Новый случай мутации гена BCKDHB 508 (C-T) в гомозиготном состоянии при болезни запаха кленового сиропа

Гусейнова Л.С.
Азербайджанский Медицинский Университет, Баку

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 (C-T) гена BCKDHB в гомозиготном состоянии у двух разнополых детей. Впервые идентифицировано наличие трех нейтральных генетических полиморфизмов в гене BCKDHA: 972 (C-T), 59 (C-T) и 1221 (A-G) в гетерозиготном состоянии. Учитывая наличие данного заболевания в популяции, обсуждаются пути их профилактики в виде медико-генетической консультации с последующей пренатальной диагностикой и массовым скринингомзаболевания среди новорожденных Азербайджанской Республики.

Введение

Болезнь запаха кленового сиропа MSUD (Maple syrup urine disease) сложное заболевание, которое является наследственным. Болезнь запаха кленового сиропа сопровождается полным или же частичным нарушением 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(1,3).

Запах кленового сиропа генетически гетерогенное заболевание, которое связано с недостаточностью ферментного комплекса дегидрогеназ кетокислот (BCKAD). В состав BCKAD входит четыре субъединицы (E1a, E1b, E2 и E3). Мутации в трех генах, кодирующие эти белки приводят к накоплению органических кетокислот в биологических жидкостях и тканях. Ген, кодирующий E1a субъединицу (BCKDHA) картирован на длинном плече хромосомы 19 в позиции 19q13.1-q13.2; субъединицу E1b BCKDHA картирован на коротком плече хромосомы 6 в позиции 6q14; E2 (DBT) картирован на коротком плече хромосомы 1 на позиции 1p31; E3 DLD картирован на коротком плече хромосомы 7 в позиции 7q31-q33. Мутация в гене E3

DLD приводит к клинической форме заболевания сходной с синдромом Ли (2).

Известно более 50-ти мутаций этих генов. Частота встречаемости для гомозигот в популяциях мира составляет 1:120000-1:290000, для гетерозигот 100-400 новорожденных. В некоторых изолятах частота гомозигот высокая и достигает 1:176 новорожденных. Заболевание имеет аутосомно-рецессивный тип наследования. У практически здоровых родителей рождается больной ребенок (4).

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 фирмыQIAGEN (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 апарат и источник питания фирмы BioRad(США). В качестве маркера для идентификации синтезированных фрагметов ДНК использовали DNALadder 100 bp (5).

Режим ПЦР для генов BCKDHA и BCKDHB был следующим: 95ºC-2 мин., (95ºC-30^{I}, 58ºC-30^{I}, 78ºC-2 мин. 25 циклов), 72ºC-10 мин. и пауза при 4ºC -10мин. и режим ПЦР для гена GAL1 - 95ºC-2 мин., (95ºC-30^{I}, 60ºC-30^{I}, 76ºC-2 мин. 30 циклов), 72ºC-10 мин. и пауза при 4ºC- 10 мин. ПЦР проводили на амплификаторе – Professional Thermocycler фирмы Biometra, (Германия). Для амплификации каждого участка гена BCKDHA (9 экзона) и BCKDHB (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: 95ºC-2 мин., (95ºC-30^{I}, 52ºC-58 ºC - 30^{I}, 78ºC-2 мин. 30 циклов), 72ºC-10 мин. и пауза на амплификаторе при 4ºC -10 мин.

Затем проводили стандартную процедуру на аппарате GENOMELabGeXP^{TM} Sequencingдля 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 старшем ребенком. Моча больного дала положительную реакцию с 2,4-динитрофенилгидрозином, что свидетельствовало о наличие заболевания запаха 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 (6).

Исследование гена BCKDHA выявило три мутации: 1. Замена нуклеотида цитозин на нуклеотид тимин в позиции 59 (59 C-T); 2. заменануклеотида цитозин на нуклеотид тимин в позиции 972 (972 C-T); 3. замена нуклеотида аденин на нуклеотид гуанин в позиции 1221 (1221 A-G). Все вышеописанные мутации были в гетерозиготном состоянии. По литературным данным все три мутации не вызывают патологию, другими словами относятся к нейтральным мутациям (7).

Следовательно, мутация 508 (C-T) генаBCKDHB в гомозиготном состоянии у больного А.М. привела к заболеванию под названием запах кленового сиропа.

Таким образом, выявлена наследственное заболеваниу связанное с обменом аминокислот- запах кленового сиропа у двух членов одной семьи. Идентифицирована мутация 508 (C-T) гена BCKDHB в гомозиготном состоянии.

Впервые идентифицировано наличие трех нейтральных генетических полиморфизмовв гене BCKDHA: 972 (C-T), 59 (C-T) и 1221 (A-G)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.

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 (C-T) гена BCKDHB в гомозиготном состоянии, которая и была причиной заболевания запаха кленового сиропа.
3. Впервые выявлено наличие трех нейтральных генетических полиморфизмовв гене BCKDHA: 972 (C-T), 59 (C-T) и 1221 (A-G) в гетерозиготном состоянии.

Литература

1. Доклад научной группы ВОЗ. «Борьба с наследственными болезнями». Женева, ВОЗ, Доклад 865, 1997, с. 133.
2. McKusick A. Mendelian inheritance in man.Tenth edition, London, 2002, p. 2115.
3. Chi, C.-S., Tsai, C.-R., Chen, L.-H., et.al.. Maple syrup urine disease in the Austronesian aboriginal tribe Paiwan of Taiwan: a novel DBT (E2) gene 4.7 kb founder deletion caused by a nonhomologous recombination between LINE-1 and Alu and the carrier-frequency determination. Europ. J. Hum. Genet. 11: 931-936, 2003. [PubMed: 14508502, related citations] [Full Text]
4. Mersey, B. D., Jin, P., Danner, D. J. Human microRNA (miR29b) expression controls the amount of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in a cell. Hum. Molec.Genet. 14: 3371-3377, 2005. [PubMed: 16203741, related citations] [Full Text]
5. Application in formation. Purification of GENOMELAB^{TM}GeXP Sequencing Productions using SPRICleanSEQ^{R}Magnetic Beards. CEQ 2000, CEQ 2000XL, CEQ 8000, CEQ 8800 &GeXP Instruments BECKMAN COULTER. Application Team Europe.
6. Chuang, J. L., Wynn, R. M., Moss, et.al., Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients. **J**. Biol. Chem. 279: 17792-17800, 2004. [PubMed: 14742428, related citations] [Full Text]
7. Mamapedia.va/detski-bolezni/endocrinology bolezni-Klenovoqo-Siropa html/
8. Dic.academic.ru/dic/nsf/ruwiki 815584.

Xülasə

Ağcaqayın şirəsinin qoxusu xəstəliyi zamanı DCKDHB genində 508(C-T) mutasiyasının homoziqot vəziyyətdə identifikasiyası.

Hüseynova L.S.

Molekulyar-genetik metodlar kompleksindən istifadə edilərək bir ailənin iki övladında amin turşuların irsi mübadilə xəstəliyi – ağcaqayın şirəsinin qoxusu xəstəliyi aşkar edilmişdir. Ağcaqayın şirəsinin qoxusu xəstəliyinin səbəbi kimi BCKDHB geninin 508 (C-T) mutasiyası homoziqot vəziyyətdə identifikasiya edilmişdir. İlk dəfə olaraq BCKDHA geninin: üç neytral mutasiyası: 972 (C-T), 59 (C-T) və 1221 (A-G) heteroziqot vəsiyyətdə aşkar edilmişdir. Xəstəliyin profilaktika yolları müzakirə edilir.

Summary

A New Case of BCKDHB 508 (C-T) Homozygous Gene Mutation In Maple Syrup Urine Diesease

Huseynova L.S.

Genetic amino acid metabolic disorder-maple syrup urine disease was detected in two children of the same family by using molecular- genetic methods. A new previously unknown in Azerbaijan homozygous mutation of 508 (C-T) for BCKDHB gene was identified in two kids of both genders. Presence of three neutral genetic polymorphisms was identified in BCKDHA gene: 972 (C-T), 59 (C-T) and 1221 (A-G), all heterozygous. Prevention methods of the disease is being discussed.