekwencję składającą się z krótkich powtórzeń tandemowych (short tandem repeats STRs). Motywem powtarzającym się jest w niej sekwencja TCTA. Sekwencja ta występuje w odległości 700 pz od końca 3' eksonu 3. Sekwencja STR jest bardzo użytecznym markerem i posiada 9 alleli dziedziczonych w sposób mendlowski. Ten system sprzężeń STR jest korzystny w populacjach charakteryzujących się obecnością jednego haplotypu w ogromnej przewadze (np. w populacjach orientalnych). System ten w znaczny sposób podnosi liczbę informatywnych analiz w rodzinach z PKU. Pomimo postępu w metodach PCR, stosowanych do analizy innych markerów polimorficznych w genie PAH, względnie prosta analiza pojedynczego systemu STR daje w rezultacie wyższy stopień heterozygotyczności niż jakakolwiek kombinacja innych markerów (GOLTSOV i współaut. 1993). Opisano ponadto 3 polimorfizmy (Q232Q, V245V oraz L385L) występujące w sekwencji kodującej (ekson 6, 7 oraz 11), w miejscach rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne. Jednak ich użyteczność jako markerów PKU jest ograniczona ze względu na ich niezbyt częste występowanie (mniej niż w 20% rodzin z fenylketonurią), (KALAYDJIEVA i współaut. 1991a).

#### POWSTAWANIE I ROZPRZESTRZENIANIE SIĘ MUTACJI W POPULACJACH

Obecność różnych mutacji w genie PAH wskazuje, że niezależne od siebie zaistniałe mutacje spowodowały PKU w różnych regionach świata. W badaniach populacyjnych PKU oceniano: sprzężenie pomiędzy PKU a haplotypem RFLP, częstości poszczególnych mutacji oraz sprzężenie pomiędzy mutacją a najczęstszym haplotypem RFLP. Stwierdzono, że haplotyp 2 jest szczególnie częsty w nieprawidłowych allelach w Europie Centralnej (JARUZELSKA i współaut. 1991, KALAYDJIEVA i współaut. 1991b), haplotyp 3 w Europie Północnej (DiLELLA i współaut. 1986a) oraz haplotyp 6 w Europie Południowej (DWORNICZAK i współaut. 1991). Haplotypy te występują niezwykle rzadko w prawidłowych allelach. W rasie kaukaskiej asocjacja mutacja/haplotyp RFLP jest różna w różnych populacjach. Na przykład, znaczna większość haplotypu 2, 3 i 6 w wyżej wymienionych częściach Europy zawiera odpowiednio mutację: R408W (DiLELLA i współaut. 1987, JARUZELSKA i współaut. 1991), IVS12nt1 (DiLELLA i współaut.

1986a) i IVS10nt546 (DWORNICZAK i współaut. 1991). Natomiast wszystkie nieprawidłowe allele o haplocyocie 2 u kanadyjczyków francuskiego pochodzenia zawierają mutację M1V (LYONNET i współaut. 1992). Chociaż zaproponowano wiele hipotez, aby wytłumaczyć asocjacje pomiędzy mutacjami a haplocyociami wydaje się prawdopodobne, że dana mutacja wystąpiła w danym haplocyocie a następnie poprzez efekt założyciela (founder effect) oraz dryft genetyczny uległa rozprzestrzenieniu w innych regionach. Znaczny wzrost częstości niektórych z tych mutacji może być skutkiem przewagi selekcyjnej heterozygot. Jednak natura przewagi selekcyjnej heterozygot nie jest jasna (EISENSMITH i Woo 1992). Asocjacja pomiędzy mutacją a haplocyociem RFLP jest cennym elementem w poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie, dlaczego częstość PKU jest tak wysoka. Biorąc pod uwagę fakt, że do niedawna osobnicy z PKU nie wydawali potomstwa należało oczekiwać, że częstość PKU powinna była maleć. Takiego zjawiska nie obserwowano być może dlatego, że nowe mutacje występowały na tyle często, iż „zastępowały” mutacje wyeliminowane z populacji poprzez brak potomstwa. Ta interpretacja nie jest w pełni przekonująca, ponieważ w takim przypadku dana mutacja występowałaby na różnych haplocyociach RFLP. Przyczyną utrzymywania się wysokiej częstości PKU mogła być wyżej wymieniona selekcyjna przewaga heterozygot. Sugerowano też, że kobiety będące nosicielkami nieprawidłowego allelu PAH mają niższe ryzyko poronienia płodu od ryzyka w populacji (LEVY 1989).

Próbowano również zrozumieć przyczynę występowania danej mutacji w różnych haplocyociach RFLP. Sugerowano powstanie *de novo* tej samej mutacji (recurrent mutation) na innym haplocyocie niż poprzednio. Prawdopodobieństwo wystąpienia tej samej mutacji *de novo* wzrasta w miejscach genu, w których obecny jest dwunukleotyd CpG ulegający spontanicznej dezaminacji w pozycji 5-metylocytozyny. Jest on zatem „gorącym miejscem” mutacji (mutation „hot spot”). Inną przyczyną występowania tej samej mutacji w różnych haplocyociach RFLP może być crossing-over, poprzez który mutacja, sprzężona z jednym haplocyociem, może zostać przeniesiona na inny. Przyczyną może być również konwersja genu (EISENSMITH i Woo 1991).

#### MUTACJE A STRUKTURA I FUNKCJA GENU PAH

Gen PAH liczący ponad 90 kZ zawiera eksony o długości 57–892 nukleotydów o łącznej długości 2,4 kZ oraz bardzo długie introny o długości 558 pz–23,5 kZ (DILELLA i współaut. 1986b). Białko kodowane przez ten gen jest homopolimerem składającym się z podjednostek o masie 52 kDa. Porównanie struktury pierwszorzędowej PAH innych gatunków pokrewnych hydroksylaz ssaków oraz innych zwierząt wskazuje na wysoki stopień podobieństwa w regionie białka kodowanym przez eksony 4–11. Najwyższy stopień tego podobieństwa (88,5%) dotyczy eksonów 7–9. Przypuszczalnie ten region jest odpowiedzialny za wspólną funkcję tych białek, to znaczy wiązanie tlenu i kofaktora oraz za katalityczną konwersję substratu (EISENSMITH i Woo 1992). Domena wiązania kofaktora jest kodowana w eksonie 7 (JENNINGS i współaut. 1991). Przypuszcza się, że miejsce odpowiedzialne za specyficzną właściwość tych białek — wiązanie substratu leży poza

tym regionem. Ważność tego centralnego regionu dla funkcji białka znajduje wyraz nie tylko w wysokim stopniu podobieństwa, ale również w wysokiej liczbie zidentyfikowanych w nim mutacji. Znamienne jest, że ponad 20% wszystkich znanych mutacji występuje w eksonie 7, natomiast ponad 70% występuje w regionie obejmującym ekson 5–12 (EISENSMITH i Woo 1992). W promotorze genu nie stwierdzono dotychczas żadnych modyfikacji sekwencji.

#### EKSPRESJA *IN VITRO* GENU PAH

Ekspresja alleli PAH pacjentów przez transfekcję do komórek w hodowli jest bardzo ważnym elementem w zrozumieniu patologii PKU na poziomie molekularnym. Ten system ekspresji PAH jest ważnym narzędziem pozwalającym udowodnić, że zmiana w sekwencji genu, którą zidentyfikowano jest rzeczywiście odpowiedzialna za obserwowany fenotyp kliniczny. Zastosowanie tego narzędzia jest szczególnie ważne w przypadku mutacji punktowych, powodujących substytucje aminokwasów (missense mutations). Nie mają one bowiem ewidentnego negatywnego wpływu na aktywność enzymu. Ponadto większość mutacji występuje u chorych w stanie heterozygotycznym (compound heterozygotes). Badanie ekspresji *in vitro* pozwala ocenić wpływ każdej mutacji z osobna na obserwowany fenotyp kliniczny a zatem ustalić korelację genotyp — fenotyp, jak również zrozumieć relację struktura — funkcja genu. Ogólny schemat badania ekspresji zmutowanych alleli *in vitro* polega na klonowaniu prawidłowego cDNA PAH (pHPAH247) w wektorze transfekcyjnym, posiadającym silny promotor. Poprzez ukierunkowaną mutagenezę wprowadza się do cDNA PAH sklonowanego w wektorze transfekcyjnym, mutację, którą uprzednio zidentyfikowano u chorego na PKU. W ten sposób uzyskaną konstrukcją transfekowane są komórki w hodowli. Jednocześnie przeprowadza się kotransfekcję z wektorem zawierającym gen reporter, na przykład gen lucyferazy lub gen kodujący CAT (acetylotransferazę chloramfenikolu) pozwalające ocenić wydajność wnikania DNA do komórek. Po odpowiednim czasie inkubacji (około 2 dni), transfekowane komórki są poddawane lizie a w uzyskanym lizacie ocenia się właściwości białka kodowanego przez zmutowany allel i porównuje z odpowiednią kontrolą. Aktywność PAH, syntetyzowaną na podstawie nieprawidłowego allelu, przedstawia się jako % aktywności białka syntetyzowanego na podstawie prawidłowego allelu. Stosowanymi do transfekcji komórkami gospodarza są komórki *E. coli* (LEDLEY i współaut. 1987) ale znacznie częściej komórki COS (nerki małpy), (OKANO i współaut. 1991) lub linia ludzkich komórek SW613 (raka jelita grubego), (CAILLAUD i współaut. 1991). Badania ekspresji *in vitro* wykazały, że większość mutacji powodujących substytucję aminokwasów prowadzi do tworzenia niestabilnego białka, którego aktywność jest w różnym stopniu obniżona. Większość badanych dotychczas mutacji nonsensownych oraz mutacji powodujących zaburzenia w splicingu prowadzi do klasycznego fenotypu, w którym hydroksylacja fenyloalaniny jest bliska zeru.



## BADANIA KORELACJI GENOTYP — FENOTYP I WYKORZYSTANIE DANYCH MOLEKULARNYCH W MEDYCYNIE

Do stwierdzenia korelacji genotypu (mutacji) z fenotypem PKU są potrzebne trzy rodzaje danych. Pierwszy z nich dotyczy fenotypu: stężenie fenyloalaniny we krwi po urodzeniu przed podjęciem diety, stopień tolerancji fenyloalaniny, wyniki badań stężenia fenyloalaniny we krwi po wykonaniu testu obciążenia białkiem oraz aktywność PAH, jeżeli wykonana została biopsja wątroby. Drugi z nich to mutacje w obydwu allelach chorego, natomiast trzeci dotyczy ekspresji *in vitro* wskazującej na stopień niedoboru PAH dla każdej mutacji z osobna. Badania Okano wskazują, że wyniki aktywności PAH *in vitro* są wyższe w stosunku do wyników uzyskanych w biopsjach wątroby. Pomimo tego analiza aktywności alleli PAH hodowanych komórek jest bardzo cenna w badaniach genotyp — fenotyp (OKANO i współaut. 1991). Przeprowadzono dotąd analizę korelacji genotyp — fenotyp dla ponad 20 mutacji punktowych powodujących substytucje aminokwasów w białku. Stwierdzono wyraźną korelację pomiędzy genotypem a stężeniem fenyloalaniny występującym u dziecka przed podjęciem leczenia, tolerancją fenyloalaniny oraz stężeniem fenyloalaniny w surowicy po wykonaniu obciążenia białkiem. Na przykład, mutacje IVS12nt1, R408W oraz IVS10nt546 w postaci homozygotycznej powodują fenotyp klasyczny, wymagający bardzo ścisłej diety, ubogiej w fenyloalaninę. W przeciwieństwie do nich mutacje Y414C oraz R261Q w postaci homozygotycznej dają fenotyp bardzo łagodny — przetrwała HPA, nie wymagająca diety. Jednak, jak już wyżej wspomniano, większość chorych na PKU w różnych populacjach to tak zwane złożone heterozygoty (compound heterozygotes). W tych wypadkach określano aktywność PAH *in vivo* poprzez obliczenie średniej aktywności *in vitro* produktów dwóch z nieprawidłowych alleli, z których każdy zawierał inną mutację. Stwierdzono korelację pomiędzy oznaczonymi średnimi aktywnościami a aktywnością PAH mierzoną *in vivo* (OKANO i współaut. 1991). Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę, w myśl której różnorodność fenotypowa w niedoborach PAH odzwierciedla różnorodność defektu w genie. Korelacja pomiędzy genotypem a fenotypem nie jest zamkniętym działem badań i jest kontynuowana w badaniach innych mutacji. Uzyskane dotychczas wyniki są wykorzystane do bardziej precyzyjnego diagnozowania fenotypu HPA oraz są pomocne w prognozowaniu leczenia. Ponadto mutacje w genie PAH mogą być wykorzystane jako podstawa klasyfikacji tak bardzo różnorodnych klinicznie niedoborów PAH.

Dane uzyskane z badań molekularnych PKU są związane z korzyściami klinicznymi, jak również są korzystne dla diagnostyki. Chodzi tutaj głównie o możliwości molekularnego testowania nosicielstwa w rodzinach obarczonych PKU oraz w populacji. Średnia częstość nosicielstwa w populacjach europejskich wynosi 1 : 50. Po sklonowaniu genu molekularne oznaczanie nosicielstwa było możliwe jedynie poprzez analizę RFLP. Później analiza sprzężeń została wzbogacona przez analizę sekwencji VNTR w regionie flankującym 3' genu oraz intro nowej sekwencji STR w pobliżu końca 3' eksonu 3. Jednym z celów analizy mutacji w genie PAH było opracowanie strategii oznaczania nosicielstwa

w populacji, to znaczy u każdego osobnika niezależnie od tego, czy posiada rodzeństwo z PKU. Oznaczanie nosicielstwa polegałoby w tym przypadku na testowaniu określonej mutacji lub ich zbioru. Cel ten nie został osiągnięty głównie dlatego, iż mutacji w genie *PAH* jest bardzo wiele (140) i testowanie tak dużej ich liczby jest niewykonalne. Określanie nosicielstwa przez testowanie mutacji ma więc zasięg ograniczony z wyjątkiem populacji, w których określona mutacja występuje szczególnie często. Dotyczy to mutacji IVS12nt1 w północnej Europie, IVS10nt546 w południowej Europie oraz mutacji R408W w Europie Wschodniej. W Polsce ta ostatnia mutacja występuje w ponad 60% nieprawidłowych alleli i stąd jej wartość diagnostyczna jest znaczna (JARUZELSKA i współaut. 1993).

Istnieje wiele metod oznaczania nosicielstwa poprzez testowanie znanej mutacji. Większość z nich polega na analizie zamplifikowanego, za pomocą PCR, fragmentu genu. Dalsze etapy to hybrydyzacja z oligonukleotydowymi sondami ASO (allele specific oligonucleotide — oligonukleotyd specyficzny do allelu), (DILELLA i współaut. 1986a), trawienie enzymem restrykcyjnym w przypadku, gdy mutacja występuje w specyficznym dla niego miejscu rozpoznania. Jeśli w miejscu wystąpienia mutacji brak miejsca restrykcyjnego można je kreować stosując technikę ACSRS (amplification created restriction site — miejsce restrykcyjne kreowane przez amplifikację) a produkt PCR poddaje się trawieniu odpowiednim enzymem restrykcyjnym (EIKEN i współaut. 1991). Stosuje się również technikę ASA (allele-specific amplification — amplifikacja specyficzna dla allelu), w której obecność lub brak produktu PCR po amplifikacji przy użyciu primera specyficznego do allelu zawierającego określoną mutację oraz primera specyficznego dla sekwencji prawidłowej może być uwidocznione w żelu agarozowym (DVORAKOWA i FAJKUSOWA 1993). Znacznym ułatwieniem w molekularnym testowaniu mutacji jest analiza DNA uzyskanego z wysuszonej kropli krwi na bibule przesyłanej pocztą. Może być ona przechowywana w suchym miejscu przez wiele miesięcy. Wykorzystuje się do tego celu materiał wysyłany w tej postaci do ośrodków screeningu PKU w celu wykonania rutynowych oznaczeń fenylalaniny (WITT i współaut. 1993).

#### UWAGI KOŃCOWE

Pomimo znacznego postępu w badaniu molekularnych podstaw PKU ostateczny cel tych badań, jakim jest opracowanie alternatywnej formy terapii, widać w dość odległej perspektywie. Na czym ta terapia będzie polegała nie do końca jest jasne. Badania zmierzające do osiągnięcia tego celu postępują dwutorowo: jest opracowywana terapia genowa PKU oraz są prowadzone badania mające na celu lepsze poznanie patogenezy upośledzenia umysłowego spowodowanego tym blokiem. Otrzymanie przed kilku laty poprzez chemiczną mutagenезę myszy z PKU pozwoliło uzyskać niezbędny dla obydwu kierunków badań model zwierzęcy. Stąd dalszy rozwój badań wygląda optymistycznie. Przedstawione w niniejszym przeglądzie dane są przykładem, jak dalece postęp metodyczny w analizie DNA, jaki dokonał się w ostatniej dekadzie, umożliwił poznanie molekularnego mechanizmu choroby genetycznej i jak dalece wiedza na ten

temat zbliżyła genetykę do medycyny. Dlatego znaczenie molekularnych badań fenyloketonurii polega również na tym, iż stanowią one model dla innych chorób genetycznych.

## PHENYLKETONURIA — FROM GENOTYPE TO THE CLINIC

### Summary

Phenylketonuria (PKU) is a metabolic disorder that results from a deficiency of the hepatic enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH). The various degrees of mental impairment that occur in patients with PKU can be reduced by rigorous implementation of a diet low in phenylalanine. With the introduction of neonatal screening, a spectrum of clinical and biochemical phenotypes has been found among patients, suggesting that the phenotypic heterogeneity of this disorder may reflect an underlying heterogeneity at the molecular level. An application of the tools of molecular biology led to the cloning of the PAH cDNA, and caused a profound increase in our current understanding of the pathogenesis of this disease and resulted in wide clinical applications. With the discovery of RFLP sites in the PAH locus, the molecular carrier testing using these markers became accessible. Furthermore, since with the use of polymerase chain reaction methodologies, many molecular lesions (140 so far) were identified, the PAH genotype of many affected individuals can be determined in some populations. This, combined with the biochemical characterization of mutant PAH proteins by *in vitro* expression analysis, can potentially refine carrier screening in families where RFLP analysis is not informative, and help to define the relationship between PAH genotype and the disease phenotype. So far, such studies have confirmed previous hypotheses that the phenotypic heterogeneity observed in PKU and related hyperphenylalaninemic disorders reflects an underlying heterogeneity of PAH genotypes. Genotype determination also allows many other clinically important issues to be examined. For example, genotype analysis permits prediction of clinical severity of PKU on the basis of the presence of mutant alleles. Genotype determination can also be used to predict the clinical outcome in affected individuals from families that exhibit both PKU and HPA hiperphenylalaninemia phenotypes.

### LITERATURA

- ABADIE V., JARUZELSKA J., LYONNET S., MILLASSEAU P., BERTHELON M., REY F., MUNNICH A., REY J., 1993. *Illegitimate transcription of the phenylalanine hydroxylase gene in lymphocytes for identification of mutations in phenylketonuria*. Hum. Molec. Genet., 2, 31-34.
- BICKEL H., GERRARD J., HICKMANS E. M., 1954. *The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenylketonuric child*. Acta Paediatr. Scand., 43, 64-67.
- CAILLAUD C., LYONNET S., REY F., MELLE D., FREBOURG T., BERTHELON M., VILARINHO L., OSORIO R. V., REY J., MUNNICH A., 1991. *A 3-base pair in-frame deletion of the phenylalanine hydroxylase gene results in a kinetic variant of phenylketonuria*. J. Mol. Biol., 266, 9351-9354.
- CHELLY J., KAPLAN J. C., MAIRE P., GAUTRON S., KAHN A., 1988. *Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues*. Nature, 333, 858-860.
- CHELLY J., CONCORDET J. P., KAPLAN J. C., KAHN A., 1989. *Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2617-2621.
- COTTON R. G. H., RODRIGUES N. R., CAMBELL R. D., 1988. *Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4397-4401.
- DIANZANI I., FORREST S. M., CAMASCHELLA C., SAGLIO G., PONZONE A., COTTON R. G. H., 1991. *Screening for mutations in the phenylalanine hydroxylase gene from Italian patients with phenylketonuria by using the chemical cleavage method: a new splice mutation*. Am. J. Hum. Genet., 48, 631-35.
- DI LELLA A. G., MARVIT J., LIDSKY A. S., GUETTLER F., WOO S. L. C., 1986a. *Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria*. Nature, 322, 799-803.
- DI LELLA A. G., KWOK S. C. M., LEDLEY F. D., MARVIT J., WOO S. L. C., 1986b. *Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene*. Biochemistry, 25, 743-749.
- DI LELLA A. G., MARVIT J., BRAYTON K., WOO S. L. C., 1987. *An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2*. Nature, 327, 333-336.

- DOCKHORN-DWORNICZAK B., DWORNICZAK B., BROEMMELKAMP L., BUELLES J., HORST J., BOECKER W. W., 1991. *Non-isotopic detection of single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP): A rapid and sensitive technique in diagnosis of phenylketonuria*. *Nucleic Acids Res.*, 19, 2500-25004.
- DVORAKOVA D., FAJKUSOWA L., 1993. *Direct analysis of R408W mutation in phenylalanine hydroxylase gene by allele-specific PCR amplification*. *Hum. Mol. Genet.*, 2, 323.
- DWORNICZAK B., AULEHLA-SCHOLZ C., KALAYDJIEVA L., BARTHOLOME K., GRUDDA K., HORST J., 1991. *Aberrant splicing of phenylalanine hydroxylase mRNA: The major cause for phenylketonuria in parts of Southern Europe*. *Genomics*, 11, 242-246.
- EIKEN H. G., ODLAND E., BOMAN H., SKJELKVALE L., ENGBRETSSEN L. F., APOLD J., 1991. *Amplification of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations*. *Nucleic Acid Res.*, 19, 1427-1430.
- EISENSMITH R. C., WOO S. L. C., 1991. *Phenylketonuria and the phenylalanine hydroxylase gene*. *Mol. Biol. Med.*, 8, 3-18.
- EISENSMITH R. C., WOO S. L. C., 1992. *Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemias: mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene*. *Hum. Mut.*, 1, 13-23.
- FODDE R., LOSEKOOT M., 1994. *Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)*. *Hum. Mut.*, 3, 83-94.
- FOELLING A., 1934. *Ueber Ausscheidung von Phenylbrenztraubensaure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillitaet*. *Z. Physiol. Chem.*, 227, 169-176.
- GOLTSOV A., EISENSMITH R. C., KONECKI D. S., LICHTER-KONECKI U., WOO S. L. C., 1992. *Association between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene*. *Am. J. Hum. Genet.*, 51, 627-636.
- GOLTSOV A. A., EISENSMITH R. C., NAUGHTON E. R., JIN L., CHAKRABORTY R., WOO S. L. C., 1993. *A single polymorphic STR system in the human phenylalanine hydroxylase gene permits rapid prenatal diagnosis and carrier screening for phenylketonuria*. *Hum. Molec. Genet.*, 2, 577-581.
- GUETTLER F., 1984. *Phenylketonuria: 50 years since Foelling's discovery and still expanding our clinical and biochemical knowledge*. *Acta Paediatr. Scand.*, 73, 705-716.
- GULDBERG P., FRIIS HENRIKSEN K., GUETTLER F., 1993. *Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis*. *Genomics*, 17, 141-146.
- GUTHRIE R., SUSI A., 1963. *A simple method for the detection of phenylketonuria in large populations of newborn infants*. *Pediatrics*, 32, 338-343.
- JARUZELSKA J., 1989. *Analysis of phenylalanine hydroxylase gene in diagnosis of phenylketonuria*. *Post. Biol. Kom.*, 16, 165-175.
- JARUZELSKA J., SLOMSKI R., 1990. *Molecular basis of phenylketonuria*. *Post. Bioch.*, 36, 24-31.
- JARUZELSKA J., FRIIS HENRIKSEN K., GUETTLER F., RIESS O., BORSKI K., BLIN M., SLOMSKI R., 1991. *The codon 408 mutation associated with haplotype 2 is predominant in Polish families with phenylketonuria*. *Hum. Genet.* 86, 247-250.
- JARUZELSKA J., MELLE D., MATUSZAK R., BORSKI K., MUNNICH A., 1992. *A new 15 bp deletion in exon 11 of the phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria*. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 763-764.
- 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.
- JENNINGS I. G., KEMP B. E., COTTON R. G. H., 1991. *Localization of cofactor binding sites with monoclonal anti-idiotypic antibodies: Phenylalanine hydroxylase*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5734-5738.
- JERVIS G. A., 1953. *Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidising system*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82, 514-515.
- KALAYDJIEVA L., DWORNICZAK B., AULEHLA-SCHOLZ C., DEVOTO M., ROMEO G., STURHMAN M., KUCINSKAS V., YURGELAVICIUS V., HORST J., 1991a. *Silent mutations in the phenylalanine hydroxylase gene as an aid to the diagnosis of phenylketonuria*. *J. Med. Genet.*, 28, 686-690.
- KALAYDJIEVA L., DWORNICZAK B., KUCINSKAS V., YURGELAVICIUS V., KUNERT E., HORST J., 1991b. *Geographical distribution gradients of the major PKU mutations and the linked haplotypes*. *Hum. Genet.*, 86, 411-413.
- KAUFMAN S., HOLTZMAN N. A., MILSTIEN S., BUTLER I. J., KRUMHOLTZ A., 1975. *Phenylketonuria due to a deficiency of dihydropteridine reductase*. *N. Engl. J. Med.*, 293, 785-790.
- KONECKI D., LICHTER-KONECKI U., 1991. *The phenylketonuria locus: current knowledge about alleles and mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in various populations*. *Hum. Genet.* 87, 377-388.

- LABRUNE P., MELLE D., REY F., BERTHELON M., CAILLAUD C., REY J., 1991. *Single-strand conformation polymorphism for detection of mutations and base substitutions in phenylketonuria*. *Am. J. Hum. Genet.*, 48, 1115-1120.
- LEDLEY F. D., GRENETT H. E., WOO S. L. C., 1987. *Biochemical characterization of recombinant human phenylalanine hydroxylase produced in Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 262, 2228-2233.
- LEVY H. L., 1989. *Molecular genetics of phenylketonuria and its implications*. *Am. J. Hum. Genet.*, 45, 667-670.
- LYONNET S., MELLE D., DE BRAEKELEER M., LAFRAMBOISE R., REY F., JOHN S. W. M., BERTHELON M., BERTHELOT J., JOURNEL H., LE MAREC B., PARNET P., DE PARSCAU L., SAUDUBRAY J. M., ROZEN R., REY J., MUNNICH A., SCRIVER C. R., 1992. *Time and space clusters of the French-Canadian MIV phenylketonuria mutation in France*. *Am. J. Hum. Genet.*, 51, 191-196.
- OKANO Y., EISENSMITH R. C., GUETTLER F., LICHTER-KONECKI U., KONECKI D., TREFZ F. K., DASOVICH M., WANG T., HENRIKSEN K., LOU H., WOO S. L. C., 1991. *Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria*. *New Engl. J. Med.*, 324, 1232-1238.
- PENROSE L. S., 1935. *Inheritance of phenylpyruvic amentia (phenylketonuria)*. *Lancet*, 2, 192-194.
- SCRIVER C. R., KAUFMAN S., WOO S. L. C., 1988. *Mendelian hyperphenylalaninemia*. *Annu. Rev. Genet.*, 22, 301-321.
- WITT M., JARUZELSKA J., KUCZORA I., MATUSZAK R., CICHY W., BORSKI K., 1993. *A simplified method for detection of the mutations predominantly causing cystic fibrosis and phenylketonuria in Polish families*. *Clin. Genet.*, 44, 44-45.
- WOO S. L. C., LIDSKYA S., GUETTLER F., CHANDRA T., ROBSON K. J. H., 1983. *Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria*. *Nature*, 306, 151-155.