

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНА BCKDHB У НАСЕЛЕНИЯ АЗЕРБАЙДЖАНСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

MOLECULAR-GENETIC RESEARCH OF BCKDHB GENE IN AZERBAIJAN POPULATION

**L. Huseynova
R. Ahverdieva**

Summary. Using molecular genetic diagnostic methods, two members of the same family were diagnosed with a disease associated with metabolic disturbances — the maple syrup urine disease.

The results of identification of the gene for the disease of the maple syrup urine disease at the 508 position of the BCKDHB gene revealed the replacement of the cytosine nucleotide with the thymine nucleotide in the homozygous state. This mutation was previously known to science as one of the mutations of pathological alleles leading to a disease of the maple syrup urine disease.

A mutation 508 (CT) of the BCKDHB gene in the homozygous state was identified, which was the cause of the disease of the maple syrup urine disease.

The study of the BCKDHA gene revealed three mutations: 1. Replacement of the cytosine nucleotide with thymine nucleotide at position 59 (59 CT); 2. replaced the cytosine nucleotide with the thymine nucleotide at position 972 (972 CT); 3. replacement of the adenine nucleotide with the guanine nucleotide at position 1221 (1221 A-G). All of the above mutations were in a heterozygous state. According to the literature, all three mutations do not cause pathology, refer to neutral mutations.

For the first time, the presence of three neutral genetic polymorphisms in the BCKDHA gene was revealed: 972 (CT), 59 (CT) and 1221 (A-G) in the heterozygous state.

Given the presence of this disease in the population, ways of their prevention are discussed in the form of medical and genetic counseling for families with a genetic risk of giving birth to a sick child, followed by prenatal diagnosis and mass screening of the disease among newborns of the Republic of Azerbaijan.

Keywords: maple syrup, metabolic diseases, toxin, amino acid, enzyme.

Гусейнова Лала Самеддиновна

*К.п.н., Азербайджанский Медицинский Университет,
Азербайджан, Баку
royahuseynova2006@gmail.com*

Агвердиева Рая Рустамовна

*К.б.н., Азербайджанский Медицинский Университет,
Азербайджан, Баку
azmbi@mail.ru*

Аннотация. С помощью молекулярно-генетических методов диагностики у двух членов одной семьи диагностировано заболевание, связанное с нарушением обмена аминокислот — запахом кленового сиропа.

Результаты идентификации гена заболевания запаха кленового сиропа в 508 позиции гена BCKDHB выявили замену нуклеотида цитозин на нуклеотид тимин в гомозиготном состоянии. Данная мутация ранее известна науке как одна из мутаций патологических аллелей, приводящая к заболеванию запаха кленового сиропа.

Идентифицирована мутация 508 (С-Т) гена BCKDHB в гомозиготном состоянии, которая и была причиной заболевания запаха кленового сиропа.

Исследование гена BCKDHA выявило три мутации: 1. Замена нуклеотида цитозин на нуклеотид тимин в позиции 59 (59 С-Т); 2. заменануклеотида цитозин на нуклеотид тимин в позиции 972 (972 С-Т); 3. замена нуклеотида аденин на нуклеотид гуанин в позиции 1221 (1221 А-Г). Все вышеописанные мутации были в гетерозиготном состоянии. По литературным данным все три мутации не вызывают патологию, другими словами, относятся к нейтральным мутациям.

Впервые выявлено наличие трех нейтральных генетических полиморфизмов в гене BCKDHA: 972 (С-Т), 59 (С-Т) и 1221 (А-Г) в гетерозиготном состоянии.

Учитывая наличие данного заболевания в популяции, обсуждаются пути их профилактики в виде медико-генетической консультации семей с генетическим риском рождения больного ребенка с последующей пренатальной диагностикой и массовым скринингомзаболевания среди новорожденных Азербайджанской Республики.

Ключевые слова: кленовый сироп, метаболические заболевания, токсин, аминокислота, фермент.

Блезнь запаха кленового сиропа MSUD (Maple syrup urine disease) сложное заболевание, которое является наследственным. Болезнь запаха кленового сиропа сопровождается полным или же частичным на-

рушением активности ферментов участвующих в обмене трех аминокислот — валина, лейцина и изолейцина. Если процесс обмена валина, лейцина и изолейцина нарушен, то происходит накопление и распад этих аминокислот

в организме. Продукты распада этих аминокислот из организма выводятся мочой и являются токсичными. Эти токсины относятся к биогенным аминам — трупному яду.

Выявлен семейный случай наследственного заболевания — запаха кленового сиропа-сопровождающийся нарушением обмена трех аминокислот, валина, лейцина и изолейцина. Идентифицирована новая ранее неизвестная в Азербайджане мутация 508 (С-Т) гена BCKDHB в гомозиготном состоянии у двух разнополых детей. Впервые идентифицировано наличие трех нейтральных генетических полиморфизмов в гене BCKDHA: 972 (С-Т), 59 (С-Т) и 1221 (А-Г) в гетерозиготном состоянии. Учитывая наличие данного заболевания в популяции, обсуждаются пути их профилактики в виде медико-генетической консультации с последующей пренатальной диагностикой и массовым скринингом заболевания среди новорожденных Азербайджанской Республики.

Введение

Генетически гетерогенное заболевание, которое связано с недостаточностью ферментного комплекса дегидрогеназ-кетокислот с боковыми цепями (BCKAD). В состав BCKAD входит 4 субъединицы (E1a, E1b, E2, и E3). Мутации в 3 генах, кодирующие эти белки приводят к нарушению расщепления разветвленных аминокислот и накоплению соответствующих разветвленных органических кетокислот в биологических жидкостях и тканях (2, 3). Ген, кодирующий E1a субъединицу (BCKDHA) картирован на 19q13.1-q13.2), субъединицу E1b (BCKDHB) картирован на 6q14), E2 (DBT) (картирован на 1p31), E3 (DLD) картирован на 7q31-q32. Мутации в гене E3 (DLD) приводят к заболеванию по клинической картине, сходному с синдромом Ли (5).

Заболевание имеет аутосомно-рецессивный тип наследования. У практически здоровых родителей рождается больной ребенок. Средняя частота 1:185000 живых новорожденных. Заболевание распространено в высокоинбредных популяциях Пенсильвании — частота 1:380 живых новорожденных (1,4,6).

Недостаточность ферментного комплекса дегидрогеназ α -кетокислот с боковыми цепями, сопровождающаяся накоплением кетокислот (превалирует α -кетокислота) в биологических жидкостях и тканях, ведет к метаболическому кетоацидозу, гипераммониемии, токсически действует на центральную нервную систему, вызывая генерализованный или локальный (белое вещество мозжечка, ствол) отек мозга, гипомиелинизацию, атрофию (9). Безусловное нейротоксическое действие имеют лейцин и его кетокислота, нейротоксический эффект валина и его кетокислоты сомнителен. Вторично нарушаются другие метаболические процессы: снижается доступность субстратов для глюконеогенеза

неза в печени — аланина и глутамина, избыточно потребляемых для реанимирования α -кетокислот, что ведет к гипогликемии. Запах «кленового сиропа» обусловлен накоплением α -кетокислот-метилвалериановой кислоты (7).

Классическая (острая) форма наблюдается наиболее часто. Заболевание дебютирует с первой недели жизни с отказа от еды, необъяснимых рвот, судорог, летаргии, быстро прогрессирующей в кому. Развивается метаболический кетоацидоз и гипогликемия. Характерны потеря веса и прогрессирующая неврологическая симптоматика в виде нарушения мышечного тонуса, патологический рефлекс Моро, стереотипные движения по типу «педалирующих» или «боксирующих» (8,10).

При промежуточной форме заболевание может дебютировать с внезапно возникшей преходящей атаксии. В большинстве случаев болезнь манифестирует от 5 месяцев до 7 лет. Внезапное ухудшение может быть связано с инфекционными заболеваниями или стрессом, что напоминает классическую форму заболевания. Моча, пот, серная пробка могут иметь специфичный сладкий запах. Во время метаболического криза наблюдается повышение уровня лейцина, изолейцина, валина в крови и их метаболитов в моче. В неонатальном периоде и между метаболическими кризами данные показатели могут иметь нормальные значения (11).

Для интермиттирующей формы характерно волнообразное течение. Заболевание манифестирует в возрасте от 5 месяцев до 2 лет, но иногда значительно позже. Приступы метаболического кетоацидоза, провоцируются факторами: вакцинацией, интеркуррентными инфекциями, высокобелковой диетой, оперативными вмешательствами. Заболевание манифестирует приступами рвот, дегидратации, прогрессирующей летаргией, судорогами, мозжечковой атаксией. В межприступный период пациенты не предъявляют жалоб и биохимические показатели (уровень аминокислот и органических кислот) может быть в пределах нормы. На высоте приступа метаболического кетоацидоза может развиваться ступор или кома с летальным исходом (6,9).

Таким образом, целью наших исследований является молекулярно-генетическое исследование двух больных детей из одной семьи с заболеванием запаха кленового сиропа, проживающих в г. Баку.

Материалы и методы исследований

Материалом для исследований явилась венозная кровь от двух детей из одной семьи А.А. в количестве 2 мл с использованием антикоагулянта — гепарин. Идентификацию мутаций проводили с использованием комплекса молекулярно-генетических методов.

Геномную ДНК из венозной крови выделяли, используя готовые наборы фирмы QIAGEN (Германия). Интактность и количество выделенного геномного ДНК, а также фрагментов гена после полимеразно-цепной реакции (ПЦР) определяли путем электрофореза на 1,7%-ом агарозном геле. Использовали электрофоретический аппарат и источник питания фирмы BioRad (США). В качестве маркера для идентификации синтезированных фрагментов ДНК использовали DNALadder 100 bp.

Режим ПЦР для генов BCKDNA и BCKDNB был следующим: 95оС-2 мин., (95оС-30I, 58оС-30I, 78оС-2 мин. 25 циклов), 72оС-10 мин. и пауза при 4оС -10мин. и режим ПЦР для гена GAL1-95оС-2 мин., (95оС-30I, 60оС-30I, 76оС-2 мин. 30 циклов), 72оС-10 мин. и пауза при 4оС- 10 мин. ПЦР проводили на амплификаторе — Professional Thermocycler фирмы Biometra, (Германия). Для амплификации каждого участка гена BCKDNA (9 экзона) и BCKDNB (10 экзона) использовали по два праймера (Forward и Reverse).

При очистке фрагментов ДНК после первой ступени ПЦР использовали набор магнитов: «Agencourt AMPure XP PCR purification» и SPRIPlate 96 Super Magnet Plate. Затем очищенные фрагменты ДНК использовали для дальнейших исследований. Вторую ПЦР проводили в режиме: 95оС-2 мин., (95оС-30I, 52оС-58 оС — 30I, 78оС-2 мин. 30 циклов), 72оС-10 мин. и пауза на амплификаторе при 4оС -10 мин.

Затем проводили стандартную процедуру на аппарате GENOME Lab GeXP™ Sequencing для определения нуклеотидной последовательности каждого фрагмента ДНК.

Результаты исследований и их обсуждения

Семья А. А. имеет трех детей: средний ребенок А.М. девочка трех лет больная с рождения, второй больной ребенок А.Т. новорожденный мальчик также больной с рождения. Оба ребенка родились в срок с нормальным весом и ростом. Однако, после первых суток после рождения у новорожденного начались проблемы, связанные с желудочно-кишечным трактом. Неспецифический запах в моче у новорожденного, напоминающий запах кленового сиропа, навел нас на мысль наличия заболевания, сопровождающегося нарушением обмена аминокислот, валина, лейцина и изолейцина, т.е. болезни запаха кленового сиропа. Такая же история была и со старшим ребенком. Моча больного дала положительную реакцию с 2,4-динитрофенилгидрозином, что свидетельствовало о наличии заболевания запаха кленового сиропа.

Результаты идентификации гена заболевания запаха кленового сиропа в 508 позиции гена BCKDNB выявили замену нуклеотида цитозин на нуклеотид тимин в гомозиготном состоянии. Данная мутация ранее известна науке как одна из мутаций патологических аллелей, приводящая к заболеванию запаха кленового сиропа (5).

Исследование гена BCKDNA выявило три мутации: 1. Замена нуклеотида цитозин на нуклеотид тимин в позиции 59 (59 С-Т); 2. замена нуклеотида цитозин на нуклеотид тимин в позиции 972 (972 С-Т); 3. замена нуклеотида аденин на нуклеотид гуанин в позиции 1221 (1221 А-Г). Все вышеописанные мутации были в гетерозиготном состоянии. По литературным данным все три мутации не вызывают патологию, другими словами, относятся к нейтральным мутациям.

Следовательно, мутация 508 (С-Т) гена BCKDNB в гомозиготном состоянии у больного А.М. привела к заболеванию под названием запах кленового сиропа.

Таким образом, выявлена наследственное заболевание связанное с обменом аминокислот — запах кленового сиропа у двух членов одной семьи. Идентифицирована мутация 508 (С-Т) гена BCKDNB в гомозиготном состоянии.

Впервые идентифицировано наличие трех нейтральных генетических полиморфизмов в гене BCKDNA: 972 (С-Т), 59 (С-Т) и 1221 (А-Г) в гетерозиготном состоянии.

Учитывая наличие данного заболевания в популяции, обсуждаются пути их профилактики в виде медико-генетической консультации семей с генетическим риском рождения больного ребенка с последующей пренатальной диагностикой и массовым скринингом заболевания среди новорожденных Азербайджанской Республики.

Выводы

1. С помощью молекулярно-генетических методов диагностики у двух членов одной семьи диагностировано заболевание, связанное с нарушением обмена аминокислот — запах кленового сиропа.
2. Идентифицирована мутация 508 (С-Т) гена BCKDNB в гомозиготном состоянии, которая и была причиной заболевания запаха кленового сиропа.
3. Впервые выявлено наличие трех нейтральных генетических полиморфизмов в гене BCKDNA: 972 (С-Т), 59 (С-Т) и 1221 (А-Г) в гетерозиготном состоянии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chuang, J.L., Wynn, R.M., Moss, C.C., Song, J., Li, J., Awad, N., Mandel, H., Chuang, D.T. Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients. *J. Biol. Chem.* 279: 17792–17800, 2004.
2. Feuchtbaum, L., Carter, J., Dowray, S., Currier, R.J., Lorey, F. Birth prevalence of disorders detectable through newborn screening by race/ethnicity. *Genet. Med.* 14: 937–945, 2012.
3. Flaschker, N., Feyen, O., Fend, S., Simon, E., Schadewaldt, P., Wendel, U. Description of the mutations in 15 subjects with variant forms of maple syrup urine disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30: 903–909, 2007.
4. Gortz, P., Koller, H., Schwahn, B., Wendel, U., Siebler, M. Disturbance of cultured rat neuronal network activity depends on concentration and ratio of leucine and alpha-ketoisocaproate: implication for acute encephalopathy of maple syrup urine disease. *Pediatr. Res.* 53: 320–324, 2003.
5. Morton, D.H., Strauss, K.A., Robinson, D.L., Puffenberger, E.G., Kelley, R. I. Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics* 109: 999–1008, 2002.
6. Nellis, M.M., Danner, D. J. Gene preference in maple syrup urine disease. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 232–237, 2001.
7. Nellis, M.M., Kasinski, A., Carlson, M., Allen, R., Schaefer, A.M., Schwartz, E.M., Danner, D. J. Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression. *Molec. Genet. Metab.* 80: 189–195, 2003.
8. Quental, S., Gusmao, A., Rodriguez-Pombo, P., Ugarte, M., Vilarinho, L., Amorim, A., Prata, M. J. Revisiting MSUD in Portuguese Gypsies: evidence for a founder mutation and for a mutational hotspot within the BCKDHA gene. *Ann. Hum. Genet.* 73: 298–303, 2009.
9. Quental, S., Macedo-Ribeiro, S., Matos, R., Vilarinho, L., Martins, E., Teles, E. L., Rodrigues, E., Diogo, L., Garcia, P., Eusebio, F., Gaspar, A., Sequeira, S., Furtado, F., Lanca, I., Amorim, A., Prata, M. J. Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. *Molec. Genet. Metab.* 94: 148–156, 2008. [
10. Schadewaldt, P., Bodner-Leidecker, A., Hammen, H.-W., Wendel, U. Whole-body L-leucine oxidation in patients with variant form of maple syrup urine disease. *Pediatr. Res.* 49: 627–635, 2001.
11. Wu, J.-Y., Kao, H.-J., Li, S.-C., Stevens, R., Hillman, S., Millington, D., Chen, Y.-T. ENU mutagenesis identifies mice with mitochondrial branched-chain aminotransferase deficiency resembling human maple syrup urine disease. *J. Clin. Invest.* 113: 434–440, 2004.

© Гусейнова Лала Самединовна (royahuseynova2006@gmail.com), Агвердиева Рая Рустамовна (azmbi@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Азербайджанский Медицинский Университет