

MEDYCYNA

Wieków Rozwojowego

Kwartalnik

Suplement II do nr 1 styczeń-marzec tom V 2001 r. ISSN 1428-345X

CEZARY ŻEKANOWSKI

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA WYBRANYCH CHOROÓB UWARUNKOWANYCH GENETYCZNIE

Rozprawa habilitacyjna

Instytut Matki i Dziecka
Warszawa 2001



<http://rcin.org.pl>

MEDYCYNĄ WIEKU ROZWOJOWEGO

KWARTALNIK

Suplement II do Nr 1 (styczeń – marzec), tom V, 2001

INSTYTUT MATKI I DZIECKA

DYREKTOR PROF. DR HAB. MED. JANUSZ SZYMBORSKI

KOMITET REDAKCYJNY

- Prof. dr hab. med. Krystyna Bożkowa** – redaktor naczelny
Prof. dr hab. med. *Bogdan Chazan* – z-ca red. naczelnego
Prof. dr hab. med. *Michał Józwick* – z-ca red. naczelnego
Doc. dr hab. med. *Aldona Sito* – z-ca red. naczelnego
Prof. dr hab. med. *Henryka Siwińska-Gotłubiowska* – z-ca red. naczelnego
Dr med. *Ilona Szilágyi-Pagowska* – sekretarz redakcji
Dr med. *Elżbieta Sendeka* – członek redakcji
Mgr *Elżbieta Żołnierczyk* – redaktor

KOMITET NAUKOWY

- | | |
|--|--|
| Prof. dr hab. n. przyr. <i>Jerzy Bal</i> | Prof. dr hab. med. <i>Maria Liebhart</i> |
| Doc. dr hab. n. przyr. <i>Ewa Bocian</i> | Prof. dr hab. med. <i>Kazimierz Łodziński</i> |
| Prof. dr hab. med. <i>Józef Bożek</i> | Prof. dr hab. med. <i>Tadeusz Mazurczak</i> |
| Prof. dr hab. med. <i>Zbigniew Brzeziński</i> | Doc. dr hab. med. <i>Krystyna Mikiel-Kostyra</i> |
| Prof. dr hab. med. <i>Barbara Cabalska</i> | Prof. dr hab. med. <i>Andrzej Milanowski</i> |
| Prof. dr hab. med. <i>Jagna Czochońska</i> | Prof. dr hab. med. <i>Zdzisław Rondio</i> |
| Prof. dr hab. med. <i>Barbara Dębiec</i> | Doc. dr hab. med. <i>Zofia Rudzka-Kańtoch</i> |
| Doc. dr hab. med. <i>Zofia Dudkiewicz</i> | Doc. dr hab. med. <i>Krzysztof Rytwiński</i> |
| Doc. dr hab. med. <i>Bożenna Eberdt-Gotłębek</i> | Prof. dr hab. med. <i>Marian Szamatowicz</i> |
| Doc. dr hab. med. <i>Jacek Grygalewicz</i> | Prof. dr hab. med. <i>Wiesław Szymański</i> |
| Doc. dr hab. med. <i>Ewa Helwich</i> | Prof. dr hab. med. <i>Janusz Szymborski</i> |
| Prof. dr hab. med. <i>Piotr Knapp</i> | Prof. dr hab. med. <i>Jerzy Świdorski</i> |
| Doc. dr hab. med. <i>Barbara Kowalewska-Kantecka</i> | Prof. dr hab. med. <i>Michał Troszyński</i> |
| Doc. dr hab. med. <i>Janusz Książek</i> | Prof. dr hab. med. <i>Janusz Wasyluk</i> |
| Doc. dr hab. med. <i>Krystyna Kuczyńska</i> | Prof. dr hab. med. <i>Kamil Wermeński</i> |
| Prof. dr hab. biol. <i>Teresa Laskowska-Klita</i> | Prof. dr hab. med. <i>Stefan Winnicki</i> |
| Doc. dr hab. med. <i>Jerzy Leibschang</i> | Prof. dr hab. med. <i>Barbara Woynarowska</i> |
| Prof. dr hab. med. <i>Tomasz Lenkiewicz</i> | Prof. dr hab. med. <i>Wojciech Woźniak</i> |
| | Prof. dr hab. med. <i>Witold Zatoński</i> |

© Copyright by Instytut Matki i Dziecka, Warszawa 2000

Wydawanie *Medycyny Wieku Rozwojowego* jest dofinansowane przez
Komitet Badań Naukowych

WYDAWCA: INSTYTUT MATKI I DZIECKA

Warszawa, ul. Kasprzaka 17a

<http://medroz.imid.med.pl> e-mail: medroz@imid.med.pl

Projekt okładki – *Artur Lewandowski*

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	7
1.1. CHOROBY, MUTACJE I DNA	7
1.1.2. Zasady diagnostyki molekularnej	7
1.1.3. Organizacja systemu diagnostyki molekularnej dla celów klinicznych	8
1.1.4. Zewnętrzna ocena jakości badań molekularnych (EQA) – przykład Wielkiej Brytanii	9
1.1.5. Europejski program zewnętrznej kontroli jakości	10
1.1.6. Techniki diagnostyki molekularnej – wybór i organizacja w skali laboratorium	11
1.2. WYBRANE CHOROBY UWARUNKOWANE GENETYCZNIE	15
1.2.1. Metaboliczna różnorodność hiperfenyloalaninemii	16
1.2.2. Molekularne podłoże klinicznej heterogenności HPA	17
1.2.3 Mutacje w genie <i>PAH</i>	17
1.2.4 Mutacje w genie <i>PTS</i>	18
1.2.5. Galaktozemię powodują defekty trzech enzymów	19
1.3. OKREŚLANIE KORELACJI POMIĘDZY GENOTYPEM, A FENOTYPEM KLINICZNYM	21
2. CEL PRACY	23
3. PACJENCI, MATERIAŁY I METODY	25
3.1. PACJENCI	25
3.2. IZOLACJA I OCZYSZCZANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH	25
3.3. SPOSOBY POSZUKIWANIA MUTACJI	25
3.3.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)	26
3.3.2. Analiza polimorfizmu konformacyjnego jednoniciowego DNA (SSCA)	26
3.3.3. Analiza heterodupleksów (HA)	27
3.3.4. Analiza transkryptów (RT-PCR)	28
3.3.5 Sekwencjonowanie	28
3.4. EKSPRESJA <i>IN VITRO</i> MUTACJI R68G I R68S	28

4. WYNIKI	31
4.1. GEN <i>PAH</i>	31
4.1.1. Mutacje w genie <i>PAH</i> zidentyfikowane w badanej grupie chorych	31
4.1.2. Genotypy w <i>locus PAH</i> chorych z różnymi postaciami hiperfenyloalaninemii	33
4.1.3. Diagnostyka molekularna w określeniu podłoża molekularnego fenylketonurii matczynej	34
4.1.4. Identyfikacja nowych mutacji w genie <i>PAH</i>	34
4.1.5. Mutacje zlokalizowane w eksonie 3 genu <i>PAH</i>	35
4.1.6. Określanie „siły” mutacji R68G i R68S metodą ekspresji <i>in vitro</i>	36
4.2. GEN <i>PTS</i>	37
4.2.1. Mutacje w genie <i>PTS</i>	37
4.2.2. Analiza transkryptów ektopowych genu <i>PTS</i> z leukocytów krwi obwodowej	39
4.3. UŻYTECZNOŚĆ KLINICZNA RÓŻNICOWEJ DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ HPA	39
4.4. Gen <i>GALT</i>	40
4.4.1. Mutacje w genie <i>GALT</i> zidentyfikowane w badanej grupie chorych	40
4.4.2. Chory niosący trzy różne mutacje w genie <i>GALT</i>	41
4.4.3. Mutacje związane z łagodną formą galaktozemii	41
4.4.4. Poszukiwanie mutacji w genie <i>GALE</i>	42
4.5. KOLEJNOŚĆ POSZUKIWANIA MUTACJI W GENACH <i>PAH</i> , <i>PTS</i> , <i>GALT</i> ORAZ <i>GALE</i>	42
5. DYSKUSJA	45
5.1. SKOMPLIKOWANIE CHORÓB JEDNOGENOWYCH	45
5.1.1. Rodzaje mutacji zmiany sensu w genie <i>PAH</i>	48
5.1.2. Mutacje zmiany sensu w eksonie 3 genu <i>PAH</i>	50
5.1.3. Trudności w ustaleniu korelacji genotyp – fenotyp umysłowy w HPA	51
5.1.4. Mutacje w genie <i>PTS</i>	52
5.1.5. Alternatywne składanie transkryptu pierwotnego genu <i>PTS</i> w leukocytach krwi obwodowej	53
5.1.6. Mutacje w genie <i>GALT</i>	53
5.1.7. Pacjenci z wysoką resztkową aktywnością <i>GALT</i>	57
5.2. ZŁOŻONOŚĆ CHORÓB JEDNOGENOWYCH: NAUKA I TECHNIKA	58
5.3. PRAKTYCZNE WNIOSKI BIOCHEMICZNE	59
5.4. WYBÓR TECHNIKI WYKRYWANIA MUTACJI	60
5.5. RUTYNOWA DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA CHORÓB DZIEDZICZNYCH – TECHNICZNE ZASADY WYBORU	62

5.6. SYSTEM DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ W POLSCE	65
5.7. MOŻLIWE KIERUNKI ZMIAN	66
5.8. ... I PYTANIA ZASADNICZE	67
6. PODSUMOWANIE	71
7. UZUPEŁNIENIA	73
8. WAŻNIEJSZE SKRÓTY	77
9. PIŚMIENNICTWO	79
10. SUMMARY	87

1. WSTĘP

1.1. CHOROBY, MUTACJE I DNA

Mutacje obserwować można na wielu poziomach organizacji układów biologicznych. Od wieków znano choroby wrodzone, pojawiające się w ciągu pokoleń w rodzinach. Dokładne badania krewnych obciążonych konkretnymi schorzeniami i zespołami klinicznymi doprowadziły do określenia sposobów dziedziczenia wielu mutacji. W latach czterdziestych XX wieku opracowano dostatecznie czułe metody badania struktury fizycznej białek, by stwierdzić na przykład, że cząsteczki hemoglobiny pochodzące od ludzi zdrowych oraz chorych na niedokrwistość sierpowatokrwinkową nieznacznie się różnią. W kilka lat później wykazano, że odmienność form tego białka wynika z zastąpienia jednego aminokwasu innym. Dopiero w 1982 roku poznano mutację w genie kodującym β -globinę, odpowiedzialną za niedokrwistość sierpowatokrwinkową. Odkrycie to wyznacza początek dynamicznego rozwoju różnorodnych metod wykrywania mutacji powodujących schorzenia uwarunkowane genetycznie.

1.1.2. Zasady diagnostyki molekularnej

Diagnostyka molekularna dla celów klinicznych polega na analizie próbki DNA lub RNA pacjenta, w celu wykrycia genotypu związanego z chorobą uwarunkowaną genetycznie. Wykrywanie mutacji powodujących choroby jest obecnie rutynową praktyką w nowoczesnych laboratoriach przyszpitalnych. Wskazaniami do badania molekularnego są:

1. weryfikacja rozpoznania choroby genetycznej,
2. określenie nosicielstwa zmutowanego genu wśród krewnych chorego lub w populacji ogólnej, gdy konkretna mutacja warunkująca chorobę występuje z dużą częstością,
3. identyfikowanie mutacji powodujących późne wystąpienie choroby genetycznej, oraz
4. prenatalne rozpoznanie choroby genetycznej (jeżeli jest ono akceptowane z etycznego punktu widzenia).

We wszystkich przypadkach wynik badania molekularnego, zarówno pozytywny, jak negatywny, należy zinterpretować w kontekście pełnego obrazu klinicznego pacjenta lub

rodziny. Ze względu na pewne odmienności metodyki oraz interpretacji klinicznej, we wstępie nie poruszam zagadnień diagnostyki molekularnej chorób mitochondrialnych, infekcyjnych, nowotworów niedziedzicznych oraz oznaczania genotypów HLA. Wiele jednak poniżej sformułowanych uwag, choć dotyczy zasadniczo dziedzicznych chorób jednogenowych, odnosi się również do diagnostyki wspomnianych wyżej chorób.

1.1.3. Organizacja systemu diagnostyki molekularnej dla celów klinicznych

Diagnostyka molekularna chorób genetycznych jest stosunkowo młodą dziedziną diagnostyki klinicznej. Większość z utworzonych w świecie do końca lat osiemdziesiątych laboratoriów powstało w oparciu o grupy badawcze zajmujące się różnymi aspektami genetyki molekularnej. Najważniejszym problemem i jednocześnie zadaniem, jakie pojawiło się przed nowo powstającymi laboratoriami była konieczność wypracowania struktury i zasad organizacji służących dobrej współpracy z istniejącym systemem służby zdrowia. Jednym z pierwszych elementów takiej integracji było wprowadzenie jednolitych standardów jakości wykonywanych badań (1).

W krajach rozwiniętych gospodarczo (USA, Kanada, Japonia, kraje Europejskiego Obszaru Gospodarczego) stosowanie molekularnych testów diagnostycznych poddane jest obecnie wielostronnej kontroli, zapewniającej ich niezawodność i ewentualne polepszanie jakości uzyskiwanych wyników. Na przykład w USA kilka ośrodków opracowuje programy licencjonowania laboratoriów diagnostycznych. Najważniejsze z nich to: *College of American Pathologists* (CAP), *The Health Care Financing Administration* (HCFA) oraz istniejące w poszczególnych stanach programy akredytacyjne. Przy udzielaniu oficjalnego uznania laboratoriom, ogólnokrajowy *The Joint Council on the Accreditation of Healthcare Organizations* (JCAHO) opiera się na protokołach diagnostycznych zaaprobowanych przez CAP. Wiele laboratoriów referencyjnych w USA uczestniczy w dobrowolnych programach kwalifikacyjnych, z których najbardziej znanym jest program kierowany przez *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS).

W USA *The College of American Pathologists* wraz z *American College of Medical Genetics* (ACMG) organizują co dwa lata program kontrolny dla laboratoriów diagnostyki molekularnej. Test, w którym uczestnictwo jest dobrowolne, ma na celu sprawdzenie zdolności konkretnego laboratorium do wyizolowania DNA z dostarczonej próbki tkanki, identyfikacji mutacji oraz interpretacji uzyskanego wyniku.

W USA dopiero w drugiej połowie lat sześćdziesiątych, początkowo w poszczególnych stanach, a w 1967 roku ustawą *Clinical Laboratory Improvement Act* (CLIA) na szczeblu federalnym, wprowadzono standardy laboratoryjnych testów o zastosowaniu klinicznym. Ustawę uwspółcześiono w 1988 roku. Podaje ona ogólne standardy dla laboratoriów badających materiał pochodzący z organizmu ludzkiego w celu „diagnostyki, zapobiegania lub leczenia chorób lub oceny stanu zdrowia człowieka”. Wskazania obejmują zasady postępowania z pacjentem, wymagania stawiane personelowi, dotyczące kontroli i certyfikatów jakości, merytorycznej wartości testów oraz wyposażenia i organizacji przestrzennej pracowni. Ustawa wymienia badania cytogenetyczne, lecz nie wspomina w sposób szczególny o diagnostyce molekularnej.

Zarówno organizacje federalne, jak zawodowe sformułowały szereg wskazówek dotyczących najkorzystniejszego zastosowania testów molekularnych. Na przykład w kwietniu 1997 roku na konferencji zorganizowanej przez *National Institutes of Health* (NIH) określono zasady badań molekularnych w CF. Rozszerzając pierwotne ustalenia z 1992 roku (diagnostyka pediatryczna) uznano, iż identyfikacja mutacji może być proponowana dodatkowo dorosłym, w których rodzinach wystąpiła mukowiscydoza, rodzicom chorych dzieci oraz wszystkim parom wyrażającym chęć diagnostyki prenatalnej z dowolnych powodów. Podobne ustalenia wypracowano dla innych jednogenowych chorób dziedzicznych włączając w to zespół łamliwego chromosomu X, zespół Angelmana (2, 3).

W krajach europejskich diagnostyka molekularna chorób dziedzicznych poddana jest różnego rodzaju ograniczeniom, mniej lub bardziej formalnym. Jeden z najstarszych i najbardziej systemów diagnostyki molekularnej posiada Wielka Brytania.

1.1.4. Zewnętrzna ocena jakości badań molekularnych (EQA) – przykład Wielkiej Brytanii

W Wielkiej Brytanii większość laboratoriów diagnostyki klinicznej uczestniczy w wewnętrznej ocenie jakości oferowanych analiz (4). Zazwyczaj do akredytacji laboratorium konieczne jest uczestnictwo w takim programie. Organizację programów EQA (*external quality assurance*) nadzoruje komisja (*Joint Working Group, JWG*) złożona z przedstawicieli organizacji profesjonalnych (np. lekarzy, genetyków) oraz członków *Royal College of Pathologists*. JWG aprobuje procedury oceniające oraz przekazuje wyniki do Sekretarza Stanu ds. Zdrowia. Podkomisje doradcze, reprezentujące poszczególne działy diagnostyki klinicznej, śledzą wykonanie programu kontrolnego dla grupy laboratoriów. Podkomisje tworzą eksperci z poszczególnych dziedzin, a ich głównym celem jest rozwiązywanie bieżących problemów organizacyjnych EQA. W przypadku genetycznej diagnostyki molekularnej merytoryczną i techniczną organizacją programu kontrolnego, formułowaniem pytań, dostarczaniem próbek DNA oraz przygotowaniem raportu końcowego zajmuje się odpowiedni komitet organizacyjny (*steering committee for Molecular Genetics External Quality Assurance*).

Próbki DNA wraz z opisem klinicznym dostarczają członkowie komitetu organizacyjnego. Są one następnie rozprawdane do uczestniczących w programie laboratoriów. Wykonanie testu wymaga bądź bezpośredniej identyfikacji mutacji, bądź śledzenia markerów genetycznych sprzężonych z chorobą. Wybór metody pozostaje w gestii uczestniczącego w programie laboratorium. Dla każdej z chorób dziedzicznych, objętej programem, dostarczonych jest kilka (4-5) próbek DNA, przy czym mogą to być próbki pochodzące od członków jednej rodziny lub pojedynczych pacjentów. Wyniki wraz z interpretacją muszą zostać zwrócone organizatorom w ciągu 6 tygodni. Wszystkie próbki oraz uczestniczące laboratoria oznaczone są kodem, znanym tylko organizatorom.

Wykonanie analizy molekularnej ocenia się na dwu poziomach poprawności: określenia genotypu i interpretacji. Ważne są zatem jasne kryteria diagnozowania jednostki chorobowej, które ustala jeden z członków komitetu organizacyjnego i przekazuje następnie drugiemu ekspertowi z komitetu. W razie niezgodności wszelkie wątpliwości interpretacyjne rozwiązuje się na forum całego komitetu organizacyjnego.

Laboratoria uczestniczące w programie otrzymują próbki dwa razy w roku. Wyniki ogłasza się corocznie, po drugim teście programu kontrolnego. Każde laboratorium otrzymuje podsumowanie ogólne, z anonimowym zestawieniem wyników i – co ważne – kryteriami oceny oraz wyniki własne z komentarzem organizatorów.

Program EQA obejmuje choroby diagnozowane przynajmniej w ośmiu brytyjskich laboratoriach. Jeżeli natomiast badana choroba występuje w populacji rzadko lub techniki stosowane do jej identyfikacji są zbyt wyspecjalizowane, organizatorzy pośredniczą w wymianie próbek między konkretnymi laboratoriami.

W przyszłości przewiduje się, iż uczestnictwo w programie kontrolnym stanie się wymogiem uzyskania akredytacji przez laboratorium diagnostyczne. W Wielkiej Brytanii już obecnie instytucje zajmujące się ubezpieczeniami zdrowotnymi wywierają presję na laboratoria, w celu utrzymania odpowiednio wysokich standardów profesjonalnych. Jednym ze składników oceny jest właśnie wynik uzyskiwany w programie EQA.

Znaczenie programów kontroli zewnętrznej wykracza poza ramy konkretnego laboratorium, konkretnej diagnozowanej choroby i techniki określania genotypu. Wywiera bowiem wpływ na cały system diagnostyki klinicznej w skali kraju. Jednym z najważniejszych rezultatów jest inicjowanie wymiany informacji i koncepcji na forum publicznym, w postaci spotkań i konferencji poświęconych szczegółowym aspektom diagnostyki molekularnej, rozszerzaniu lub zmianie zakresu badanych chorób czy wprowadzaniu nowych metod i aparatury.

1.1.5. Europejski program zewnętrznej kontroli jakości

Projekt organizacji europejskiego programu kontroli jakości w diagnostyce molekularnej (*European Molecular Genetics Quality Network*, EMQN) sformułowano w Londynie, na spotkaniu *European Workshop on Quality Issues in Clinical Molecular Genetics* w 1996 roku (5). Cele zakreślono szeroko, poczynając od ujednoczenia istniejących i narodowych programów kontrolnych i zaproponowania systemu standaryzacji krajom nie posiadającym dotychczas podobnych programów. Zaplanowano wprowadzenie europejskich kryteriów kontroli zewnętrznej dla rzadko występujących chorób genetycznych oraz zbudowanie systemu wymiany wiadomości, zapewniającego wprowadzanie w laboratoriach europejskich najważniejszych metod, protokołów laboratoryjnych, warunków prowadzenia analiz, kontroli, interpretacji wyników oraz formułowania raportów końcowych. Rozpoczęto tworzenie bazy danych diagnozowanych chorób, dostępnej dla lekarzy i laboratoriów diagnostycznych oraz organizowanie kolekcji linii komórkowych pochodzących od rodzin z chorobami genetycznymi. Zasadnicze elementy planowanego systemu europejskiego oparto na, przedstawionym powyżej, brytyjskim system kontroli zewnętrznej.

Od tego czasu EMQN stał się częścią finansowanego przez Unię Europejską programu badawczo-rozwojowego w ramach sekcji Standardów Pomiarów i Testów. Programy EQA diagnostyki konkretnych chorób koordynowane są przez laboratoria referencyjne z różnych krajów Wspólnoty (6, 7).

1.1.6. Techniki diagnostyki molekularnej – wybór i organizacja w skali laboratorium

Zakres testów molekularnych wykonywanych w konkretnym laboratorium diagnostycznym zależy od wielu czynników. Wśród najważniejszych można wymienić:

1. częstość występowania poszczególnych chorób genetycznych w konkretnej populacji,
2. zapotrzebowanie na testy molekularne,
3. praktyczną możliwość identyfikacji mutacji lub śledzenia sposobu dziedziczenia markerów polimorficznych w rodzinach ryzyka,
4. skomplikowanie i koszt testu,
5. zainteresowania naukowe badaczy i zespołów klinicznych.

Warto zwrócić uwagę na punkt 3, ponieważ teoretycznie testy molekularne stosować można w diagnostyce wielu chorób, w różnym stopniu warunkowanych mutacjami materiału genetycznego. Obecnie jednak, przede wszystkim ze względu na stosunkowo wysokie koszty i skomplikowanie techniczne, diagnostykę molekularną na szerszą skalę wykonuje się w przypadku kilku chorób dziedzicznych. Najważniejsze to mukowiscydoza i zespół łamliwego chromosomu X, gdzie stosowane testy cechuje wysoka wykrywalność i powtarzalność wyników, których nie zapewniają konwencjonalne sposoby identyfikacji tych chorób. Duże znaczenie praktyczne, w tym prognostyczne, ma powiązanie oznaczonych genotypów z przebiegiem klinicznym choroby. Przykładem może być postać „trzewna” mukowiscydozy, przewlekła choroba ziarniniakowa o łagodnym przebiegu, łagodna hiperfenyloalaninemia czy łagodna postać deficytu syntazy tetrahydrobiopterynowej.

Zwiększeniu liczby pacjentów, badanych w konkretnym laboratorium towarzyszy zmniejszenie kosztów wykonania badania oraz zwiększenie dokładności wyników. Duże laboratoria, gromadzące próbki z wielu szpitali, są ponadto zdolne do wdrażania i opracowywania nowych technologii diagnostycznych, jak również szkolenia personelu technicznego (8).

* * *

Diagnostyka molekularna chorób genetycznych opiera się na metodach stosowanych od lat w badaniach podstawowych z zakresu genetyki i biologii molekularnej. Zasadniczo polegają one na izolacji kwasu nukleinowego i stwierdzeniu zmian jego sekwencji, w porównaniu z sekwencją wzorcową (nie zmutowaną) (9).

Podobnie jak przy wykonywaniu innych testów klinicznych, również tu należy wprowadzić zabezpieczenia uniemożliwiające pomylenie próbek. Pomyłka na tym etapie jest najbardziej niebezpieczna i trudna do wykrycia w toku dalszej analizy. Dlatego każda dostarczona do laboratorium próbka tkanki pacjenta musi zostać opatrzona własnym numerem oraz numerem rodowodu, wspólnym dla badanej rodziny. Dodatkowo można stosować np. numer PESEL, datę otrzymania próbki czy skrót literowy wstępnego rozpoznania klinicznego.

Informacje o pacjentach, rozpoznaniu klinicznym, wykonanych analizach i wynikach gromadzone są w komputerowej bazie danych (oraz w postaci wydruków). Ze względu na

prawną ochronę danych osobowych dostęp do danych oraz próbek DNA pacjentów ograniczony jest do pracowników laboratorium.

Wstępnym etapem diagnostyki molekularnej jest zatem otrzymanie kwasu nukleinowego z pobranej od pacjenta tkanki. Najczęściej izoluje się DNA, rzadziej całkowity RNA lub mRNA, z krwi obwodowej (pobranej na EDTA), popłuczyn jamy ustnej, bioptatów skóry, trofoblastu, z komórek płynu owodniowego lub innych tkanek. Izolacja kwasu nukleinowego prowadzona jest zazwyczaj nieautomatycznie, techniką ekstrakcji organicznej, poprzez stopniowe wysalania białek lub metodą lizy alkalicznej. DNA można wyodrębnić również ze skrawków parafinowych czy z plam krwi naniesionych na bibułę filtracyjną. W przypadku diagnostyki nowotworów często konieczna jest histologiczna ocena zmian chorobowych w próbce, z której otrzymuje się kwas nukleinowy.

W pojedynczych przypadkach preparaty wymagają dializy dla usunięcia niskocząsteczkowych inhibitorów reakcji PCR (dotyczy to szczególnie reakcji wielokrotnego PCR). Inhibitorami polimeraz termostabilnych są: heparyna, hem z rozbitych erytrocytów, mocznik czy duże ilości RNA. Należy o tym pamiętać, izolując DNA np. z plam krwi.

Wyizolowany DNA w postaci roztworu w buforze TE (około 100-500 µg/µl) przechowywany jest w temperaturze +4°C przez okres do 6 miesięcy lub -20°C przez okresy dłuższe. Po wykonaniu badania próbki DNA nie są nigdy niszczone, lecz gromadzone w temperaturze -20°C. Biopty tkanki nowotworowej oraz roztwory wodne RNA przechowywane są zasadniczo w temperaturze -70°C. Materiał do izolacji DNA w postaci plam krwi na bibule filtracyjnej można przechowywać w zamkniętych torebkach foliowych, suchym miejscu, w temperaturze pokojowej przez lata. Równie trwałe są histologiczne preparaty parafinowe.

Dla celów testów opartych na reakcji PCR do izolacji DNA i RNA stosować można techniki wykorzystujące związki chaotropowe i chromatografię jonowymienną. Inne metody (np. ekstrakcja organiczna), pozwalające uzyskać preparaty o bardzo wysokiej czystości, bądź o większej długości fragmentów, są zbyt pracochłonne i wymagają stosowania szkodliwych odczynników, by stosować je rutynowo. Uzyskanie z tkanki pacjenta kwasu nukleinowego o dobrej jakości jest jednak najważniejsze, gdyż wpływa na poprawność dalszej analizy.

Automatyczna izolacja kwasów nukleinowych, choć powtarzalna i minimalizująca niebezpieczeństwo zanieczyszczeń oraz pomyłek, jest na razie rzadko wykorzystywana ze względu na wysokie koszty. Automatyzacja znajduje natomiast zastosowanie w dalszych etapach analizy.

Istnieje wiele metod wykrywania mutacji, w większości opartych na różnych odmianach techniki PCR. Wybór najodpowiedniejszej metody uzależniony jest od wielu czynników, z których najważniejsze to rodzaj badanego kwasu nukleinowego (RNA, cDNA lub najczęściej genomowy DNA), liczba próbek do przebadania czy różnorodność mutacji odpowiedzialnych za powstanie choroby. Na przykład przebadanie próbki DNA pacjenta z podejrzeniem mukowiscydozy na obecność ok. 20 mutacji w *locus CFTR* umożliwia identyfikację średnio w 90% przypadków. Podobnie jest w przypadku β -talasemii. Jednak już diagnostyka molekularna defektu czynnika V krzepialności krwi czy dziedzicznej hemochromatozy wymaga sprawdzenia obecności tylko jednej lub dwu mutacji. Oczywiście profil mutacji warunkujących konkretną chorobę dziedziczną jest często różny dla różnych

populacji, dlatego dostępne handlowo testy diagnostyczne przygotowane są z myślą o określonej grupie badanych (np. Żydów aszkenazyjskich czy Afroamerykanów).

W diagnostyce molekularnej, przede wszystkim chorób infekcyjnych, wykorzystywane się także inne niż PCR sposoby powielania wyjściowego materiału. Do najpopularniejszych należą reakcje: łańcuchowa ligazy (LCR), reakcja łańcuchowa naprawy (RCR), reakcja transkrypcji aktywowanej przez ligację, system wykorzystujący replikazę faga Φ i inne (10).

W wyborze sposobu wykrywania mutacji duże znaczenie ma koszt badania, szczególnie wysoki we wstępnym etapie wprowadzania nowej techniki lub diagnostyki molekularnej nowej jednostki chorobowej. Koszty obejmują nie tylko przystosowanie laboratorium, nową aparaturę, programy komputerowe, odczynniki, lecz również nakłady związane ze szkoleniem pracowników, czy opłatami licencyjnymi. Wprowadzenie nowych technik wymaga także czasu, przeznaczanego na określenie molekularnego podłoża diagnozowanej choroby genetycznej w konkretnej populacji (spektrum mutacji). Jest to szczególnie istotne w krajach wieloetnicznych (np. USA, Kanada, Holandia).

Większość stosowanych metod wykrywania mutacji innych niż duże delecje, insercje lub ekspansje krótkich powtórzeń sekwencji, opiera się na wykorzystaniu techniki PCR, a następnie różnych wariantów elektroforezy, hybrydyzacji w roztworze lub w fazie stałej, a coraz częściej automatycznego sekwencjonowania. W ciągu ostatnich lat odchodzi się od stosowania znaczników radioaktywnych na rzecz wizualizacji fluorescencyjnej, chemoluminescencyjnej lub kolorymetrycznej. Każda z wspomnianych metod prowadzi do wzmocnienia wyjściowego sygnału i zwiększenia specyficzności detekcji.

Najprostsza metoda rozróżniania alleli prawidłowych od zmutowanych polega na elektroforetycznym wykrywaniu różnic w długości badanych fragmentów DNA. Przykładem są mutacje powodujące CF: najczęstsza w populacji Polskiej $\Delta F508$ oraz częsta delecja eksonów 2 i 3 wykrywane są rutynowo odpowiednio techniką elektroforezy poliakrylamidowej lub agarozowej produktów powielania fragmentów genu *CFTR*. Do identyfikacji różnic wielkości alleli z mutacjami dynamicznymi np. genu *FMR-1* związanego z zespołem łamliwego chromosomu X, wykorzystuje się obecnie zarówno hybrydyzację genomową (w przypadku pełnych mutacji), jak zmodyfikowaną technikę PCR (w przypadku alleli prawidłowych lub niosących premutacje). Istnieją już dostępne handlowo testy oparte wyłącznie na technice amplifikacji DNA.

Mutacje zmiany sensu wymagają dodatkowych metod rozróżnienia fragmentów powielania genu (amplikonów) przed elektroforezą, na przykład trawieniem odpowiednim enzymem restrykcyjnym. W celu wykrycia mutacji nie zmieniającej układu naturalnych miejsc restrykcyjnych konieczne jest wprowadzanie w reakcji PCR sekwencji rozpoznawanej przez restryktazę (*artificially created restriction site*, ACRS).

Identyfikacja mutacji w dużych genach lub w genach w których występuje wiele, różnych mutacji wymaga niekiedy stosowania wielokrotnego PCR (multiplex PCR). Dostępne handlowo zestawy wykrywania kilku-kilkunastu najczęstszych na konkretnym obszarze geograficznym mutacji np. dla mukowiscydozy czy β -talasemii wykorzystują często zasadę hybrydyzacji na nośniku stałym np. technikę odwróconej hybrydyzacji, w której z membraną sprzęgnięte są sondy oligonukleotydowe specyficzne wobec konkretnych mutacji. W

trakcie reakcji PCR z DNA pacjenta do produktów powielania włączane są znaczniki (fluorescencyjne, luminescencyjne lub kolorymetryczne), umożliwiające wykrywanie amplikonów hybrydujących z konkretną sondą. Wszystkie etapy analizy opartej na hybrydyzacji na nośniku można łatwo zautomatyzować i zminiaturyzować, choć do tej pory koszty wdrożenia stanowią przeszkodę w szerokim rozwoju tej technologii.

W przypadku testowania dużej liczby próbek na obecność nielicznych mutacji można zastosować technikę prostej hybrydyzacji, w której powielony fragment badanego genu sprzęgnięty z nośnikiem hybrydowany jest z sondą obecną w roztworze.

W diagnostyce molekularnej istotne jest także rozróżnianie stanu metylacji DNA (np. w przypadku diagnostyki zespołu Angelmana i Williego-Pradera), co można obecnie wykonać techniką PCR.

Identyfikacja mutacji rzadko występujących lub do tej pory nieznanymi wymaga stosowania metod przeglądania sekwencji genu z których najczęściej stosowane są różne odmiany SSCA (analizy polimorfizmu jednoniciowych fragmentów DNA), HA (analizy heterodupleksów) oraz DGGE (elektroforezy DNA w gradiencie czynnika denaturującego). Umożliwiają one zidentyfikowanie fragmentów genu o sekwencji zmienionej w stosunku do sekwencji prawidłowej. Potwierdzenie obecności mutacji wymaga zasadniczo sekwencjonowania tak wybranego fragmentu DNA.

W najbliższej przyszłości coraz szerzej będzie wykorzystywane bezpośrednio, cykliczne fluorescencyjne sekwencjonowanie automatyczne. Już obecnie zastosowanie sekwencjonowania w diagnostyce molekularnej jest uzasadnione ekonomicznie w przypadku poszukiwania mutacji powodujących rzadko występujące choroby genetyczne lub w sytuacjach istotnych klinicznie, gdzie ważne jest szybkie potwierdzenie wstępnego rozpoznania.

Duże nadzieje wiąże się z nową, bardzo szybką, w pełni zautomatyzowaną metodą sekwencjonowania przez hybrydyzację i coraz większą miniaturyzacją (*chip technology, układy scalone DNA*). W obecnym stanie zaawansowania technologie te wykorzystywane są także np. do otrzymywania DNA, reakcji PCR (w czasie krótszym niż 90 sekund) czy wykrywania znanych mutacji techniką sekwencjonowania przez hybrydyzację. Istnieją komercyjne urządzenia do sekwencjonowania wybranych genów i automatycznego odczytywania sekwencji (11).

W zdecydowanej większości przypadków wstępnym etapem analizy RNA jest przepisanie sekwencji na dużo trwalszy i łatwiejszy w badaniu cDNA w reakcji odwrotnej PCR (RT-PCR). Dalsze etapy badania są analogiczne, jak przy analizie genomowego DNA.

Wybór metody i konkretnej techniki identyfikacji mutacji zależy od klinicznego celu diagnostyki molekularnej oraz znajomości zmian sekwencji badanego genu. Nie istnieje zatem jedna i uniwersalna metoda diagnostyczna, przystosowana do wszystkich przypadków.

Identyfikacja mutacji rzadko występujących lub nowych stanowi dodatkowy problem diagnostyczny, bowiem nieznanymi lub słabo poznany jest ich wpływ na fenotyp kliniczny chorego. Diagnostyka molekularna konkretnej choroby uwarunkowanej genetycznie wymaga zatem wstępnej identyfikacji zmian sekwencji badanego genu w możliwie dużej grupie chorych oraz wśród osób reprezentujących populację ogólną. Duże znaczenie ma również analiza funkcjonalnego znaczenia mutacji np. techniką analizy *in vitro* produktów transkrypcji lub translacji.

Istotna jest poprawna interpretacja otrzymanego wyniku analizy. Gdy analiza wykonywana jest przez personel techniczny, obraz prążków elektroforetycznych, rezultat sekwenjonowania czy hybrydyzacji powinny zostać odczytane przez dwie osoby niezależnie i dopiero ich zgodna interpretacja upoważnia do przygotowania raportu końcowego. Wynik badania, przekazywany lekarzowi zlecającemu powinien zostać podpisany przez osobę wykonującą badanie oraz osobę sprawdzającą poprawność wyniku i interpretacji (kierownika pracowni). Duże znaczenie ma jasność, ścisłość i jednoznaczność podawanych informacji, tak by można je zrozumieć bez pogłębionej znajomości genetyki.

Większość testów molekularnych cechuje bardzo wysoka wykrywalność mutacji oraz specyficzność. Żaden z testów nie osiąga jednak 100% czułości. Jest to spowodowane względami zasadniczymi, na przykład możliwą zmiennością miejsc przyłączania starterów PCR uniemożliwiająca powielenie jednego z alleli badanego genu. Drugą przyczyną są błędy wykonania, odczytu lub interpretacji wyniku.

Ponieważ negatywny wynik testu molekularnego powoduje zmianę wstępnego rozpoznania lub oceny ryzyka choroby, wymaga on szczególnie wnikliwej interpretacji. Często konieczne jest porównanie otrzymanego wyniku z rezultatami innych testów (biochemicznych, immunologicznych), badań antropometrycznych oraz z obrazem klinicznym chorego. Identyfikacja mutacji u pacjenta wymaga niekiedy określenia, czy mutacja taka występuje i z jaką częstością w populacji ogólnej (lub grupie etnicznej do której należy badany).

1.2. WYBRANE CHOROBY UWARUNKOWANE GENETYCZNIE

Hiperfenyloalaninemia oraz galaktozemia zostały wybrane jako modelowe, jednogennowe choroby autosomalne recesywne. Są to jedne z najczęściej występującymi w populacji polskiej chorób uwarunkowanych genetycznie, odpowiednio: 1: 8000 oraz 1:40.000 żywych urodzeń.

Diagnostyka molekularna nie jest dziedziną autonomiczną, lecz wymaga bardzo dobrego współdziałania lekarza oraz genetyka. Wynik analizy molekularnej powinien być zawsze zinterpretowany w kontekście pełnego obrazu klinicznego pacjenta. Wymóg ten jest szczególnie istotny we wstępnym okresie wprowadzania nowych metod diagnostycznych. Instytut Matki i Dziecka (IMiD) od lat sześćdziesiątych jest ośrodkiem o znaczeniu ogólnokrajowym diagnostyki biochemicznej i leczenia hiperfenyloalaninemii oraz galaktozemii. Również z tego punktu widzenia wybór chorób nie był przypadkowy.

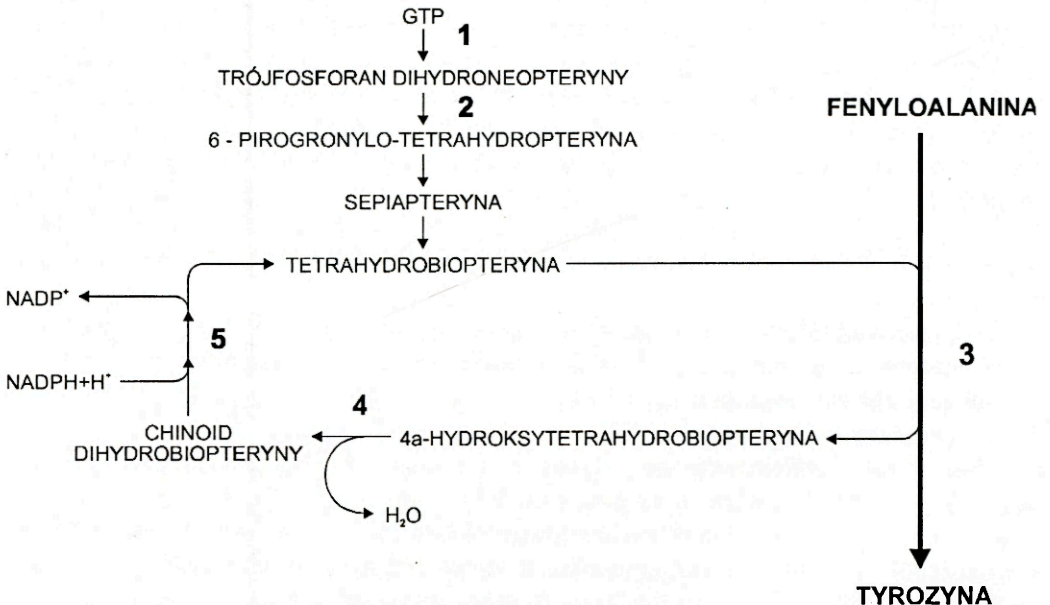
W Polsce hiperfenyloalaninemia wykrywana jest w pourodzeniowym teście przesiewowym (pierwotnie test Guthrie'ego, a obecnie ilościowe oznaczanie kolorymetryczne fenyloalaniny) (12).

Badania przesiewowe w kierunku galaktozemii nie są w Polsce wykonywane. Oznaczana jest jedynie aktywność enzymu, którego deficyt jest najczęstszą przyczyną galaktozemii (urydylilotransferazy galaktozo-1-fosforanowej, GALT) w erytrocytach dzieci z podejrzeniem klinicznym galaktozemii. Nie wykonuje się różnicowej diagnostyki biochemicznej poszczególnych postaci galaktozemii. Dokładniejsze określenie charakteru choroby, stopnia jej ostrości czy przewidywanie dalszego rozwoju dziecka nie jest możliwe bezpośrednio po wstępnym rozpoznaniu, lecz wymaga długotrwałej obserwacji i badań pośrednich.

Diagnostyka molekularna umożliwiła szybkie potwierdzenie rozpoznania wstępnego, jak również przewidywanie rozwoju obrazu klinicznego w oparciu o zidentyfikowany genotyp (13).

1.2.1. Metaboliczna różnorodność hiperfenyloalaninemii

Dziedziczna hiperfenyloalaninemia (HPA) obejmuje grupę chorób powodowanych uszkodzeniem jednego ze składników systemu katabolizmu fenylalaniny (ryc. 1). Wspólną cechą HPA jest trwale podwyższone stężenie fenylalaniny we krwi i płynach ustrojowych. W prawie 98% przypadków defekt dotyczy hydroksylazy fenylalaninowej (PAH), a w pozostałych enzymów związanych z biosyntezą lub metabolizmem kofaktora reakcji przekształcania fenylalaniny w tyrozynę (por. ryc. 1). Wszystkie postaci HPA dziedziczone są w sposób autosomalny recesywny (14).



Ryc.1. Schemat enzymatycznego systemu hydroksylacji fenylalaniny.

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

Tetrahydrobiopteryna (BH_4) jest kofaktorem nie tylko hydroksylazy fenylalaninowej, lecz również hydroksylazy 3-tyrozynowej oraz hydroksylazy 5-tryptofanowej, które są kluczowymi enzymami szlaków biosyntezy neurotransmiterów (dopaminy i serotoniny). Stąd defekt enzymów związanych z utrzymywaniem właściwego poziomu BH_4 prowadzi do hiperfenyloalaninemii której towarzyszy deficyt amin biogennych.

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

Podstawowym, noworodkowym testem przesiewowych w kierunku HPA był do 1998 roku test Guthriego. Obecnie stosuje się test kolorymetryczny, umożliwiający precyzyjne oznaczenia stężenia fenylalaniny we krwi. Jednoczesne oznaczenie poziomów fenylalaniny i tyrozyny możliwe jest np. metodą fluorymetryczną. Nieprawidłowy wynik wymaga dalszej diagnostyki różnicującej dwie zasadnicze postaci HPA. Na deficyt BH_4 wskazuje pozytywny wynik testu doustnego obciążenia kofaktorem. Dalsza diagnostyka wymaga oznaczenia stężenia biopteryny i neopteryny w moczu oraz w miarę możliwości w płynie mózgowo-rdzeniowym, dla dokładnego wskazania defektywnego enzymu oraz postaci choroby (15).

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

Objawom choroby zapobiega się poprzez stosowanie diety niskofenyloalaninowej o różnym zakresie (deficyt PAH), przez doustne podawanie BH_4 (deficyt GTP-CH lub PTPS) lub łączne stosowanie diety i uzupełnianie kofaktora (DHPR). W deficytach BH_4 , w celu przywrócenia równowagi neurotransmiterów podaje się również prekursor dopaminy i serotoniny (16, 17).

1.2.2. Molekularne podłoże klinicznej heterogenności HPA

U podstaw dziedzicznej HPA leży uszkodzenie genów kodujących enzymy systemu hydroksylacji fenylalaniny. Znana jest zarówno lokalizacja chromosomowa, jak sekwencja wszystkich genów, których mutacje powodują HPA.

Rozwój i upowszechnienie w medycynie metod biologii molekularnej umożliwiły poznanie mutacji powodujących różne postaci HPA. Okazało się, że u podstaw heterogenności form klinicznych HPA leży heterogenność na poziomie molekularnym. Zidentyfikowano szereg mutacji w genach kodujących hydroksylazę fenylalaninową (*PAH*), cyklohydrolazę I GTP (*GTPCH*), syntazę 6-pirogronilotetrahydrobiopterynową (*PTS*) oraz reduktazę tetrahydrobiopterynową (*DHPR*). Wiele z mutacji, zwłaszcza w genie *PAH* i *PTS*, powiązano z konkretnymi fenotypami biochemicznymi i klinicznymi chorych. Diagnostyka molekularna stanowi zatem dodatkowe narzędzie ułatwiające lekarzowi wybór i planowanie optymalnego dla danego chorego sposobu leczenia (18).

1.2.3. Mutacje w genie *PAH*

W obrębie HPA powodowanej mutacjami w genie *PAH* wyróżnić można trzy zasadnicze postaci kliniczne: klasyczną PKU, łagodną PKU oraz łagodną HPA (19).

Tabela. I. Uproszczona klasyfikacja hiperfenyloalaninemii wynikającej z defektu genu *PAH*

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

Do połowy 2000 roku zidentyfikowano ponad 400 mutacji w genie *PAH*. Różne mutacje w różnym stopniu ograniczają aktywność hydroksylazy fenylalaninowej, można wyróżnić jednak w ich obrębie trzy grupy: mutacje silne (S), łagodne (Ł) i pośrednie (P).

Obydwa zmutowane allele *PAH* kodują podjednostki hydroksylazy, które wspólnie tworzą aktywny katalitycznie tetramer. Heterogenność postaci klinicznej HPA zależy zatem również od tego, które mutacje spotkają się u chorego. Kombinacja dwu mutacji S powoduje zawsze klasyczną PKU. Dwie mutacje Ł - fenotyp prawidłowy lub niekiedy łagodną HPA. Połączenie mutacji Ł i S łagodną HPA, a mutacji S i P łagodną PKU. Dwie mutacje P prowadzą najczęściej do łagodnej HPA.

1.2.4. Mutacje w genie *PTS*

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

Podobnie jak w deficycie hydroksylazy fenylalaninowej, również w tym przypadku przyczyną różnorodności objawów jest wielość mutacji oraz tetrameryczna budowa enzymu. Dotychczas zidentyfikowano ponad 40 mutacji w genie *PTS*. Liczba chorych z określonym genotypem w *locus PTS* pozostaje nadal niewielka, dlatego nie ustalono zbyt wielu związków między konkretnymi mutacjami a fenotypem klinicznym chorych. Badania ekspresji mutacji *in vitro* wskazują jednak, że niektóre mutacje pozostawiają znaczącą aktywność resztkową enzymu (np. R16C, V56M) (20).

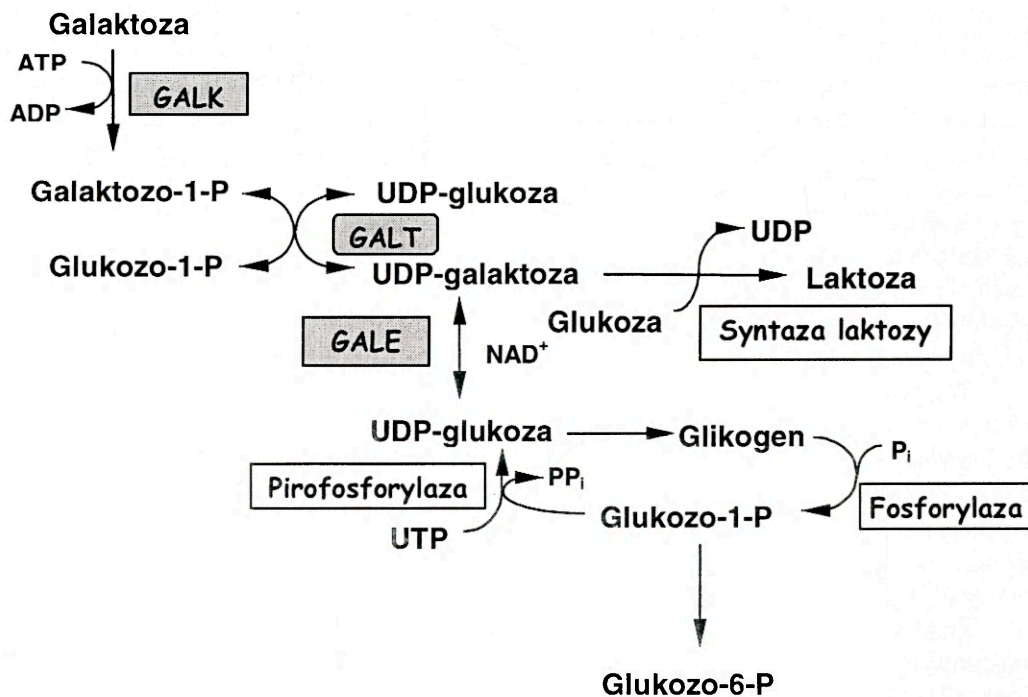
W przypadku deficytu PTPS wykryto pewne odstępstwa od dziedziczenia autosomalnego recesywnego. Niektórzy nosiciele jednego, zmutowanego allelu *PTS* wykazują objawy deficytu kofaktora (np. niskie poziomy aktywności PTPS czy nieprawidłowy profil pteryn w moczu). Wydaje się, że nieliczne mutacje w genie *PTS* są tzw. mutacjami negatywnie dominującymi. Powodowane przez nie podstawienia aminokwasowe wpływają niekorzystnie na współdziałanie podjednostek syntazy, zmniejszając aktywność tetrameru zbudowanego z podjednostek tworzonych na matrycach obu alleli genu *PTS*.

1.2.5. Galaktozemia powodująca defekty trzech enzymów

Galaktoza jest heksozą występującą najpowszechniej w połączeniu z glukozą jako dwucukier laktoza. Obecna jest w wielu produktach spożywczych: w dużych ilościach w mleku, naturalnym pokarmie noworodków i niemowląt, a w nieco mniejszym stopniu obecna jest w pokarmie starszych dzieci i dorosłych.

Znane są trzy dziedziczne defekty enzymatyczne (galaktozemia), uniemożliwiające prawidłowe wykorzystanie galaktozy przez organizm człowieka (por. ryc. 2). Najczęstsza galaktozemia, klasyczna, wynika z braku lub niepełnej aktywności urydylotransferazy galaktozo-1-fosforanowej (GALT). Dużo rzadsze są niedobory galaktokinazy (GALK) lub 4-epimerazy urydynodifosfogalaktozowej (GALE). Wszystkie formy choroby dziedziczne są w sposób autosomalny recesywny (21-23).

Objawy kliniczne galaktozemii pojawiają się w pierwszych dniach życia i karmienia noworodka. W większości przypadków przebieg kliniczny jest burzliwy. Dominują objawy uszkodzenia wątroby – żółtaczka, skaza krwotoczna, wodobrzusze, uogólnione obrzęki, hepatomegalia. Niekiedy występują wymioty, biegunki, wyniszczenie, skłonność do zakażeń, tubulopatia, zaćma. Obraz choroby w tym okresie jest bardzo różnorodny. W później-



Ryc. 2 Schemat katabolizmu galaktozy. Niezdolność do metabolizowania galaktozy może być spowodowana brakiem lub niepełną aktywnością trzech enzymów. Przy niedoborze GALT, aktywność epimerazy umożliwia tworzenie UDPgal z glukozy. Dzięki temu możliwe jest stosowanie diety wolnej od galaktozy.

szym okresie mogą wystąpić powikłania w postaci stanów hipoglikemicznych czy hiperbilirubinemii prowadzącej do żółtaczki jąder podstawy mózgu. Dalsze podawanie galaktozy w większości przypadków prowadzi do zgonu w ciągu kilku- kilkunastu dni.

W klasycznej galaktozemii o łagodnym przebiegu oraz u starszych, nie leczonych dzieci, obserwowana jest hepatomegalia z cechami marskości wątroby, rozwój zaćmy, upośledzenie rozwoju umysłowego. Ten klasyczny zespół objawów, choć daleko mniej nasilony, spotykany jest także u chorych leczonych.

Leczenie galaktozemii polega na wyeliminowaniu z diety galaktozy i obowiązuje przez całe życie. Dieta eliminacyjna w ostrym okresie choroby jest bardzo skuteczna: ustąpienie objawów uszkodzenia wątroby obserwuje się w ciągu kilku dni. Dieta nie zapobiega jednak w pełni wystąpieniu objawów późnych, tak że rozwój umysłowy większości chorych nie jest w pełni zadowalający. Występują zaburzenia zachowania, percepcji wzrokowej, opóźnienia rozwoju mowy, trudności w nauce. U części chorych pojawiają się objawy neurologiczne, u niektórych (mimo leczenia) rozwija się zaćma, u dziewczynek dysfunkcja jajników (24-26).

Brak aktywności GALT prowadzi do podwyższenia galaktozy i jej metabolitów: galaktozo-1-fosforanu i galaktitolu w tkankach i płynach ustrojowych. Związki te odgrywają zasadniczą rolę w pojawianiu się wczesnych objawów galaktozemii. Późne skutki choroby, przede wszystkim o charakterze neurologicznym, wynikają najprawdopodobniej z niedoboru UDP-galaktozy, prowadzącego do zakłócenia galaktozylacji glikoprotein i glikolipidów. Zakłóceniu ulegają również procesy fosforylacji (27). Przyjmuje się, że niepełna skuteczność diety eliminacyjnej w późniejszym okresie życia chorych wynika ze spożywania galaktozy obecnej w tzw. ukrytych źródłach (owoce, warzywa) oraz endogennej produkcji galaktozy i galaktozo-1-fosforanu (28).

Deficyt GALT powodować może zmiany już w okresie płodowym: zaćmę wrodzoną, uszkodzenia jajników oraz wątroby. Przypuszcza się, że wiele nieprawidłowości ujawniających się w późniejszym okresie życia chorych może mieć swój początek w okresie życia płodowego. Ponieważ galaktoza łatwo przenika przez łożysko duże znaczenia ma utrzymywanie przez kobietę ciężarną diety bezmlecznej.

Wspomniane mechanizmy patogenezы są jednakowe u wszystkich chorych. Jednak skutek ich działania może być różny u różnych osób. Różnice w obrazie klinicznym choroby ujawniają się już u noworodków, ale są szczególnie wyraźne w późniejszych okresach życia. Postulowane do niedawna czynniki prognostyczne w galaktozemii takie jak wiek rozpoznania, przebieg choroby w okresie noworodkowym czy jakość diety, mają ograniczone znaczenie. Przyjmuje się, że różnorodność przebiegu klinicznego w pewnej mierze warunkuje rodzaj mutacji w genie kodującym urydilotransferazę (*GALT*) (29).

Znanych jest obecnie ponad 180 mutacji w genie *GALT*. Niektóre z nich powiązано z łagodnym przebiegiem choroby (np. mutacje T138M, S135L, R259W). Znalaziono również wiele polimorfizmów wewnątrzgenowych, których występowanie towarzyszy łagodnym postaciom galaktozemii. Wydaje się, że polimorfizmy owe są jedynie markerami istotnych przyczynowo mutacji leżących w ukrytych sekwencjach genu *GALT* lub poza nim.

Funkcjonalna GALT jest homodimerem i występuje w kilku izoformach polimorficznych, które najłatwiej wykryć na podstawie różnic w ruchliwości elektroforetycznej. Naj-

częstsze warianty polimorficzne to: Duarte-1 (D-1), o normalnej lub zwiększonej aktywności enzymatycznej oraz Duarte-2 (D-2, o aktywności 35-45% normy (30). Pierwszy z nich powodowany jest obecnością mutacji N314D oraz L218L w tym samym allelu (*in cis*). D-2 związany jest z mutacją N314D, której towarzyszą *in cis* polimorfizmy G1105C i G1391A. Chory noszący jedną mutację silną oraz drugi allel D-2 charakteryzuje się aktywnością GALT rzędu 25% (31).

Wydaje się, że mutacja N314D nie jest bezpośrednią przyczyną zmniejszenia aktywności GALT. Po pierwsze jest to jedyna mutacja, obecna w dwu zasadniczo różnych allelach (D-1 i D-2), o przeciwnym wpływie na aktywność transferazy. W wielu przypadkach sekwencjonowano całą sekwencję kodującą genu nie znajdując innych zmian. Ponadto oznaczenie wpływu mutacji N314N w dwu układach *in vitro* (ssaczym i drożdżowym) nie wykazało zmniejszenia aktywności zmutowanego enzymu (32, 33). Sugerowano, iż mutację N314D można traktować jako marker sprzężony z mutacją (*ami*) położoną (*ymi*) poza regionem kodującym genu *GALT* lub nawet poza samym genem. Mutacja N314D wpływać może także na syntezę, składanie, rozpad lub aktywność translacyjną mRNA *GALT*. Taką sugestią uprawdopodobnia obserwacja, iż allel D-2 powoduje ograniczenie aktywności GALT poprzez zmniejszenie stężenia enzymu w komórce (34).

Ostatnio prowadzone badania zdają się jednak wskazywać, iż mutacja N314D zmniejsza stabilność białka GALT w ludzkich limfoblastach, nie wpływając na mRNA genu *GALT* (35).

Wykazano, że niedobór GALT rzędu 50% może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem endometriozy i agenezji pochwy (36, 37). Zaburzenia w budowie dróg rodnych obserwowano także u nosicielek mutacji Q188R.

GALT ulega ekspresji we wszystkich tkankach, choć w zróżnicowanej ilości. Najwyższe poziomy obserwuje się w wątrobie, jajnikach, mózgu i erytrocytach. Najwyższa aktywność transferazy ma miejsce w okresie perinatalny, co może być związane m.in. z zachodzącą w tym okresie mielinizacją neuronów (38).

1.3. OKREŚLANIE KORELACJI POMIĘDZY GENOTYPEM, A FENOTYPEM KLINICZNYM

„Siłę” mutacji określać można w różnych układach ekspresji *in vitro*. Sposób polega na sztucznym wprowadzeniu do sekwencji kodującej (cDNA) np. genu *PAH* konkretnej mutacji. W odpowiednich warunkach na matrycy tak zmienionego DNA, powstaje mRNA i białko hydroksylazy. Aktywność powstałego enzymu można oznaczać standardowymi metodami i porównać z aktywnością natywnej hydroksylazy.

Siłę mutacji można określać również klinicznie (*in vivo*): porównując fenotypy chorych z oznaczonymi genotypami w genie powodującym chorobę (39, 40). Warunkiem powodzenia jest oczywiście poznanie genotypów dostatecznie dużej liczby chorych i powiązanie zidentyfikowanych mutacji z szeregiem wskaźników stosowanych w klasyfikacji postaci diagnozowanej choroby. Najczęściej określa się stężenie fenyloalaniny we krwi po urodzeniu (fenotyp biochemiczny), tolerancję fenyloalaniny w pożywieniu, tzn. ilość feny-

loalaniny w przeliczeniu na dzień i kilogram masy ciała, która nie podnosi poziomu fenyloalaniny we krwi poza pożądane z klinicznego punktu widzenia granice określone dla konkretnego wieku chorego (fenotyp metaboliczny), profil eliminacji fenyloalaniny po doustnym podaniu białka lub samego aminokwasu. Ważne jest również określenie zależności od wieku ilorazu rozwoju (DQ) lub ilorazu inteligencji (IQ), możliwych objawów neurologicznych czy zmian w obrazie MRI.

W pracy tej, w przypadku klasyfikacji form HPA, posługiwano się wskazówkami opracowanymi przez Güttlera (41). Klasyfikacja postaci galaktozemii oparta była zasadniczo na określeniu aktywności GALT w erytrocytach osób chorych.

Analiza *in vitro* mutacji powodujących różne formy HPA jest chyba najbardziej zaawansowana, w porównaniu z innymi chorobami dziedzicznymi. Wynika to po części ze względnej łatwości badania aktywności PAH *in vitro* (w porównaniu np. z GALT), oraz z istnienia od początku lat dziewięćdziesiątych światowego rejestru mutacji w genie *PAH*. Polscy lekarze i biologowie molekularni (B. Cabalska, M. Giżewska, J. Jaruzelska, M. Nowacka, C. Żekanowski) od prawie 10 lat uczestniczą w wymianie danych w ramach projektów koordynowanych przez *PAH Mutation Analysis Consortium* oraz od 3 lat w projektach: *International Database of Tetrahydrobiopterin Deficiencies*. (B. Cabalska, M. Giżewska, M. Nowacka, C. Żekanowski) i *GALT Mutation Database* (B. Radomska, C. Żekanowski) (42-44). Wszystkie zidentyfikowane w populacji polskiej mutacje oraz określone korelacje genotypu z fenotypem klinicznym są na bieżąco zgłaszane do wymienionych, dostępnych internetowo, baz danych. Dzięki tym i podobnym inicjatywom obejmującym wiele chorób dziedzicznych, możliwa jest szybka interpretacja kliniczna identyfikowanych genotypów (45). Możliwa staje się także integracja danych klinicznych, molekularnych i krystalograficznych, która już w niedalekiej przyszłości zaowocować może powstaniem funkcjonalnych map hydroksylazy fenyloalaninowej i urydyliłotransferazy galaktozo-1-fosforanowej.

2. CEL PRACY

Zasadniczym celem pracy było poznanie podłoża molekularnego wybranych chorób uwarunkowanych genetycznie (hiperfenyloalaninemii i galaktozemii) oraz określenie związków między genotypem a fenotypem klinicznym chorych.

Zadaniem praktycznym było ustalenie zasadności stosowania diagnostyki molekularnej, opracowanie podstaw dla rutynowego identyfikowania mutacji powodujących wspomniane choroby oraz wybór optymalnych dla laboratorium referencyjnego technik diagnostycznych. Zadania te wymagały wstępnego ustalenia zakresu mutacji występujących u badanych chorych w populacji polskiej.

Podjęto także próbę oceny stanu obecnego i nakreślenia kierunku przyszłych zmian w dziedzinie diagnostyki molekularnej dla celów klinicznych w Polsce.

3. PACJENCI, MATERIAŁY I METODY

3.1. PACJENCI

Przebadano próbki DNA pochodzące od 85 dzieci z łagodną HPA, 22 dzieci z łagodną PKU, 2 chorych z klasyczną PKU, 7 z deficytem PTPS oraz 83 z deficytem GALT oraz 4 z podejrzeniem defektu GALE.

Pacjenci znajdują się pod opieką Kliniki Pediatrii Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie (prof. Barbara Cabalska, dr Maria Nowacka, dr Barbara Radomska), II Kliniki Pediatrii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie (dr Maria Giżewska), Kliniki Pediatrii Akademii Medycznej w Gdańsku (dr Jolanta Ulewicz-Filipowicz) oraz Poradni Genetycznej *Collegium Medicum* UJ w Krakowie (dr Ewa Kostyk).

Wszystkie rodziny wyraziły zgodę na wykonanie diagnostyki molekularnej.

3.2. IZOLACJA I OCZYSZCZANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

DNA izolowano z leukocytów krwi obwodowej (analiza genów *GALT*, *GALE*, *PAH*, *PTS*, *GTPCH*, *PCDH*) lub hodowli fibroblastów (gen *PTS*) metodą stopniowego wysalania białek komórkowych lub stosując zestaw QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagene). Do wyodrębniania mRNA używano Oligotex Direct mRNA Kit (Qiagene). Plazmidowy DNA izolowano z użyciem zestawu QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagene).

Stężenie i czystość preparatów DNA i RNA w razie potrzeby oznaczano spektrofotometrycznie i elektroforetycznie wg Sambrooka i wsp. Niekiedy DNA dializowano metodą kroplową: roztwór DNA nanoszono bezpośrednio na powierzchnię filtrów z PVDF o średnicy porów $\leq 0,025 \mu\text{m}$ (Millipore).

3.3. SPOSOBY POSZUKIWANIA MUTACJI

W genomowym DNA mutacji poszukiwano stosując technikę nieizotopowej analizy konformacyjnej pojedynczej nici DNA (*single stranded conformational analysis*, SSCA) oraz poprzez analizę heterodupleksów w żelu poliakrylamidowym i MDE (*mutation detection enhanced*, firmy FMC), po amplifikacji odpowiednich fragmentów DNA tech-

niką PCR. Żele barwiono metodą srebrową lub bromkiem etydy. Odcinki DNA o zmiennej ruchliwości elektroforetycznej poddawano bezpośrednio, fluorescencyjnemu sekwencjonowaniu cyklicznemu. Najczęściej jednak sekwencjonowano poszczególne eksony genu *PAH* w kolejności odpowiadającej rozkładowi częstości mutacji w sekwencji genu.

Mutacji poszukiwano również w sekwencji kodującej genu *PTS* stosując RT-PCR z całkowitym RNA komórkowym lub mRNA. Uzyskany cDNA poddawano bezpośrednio, fluorescencyjnemu sekwencjonowaniu cyklicznemu (46).

Niekiedy mutacje znane, w genach *PAH* i *GALT*, poszukiwano stosując metodę PCR-RFLP oraz ACRS (wg. Żekanowskiego i wsp. 1995 oraz Kozaka i wsp. 2000) (47).

3.3.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Powielanie DNA wykonywano w termocyklarach firmy MJ Research (PCT 100 i PCT 200). Reakcje prowadzono w warunkach standardowych (temperatura przyłączenia 56-58°C), w buforze dostarczonym przez producenta polimerazy Taq. W przypadku powielania eksónów genu *GALT* i *GALE* stosowano polimerazę Taq firmy Qiagene z buforem Q oraz temperaturę przyłączenia 60°C.

Przy powielaniu eksónu 1 genu *PTS* prowadzono dwie rundy PCR (48). W pierwszej reakcji temperatura przyłączenia wynosiła 54°C. Powstający fragment o właściwej wielkości wycinano z żeli agarozowego i oczyszczano stosując QiaEx II (Qiagene). Około 1/50 oczyszczonego produktu powielano powtórnie z tymi samymi starterami, stosując temperaturę 65°C (49). Stosowano także startery podane w pracy Romstad i wsp (50).

Sekwencje starterów do reakcji PCR i sekwencjonowania projektowano także w oparciu o dostępne w bazach danych sekwencje DNA lub stosowano startery dostępne w literaturze. Sekwencje starterów używanych przy powielaniu i sekwencjonowaniu eksónów genów *PAH* i *GALT* podano w *Uzupełnieniach*.

Produkty PCR oddzielano od niewykorzystanych w reakcji starterów stosując technikę selektywnej adsorpcji na membranie z żelu krzemionkowego (QIAquick Spin PCR Purification Kit, Qiagene) lub techniką ultrafiltracji membranowej (Microcon 100 lub 30, Amicon).

3.3.2. Analiza polimorfizmu konformacyjnego jednoniciowego DNA (SSCA)

Analizę SSCA prowadzono w aparacie firmy Pharmacia (Phast System) zasadniczo zgodnie z zaleceniami producenta (12.5% natywny żel poliakrylamidowy) lub w 8% żelu poliakrylamidowym w aparacie firmy Hoeffer.

Produkty powielania poszczególnych fragmentów genu denaturowano w temperaturze 94°C przez 3 min., w buforze zawierającym dejonizowany formamid (50% v/v) oraz barwniki elektroforetyczne, a następnie chłodzono w lodzie przez 5 min. Próbkę poddawano elektroforezie w ustalonych eksperymentalnie warunkach dla każdego z fragmentów DNA. Na przykład dla większości eksónów genu *PAH* w aparacie Phast System elektroforezę prowadzono przez 250-300 Vh, przy 400V i 2.5W, w temperaturze 7-15°C. Dla

8% żelu poliakrylamidowego wg. Sambrooka rozdział prowadzono przez 16 godz., przy 15-20 V/cm, w 8-10°C.

Jako kontrolę stosowano produkty powielania odpowiednich fragmentów o znanej sekwencji.

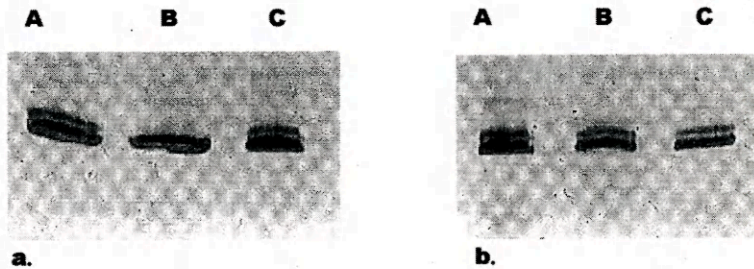


Ryc. 3. Wyniki SSCA powielania eksonu 11 genu PAH siedmiu chorych z łagodną HPA. Dla próbek oznaczonych numerami 5 i 7 stwierdzono zmiany w obrazie prążków SSCP. Odpowiadają one kolejno: polimorficznemu podstawieniu L385L oraz mutacji łagodnej T380M.

3.3.3. Analiza heterodupleksów (HA)

Analizę heterodupleksów (*heteroduplex analysis*, HA) prowadzono w aparacie Phast System oraz w żelach poliakrylamidowych i MDE w aparacie firmy Hoeffer (odpowiednio: HA i HA-MDE).

HA-MDE prowadzono w żelu MDE 1x bez dodatku mocznika, zasadniczo zgodnie z zaleceniami producenta. Odpowiednie produkty PCR mieszano ze sobą w równych molarnej ilościach, denaturowano termicznie i chłodzono przy spadku temperatury 1° / minutę do 37°C. Po dodaniu barwników elektroforetycznych próbki rozdzielano przy 20 V/cm przez noc w temperaturze pokojowej.



Ryc. 4. Identyfikacja mutacji K258N metodą HA. Przed rozdziałem elektroforetycznym powielony, badany ekson 9 genu *GALT* trzech chorych hybrydyzowano z odpowiadającym mu produktem PCR nie niosącym mutacji (a) lub z produktem PCR niosącym mutację K285N w układzie homozygotycznym (b). Ścieżka B: brak mutacji K258N. Ścieżki A i C: mutacja K285N w jednym allelu genu *GALT*.

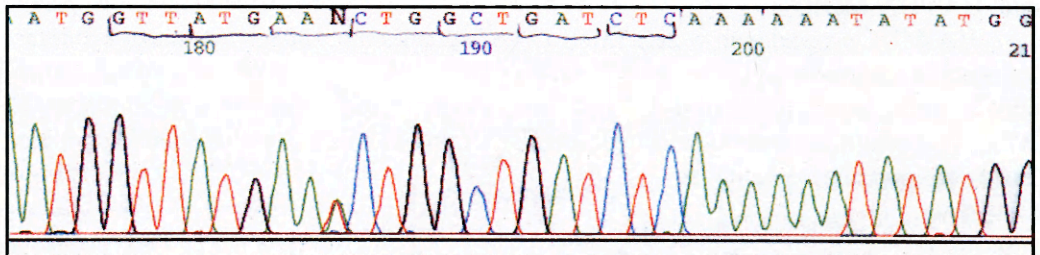
3.3.4. Analiza transkryptów (RT-PCR)

Całkowity mRNA izolowano z hodowli fibroblastów lub z leukocytów krwi obwodowej stosując Oligotex Direct mRNA Kit (Qiagene). Możliwe śladowe ilości DNA usuwano przez trawienie DNaząI. Syntezę pierwszej nici cDNA prowadzono ze starterem oligo(T), stosując SuperScript Preamplification System (Stratagene). Następnie cDNA genu *PTS* powielano w reakcji PCR stosując startery PTPS11 i PTPS12 (wg. Thony'ego i wsp. 1994) w warunkach standardowych.

3.3.5. Sekwencjonowanie

Oddzielone od niewykorzystanych w reakcji PCR starterów powielone fragmenty genów sekwencjonowano stosując zestaw DNA Sequencing Kit (PE Biosystems) zasadniczo zgodnie z zaleceniami producenta, podwyższając jedynie temperaturę przyłączania startera do 58°C) oraz automatyczny sekwenator ABI 310 (PE Biosystems). Produkty oddzielano od niewykorzystanych fluorescencyjnych terminatorów stosując ultrafiltrację żelową (Centri Sep, firmy PE Biosystems) lub wytrącanie etanolem w obecności jonów Mg^{2+} .

Produkty reakcji sekwencjonowania rozdzielano w automatycznym, kapilarnym sekwenatorze ABI 310 (PE Biosystems). Przy analizie wyników wykorzystywano program Sequencing Analysis 3.0 oraz Sequence Navigator (Macintosh), będące częścią oprogramowania użytkowego ABI 310.



Ryc. 5. Wynik sekwencjonowanie eksonu 4 genu *PTS* ze zidentyfikowaną nową mutacją N72L (c.216 T→A).

3.4. EKSPRESJA *IN VITRO* MUTACJI R68G I R68S

Mutagenezę *in vitro* przeprowadzono wykorzystując zestaw Quick Change (Stratagene), zgodnie z zaleceniami producenta.

Analizę ekspresji w komórkach *Escherichia coli* prowadzono z użyciem plazmidu ekspresyjnego pMAL-c2. Plazmid obejmuje gen kodujący białko fuzyjne, złożone z PAH oraz białka wiążącego maltozę (*maltose binding protein*, MBP). Aktywność PAH mierzono poprzez przekształcenie ^{14}C -Phe to ^{14}C -Tyr w nieoczyszczonym lizacie komórkowym oraz

jako aktywność białka fuzyjnego po oczyszczeniu przez chromatografię powinowactwa na złożu zawierającym amylozę. W reakcji testowej stosowano sztuczny kofaktor reakcji hydroksylacji: 6-metylotetrahydrobiopterynę (6MPH₄). Radioaktywne aminokwasy wykrywano techniką chromatografii cienkowarstwowej i autoradiografii, a wyniki analizowano stosując system dokumentacji danych Gel Doc (BioRad). Kontrolę pozytywną stanowił plazmid pMAL-c2 z sekwencją PAH typu dzikiego.

Całkowity lizat komórkowy oraz oczyszczone białko fuzyjne analizowano stosując SDS/PAGE. Białko fuzyjne zmutowane oraz prawidłowe przenoszono następnie na membranę nylonową metodą elektroblottingu i mierzono immunoreaktywność, stosując oczyszczone mysie przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw hydroksylazom: tryptofanowej, tyrozynowej i fenyloalaninowej (Pharmingen). Wyniki analizowano stosując system dokumentacji danych Gel Doc (BioRad).

Analizę ekspresji w małych komórkach COS prowadzono z zastosowaniem ludzkiego wektora ekspresyjnego pRc/CMV. Komórki COS transfekowano stosując lipofektynę (BRL). Komórki transfekowano normalnym lub zmutowanym konstruktem oraz jednocześnie cDNA β -galaktozydazy. We wszystkich przypadkach wydajność transfekcji była porównywalna, co sprawdzono analizując aktywność β -galaktozydazy w komórkach.

Aktywność PAH mierzono w nie oczyszczonym ekstrakcie komórkowym, jak poprzedni, stosując naturalny kofaktor reakcji: tetrahydrobiopterynę (BH₄). Wielkość oraz immunoreaktywność powstającego białka analizowano jak podano wyżej.

4. WYNIKI

4.1. GEN PAH

4.1.1. Mutacje w genie PAH zidentyfikowane w badanej grupie chorych

Przebadano próbki DNA pochodzące 22 dzieci z łagodną PKU od oraz od 79 dzieci z łagodną HPA. Wyniki podano w tabeli II i III.

Tabela. II. Mutacje zidentyfikowane w grupie 22 chorych z łagodną postacią PKU (n = 44 allele).
Mutacje „pośrednie” zacięziono. Mutacje zidentyfikowane po raz pierwszy w badanej grupie opatrzone gwiazdką.

mutacja	położenie	częstość (%)	uwagi
R408W	E12	25	
E390G	E11	13,6	
Y414C	E12	9,1	
A104D	E3	9,1	
R241H	E7	6,8	
IVS10	I10	6,8	
R243Q	E7	4,5	
L48S	E2	2,3	
F55fs	E2	2,3	
*R68G	E3	2,3	
R68S	E3	2,3	
*I95F	E3	2,3	
IVS4	I4	2,3	
R158Q	E5	2,3	
*D222G	E6	2,3	pośrednia?
*Q226H	E6	2,3	
R261Q	E7	2,3	pośrednia?
ΔT322	E9	2,3	
V388M	E11	2,3	
		Σ = 100	

mutacje nowe: R68G = c.202A→G; I95F = c.283A→T D222G = c.665 A→G; Q226H = c.678G→C;
IVS4 = c.442-1g→a; IVS10 = c.1066-11g→a;

Tabela III. Mutacje zidentyfikowane w grupie 79 chorych z łagodną postacią HPA (n = 158 alleli). Mutacje „łagodne” zaciemniono, a „pośrednie” zaznaczono. Mutacje zidentyfikowane po raz pierwszy w badanej grupie opatrzone gwiazdką.

mutacja	położenie	częstość (%)	uwagi
R408W	E12	32,3	
A403V	E12	10,1	
A300S	E8	9,5	
I306V	E9	7,6	
R297H	E8	5,7	
F55L	E2	3,2	
V245A	E7	3,2	
IVS10	I10	3,2	
R158Q	E5	2,5	
T380M	E11	1,9	
D415N	E12	1,9	
F55fs	E2	1,3	
D145V	E4	1,3	
P211T	E6	1,3	
R252W	E7	1,3	
R261Q	E7	1,3	pośrednia?
V388M	E11	1,3	pośrednia
IVS12	I12	1,3	
L48S	E2	0,6	pośrednia
*IVS2	I2	0,6	
*R71H	E3	0,6	
R87S	E3	0,6	
*P89S	E3	0,6	
*IVS4	I4	0,6	
*D222G	E6	0,6	pośrednia?
V230I	E6	0,6	
R243Q	E7	0,6	
R261X	E7	0,6	
G272X	E7	0,6	
P281L	E7	0,6	
K320N	E9	0,6	
A322T	E9	0,6	
delT323	E9	0,6	
Y414C	E12	0,6	pośrednia
		Σ = 100	

mutacje nowe: R71H = c.212G→A; P89S = c.265C→T; IVS4 = c.441+5g→t; IVS2 = c.168+5g→a
IVS12 = c.1315+1g→a

Nie stwierdzono różnic w częstości występowania poszczególnych mutacji u chorych pochodzących z różnych rejonów Polski.

4.1.2. Genotypy w *locus PAH* chorych z różnymi postaciami hiperfenyloalaninemii

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

Mutacją „silną” jest u dużej części chorych mutacja R408W. Jest to spowodowane wysoką częstością tej mutacji w populacji polskiej (ok. 55% u grupie chorych z klasyczną PKU, ok. 32% w grupie łagodnej HPA i ok. 22% w przypadku łagodnej PKU).

Mutacja R408W powoduje całkowity brak aktywności hydroksylazy, i zapewne nieobecność białka PAH *in vivo*, co ułatwia i czyni bardziej obiektywną ocenę siły mutacji rzadkich i nowych (51). Analogicznie traktować można stosunkowo częste w badanej grupie mutacje splicingowe (np. IVS10, IVS12) i terminacyjne (R261X, G272X). Chorych niosących jedną z wymienionych mutacji „silnych” można traktować jak funkcjonalne hemizygoty pod względem mutacji w drugim allelu. Fenotyp kliniczny zależy zatem jedynie od mutacji w drugim allelu.

Zarówno łagodna HPA, jak łagodna PKU powodowane były we wszystkich przypadkach przez dwie różne mutacje, w dwu allelach genu PAH. Jedną z mutacji była „silna”, druga „słaba” lub „pośrednia”. Jedynym wyjątkiem była chora o genotypie V388M/V388M. Mutacja V388M jest mutacją pośrednią, stąd fenotyp kliniczny określono jako łagodną HPA (52). Chora nie stosowała diety, a średnie poziomy feniloalaniny były stosunkowo wysokie. Rozwój intelektualny był prawidłowy.

Stosując opisaną ocenę *in vivo* siły mutacji, jako bezsprzecznie łagodne określono mutacje F55L, P211T, V230I, R297H. Mutacje te odnotowywano w piśmiennictwie jako mutacje „łagodne”, „pośrednie” lub niekiedy „silne” (P211T). Mutacja K320N zidentyfikowana została u chorego niosącego w drugim allelu mutację zmieniającą ramkę odczytu (F55fs), co pozwala na bezsprzeczne określenie jej jako mutacji łagodnej”. Podobnie sytuacja przedstawia się z mutacjami R71H i P89S, związanymi z mutacją R408W (53).

Klasyfikację wszystkich znalezionych mutacji zawarto w tabelach II i III.

Oznaczono również genotypy dwu chorych z poziomami feniloalaniny w surowicy wskazującymi na klasyczną PKU, stosujących niekonsekwentnie dietę niskofeniloalaninową, których jednak obraz kliniczny odbiegał od typowego, przede wszystkim pod względem dobrego rozwoju intelektualnego i braku jakichkolwiek zaburzeń neurologicznych. U chorych tych zidentyfikowano genotypy: R261Q/R408W.

Do osobnej grupy zaliczono chorych z klinicznie rozpoznaną łagodną HPA. U czterech z nich znaleziono tylko jedną mutację „silną” (R408W lub R158Q).

U dwojga nie znaleziono żadnej mutacji, ani charakterystycznych zmian polimorficznych w genie *PAH*. Określono sekwencje genu *PAH* począwszy od regionu promotorowego (od pozycji -159), do końca eksonu 13 oraz we flankujących sekwencjach intronowych. U chorych tych przeszukano również wszystkie eksony genów kodujących cyklohydrolazę I GTP oraz dehydratazę pteryno-4-karbinoloaminowej, nie znajdując żadnych zmian w stosunku do sekwencji prawidłowych (54-56). Późniejsza obserwacja kliniczna potwierdziła

wstępne rozpoznanie łagodnej HPA tylko u jednego chorego. Poziomy fenylalaniny u drugiego noworodka powróciły do normy po kilku tygodniach.

4.1.3. Diagnostyka molekularna w określeniu podłoża molekularnego fenylketonurii matczynej

U urodzonego w wyniku prawidłowej ciąży dziecka niespokrewnionych rodziców wykryto fenylketonurię (wyjściowy poziom fenylalaniny: 1120 mmoli/litr). Badaniem klinicznym stwierdzono mikrocefalię i inne objawy zespołu fenylketonurii matczynej. Oznaczono poziom fenylalaniny we krwi matki (900 μ moli/litr) oraz rodzaj mutacji w genie PAH (R261Q/R408W). Ojciec był nosicielem mutacji R408W. Dziecko odziedziczyło dwie mutacje R408W od rodziców.

Pierwsza ciąża wspomnianej pary została poroniona. Nie określono ilorazu inteligencji u matki, jednak z wywiadu wynika, że znajduje się ona na pograniczu normy oraz że funkcjonuje bez problemów w swoim środowisku.

4.1.4. Identyfikacja nowych mutacji w genie PAH

W grupie chorych z łagodną PKU i łagodną HPA znaleziono odpowiednio 5 oraz 4 nowe mutacje (zaznaczone gwiazdkami w tabelach II i III).

Poniżej podano zmiany polimorficzne znalezione w eksonach i we flankujących sekwencjach intronowych genu PAH. Nie prowadzono systematycznego określania częstości zmian polimorficznych genu PAH, dlatego uwagi o częstościach są jedynie orientacyjne.

Tabela IV. Zidentyfikowane zmiany polimorficzne w genie PAH

nazwa	położenie	uwagi
c.-71a→c	5'UTR	rzadko występujący
c.168+19t→c	I2	często występujący
c.353-22c→t	I3	często występujący
c.441+47c→t	I4	nowy polimorfizm (2 allele)
Q232Q	E6	często występujący
V245V	E7	b. często występujący
L385L	E11	często występujący
Y414Y	E12	znaleziony w jednym allelu prawidłowym

4.1.5. Mutacje zlokalizowane w eksonie 3 genu *PAH*

U ośmiu chorych (w tym jednego rodzeństwa) znaleziono mutacje w eksonie 3 genu *PAH* (57).

W tabeli poniżej podano związek pomiędzy genotypami i fenotypami we wspomnianej grupie. Większość chorych to funkcjonalne hemizygoty, pod względem mutacji łagodnej lub pośrednie (druga mutacja całkowicie lub bardzo znacznie ogranicza aktywność hydroksylazy). Dzięki temu można przeanalizować zależność siły mutacji mutacji łagodnych i pośrednich, od ich położenia w obrębie eksonu 3, kodującego część domeny regulatorowej *PAH* (por: *Dyskusja*).

Tabela V. Zależności genotyp-fenotyp u chorych z mutacjami w eksonie 3 genu *PAH*.

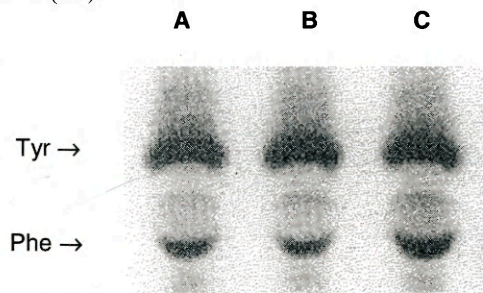
Genotyp	PRA (%)	Wyjściowe stężenie phe (μmole/litr)	Zakres stężeń phe (μmole/litr)	Rozwój psychiczny		Tolerancja phe		Fenotyp kliniczny
				wiek (lata)	IQ	wiek (lata)	mg/kg/day	
R68G/R243Q	100/10	1140	120-600 (dieta)	5	98	5	34	łagodna PKU
R68G/R243Q	100/10	925	240-480 (dieta)	3	95	2	48	łagodna PKU
R68S/R408W	100/0	360	120-485 (dieta)	2	123		41	łagodna PKU
R71H/R408W	?/0	240	200-480	4	108	5	44	łagodna HPA
S87R/IVS10	?/0	240	200-330		bd	3 mc	84 (normalny)	łagodna HPA
P89S/R408W	?/0	670	600-720	4	123	8	46	łagodna HPA (granica)
I95F/R408W	?/0	860	175-450 (dieta)	2.5	133	2.5	36-40	łagodna PKU
A104D/R243Q	26/10	860	120-360 (dieta, pierwsze 2 lata), potem 1200-1300 (praktycznie bez diety)	14	106	2	49	łagodna PKU

PRA – *predicted residual activity* (przewidywana aktywność resztkowa); bd – brak danych; IVS10 = c.1066-11g→a; chorych z łagodną HPA, nie stosujących diety zacieniono.

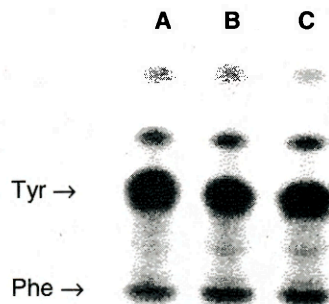
4.1.6. Określanie „siły” mutacji R68G i R68S metodą ekspresji *in vitro*

W bakteryjnym układzie badania ekspresji *in vitro* aktywność PAH mierzono badając przekształcenie ^{14}C -Phe do ^{14}C -Tyr. Nie wykryto różnic w aktywności resztkowej PAH pomiędzy nie oczyszczonym ekstraktem komórkowym, a oczyszczonym białkiem fuzyjnym PAH-MBP. W obu przypadkach aktywność była taka sama, jak normalnego białka PAH-MBP (98-104%) (ryc. 6). Nie zaobserwowano skłonności do agregacji białka PAH-MBP, jako że przedłużone przechowywanie preparatu w 4°C nie prowadziło do zmniejszenia aktywności resztkowej enzymu. Immunoreaktywność PAH-MBP niosących podstawienia R68G i R68S oceniona techniką Western blotting była normalna.

Następnie przeprowadzono trzy niezależne transfekcje małych komórek COS stosując standardową procedurę. Wydajność transfekcji sprawdzano mierząc aktywność transkrypcyjną wprowadzanego jednocześnie cDNA b-galaktozydazy. Aktywności resztkowe obu, zmienionych białek PAH były identyczne z aktywnością formy natywnej (po uśrednieniu: 100% dla R68G i 98% dla R68S) (ryc. 7). Technika Western blotting oceniono, że oba białka PAH powstają w identycznych ilościach i wykazują identyczną immunoreaktywność, co białko prawidłowe (58).



Ryc. 6. Aktywność PAH w postaci białka fuzyjnego (PAH-MBP) mierzona poprzez zdolność przekształcenia ^{14}C -Phe do ^{14}C -Tyr, z wykorzystaniem sztucznego kofaktora reakcji (6MPH4). Ścieżka A przedstawia aktywność prawidłowego białka PAH. Ścieżki B i C obrazują aktywności zmutowanych białek: R68G i R68S.



Ryc. 7 Aktywność PAH w komórkach COS, mierzona poprzez zdolność przekształcania ^{14}C -Phe do ^{14}C -Tyr, z wykorzystaniem naturalnego kofaktora reakcji (BH4). Ścieżka A przedstawia aktywność prawidłowego białka PAH. Ścieżki B i C obrazują aktywność zmutowanych białek: R68S i R68G.

4.2. GEN *PTS*4.2.1. Mutacje w genie *PTS*

W celu identyfikacji mutacji w genie *PTS* sekwencjonowano wszystkie eksony genu wraz z flankującymi obszarami intronowymi (58). Stosowano także technikę RT-PCR do przeszukiwania całej sekwencji kodującej genu. Istnienie zidentyfikowanych w ten sposób mutacji potwierdzano analizując sekwencje odpowiednich eksonów genu *PTS*. W tabeli poniżej zebrano zidentyfikowane mutacje.

Tabela VI. U sześciu chorych z deficytem PTPS określono pełne genotypy w *locus PTS*.

mutacja	położenie	częstość (%)	uwagi
D136V	E6	50	łagodna w układzie homozygotycznym
N36K	E2	25	
*E35G	E2	8,3	
*N72L	E4	8,3	łagodna?
*F100L	E5	8,3	

mutacje nowe: E35G = c.104 A→G; N72L = c.216 T→A ; F100V = c.298 T→G

Na następnej stronie, w tabeli VII, podano genotypy wszystkich chorych wraz z wybranymi wskaźnikami biochemicznymi, przebiegiem choroby i rozpoznaniem klinicznym.

Tabela VII. Korelacje pomiędzy genotypem w *locus PTS* a fenotypem klinicznym w grupie 7 chorych z deficytem PTPS.

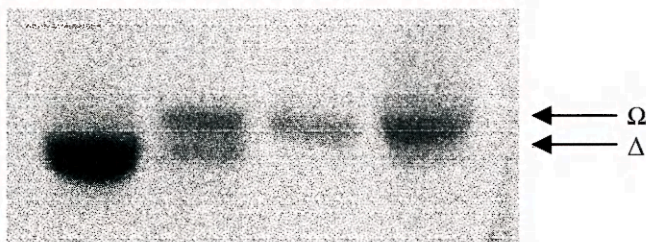
inicjały pacjenta i genotyp	wyjściowy poziom fen $\mu\text{mole/litr}$	wskaźniki biochemiczne: 1. biopteryna (mmole/mol kreatyniny) 2. neopteryna (mmole/mol kreatyniny) 3. % biopteryny	rozwój fizyczny i umysłowy	rozpoznanie
OK D136V/D136V	1643	1. 7,32 2. 63,58 3. 10,3	DQ w wieku 6 mc 99, IQ w wieku 18 mc 105; w wieku 9 lat 114	łagodna forma deficytu PTPS; diagnoza PTPS w wieku 6 mc
KT D136V/D136V	670	1. 0,72 2. 12,63 3. 5,4	DQ w wieku 12 mc 77; po wprowadzeniu właściwego leczenia, w wieku 1,5 roku DQ = 99	łagodna forma deficytu PTPS; po urodzeniu leczenie dietą, w wieku 9 miesięcy objawy neurologiczne, gorączka, mioklonia; rozpoznanie deficytu PTPS
EC N36K/N72L	Guthrie: 1500-3000	1. 0,61 2. 2,57 3. 2,3	IQ w wieku 15 lat 76; agresywne zachowania, trudności w nauce	rozpoznanie PKU, do 17 roku życia na diecie; diagnoza deficytu PTPS w 17 roku życia; łagodna postać deficytu.
DP N36K/D136V	3067	1. 0,466 2. 4,04 3. 10,356	DQ w wieku 7 mc 48, w wieku 3 lat 38; IQ w wieku 10 lat 33	leczenie w ciągu pierwszych lat życia niekonsekwentne
MP N36K/D136V		1. 0,129 2. 4,114 3. 3,047	DQ w wieku 8 mc 63; w wieku 2 lat 78	brat DP
MK N36K/D136V	Guthrie: 2840	1. brak 2. 2,44 3. 0	DQ w wieku 1 r 2 mc nie do oceny; po wprowadzeniu właściwego leczenia znaczna poprawa, DQ w wieku 1 r 4 mc 23, w wieku 2 i 5 mc DQ = 58	od urodzenia do wieku 1 roku i 2 mc leczenie dietą; od 4 mc życia postępująca degradacja psychoruchowa; diagnoza deficytu PTPS w wieku 1 r 2 mc
MR E35G/F100V	1483	1. 0,05 2. 30,7 3. 0,16	DQ w wieku 6 mc 66; IQ w wieku 14 lat 99	diagnoza PTPS w wieku 6 mc

We wszystkich przypadkach oznaczano aktywność reduktazy dinydropterydynowej z wynikiem prawidłowym; łagodne formy deficytu PTPS zacieniono.

4.2.2. Analiza transkryptów ektopowych genu *PTS* z leukocytów krwi obwodowej

W transkryptach ektopowych genu *PTS* obecnych w leukocytach krwi obwodowej chorego z genotypem D136V/D136V, oprócz wspomnianych mutacji wykryto także delecję 23 nukleotydów (cały ekson 3, pozycje 3746-3768 w sekwencji genomowej, GeneBank L76259). Identyčną delecję wykryto następnie w cDNA pochodzącym z leukocytów dziecięciu klinicznie zdrowych osób. W większości przypadków transkryptowi z delecją towarzyszył transkrypt pełnej długości. Nie określono jednak dokładnie proporcji obu form transkryptów. Z obrazu elektroforetycznego powielonej sekwencji kodującej *PTS* można wnosić, że obie formy występują w podobnych ilościach.

Wspomniana delecja ta była nieobecna w genomowym DNA jak również w mRNA wyizolowanym z hodowli fibroblastów.



Ryc. 8. Analiza elektroforetyczna sekwencji kodującej genu *PTS*. Widoczne dwie formy transkryptu: pełnej długości (Ω) oraz z delecją (Δ) obejmującą ekson 2. Próbkę pochodzą z leukocytów krwi obwodowej 4 osób zdrowych.

4.3. Użyteczność kliniczna różnicowej diagnostyki molekularnej HPA

W kilkunastu przypadkach wątpliwych klinicznie oznaczono postać hiperfenyloalaninemii znajdując mutacje w genach *PAH* i *PTS*.

U dziesięciu noworodków, ze wskazań klinicznych, wykonano diagnostykę molekularną dla określenia postaci HPA. U pięciorga dzieci zidentyfikowano genotyp R408W/R408W, u jednego R158Q/R408W, a u pozostałych potwierdzono łagodną HPA lub łagodną PKU, co pozwoliło na właściwe ukierunkowanie leczenia.

U chorej z rozpoznaną w okresie noworodkowym klasyczną postacią PKU, leczoną dietą niskofenyloalaninową, wykonano diagnostykę molekularną w kierunku łagodnej PKU, na prośbę lekarza prowadzącego. Ponieważ nie znaleziono mutacji w genie *PAH*, przeszułano wszystkie eksony genu *PTS*, wykazując obecność mutacji N36K/N72L. Rozpoznanie pierwotne okazało się błędne.

U trzech chorych o niepewnych wynikach testów biochemicznych, na prośbę lekarza pediatry, poszukiwano mutacji w genie *PTS*. W jednym przypadku znaleziono mutację N36K/D136V. W pozostałych przypadkach ustalono rozpoznanie łagodnej PKU i łagodnej HPA.

4.4. GEN *GALT*4.4.1. Mutacje w genie *GALT* zidentyfikowane w badanej grupie chorych

Przebadano próbki DNA pochodzące od 77 chorych z całkowitym brakiem aktywności *GALT*, 9 z aktywnością *GALT* rzędu 25-50%, jednej z aktywnością resztkową *GALT* rzędu 0,28% oraz 4 z podejrzeniem defektu *GALE*.

W grupie 65 chorych z klasyczną galaktozemią zidentyfikowano 18 różnych mutacji w genie *GALT*. W przypadku znalezienia nowej mutacji, sekwencjonowano wszystkie eksony genu *GALT* oraz potwierdzano występowanie wspomnianej mutacji u rodziców.

Tabela VIII. Mutacje zidentyfikowane w grupie 77 chorych z klasyczną postacią galaktozemii (n = 154 alleli) Mutacje zidentyfikowane po raz pierwszy w badanej grupie opatrzone gwiazdką.

mutacja	położenie	częstość (%)	uwagi
Q188R	E6	54	
K285N	E9	28	
IVS3	I3	4,5	
Y209S	E7	1,9	
R333W	E10	1,9	hipogonadyzm
*W167R	E5	1,3	
Y209C	E7	1,3	
A320T	E10	1,3	
*S45L	E2	0,65	
R51L	E2	0,65	
F95L	E2	0,65	
S135L	E4	0,65	łagodna ?
Q164X	E5	0,65	
*Q169K	E5	0,65	
*IVS5	I5	0,65	
*R204P	E7	0,65	
*P250T	E8	0,65	
*F131C	E4	0,65	
		Σ = 100	

IVS3 = c.329-2a→c;

mutacje nowe: S45L = c.134C→T; F131C = c.392T→G; W167R = c.499T→C; Q169K = c.505C→A; IVS5 = c.507nt2t→c; R204P = c.611G→C; P250T = c.748C→A.

Dwie mutacje: Q188R i K285N stanowią łącznie 82% znalezionych mutacji. Mutacja IVS3 występuje w 4,5% zmutowanych alleli. Pozostałych 15 mutacji występuje z częstością od 1,9% do 0,65%. Taki rozkład częstości ułatwia ewentualne prowadzenie diagnostyki molekularnej galaktozemii, polegającej na rutynowym wykrywaniu mutacji najczęstszych techniką PCR-RFLP i ACRS oraz stosowaniu techniki sekwencjonowania do pozostałych przypadków (60).

W badanej grupie chorych znaleziono trzy nowe polimorfizmy w genie *GALT*: w intronie 8: c.820+23t→g, c.820+16 a→g oraz w intronie 10: c.1056+36t→a. Nie znaleziono natomiast polimorfizmów związanych z wariantem Duarte-1 lub Duarte-2.

4.4.2. Chory niosący trzy różne mutacje w genie *GALT*

U jednej osoby z zerową aktywnością *GALT* znaleziono trzy różne mutacje: K285N / E271G (c.812 A→G) + I378V (c.1132A→G). Mutacje E271G i I378V są mutacjami nowymi. Ponieważ mutacja I378V zmienia przedostatni kodon białka *GALT*, a wprowadzone podstawienie ma naturę konserwatywną, można przypuszczać że jest podstawieniem milczącym lub wariantem polimorficznym. Ostatecznego dowodu dostarczy zapewne analiza aktywności transferazy w układzie *in vitro*.

U matki znaleziono zmiany sekwencji odpowiadające wariantowi Duarte-2 oraz mutację K285N (patrz tab. VIII).

4.4.3. Mutacje związane z łagodną formą galaktozemii

W przypadku 5 osób z łagodną galaktozemią określono sekwencję wszystkich eksonów *GALT* wraz z flankującymi sekwencjami intronowymi. Nie przeszukiwano sekwencji 5' i 3' UTR. Wyniki zebrano w tabeli poniżej.

Pełną korelację pomiędzy genotypem w *locus GALT* a poziomem aktywności *GALT* wykazano dla dwu pierwszych chorych. Mutacja N314D to molekularny wyznacznik biochemicznie definiowanego wariantu Duarte-2. W układzie homozygotycznym związana jest z aktywnością *GALT* obniżoną do 50%. W połączeniu z mutacją silną obniżenie aktywności enzymu sięga 20-25%.

U chorego z aktywnością *GALT* rzędu 25% nieoczekiwanie znaleziono mutację N314D w obu allelach genu *GALT*.

U chorego z nową mutacją P66L nie znaleziono mutacji w drugim allelu genu *GALT*, ani dodatkowych polimorfizmów.

Tabela IX. Genotypy zidentyfikowane w grupie 5 chorych z łagodną formą galaktozemii. Mutacje zidentyfikowane po raz pierwszy w badanej grupie opatrzone gwiazdką.

genotyp	położenie mutacji	aktywność GALT (%)	uwagi
K285N / N314D + c.378-27g→c + c.508-24g→a	E9 / E10+ I4 + I5	20%	syn: E271G+I378V / K285N
Q188R + c.508-24g→a / N314D + c.378-27g→c + c.508-24g→a	E6 +I5 / E10 + I4, I5	27	syn: Q188R / R204P (0% GALT)
N314D + c.378-27g→c + c.507+62g→a / N314D +c.378-27g→c + c.507+62g→a	E10 + I4, I5 / E10 + I4, I5	25	
Y209C / N314D (brak polimorfizmów D-2)	/ E10	25	córka: Q188R / Y209C (0% GALT)
*P66L / ? (brak polimorfizmów)		28	

mutacja nowa: P66L = c.197C→T

4.4.4. Poszukiwanie mutacji w genie *GALE*

U sześciu chorych z klinicznym podejrzeniem deficytu 4-epimerazy urydynodifosfogalaktozowej poszukiwano najpierw mutacji w genie *GALE*. U żadnego z chorych nie znaleziono mutacji w sekwencji kodującej oraz flankujących obszarach intronowych. U wszystkich chorych oraz u 10 osób zdrowych, stanowiących kontrolę, zidentyfikowano jedynie polimorficzne podstawienie nukleotydowe w stosunku do podanej w bazie danych GeneBank sekwencji genu *GALE*.

U chorych z podejrzeniem defektu *GALE* poszukiwano następnie mutacji w genie *GALT*. Tylko u jednego chorego zidentyfikowano mutacje: wariant D-1 (N314K + L218L *in cis*), co potwierdziło wynik badania biochemicznego (aktywność GALT rzędu 118% normy). W badanej grupie nie stwierdzono żadnych podstawień polimorficznych.

4.5. KOLEJNOŚĆ POSZUKIWANIA MUTACJI W GENACH *PAH*, *PTS*, *GALT* ORAZ *GALE*

Przedstawione wyniki umożliwiają także zaproponowanie optymalnej strategii poszukiwania mutacji w genach *PAH*, *GALT* i *PTS*. Identyfikacja mutacji jest szczególnie istotna w łagodnych postaciach hiperfenyloalaninemii oraz w przypadkach wątpliwych diagnostycznie.

Kolejność przeszukiwania eksonów we wspomnianych genach przedstawiono poniżej.

gen *PAH*: 12, 11, 8, 9, 3, 2 > 7 > 4, 6, 5 >> 1,13

gen *PTS*: 5-6>2, 3, 4 >>1 lub cDNA

gen *GALT*: 6, 9 > 2, 3, 4, 7, 5, 8 > 10 > 11>>1

gen *GALE*: wszystkie eksony jednocześnie

W przypadku genu *GALT*, ze względu na dużą liczbę znaczących polimorfizmów i stosunkowo duże prawdopodobieństwo występowania podwójnie zmutowanych alleli zasadne jest sekwencjonowanie wszystkich eksonów.

5. DYSKUSJA

5. 1. SKOMPLIKOWANIE CHORÓB JEDNOGENOWYCH

Tradycyjny podział chorób dziedzicznych m.in. na jednogenowe i wieloczynnikowe wydaje się pewnym uproszczeniem. W przypadku wszystkich chorób genetycznych, oprócz podstawowego genu, którego mutacje powodują chorobę, w tworzeniu fenotypu uczestniczyć może wiele *loci*, a także środowisko zewnętrzne.

Choroby dziedziczone autosomalnie recesywne, takie jak hiperfenyloalaninemia czy galaktozemia są szczególnie interesującym przedmiotem badań. Powodowane są przez wiele, różnych mutacji, które obecne w dwu chromosomach homologicznych, powodują chorobę. Ekspresja genotypu zależy zatem od rodzaju obu mutacji identyfikowanych u chorego. Ponieważ geny, których defekt powoduje HPA, galaktozemię czy np. CF kodują białka aktywne dopiero w postaci multimerycznej, istotna jest nie tylko uśredniona aktywność resztkowa białek powstających na matrycy jednego i drugiego allelu. „Wypadkowa” aktywność wynika ze współistnienia w różny sposób zmienionych podjednostek białkowych.

Niektóre mutacje zmiany sensu (np. F39L, G46S, L48S, I65T czy A104D w genie *PAH*) zmniejszają wewnątrzkomórkową stabilność białka, zwiększając zdolność do agregacji, bądź przyspieszając jego degradację (61, 62). Dokładniejsze badania z wykorzystaniem różnych systemów ekspresji *in vitro* oraz trójwymiarowego modelowania komputerowego, wykazały iż wszystkie wspomniane mutacje wpływają na fałdowanie i oligomeryzację białka PAH, powodując przyspieszoną degradację proteolityczną i w konsekwencji zmniejszają stężenie hydroksylazy w cytoplazmie komórki. Badania wskazują, że zwiększona degradacja zmutowanych białek jest często bezpośrednią przyczyną wielu chorób dziedzicznych (63). Przypuszcza się, że w pewnych warunkach fizjologicznych (np. w stresowych), gdy zwiększeniu ulega stężenie wewnątrzkomórkowych chaperonów, szkodliwy efekt niektórych mutacji, może zostać w pewnym zakresie, skompensowany (prof. M. Ugarte, inf. ustna).

Niekiedy mutacje zmiany sensu oraz mutacje terminacyjne prowadzą do powstawania transkryptów pozbawionych jednego lub kilku eksonów. Zjawisko to opisano zarówno dla transkryptów ektopowych genu *PAH*, jak też dla mRNA innych genów (64-66). Zaproponowano różne wyjaśnienia. Być może zmianie ulega struktura przestrzenną pre-mRNA, co zakłóca proces wycinania intronów lub aktywuje alternatywne miejsca splicingu. Przypuszcza się też, że mutacje terminacyjne są rozpoznawane przez spliceosom, tak że niosący je

ekson zostaje wycięty przy zachowaniu otwartej ramki odczytu, co może niekiedy zachować przynajmniej część funkcji kodowanego białka. Zjawisko to jeszcze bardziej komplikuje zależności pomiędzy genotypem a fenotypem.

Kolejnym elementem powiększającym złożoność fenotypową jest aktywność genów specyficznych względem organu lub tkanki, także poza podstawowym miejscem ekspresji. Na przykład aktywne białko hydroksylazy fenyloalaninowej, oprócz wątroby, syntezowane jest także w nerkach, trzustce i mózgu. mRNA *PAH* w nerkach jest identyczne z mRNA wątrobowym. Różnica pojawia się dopiero na poziomie aktywnej formy enzymu: dimeru w nerkach, tetrameru w wątrobie (67, 68). Z badań na zwierzętach wynika, iż obie formy enzymu regulowane są przez różne czynniki, posiadają różne własności kinetyczne i różne optymalne warunki fizjologiczne. Prawdopodobne mutacje wpływające na zdolność monomeru *PAH* do oligomeryzacji, w różnym stopniu zmieniają aktywność enzymu wątrobie i nerkach.

Wydaje się, że nerkowa forma *PAH* u ludzi może pełnić istotną rolę w utrzymywaniu poziomu fenyloalaniny na fizjologicznym poziomie, gdyż w niewydolności nerek zdolność do katabolizowania tego aminokwasu ulega widocznemu pogorszeniu (69). Być może niezgodności pomiędzy oznaczeniami aktywności zmutowanej *PAH in vitro* (np. komórkach COS, wywodzących się z małpiej nerki) i *in vivo* (w bioptatach wątroby), mogą wynikać z różnego wpływu mutacji na formy hydroksylazy powstające w różnym otoczeniu komórkowym (70). Jest to jedna z możliwych interpretacji zaprezentowanego w rozprawie wyniku oznaczania aktywności *in vitro* mutacji R68G/S.

Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku genu *GALT*, ulegającego zróżnicowanej ekspresji w różnych tkankach. Znane są mutacje wpływające w różny sposób, w zależności od tkanki, na aktywność galaktotransferazy. Klasycznym przykładem jest wspomniana mutacja S135L, związana w układzie homozygotycznym z brakiem aktywności *GALT* w erytrocytach, lecz poziomami rzędu 5-10% w wątrobie i tkance jelit. Chorzy z wspomnianą mutacją w co najmniej jednym allelu, mimo braku aktywności enzymu w erytrocytach, mogą mieć całkowicie normalny wynik testu oddechowego, wskazującego na normalne utlenianie galaktozy do CO₂.

Dodatkowa złożoność wynika także z wpływu wielu genów na ostateczny fenotyp choroby. Znamiennym przykładem jest zespół Hartnupa (OMIM 234500) powodowany zasadniczo mutacjami w *locus* 11q13, zaburzającymi transport aminokwasów w nerce i jelicie cienkim. Jednak bardzo dużą rolę odgrywają inne geny, uczestniczące w utrzymaniu ogólnej homeostazy aminokwasów w organizmie. Wpływ dodatkowych czynników genetycznych powoduje, że choroba może wystąpić w postaci łagodnej, będącej właściwie wariantem biochemicznym, lub ostrej, z objawami przypominającymi pelagrę. W przypadku CF rodzaj mutacji w *locus* *CFTR* oraz modyfikator, położony najprawdopodobniej w chromosomie 19q13 wpływają łącznie na objawy mukowiscydozy związane z niedrożnością smółkową i w mniejszym stopniu z funkcją płucną (71).

Podobnie w tworzeniu fenotypu umysłowego chorych z różnymi postaciami HPA uczestniczą zapewne geny związane z transportem aminokwasów poprzez barierę krew-mózg, mielinizacją neuronów czy alternatywnymi drogami wykorzystania fenyloalaniny.

Wiele elementów przyczyniających się do powstania obrazu klinicznego osoby z hiperfenyloalaninemią czy galaktozemią leży poza najszerzej nawet pojętym genotypem. Nie

można zapominać na przykład o psychosocjalnych konsekwencjach przewlekłej choroby, związanych z codziennym stosowaniem diety czy częstymi wizytami w szpitalu. Wydaje się, że pewne zaburzenia, wykrywane w testach osobowościowych u młodzieży z właściwie leczoną klasyczną PKU, powodowane są nie przyczynami organicznymi, lecz swoistymi trudnościami w dostosowaniu się do rówieśniczego środowiska (72). Dużą rolę odgrywa w tym wypadku postawa rodziców, ich oczekiwania względem chorych dzieci czy sposób traktowania (73).

* * *

W pracy przedstawiono wyniki poszukiwania mutacji w genach *PAH*, *PTS*, *GALT* i *GALE* wśród chorych z różnymi postaciami hiperfenyloalaninemii i galaktozemii. Wykazano, iż heterogenności objawów klinicznych odpowiada duża różnorodność mutacji oraz genotypów. Większość ze zidentyfikowanych mutacji powiązano z konkretnymi fenotypami klinicznymi chorych. Zaproponowano m.in. że mutacje zmiany sensu, w zależności od położenia w obrębie eksonu 3 genu *PAH* powodować mogą łagodną PKU, bądź łagodną HPA.

Otrzymane wyniki potwierdzają złożony charakter wymienionych chorób, odbiegający od tradycyjnego ujęcia chorób jednogenowych. Wieloczynnikowość dotyczy zwłaszcza uwarunkowań genetycznych obrazu neurologicznego, intelektualnego oraz emocjonalnego chorych.

Identyfikacja chorego z HPA, u którego nie stwierdzono mutacji w genie *PAH* oraz 4 z pojedynczymi mutacjami silnymi, może sugerować istnienie grupy zmian sekwencji położonych w nie badanych dotychczas regionach genu np. w nie ulegającym translacji regionie 3' (74). Podobnie identyfikacja mutacji położonych w intronach genu *PAH*, liczących od 558 do ponad 23.000 pz, jest przedsięwzięciem bardzo skomplikowanym. Kończący się projekt Poznania Genomu Człowieka stwarza jednak szansę na wyjaśnienie tego problemu.

Wydaje się bardzo prawdopodobne, że w tworzeniu fenotypu HPA uczestniczą również inne *loci*, związane np. z homeostazą biochemiczną organizmu. Identyfikacja potencjalnych genów kandydujących wymagałaby zastosowania jednej z metod analizy sprzężeń. Warunkiem wstępnym jest posiadanie możliwie dużej grupy rodzin z nietypowym obrazem klinicznym lub charakterystycznymi genotypami w *locus PAH*. Współpraca naukowców z wielu krajów świata, w tym Polski, w ramach *PAH Mutation Consortium* stwarza szansę na podjęcie tak zakreślonego projektu badawczego.

* * *

Przeprowadzone badania potwierdziły, iż diagnostyka molekularna jest pewnym sposobem identyfikowania bezobjawowych nosicieli zmutowanego genu, co może być istotne w poradnictwie genetycznym w rodzinach ryzyka. W okresie pięciu lat określono nosicielstwo zmutowanego genu *PAH* dla ponad 30 zdrowych krewnych probanda. Ustalono również genotypy w *locus PTS* dla 2 członków rodzin ryzyka hiperfenyloalaninemii oraz genotypy w *locus GALT* dla 25 członków rodzin ryzyka galaktozemii.

5.1.1. Rodzaje mutacji zmiany sensu w genie PAH

Zbyt mało na razie wiadomo o funkcjonalnej strukturze hydroksylazy fenyloalaninowej czy syntazy tetrahydrobiopterynowej, by z na podstawie położenia nowej mutacji i rodzaju powodowanego przez nią podstawienia aminokwasowego wnioskować o efektach fenotypowych (75). Opublikowane w zeszłym roku dane krystalograficzne dotyczące domeny regulacyjnej i katalitycznej szczurzej PAH w powiązaniu z mapami krystalograficznymi fragmentów ludzkiej hydroksylazy, umożliwiają rozpoczęcie systematycznych badań w tym zakresie (76, 77).

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

Konieczne jest zatem zastosowanie przejściowej ekspresji mutacji w różnych układach *in vitro* oraz analizy fenotypów chorych z identycznymi lub podobnymi mutacjami. Dopiero integracja wszystkich elementów pozwoli zbudować funkcjonalną mapę hydroksylazy fenyloalaninowej (78, 79).

Celem przeprowadzonych badań było poznanie genotypów reprezentatywnej dla populacji polskiej grupy chorych z różnymi postaciami HPA. Uzyskane wyniki umożliwiają powiązanie poszczególnych mutacji z klinicznym obrazem chorych. Uzupełniają również dane o korelacjach pomiędzy genotypem w *locus PAH* a fenotypem HPA opublikowane dla populacji kilku krajów europejskich oraz USA i Kanady.

Zaprezentowane powiązania mutacji w genie *PAH* z fenotypami klinicznymi są zasadniczo zgodne z zależnościami znajdowanymi w innych populacjach (80-94).

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

Na przykład mutacja R241H w badanej grupie chorych związana jest wyłącznie z łagodną PKU, charakteryzującą się dużą tolerancją pokarmową fenyloalaniny. Wynik ten jest nieoczekiwany, jako że mutację tę w Polsce uznano początkowo za mutację powodującą klasyczną PKU, a aktywność resztkową enzymu szacowano na ok. 1% (95). W populacji sycylijskiej natomiast mutacja R241H powoduje zarówno PKU, jak łagodną PKU, w połączeniu z mutacjami silnymi.

Podobnie mutację V388M uznano na podstawie analizy badanej grupy chorych za mutację pośrednią. Chora o genotypie V388M/V388M została zdiagnozowana biochemicznie i klinicznie jako łagodna HPA. Charakteryzuje się ona stosunkowo wysokimi poziomami fenyloalaniny, jednak bez wpływu na rozwój umysłowy. Chory V388M/E390G prezentuje natomiast fenotyp łagodnej PKU i pozostaje na diecie z częściowo ograniczoną podażą fenyloalaniny. Mutacji V388M nie znaleziono natomiast przeszukując ekson 11 genu *PAH* techniką SSCA w grupie ponad 60 chorych z klasyczną PKU.

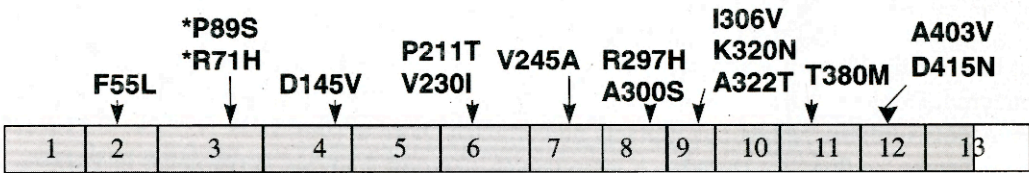
Mutację P211T zidentyfikowano jako bezsprzecznie łagodną, powodującą w powiązaniu z mutacją R408W łagodną postać HPA. Mutacja była do tej pory wiązana z klasyczną PKU.

Jako mutacje bezsprzecznie łagodne określono także mutacje A403V, A300S, F55L, które w innych populacjach wiązane były bądź z łagodną PKU, bądź z łagodną HPA. Mutacje Y414C i E390G uznano za mutacje pośrednie. Mutację R158Q określono jako mutację silną, która jednak w układzie homozygotycznym powoduje zwiększoną tolerancję pokarmową fenyloalaniny (96-98).

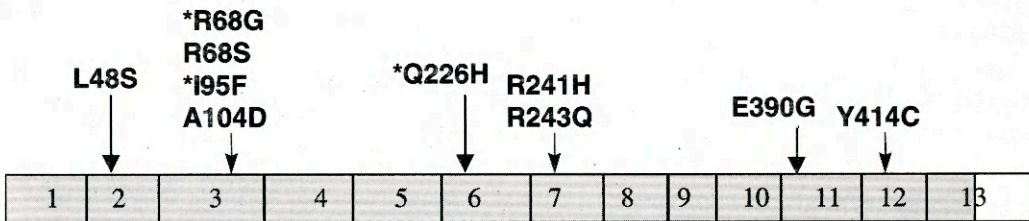
U chorego z klinicznym i biochemicznym rozpoznaniem łagodnej hiperfenyloalaninemii nie znaleziono żadnych mutacji w genie *PAH* oraz w genach *PCDH* i *GTPCH*. U 4 chorych z identycznym rozpoznaniem znaleziono pojedynczą mutację „silną”. Można przypuszczać, że w tych przypadkach mutacje powodujące HPA położone są albo w regionach regulatorowych genu *PAH*, albo w głębokich sekwencjach intronowych. U osób tych nie wykryto jednak nieznanymi polimorfizmów w obrębie genu *PAH*, które mogłyby być markerami wspomnianych, niezidentyfikowanych mutacji.

Ponieważ jedyną mutacją znaną u wspomnianych wyżej czterech chorych z łagodną HPA, jest mutacja silna, nie można oczekiwać iż nie wykryto delecji większego obszaru genu, uniemożliwiającej powielenie jednego z alleli genu *PAH*. Przyczyną (choć mało prawdopodobną) może być także zmiana w obrębie sekwencji przyłączenia startera (ów), uniemożliwiająca powielanie eksonu niosącego mutację łagodną.

Ryciny poniżej pokazują położenie mutacji związanych z łagodną HPA i łagodną PKU w obrębie genu *PAH*.



Ryc. 9. Mutacje w genie *PAH* związane z łagodną HPA, zidentyfikowane w badanej grupie chorych.



Ryc. 10. Mutacje w genie *PAH* związane z łagodną PKU, zidentyfikowane w badanej grupie chorych.

5.1.2. Mutacje zmiany sensu w eksonie 3 genu PAH

Szczególnie interesującą grupę stanowią mutacje w eksonie 3 genu *PAH*. Ekson ten koduje część domeny regulacyjnej hydroksylazy fenyloalaninowej i zgrupowanych jest w nim szereg mutacji łagodnych i pośrednich, jak również mutacje silne. Identyfikacja odpowiednio dużej grupy chorych niosących mutacje w tym obszarze genu, najlepiej w układzie homozygotycznym lub w powiązaniu z „silnymi” mutacjami w rodzaju R408W stanowi podstawę do budowania funkcjonalnej mapy białka hydroksylazy. Analizie *in vivo* powinna towarzyszyć analiza *in vitro* wpływu mutacji na aktywność i inne parametry biochemiczne białka PAH.

Przedstawione w tab. V dane sugerują, iż mutacje położone pomiędzy pozycjami 71 i 94 związane są z łagodną HPA. Z opublikowanych doniesień wynika, że inne mutacje z tego regionu np. E76A, T81P, D84Y, Δ194 powodują łagodną HPA. Podstawienia położone poza granicami wyznaczonymi kodonami 71 i 94, powodują łagodną PKU (np. I65T, S70P, A104D). Obserwacja ta może być istotna klinicznie w przypadku zidentyfikowania u noworodka nie znanej dotychczas mutacji w eksonie 3.

Zaprezentowane wyniki wskazują również, iż mutacje R68G i R68S nie zmieniają aktywności PAH, zarówno w postaci białka fuzyjnego PAH-MBP w układzie bakteryjnym, jak hydroksylazy ekspresowanej w układzie ssaczym. Ponadto białka w obu układach *in vitro* powstawały w ilościach normalnych oraz wykazywały normalną immunoreaktywność. Oba zastosowane układy analizy *in vitro* z powodzeniem wykorzystywano do badania aktywności resztkowej wielu mutacji w genie *PAH*.

Podobną sytuację zaobserwowano w przypadku mutacji A403V, która w identycznym układzie bakteryjnym wydawała się być zmianą milczącą, nie wpływającą na aktywność enzymu. Dopiero znalezienie wielu chorych z mutacją A403V w grupie chorych z łagodną HPA potwierdziło, że jest ona mutacją powodującą chorobę (99).

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

Wyniki oznaczeń *in vitro* przy zastosowaniu standardowego stężenia fenyloalaniny i нефизjologicznych stężeń kofaktora mogą różnić się znacznie od aktywności w warunkach fizjologicznych. Dlatego określenie siły mutacji u chorych funkcjonalnie hemizygotycznych jest szczególnie istotne. Ponieważ mutacja R408W całkowicie znosi aktywność hydroksylazy, można przyjąć, iż w przypadku genotypów R68G/R408W i R68S/R408W fenotyp chorych zależy wyłącznie od mutacji w kodonie 68. Może to oznaczać, iż mutacje te wpływają na stabilność białka *in vivo* lub na regulacyjne funkcje hydroksylazy.

Ponieważ kilkudniowe przetrzymywanie białek PAH-MBP niosących oba podstawienia aminokwasowe nie zmniejszyło aktywności hydroksylazy, można przypuszczać że badane mutacje nie zwiększają agregacji PAH. Zjawisko takie, jak wspomniano wyżej, obserwowano np. dla mutacji F39L, K42I, L48S czy I65T.

Bardzo prawdopodobne jest zatem zakłócenie funkcji regulacyjnych hydroksylazy przez mutacje w kodonie 68, jako że ekson 3 koduje część domeny uczestniczącej w modulowaniu aktywności PAH.

5.1.3. Trudności w ustaleniu korelacji genotyp – fenotyp umysłowy w HPA

Znając rodzaj mutacji można przewidywać fenotyp metaboliczny oraz kliniczny chorego. Najtrudniejszym zadaniem jest przewidywanie w oparciu o diagnozę molekularną dynamiki rozwoju intelektualnego czy emocjonalnego u chorych z klasyczną i łagodną PKU (100).

W przypadku łagodnej HPA nie występują zasadniczo zaburzenia w sferze poznawczej czy emocjonalnej. W przypadku obu postaci fenyloketonurii zależności te nie są jasne. Wynika to przede wszystkim z złożonego charakteru umysłowości człowieka i niewielkiego rozeznania w biochemicznych mechanizmach szkodliwego wpływu podwyższonych stężeń fenyloalaniny w organizmie (101). Wydaje się, że w fenyloketonurii genotyp wpływa na występujące zawsze, niezależnie od stosowanej diety, wahania poziomu fenyloalaniny w krótszych odcinkach czasu. Przypuszcza się, że zmiany te są jednym z elementów wpływających na obraz neurologiczny chorych. Wahania stężenia fenyloalaniny we krwi są mniejsze u chorych z łagodną formą PKU, a być może również w przypadku pewnych genotypów klasycznej PKU (np. związanych z mutacją R261Q, zwłaszcza w układzie homozygotycznym) (102, 103). Zbyt mało jednak nadal wiadomo o mechanizmach prowadzących do uszkodzenia mózgu w wyniku wysokich stężeń fenyloalaniny we krwi.

W badanej w IMiD grupie chorych z klasyczną PKU (wyniki nie zamieszczone) znaleziono trzy osoby o genotypie R261Q/R408W. Wszystkie one wykryte zostały w teście Guthriego i stosowały, choć niekonsekwentnie, dietę niskofenyloalaninową. We wszystkich przypadkach rozwój umysłowy był prawidłowy.

Przedstawiony w *Wynikach* przykład nierozpoznanej fenyloketonurii (genotyp R261Q/R408W), prowadzącej do fenyloketonurii matczynej, wskazuje iż być może obecność mutacji R261Q umożliwiła łatwiejszy wpływ dodatkowych czynników modyfikujących, polepszających rozwój umysłowy. Charakterystyczne, iż mutację R261Q w układzie homozygotycznym lub w kombinacji z innymi silnymi mutacjami znajdowano w wielu przypadkach fenyloketonurii matczynej.

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

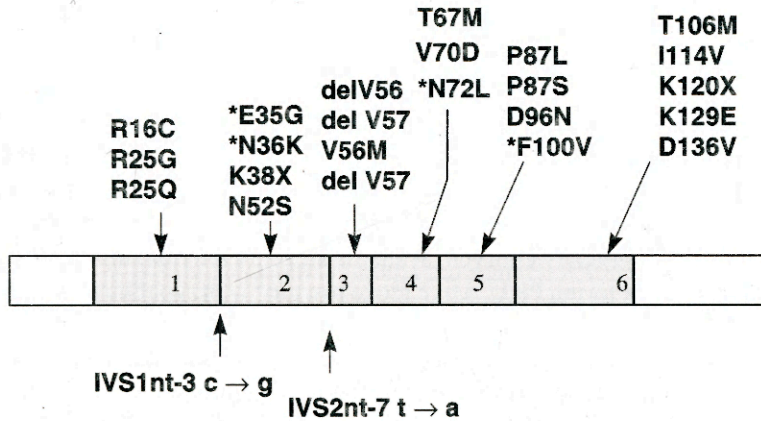
Ostatnio publikowane wyniki badań z zastosowaniem protonowego rezonansu magnetycznego (¹H-NMR) sugerują, że pomiędzy ludźmi istnieją różnice w kinetyce przyswajania, metabolizmu fenyloalaniny i jej przenikania przez barierę krew-mózg (104, 105). W rezultacie wewnątrzmożgowe stężenia fenyloalaniny u chorych z PKU mogą być bardzo

różne, mimo takich samych stężeń fenyloalaniny we krwi i takich samych genotypów w *locus PAH* (106). Jak dotąd nie wiadomo nic o genach wpływających na transport fenyloalaniny poprzez barierę krew-mózg.

Można zatem przyjąć, że nawet klasyczna fenyloketonuria, rozpatrywana na poziomie „fenotypu umysłowego”, jest cechą złożoną, wieloczynnikową oraz znajdującą się pod kontrolą wielu genów.

5.1.4. Mutacje w genie *PTS*

W badanej grupie chorych zidentyfikowano 5 różnych mutacji w genie *PTS*. Dwie z nich, D136V i N36K, znaleziono łącznie w $\frac{3}{4}$ wszystkich zmutowanych alleli. Cztery spośród zidentyfikowanych mutacji to mutacje nowe (E35G, N36K, N72L i F100V), wykryte po raz pierwszy w badanej grupie chorych.



Ryc. 11. Najczęściej występujące mutacje w genie *PTS*. Mutacje zidentyfikowane po raz pierwszy w badanej grupie chorych zaznaczono gwiazdką.

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

Znany jest przypadek chorego z centralną postacią deficytu PTPS o genotypie T67M/D136V. Zaobserwowano u niego niestabilność enzymu, powstającego na matrycy zmutowanych w różny sposób alleli. Jednocześnie z badań *in vitro* wiadomo, że obie mutacje analizowane w układzie ekspresji *in vitro* prowadzą do powstania syntazy zachowującej umiarkowaną aktywność resztkową. Zaproponowano więc, że mutacje te prowadzą do powstania podatnych na degradację *in vivo* form enzymu (107).

Identyfikacja w badanej grupie dwu chorych homozygotycznych pod względem mutacji D136V wykazujących postać obwodową defektu syntazy, sugeruje iż niestabilność en-

zymu zaobserwowana u chorego T67M/D136V wynikać może z faktu zaburzonego współdziałania, w różny sposób zmutowanych podjednostek syntazy (efekt negatywnego dominowania). Hipotezę tę może zweryfikować dopiero oznaczenie aktywności PTPS w hodowli fibroblastów chorych KT i OK.

Chora o inicjałach CE (lat 19) została błędnie zdiagnozowana w okresie noworodkowym jako klasyczna postać PKU i leczona dietą niskofenyloalaninową. W wieku 17 lat pojawiły się problemy neurologiczne. Diagnostyka molekularna wykazała obecność mutacji N36K/N72L w genie *PTS*. Nie wykonano oznaczenia poziomu pteryn w płynie mózgowo-rdzeniowym chorej, co pozwoliłoby postawić definitywne rozpoznanie obwodowej („łagodnej”) postaci deficytu PTPS. Jednak brak degradacji psychicznej i zaburzeń neurologicznych, aż do wieku kilkunastu lat sugeruje postać łagodną. Ponieważ mutacja N36K wraz z mutacją D136V została zidentyfikowana u chorych z postacią centralną deficytu PTPS (tab. VII), można przypuszczać, że mutacja N72L jest mutacją „łagodną”.

5.1.5. Alternatywne składanie transkryptu pierwotnego genu *PTS* w leukocytach krwi obwodowej

Syntaza tetrahydrobiopterynowa ulega ekspresji w wątrobie, a także m.in. w fibroblastach. Natomiast w leukocytach krwi obwodowej wykrywa się jedynie transkrypty ektopowe.

Podjęto próbę wykorzystania łatwo dostępnych leukocytów krwi obwodowej do analizy mutacji w cDNA *PTS*. Analizując transkrypty ektopowe dziesięciu osób, dziewięciu zdrowych i jednego chorego z deficytem PTPS i genotypem D136V/D136V nieoczekiwanie zidentyfikowano u wszystkich mRNA z delecją obejmującą pełen ekson 3. U chorego potwierdzono jednocześnie genotyp warunkujący deficyt PTPS.

Wspomniana delecja 23 nukleotydów nie występuje w transkryptach izolowanych z hodowli fibroblastów, ani w genomowym DNA. Wskazuje na to obecność mutacji D136V wykrywanych w genomowym DNA i transkryptach izolowanych z hodowli fibroblastów chorego.

W niektórych przypadkach transkryptowi z delecją towarzyszyły transkrypty pełnej długości. Nie określono jednak dokładnie proporcji obu form mRNA. Z obrazu rozdziału elektroforetycznego (2,5% agaroz) powielonej sekwencji kodującej *PTS* można wnosić, że obie formy występują w podobnych ilościach. Wydaje się więc, że w leukocytach ma miejsce oprócz prawidłowego, także alternatywny splicing transkryptu pierwotnego. Nie jest jednak wykluczone, że efekt ten to artefakt, towarzyszący procesowi izolacji RNA.

Rutynowa diagnostyka molekularna deficytu PTPS nie może być zatem prowadzona w oparciu o mRNA izolowany z leukocytów krwi obwodowej.

5.1.6. Mutacje w genie *GALT*

U wszystkich chorych z klasyczną galaktozemią znaleziono silne mutacje w obu allelach genu *GALT*. Wśród 18 mutacji, siedem to mutacje nowe, zidentyfikowane po raz pierwszy w badanej grupie.

Korelacje pomiędzy genotypem a fenotypem klinicznym galaktozemii sprowadzają się w zasadzie do podziału na mutacje „silne” i „słabe”. Próba oceny korelacji pomiędzy nasileniem objawów w okresie noworodkowym, przebiegiem klinicznym czy poziomem galaktozo-1-fosforanu, a genotypem u pacjentów z różnymi mutacjami „silnymi” nie dała wyraźnych rezultatów. Także w obrębie grupy chorych o takim samym genotypie (np. IVS3/IVS3 czy Q188R/Q188R) istnieje duże zróżnicowanie objawów klinicznych. Zróżnicowanie to występuje nawet pomiędzy rodzeństwem o tym samym genotypie.

Wydaje się że jedynie genotyp K285N/K285N znaleziony u 8 probandów związany jest z ostrzejszym przebiegiem galaktozemii i degradacją psychoruchową, poważnymi zaburzeniami mowy, zwłaszcza po 4. roku życia. Efektu takiego nie obserwowano w grupie 22 chorych z genotypem Q188R/Q188R oraz u 20 chorych z genotypem Q188R/N285N.

Z danych literaturowych wynika, że z mutacją R333W związany jest hipogonadyzm u dziewcząt. Związek taki został potwierdzony w badanej grupie chorych u dziewczynki o genotypie: Q188R/R333W. Hipogonadyzm obserwowano jednak także u chorych kobiet z innymi genotypami np. Q188R/Q188R.

Przyjmuje się, iż w przypadku galaktozemii, odmiennie niż w hiperfenyloalaninemii, tło metaboliczne w znaczącym stopniu modyfikuje przebieg kliniczny choroby. Często, jednak nie zawsze, duże znaczenie ma czas rozpoczęcia leczenia dietą bez galaktozy. Dieta wprowadzona w okresie rozwoju płodowego bądź od pierwszego karmienia dziecka pozwala uniknąć ciężkiego przebiegu noworodkowego i do pewnego stopnia ograniczyć występowanie skutków późnych. Jednak nawet prawidłowo stosowana dieta nie gwarantuje normalnego rozwoju umysłowego dzieci z galaktozemią.

Brak aktywności GALT prowadzi do podwyższenia poziomów galaktozy i jej metabolitów: galaktozo-1-fosforanu, galaktonianu i galaktitolu w tkankach i płynach ustrojowych. Przyjmuje się, iż związki te (zwłaszcza galaktitol) odgrywają zasadniczą rolę w pojawianiu się wczesnych objawów galaktozemii, do których należą żółtaczka, skaza krwotoczna, wodobrzusze, niekiedy wymioty, biegunki, wyniszczenie, skłonność do zakażeń, zaćma.

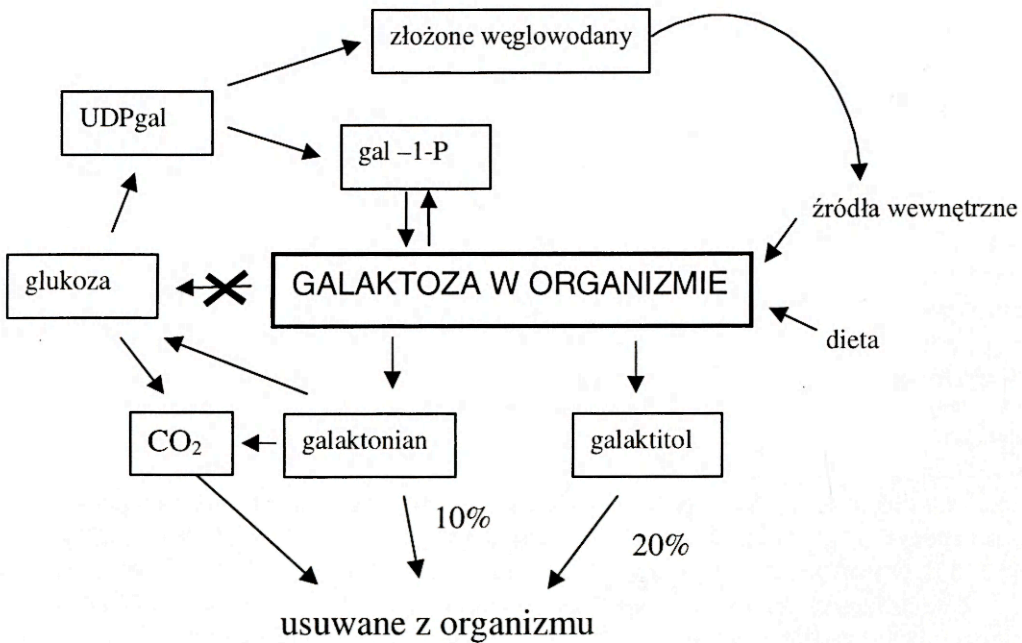
Późne skutki choroby, przede wszystkim o charakterze neurologicznym, wynikają najprawdopodobniej z niedoboru UDP-galaktozy, prowadzącego do zakłócenia galaktozylacji glikoprotein i glikolipidów. Zakłóceniu ulegają również procesy fosforylacji. Niepełna skuteczność diety eliminacyjnej w późniejszym okresie życia chorych wynika najpewniej ze spożywania galaktozy obecnej w tzw. ukrytych źródłach (owoce, warzywa) oraz – co ważniejsze – endogennej produkcji galaktozy i jej toksycznych metabolitów. Galaktoza endogenna wytwarzana jest w wyniku katabolizmu złożonych węglowodanów (np. glikolipidów, glikoproteidów) oraz z UDPgalaktozy (wytwarzanej z kolei z glukozy).

Deficyt GALT powodować może zmiany już w okresie płodowym: zaćmę wrodzoną, uszkodzenia jajników oraz objawy marskości wątroby. Przypuszcza się, że wiele nieprawidłowości ujawniających się w późniejszym okresie życia chorych może mieć swój początek w okresie życia płodowego. Ponieważ galaktoza łatwo przenika przez łożysko duże znaczenia ma utrzymywanie przez kobietę ciężarną diety bezmlecznej.

Wspomniane mechanizmy patogenezy są jednakowe u wszystkich chorych. Jednak skutek ich działania może być różny u różnych osób. Różnice w obrazie klinicznym choroby ujawniają się już u noworodków, ale są szczególnie wyraźne w późniejszych okresach

życia. Postulowane do niedawna czynniki prognostyczne w galaktozemi takich jak wiek rozpoznania, przebieg choroby w okresie noworodkowym czy jakość diety, mają ograniczone znaczenie. Różnorodność przebiegu klinicznego w ograniczonym stopniu warunkowana jest rodzajem mutacji w genie *GALT*. Jednak nawet w obrębie grupy chorych z tymi samymi mutacjami obserwuje się dużą zmienność objawów klinicznych.

Obecnie uznaje się, że „samozatrucie”, powodowane wytwarzaniem galaktozy w organizmie chorego, szczególnie we wczesnym niemowlęctwie, jest najważniejszym czynnikiem patogennym. Zasadnicze przemiany galaktozy w organizmie chorego z galaktozemią przedstawia ryc. 12.



Ryc. 12. Schemat metabolizmu galaktozy w organizmie chorego z galaktozemią znajdującego się na diecie z ograniczoną podażą galaktozy. Mutacje w genie *GALT* powodują blok metaboliczny przekształcania galaktozy do glukozy, co powoduje gromadzenie galaktozy w organizmie. Uaktywieniu ulegają alternatywne szlaki przekształcania galaktozy, powstaje m.in. galaktitol i galaktonian. Galaktitol nie ulega przekształceniom i wydalany jest z moczem. Galaktonian może być utleniany do CO_2 lub przekształcany do glukozy. Niewielkie ilości galaktozy pochodzą z diety (tzw. źródła ukryte), lecz większość powstaje z rozpadu złożonych węglowodanów i UDP-galaktozy. Około 30% wewnętrznie wytworzonej galaktozy usuwane jest z moczem w postaci galaktonianu (10%) i galaktitolu (20%). Reszta ulega utlenieniu poprzez galaktonian oraz być może w wyniku istnienia resztkowej aktywności *GALT*. Jak się okazuje chorzy potrafią w ciągu kilku godzin utlenić stosunkowo duże ilości galaktozy.

Mutacje w genie *GALT* powodują blok metaboliczny przekształcania galaktozy do glukozy, co powoduje gromadzenie galaktozy w organizmie. Uaktywieniu ulegają alternatywne szlaki przekształcania galaktozy, powstaje m.in. galaktitol i galaktonian. Galaktitol nie ulega przekształceniom i wydalany jest z moczem. Galaktonian może być utleniany do CO₂ lub przekształcany do glukozy. Niewielkie ilości galaktozy pochodzą z diety (tzw. źródła ukryte), lecz większość powstaje z rozpadu złożonych węglowodanów i UDP-galaktozy. Około 30% wewnątrz wytworzonej galaktozy usuwane jest z moczem w postaci galaktonianu (10%) i galaktitolu (20%). Reszta ulega utlenieniu poprzez galaktonian oraz być może w wyniku istnienia resztkowej aktywności *GALT*. Jak się okazuje chorzy potrafią w ciągu kilku godzin utlenić stosunkowo duże ilości galaktozy.

Pełna charakterystyka chorego z galaktozemią obejmować powinna znajomość następujących elementów:

- stopnia wytwarzania endogennej galaktozy
- zdolności organizmu do utleniania galaktozy
- aktywności alternatywnych szlaków przemiany gal (np. szlaku prowadzącego do wytwarzania kwasu galaktonowego)
- oraz rodzaju mutacji (108).

Nie istnieje prosta korelacja pomiędzy genotypem w genie *GALT*, a przebiegiem klinicznym galaktozemią.

Na przykład mutacja S135L uznawana jest za mutację „łagodną” w układzie homozygotycznym, w przypadku stosowania diety. Jednak ocena aktywności zmutowanego białka *GALT* różniła się znacznie. Na przykład u chorych S135L/S135L nie jest wykrywana aktywność *GALT* w erytrocytach, podczas gdy w wątrobie i śluzówce jelita aktywność resztkowa wynosi około 10%, a w leukocytach jest rzędu 0-5%. Zastosowanie drożdżowego układu *in vitro* umożliwiło dokładniejsze oznaczenia kinetyczne, wskazujące, że mutacja S135L powoduje zmniejszenie wartości K_m *GALT* około 2 razy, a aktywności specyficznej około 10 razy (109). Chorzy niosący w jednym lub dwu allelach mutację S135L produkują ponadto mniej galaktitolu, niż chorzy z klasyczną galaktozemią (110).

Z opublikowanych ostatnio wyników badań nad zdolnością organizmu chorych z galaktozemią do utleniania galaktozy wynika natomiast, iż chorzy genotypie S135L/S135L, S135L/Q188R czy Q188R/N314D nie różnią się od osób zdrowych pod względem ogólnej zdolności organizmu do utleniania galaktozy (111, 112).

Jednak w badanej grupie chorych pacjentka S135L/Q188R prezentuje klasyczną postać galaktozemią. Nie znaleziono u niej w genie *GALT* innych, charakterystycznych zmian sekwencji. Wydaje się, że wspomniane trudności w ustaleniu siły mutacji S135L wskazują na znaczący udział dodatkowych czynników metabolicznych, przynajmniej dla niektórych genotypów *GALT*.

Wśród dzieci znajdujących się pod opieką Kliniki Pediatrii IMiD nie ma chorych z aktywnością resztkową galaktotransferazy rzędu 0,5-3% i łagodniejszym przebiegiem choroby. Jest to sytuacja odmienna od tej, jaką opisywano dla populacji europejskich: np. niemieckiej czy tureckiej. W populacjach tych nawet kilka procent wszystkich chorych z niedoborem *GALT* charakteryzuje się aktywnością resztkową enzymu od 1 do 3%. Trudno jednoznacznie określić przyczyny takiego stanu rzeczy.

5.1.7. Pacjenci z wysoką resztkową aktywnością GALT

Wśród chorych z łagodną galaktozemią pełną korelację pomiędzy genotypem w *locus GALT* a poziomem aktywności transferazy wykazano jedynie dla genotypów K285N/N314D D-2 i Q188R/N314D D-2. Mutacja N314D wraz z towarzyszącymi polimorfizmami w intronach 4 i 5, to molekularny odpowiednik biochemicznie definiowanego wariantu Duarte-2. W układzie homozygotycznym powoduje obniżenie aktywności GALT do 50%. W połączeniu z mutacją silną obniża aktywność enzymu do 25%.

U chorych z pojedynczą silną mutacją należało się spodziewać aktywności GALT rzędu 50%. Podobną, u chorego z mutacjami N314D w obu allelach genu GALT. Odnotowana aktywność około 25% może mieć różne przyczyny:

Możliwa jest obecność mutacji w obszarach nie sekwencjonowanych (np. nie ulegającym translacji regionie 3') lub w innych genach związanych z powstawaniem fenotypu galaktozemii. Mutacje silne, typu Q188R i K285N są mutacjami częściowo negatywnie dominującymi. Efekt ten związany jest z oligomeryczną budową białka transferazy. Niektóre mutacje mogą zakłócać współdziałanie podjednostek prawidłowych i zmutowanych w tworzeniu aktywnej GALT.

Innym prawdopodobnym wyjaśnieniem jest błąd metody w oznaczaniu aktywności GALT Zakładzie Biochemii Instytutu Matki i Dziecka. Sięgać on może nawet 12% w przypadku niezerowej aktywności transferazy. Efekt ten może ulec wzmocnieniu ze względu na szeroki zakres aktywności prawidłowej GALT w populacji ogólnej. Punktem odniesienia dla określania procentowej aktywności GALT jest bowiem wartość średnia w populacji: 23,8 $\mu\text{M UDPgal/h/gHb}$. Tymczasem przedział zmienności jest dość duży: od 16,7 do 35 $\mu\text{M UDPgal/h/gHb}$. Jeżeli tłem metabolicznym dla pojedynczej, silnej mutacji jest wartości aktywności enzymu z lewego krańca przedziału, to można oczekiwać wartości około 25-35% normy. Poziomy takie zanotowano u chorych z badanej grupy, u których wykryto pojedynczą mutację silną.

Interpretację taką sugeruje również fakt nie znalezienia żadnych polimorfizmów intronowych u chorych z oznaczoną pojedynczą mutacją „silną”. Związek mutacji „silnych” ze specyficznymi markerami sugerowałby bowiem np. istnienie mutacji „łagodnej” w nie badanych obszarach genu, bądź wskazywałby że polimorfizmy same wpływają na zmniejszenie aktywności GALT.

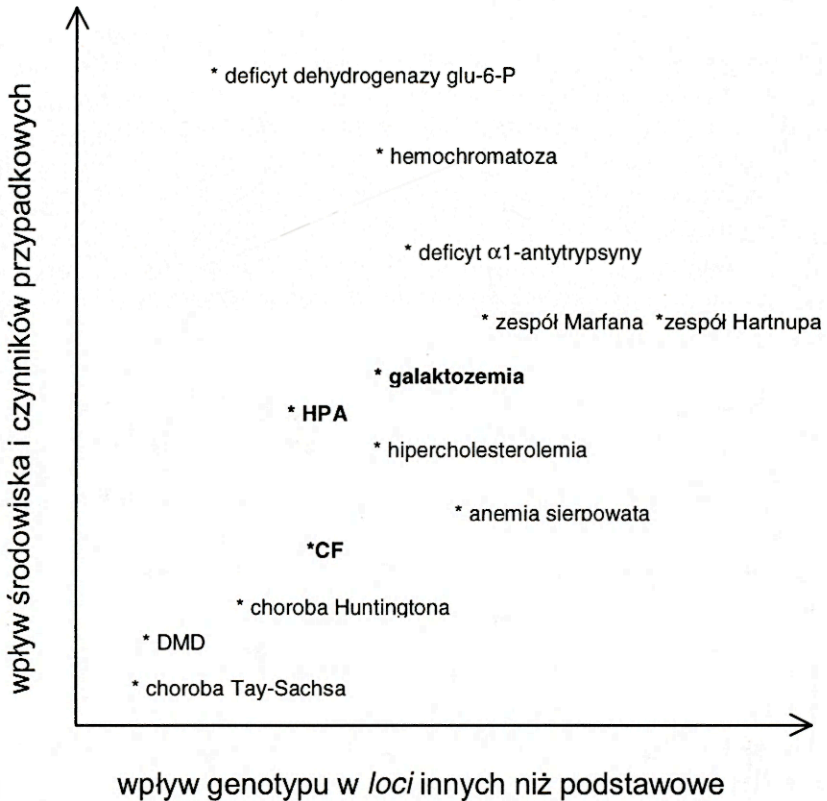
Trudności w interpretacji wyników diagnostyki molekularnej, takie jak opisana powyżej, wskazują dobitnie na konieczność poprawnej charakterystyki biochemicznej i klinicznej chorych. Diagnostyka molekularna nie jest metodą absolutną lecz pomocniczą i zawsze wymaga interpretacji w świetle pełnego obrazu klinicznego i biochemicznego osoby chorej lub rodziny ryzyka. Również wprowadzenie nowych testów molekularnych, zwłaszcza na szeroką skalę, powinno być poprzedzone otwartą dyskusją nad ich użytecznością i znaczeniem dla dobra badanych osób.

W tym kontekście znamienny jest wynik diagnostyki u chorych z podejrzeniem deficytu GALE. W jej wyniku nie znaleziono mutacji w genach GALE, a także GALT – co pozostaje w sprzeczności z rozpoznaniem klinicznym. Jednak samo rozpoznanie nie opiera się na bezpośrednim pomiarze aktywności GALE we krwi chorych, a jedynie na pośred-

nich wskazówkach (np. poziom galaktozo-1-fosforanu, galaktitolu, aktywność GALT). Można zatem przypuszczać, że fenotyp kliniczny przypominający deficyt GALE powodowany jest także przez defekt innych genów. Obserwacja ta wskazuje również na bezwzględną konieczność prowadzenia rutynowej diagnostyki biochemicznej innych niż klasyczna postaci galaktozemii.

5.2. ZŁOŻONOŚĆ CHORÓB JEDNOGENOWYCH: NAUKA I TECHNIKA

Wszystko, co powiedziano wyżej wskazuje, że tradycyjne wyróżnianie chorób jednogenowych i wieloczynnikowych, jest uproszczeniem. W przypadku wszystkich schorzeń genetycznych, oprócz podstawowego genu, którego mutacje powodują chorobę, w tworzeniu fenotypu uczestniczyć może wiele genów i obszarów chromosomów, a także środowisko zewnętrzne (por. rycina poniżej) (113).



Ryc. 13. Schemat obrazuje potencjalny wpływ genotypu i czynników innych niż genetyczne na fenotyp niektórych chorób jednogenowych. Nie uwzględniono heterogenności wynikającej z wielości mutacji w podstawowym genie warunkującym chorobę.

Szlaki metaboliczne nie są zwykle kontrolowane w pojedynczych miejscach lecz na wszystkich etapach przemian, które łącznie wpływają na wydajność całego procesu. Regulacja dokonywana jest ponadto na wszystkich poziomach (molekularnym, komórkowym, narządowym, organizmalnym), a modulatorami mogą być czynniki zarówno z obrębu regulowanego systemu, jak spoza niego. Nasze rozeznanie zarysowanych złożoności pozostaje na bardzo elementarnym poziomie. Wyjaśnienie wymagało będzie podejścia bardziej całościowego, niż to prezentowane przez współczesną biologię molekularną.

Nadzieje związane z badaniami genetycznymi są ogromne. Wyrażają je zarówno środowiska naukowe i medyczne, związane z przemysłem biotechnologicznym i farmaceutycznym, jak opinia publiczna. Włączenie aspektu molekularnego do projektów naukowych z wielu dziedzin nauki podstawowej i stosowanej ułatwia zdobywanie funduszy niezbędnych do prowadzenia badań. Jednocześnie w prasie popularnej pojawiają się doniesienia o najnowszych badaniach z dziedziny genetyki molekularnej, z sugestią iż od odkrycia genu do terapii jeden tylko krok. Często jednak oryginalne publikacje dotyczą jedynie powiązania genu czy jedynie odcinka chromosomu, z chorobą. Poznanie patomechanizmu choroby pozostaje najczęściej bardzo odległym celem.

Bezpośrednim, najprostszym, rezultatem poznania sekwencji genomu człowieka będzie zapewne opracowanie diagnostycznych i prognostycznych testów molekularnych dla wielu schorzeń dziedzicznych. Dostępność testów powiększy grupę chorób uwarunkowanych genetycznie, które można diagnozować lecz nie można leczyć. Nie należy się bowiem spodziewać skutecznych form somatycznej terapii genowej wcześniej niż za 20-40 lat.

Jednak nawet w przypadku prostych chorób jednogenowych, w tworzeniu fenotypu klinicznego w różnym stopniu uczestniczy wiele genów, a także środowisko zewnętrzne. Identyczne mutacje powodują czasami różne nasilenie choroby u różnych osób. Niekiedy zaś mutacje w tym samym genie wywołują zasadniczo odmienne jednostki chorobowe. Określenie korelacji pomiędzy genotypem a fenotypem klinicznym wymaga zatem długotrwałych, wielośrodkowych badań. Jeszcze bardziej skomplikowane zależności występują w przypadku schorzeń wieloczynnikowych i wielogenowych. Problemy te wykraczają poza poznanie informacji liniowej, zawartej w DNA – wymagają badania komórek, ich zespołów oraz całego organizmu (114).

5.3. PRAKTYCZNE WNIOSKI BIOCHEMICZNE

Przedstawiony materiał sugeruje wyraźnie, iż w przypadku galaktozemii daleko ważniejsza od określania genotypu, jest pełna diagnostyka biochemiczna chorych. Powinna obejmować oznaczanie poziomu aktywności trzech podstawowych enzymów szlaku przemian galaktozy (GALT, GALE i GALK), zawartości galaktozy we krwi oraz podstawowych toksycznych metabolitów (galaktozo-1-fosforanu, galaktitolu i galaktonianu). Nowoczesne techniki diagnostyczne wykorzystujące chromatografię gazową i spektrometrię masową, pozwalają szybko i precyzyjnie oszacować endogenną produkcję galaktozy przez organizm chorego. Rozmiary produkcji endogenne w dużym stopniu wpływają na późne objawy galaktozemii (115).

Pewne znaczenie diagnostyczne może mieć również określanie tempa przekształcania [$1-^{13}\text{C}$] galaktozy do $^{13}\text{CO}_2$, dostarczające informacji o ogólnej zdolności organizmu do utleniania galaktozy. W ten sposób można odróżnić ciężkie od łagodnych postaci deficytu GALT. Jednak w przypadku niektórych genotypów (np. R258C/Y209C, K285N/T138M, S135L/S135L) pomimo niskiej aktywności resztkowej GALT w erytrocytach, całkowita zdolność organizmu do utleniania galaktozy pozostaje prawidłowa. Zjawisko to wynika zapewne z resztkowej aktywności GALT w innych tkankach (wątrobie, jelicie cienkim).

Wykrycie w okresie noworodkowym rzadko występujących bądź nowych mutacji w genie *GALT*, połączone nawet z zerową aktywnością enzymu w erytrocytach nie powinno stanowić wyłącznej podstawy do wprowadzenia diety pozbawionej laktozy. Decyzja co do zakresu i czasu stosowania diety powinna być poprzedzona dokładnymi badaniami biochemicznymi, na przykład testem oceniającym zdolność noworodka do utleniania galaktozy.

W galaktozemii diagnoza molekularna stanowi zatem jedynie uzupełnienie i rozszerzenie rozpoznania biochemicznego i klinicznego. Wydaje się na przykład, że znalezienie u probanda mutacji K285N w układzie homozygotycznym, sugeruje ciężki przebieg galaktozemii. Podobnie identyfikacja mutacji R333W sugerowała będzie wystąpienie w okresie dojrzewania hipogonadyzmu u dziewcząt.

Identyfikacja wielu polimorficznych zmian w genie *GALT* wskazuje, że oczekiwać można dodatkowych podstawień nukleotydowych w regionach znajdujących się pod mniejszą presją selekcyjną. Przykładem może być mutacja I378V zidentyfikowana jako trzecia, u chorego z klasyczną galaktozemią (por. *Wyniki*). W tego typu przypadkach trudno niekiedy zdecydować, która z mutacji jest zmianą powodującą chorobę, a która milczącym podstawieniem nukleotydowym (116).

5.4. WYBÓR TECHNIKI WYKRYWANIA MUTACJI

W ciągu sześciu lat wprowadzono do rutynowej praktyki Zakładu Genetyki Medycznej IMiD szereg nowoczesnych metod analizy kwasów nukleinowych. Dzięki nim można identyfikować najczęściej występujące w populacji polskiej mutacje powodujące różne choroby uwarunkowane genetycznie (por. tab. XIII w *Uzupełnieniach*). Można również poszukiwać mutacji rzadkich i nieznanych. Podstawową i niezastąpioną techniką stało się bezpośrednie, fluorescencyjne sekwencjonowanie DNA. Doświadczenie zdobyte przy analizie mutacji powodujących hiperfenyloalaninemię i galaktozemię może znaleźć zastosowanie w diagnostyce molekularnej innych chorób uwarunkowanych genetycznie, a także nowotworów. Poniżej sformułowano kilka praktycznych wniosków, dotyczących prowadzenia diagnostyki molekularnej.

Do izolacji DNA z powodzeniem stosować można metodę stopniowego wysalania białek komórkowych. Cechuje ją prostota i szybkość wykonania. W rzadkich przypadkach czystość preparatów nie wystarcza do prowadzenia np. reakcji wielokrotnego PCR. Wymagany jest wtedy dodatkowy etap oczyszczania, korzystnie metodą dializy kroplowej. Preparaty DNA otrzymane metodą wysalania można stosować także w hybrydyzacji genomowej. Inne sposoby izolacji DNA (np. ekstrakcja organiczna, selektywna adsorbcja na handlowo

dostępnych żelach krzemionkowych) stosowano rzadko, ze względu na wyższe koszty odczynników. Czystość preparatu i długość otrzymywanych fragmentów DNA można jednak w ten sposób zwiększyć, co jest niekiedy istotne.

Do izolacji całkowitego RNA komórkowego lub całkowitego poli(A)-mRNA można wykorzystać zmodyfikowaną metodę Chomczyńskiego lub zestawy do selektywnej adsorpcji adenylowanych transkryptów. Dużo większą labilność cząsteczek RNA w porównaniu z DNA, powoduje iż praca wymaga zachowania odpowiednich warunków czystości.

Jakość preparatów kwasów nukleinowych należy początkowo oceniać spektrofotometrycznie oraz elektroforetycznie. Po ustaleniu rutynowych warunków izolacji można zrezygnować z kontroli wszystkich preparatów DNA, na rzecz okresowego sprawdzania jakości. Bardziej wrażliwe na degradację preparaty RNA powinno się natomiast oceniać każdorazowo przed dalszymi etapami analizy.

Wybór techniki wykrywania mutacji zależy zarówno od molekularnej natury diagnozowanej choroby, jak rodzaju laboratorium (117). W przypadku chorób genetycznych powodowanych niewielką liczbą lub kilkoma zdecydowanie częstymi mutacjami, optymalne jest stosowanie technik analizy rutynowej: PCR-RFLP, ACRS (techniki sztucznie stworzonych miejsc restrykcyjnych), ASO (hybrydizacji oligonukleotydowej) czy odwrotnej hybrydizacji. Po odpowiednim przeszkoleniu personelu i opracowaniu zasad kontroli wewnętrznej oraz zewnętrznej (kontakt z laboratorium referencyjnym) w rutynowej diagnostyce prowadzonej nawet w małych laboratoriach przyszpitalnych, stosować można handlowo dostępne zestawy diagnostyczne.

Do wykrywania obszarów genów o sekwencji nukleotydowej odmiennej od typowej, z powodzeniem stosować można technikę SSCA oraz HA. Możliwe jest stosowanie jednocześnie obu metod i prowadzenie rozdzielu elektroforetycznego np. w żelu MDE, charakteryzującym się lepszym (w porównaniu z tradycyjnymi żelami poliakrylamidowymi) rozdziałem form konformacyjnych DNA. Technika HA pozwala ponadto przeglądać odcinki DNA o długości większej niż SSCA (powyżej 500pz). Optymalne warunki elektroforezy muszą zostać ustalone eksperymentalnie dla konkretnych fragmentów DNA.

Powielone fragmenty genu o zmienionej sekwencji należy poddać sekwencjonowaniu, nawet wtedy, gdy wzór prążków SSCP lub HA wskazuje na występowanie konkretnej mutacji. Z tego powodu można pominąć wstępne przeszukiwanie sekwencji genu. Bezpośredniemu, fluorescencyjnemu sekwencjonowaniu poddawać należy eksony badanego genu w kolejności, ustalonej w badaniu pilotowym. W przypadku badania genów o niewielkiej liczbie eksonów można prowadzić jednocześnie sekwencjonowanie wszystkich fragmentów kodujących białko.

W diagnostyce można również wykorzystać określanie sekwencji cDNA genu. Niekiedy jednak pełny mRNA można otrzymać tylko z określonego rodzaju tkanki. Z ekonomicznego punktu widzenia, w przypadku genów liczących niewiele eksonów metoda oparta na analizie cDNA nie daje zbyt wiele korzyści, gdyż konieczne jest stosowanie dodatkowego etapu RT-PCR. Ponadto potwierdzenie mutacji zakłócającej wycinanie intronów wymaga sekwencjonowania odpowiedniego fragmentu genomowego DNA. Dodatkową trudnością jest konieczność sekwencjonowania z obu stron fragmentów cDNA liczących powyżej 600 pz, dla uniknięcia niepewności w określaniu podstawień nukleotydowych na

końcach sekwencji. Przeszkodą może być również występowanie w sekwencjach intronowych dużej liczby istotnych (lub potencjalnie istotnych) diagnostycznie polimorfizmów.

Wydaje się więc, że do celów diagnostyki molekularnej prościej stosować bezpośrednie sekwencjonowanie kolejnych eksonów. Taki wybór jest uzasadniony ekonomicznie w przypadku genów liczących od kilku do kilkunastu eksonów o długości do około 600 pz, w których mutacje rozmieszczone są nierównomiernie we wszystkich obszarach genu.

Każdego roku pojawia się na rynku szereg nowych testów diagnostycznych, często wykorzystujących nowe metody identyfikowania mutacji. Wprowadzenie do rutynowej diagnostyki konkretnej techniki powinno być zawsze poprzedzone niewielkim programem sprawdzającym zdolność techniki do wykrywania mutacji w konkretnej populacji, oceną niezawodności testu, włączając w to możliwe wyniki fałszywie negatywne i fałszywie pozytywne czy dopasowanie handlowego zestawu do stosowanej w laboratorium metody izolacji DNA lub RNA.

5.5. RUTYNOWA DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA CHOROÓB DZIEDZICZNYCH – TECHNICZNE ZASADY WYBORU

Otrzymane wyniki prócz znaczenia czysto poznawczego, służyły wprowadzeniu nowoczesnych metod diagnostyki molekularnej i stworzeniu referencyjnego laboratorium diagnostycznego chorób genetycznych. Z perspektywy sześciu lat pokusić się można o odpowiedź na zasadnicze pytanie: w jakich sytuacjach stosować należy diagnostykę molekularną i jakie mutacje identyfikować. Odpowiedź na to pytanie zależy nie tylko od dyskutowanych powyżej uwarunkowań poznawczych i technicznych, lecz również od użyteczności klinicznej wyniku diagnostyki, istnienia konkurencyjnych metod biochemicznych czy możliwości finansowania diagnostyki molekularnej.

Obecnie pourodzeniowa diagnostyka HPA oparta jest na tanim, prostym i stosunkowo precyzyjnym teście kolorymetrycznym. Cena pojedynczego wyniku wynosi 11 zł. W przypadkach dzieci z podwyższonym poziomem fenyloalaniny we krwi wykonywane są dodatkowe badania: fluorometryczne określenie stężenia fenyloalaniny i tyrozyny, oznaczenie profilu pteryn w moczu, test obciążenia tetrahydrobiopteryną oraz oznaczanie aktywności reduktazy dihydrobiopterynowej. Koszt dodatkowych badań jest mniej więcej rząd wielkości wyższy, pozwala jednak zdiagnozować konkretną postać HPA.

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

Niekiedy jednak dokładne określenie postaci HPA może być trudne: w okresie noworodkowym postaci łagodne naśladują klasyczną PKU lub niekiedy odwrotnie (por.: *Wyniki*). Pewne rozpoznanie postawione być może metodami klasycznymi niekiedy po kilkunastu miesiącach obserwacji. Diagnostyka molekularna oparta na sekwencjonowaniu oferuje w tym wypadku szybkie (tydzień) i pewne rozpoznanie konkretnej postaci HPA, umożliwiające szybkie wprowadzenie odpowiedniej diety i udzielenie porady rodzicom (118, 119).

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

Tabela X. Zasadnicze korelacje pomiędzy rodzajem mutacji w *locus PAH* a postacią kliniczną HPA

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

Wczesna identyfikacja mutacji „pośrednich” (np. R241H) może być szczególnie użyteczna klinicznie. Niekiedy bowiem podwyższenie stężenia feniloalaniny we krwi dzieci z łagodną PKU następuje powoli, tak że diagnoza kliniczna zostaje postawiona dopiero pod koniec pierwszego roku życia lub jeszcze później (120, 121). Możliwe są także sytuacje odwrotne, gdy u noworodka występują stężenia feniloalaniny charakterystyczne dla PKU, w ciągu kilku miesięcy ustalają się na poziomie charakterystycznym dla łagodnej HPA. Możliwe jest także, że wstępne rozpoznanie łagodnej HPA nie uzyska potwierdzenia molekularnego, a dalsza obserwacja kliniczna wskazuje na przejściową, niedziedziczną HPP. Znane są także przypadki przejściowo podwyższonych poziomów feniloalaniny u nosicieli jednej mutacji w genie *PAH* (122). Podobne przypadki opisano także w niniejszej pracy.

Diagnostyka molekularna jest istotna w przypadku rodzin ryzyka, w których zidentyfikowano różne postaci HPA, np. łagodną HPA i łagodną PKU u rodzeństwa. Znalezienie mutacji pozwoli wyjaśnić czy np. jest to wynikiem odziedziczenia mutacji związanej z równymi postaciami HPA, lub też czy jeden z rodziców jest niesie dwie mutacje łagodne, powodujące bezobjawową HPA. Rozróżnienie to jest istotne z punktu widzenia poradnictwa genetycznego.

Wskazaniem do diagnostyki molekularnej z wykorzystaniem sekwencjonowanie może być także postać łagodnej PKU, w której identyfikacja mutacji może dostarczyć informacji istotnych np. do określenia sposobu prowadzenia diety niskofeniloalaninowej. Koszt pojedynczego badania sięga szacunkowo 600-900 zł.

W przypadku HPA powodowanej deficytem enzymów innych niż DHPR zasadne wydaje się stosowanie diagnostyki molekularnej. Dla deficytu PTPS i GTP-CH na przykład

opisano korelacje pomiędzy genotypem a przebiegiem choroby, istotne dla strategii leczenia chorych. Zbyt niska liczba zidentyfikowanych genotypów, zwłaszcza w przypadku defektu cyklohydrolazy, nie pozwala jednak na pewne wnioski.

Odmienne przedstawia się sytuacja diagnostyki molekularnej klasycznej PKU. W obrębie tej postaci HPA nie znaleziono dotąd istotnych klinicznie korelacji pomiędzy genotypem a fenotypem klinicznym. Potwierdzenie jedynie rozpoznania biochemicznego i klinicznego klasycznej PKU wydaje się bezzasadne merytorycznie i nieopłacalne ekonomicznie (123-125).

Wyjątek może stanowić wspomniana w *Wynikach* mutacja R261Q, którą w różnych populacjach powiązano z zasadniczo normalnym poziomem intelektualnym, mimo wysokich stężeń fenylalaniny. Znane przypadki chorych wykrywane są często przypadkowo, na podstawie wystąpienia fenylketonurii matczynej u potomstwa kobiety pozornie zdrowej, która z jakichś względów nie została zidentyfikowana w teście pourodzeniowym.

Diagnoza molekularna jest niewątpliwie sposobem pewnej identyfikacji nosicieli jednej kopii zmutowanego genu *PAH* wśród zdrowych krewnych probandów. Istniejące testy biochemiczne pozostawiają stosunkowo duży margines wyników niepewnych, są ponadto skomplikowane i wymagają dokładnej standaryzacji. Ze względu na dużą liczbę mutacji nie wydaje się natomiast sensowne z technicznego punktu widzenia identyfikowanie mutacji u osób z populacji ogólnej (np. przyszłych małżonków osób z rodzin ryzyka PKU).

W niektórych przypadkach możliwe jest wykluczenie wystąpienia klasycznej PKU w rodzinie. Na przykład dzieci nosiciela mutacji słabej, niezależnie od rodzaju mutacji odziedziczonej ewentualnie od drugiego rodzica, będą wykazywały łagodną postać HPA. Identyfikacja mutacji łagodnej w tym samym przypadku sugerowała będzie łagodną PKU lub łagodna HPA. Diagnostyka molekularna może być zatem stosowana w poradnictwie genetycznym rodzin ryzyka HPA.

Wydaje się jednak, że należy rozważyć sposób finansowania badań tych kategorii pacjentów. Odmienne niż w przypadku łagodnych form HPA, gdzie badania mogłyby być finansowane przez Kasy Chorych, tego typu usługa powinna być pełnopłatna. HPA jest chorobą zasadniczo uleczalną objawowo lub w ogóle bezobjawową i określenie genotypu nie powinno mieć wpływu na decyzje prokreacyjne rodziny.

W przypadku galaktozemii sytuacja przedstawia się odmiennie. Jak wspomniano w badanej grupie nie wykryto istnienia zasadniczego związku pomiędzy rodzajem mutacji, a fenotypem klinicznym chorych. Potwierdzenie hipotezy, iż mutacja K285N w układzie homozygotycznym powoduje nasilony przebieg galaktozemii, wymagało będzie kilkuletniej obserwacji zdiagnozowanej molekularnie grupy chorych. Również łagodne postaci galaktozemii wydają się zależne od dodatkowych czynników genetycznych czy mutacji w nie badanych standardowo obszarach genu *GALT*. Niekiedy także klasyczna postać galaktozemii związana jest z występowaniem w genie *GALT* więcej niż dwu mutacji w jednym allelu oraz szeregu dodatkowych polimorfizmów, co uzasadnia konieczność sekwencjonowania wszystkich obszarów genu (126, 127).

Nie można wykluczyć, że w grupie chorych z genotypem np. Q188R/Q188R identyfikowanym nie poprzez sekwencjonowanie wszystkich eksonów genu *GALT*, lecz techniką PCR-RFLP znajdują się osoby niosące trzy mutacje lub znaczące diagnostycznie polimor-

fizmy. Być może nie wykryte zmiany sekwencji są dodatkową z przyczyn zmienności objawów klinicznych w obrębie grupy chorych z tym samym genotypem. Jest to znaczące ograniczenie rutynowej diagnostyki nastawionej wyłącznie na identyfikowanie mutacji najczęstszych.

Trudno określić częstość występowania podwójnie zmutowanych alleli. Znajdowano je w przypadku kilku innych chorób jednogenowych: fenyloketonurii, choroby Gauchera czy mukowiscydozy (128). Zjawisko to jest warte dokładniejszego zbadania i stanowi dodatkowy argument za diagnostycznym sekwencjonowaniem wszystkich eksonów genów powodujących chorobę.

Diagnostyka molekularna jest zatem jednym, choć na pewno nie najważniejszym, sposobem postawienia pewnego rozpoznania galaktozemii. Daje ponadto możliwość identyfikowania nosicieli zmutowanego genu powodującego chorobę w rodzinach ryzyka. Do podobnych wniosków prowadzą badania także innych populacji europejskich: włoskiej, niemieckiej, czeskiej czy tureckiej (129, 130).

Wiele powyższych uwag można odnieść również do innych chorób uwarunkowanych genetycznie, w których możliwa jest określanie mutacji w genach powodujących chorobę.

5.6. SYSTEM DIAGNOSTYKI MOLEKULARNEJ W POLSCE

Sytuacja diagnostyki molekularnej w Polsce pod wieloma względami przypomina sytuację w Grecji, gdzie nie istnieją formalne regulacje dotyczące norm laboratoryjnych, kontrola jakości testów genetycznych jest sprawą wewnętrzną laboratorium i nie istnieje także ogólnokrajowy program zewnętrznej kontroli jakości.

Większość ośrodków genetyki medycznej w Polsce, w których prowadzona jest diagnostyka chorób dziedzicznych, powiązana jest z ośrodkami naukowo-badawczymi lub akademickimi. Niektóre pełnią rolę nieoficjalnych laboratoriów referencyjnych dla całego kraju w zakresie diagnostyki określonych chorób. Zakład Genetyki Człowieka PAN oraz Zespół Genetyki Molekularnej ZGM IMiD uczestniczą od 1997 roku w europejskim programie kwalifikacyjnym organizowanym w ramach *European Concerted Action on Cystic Fibrosis* (obecnie koordynowanym przez EMQN). Uzyskiwane wyniki potwierdzają merytoryczną zasadność stosowanych metod, wysoką wykrywalność mutacji oraz pełny profesjonalizm, nie odbiegające od standardów obowiązujących w laboratoriach krajów EWG (131).

Zespół Cytogenetyki ZGM IMiD jako jedyny w kraju uczestniczy od 1997 roku w brytyjskim programie kontrolnym laboratoriów cytogenetycznych (*United Kingdom National External Quality Assessment Scheme in Clinical Genetics*). Retrospektywna kontrola obejmuje analizę kariotypów konstytucjonalnych we krwi i komórkach płynu owodniowego. Oceniany jest m.in. czas wykonania badania, procent wyników poprawnych, odpowiedniość wyboru rozdzielczości analizy w odniesieniu do wstępnego rozpoznania. Wyniki kontroli potwierdzają wysoką jakość badań i wykrywalność aberracji chromosomowych, nie odbiegające od standardów obowiązujących w zaawansowanych laboratoriach cytogenetycznych Wielkiej Brytanii.

W roku 1996 Kolegium Medycyny Laboratoryjnej w Polsce rozpoczęło we współdziałaniu z fińską organizacją niedochodową *Labquality* realizowanie programu zewnętrznej kontroli laboratoriów diagnostycznych. Uczestnictwo w programie jest dobrowolne i obejmuje wybrane testy biochemiczne, hematologiczne, immunologiczne oraz mikrobiologiczne. W założeniu program sprawdzający dotyczył będzie również dziedziny genetyki klinicznej (132, 133).

Poszczególne laboratoria dostrzegają konieczność wprowadzenia systemu kontroli zewnętrznej. Na przykład w roku 1999 Zakład Genetyki Medycznej IMiD na prośbę Katedry Patofizjologii AM we Wrocławiu dokonał oceny wykrywalności mutacji w genie *CFTR*, prowadzonej w tym laboratorium. Zastosowano typowy schemat EQA, przesyłając anonimowe próbki do określenia genotypu. Test wypadł pomyślnie i być może stanie się podstawą dla nawiązania podobnej współpracy między innymi laboratoriami diagnostycznymi.

W Polsce nie powołano jednak dotychczas ogólnokrajowej instytucji, która zajmowałaby się wypracowywaniem kryteriów badań oraz formułowaniem zaleceń dla laboratoriów diagnostycznych, a w szczególności laboratoriów genetycznych. Krajowych struktur kontrolnych nie może też zastąpić uczestnictwo w europejskich i zagranicznych programach oceniających. W Polsce nie istnieje niestety spójny i zorientowany na rozwój i przyszłe zadania system finansowania diagnostyki molekularnej np. z budżetu MZiOS oraz program szkolenia specjalistów (134).

5.7. MOŻLIWE KIERUNKI ZMIAN...

Choroby uwarunkowane mutacjami pojedynczych genów dotyczą około 1,5% żywo urodzonych dzieci. Częstość wad wrodzonych i chorób wieloczynnikowych o składniku genetycznym wynosi około 4%. Skala problemu społecznego jest zatem mniejsza, niż w przypadku dziecięcych schorzeń onkologicznych, co do pewnego stopnia tłumaczy mniejsze zainteresowanie problemem ze strony instytucji finansujących system opieki zdrowotnej. Niemniej wiele z chorób genetycznych ma charakter przewlekły, o skomplikowanym i ciężkim przebiegu klinicznym oraz o zwiększonym prawdopodobieństwie powtórnego wystąpienia w rodzinie. Charakter tej klasy chorób stwarza tym samym wiele problemów leczniczych i ludzkich. Konwencjonalna diagnostyka schorzeń uwarunkowanych genetycznie jest także niekiedy utrudniona, co przyczynia się do późniejszego postawienia trafnego rozpoznania, a w konsekwencji odwleka moment wprowadzenia właściwego leczenia i objęcia we właściwym czasie opieką rodziny zwiększonego ryzyka genetycznego.

Diagnostyka molekularna w wielu przypadkach jest jedynym sposobem postawienia szybkiego i pewnego rozpoznania choroby genetycznej.

W Polsce istnieje kilkanaście laboratoriów prowadzących diagnostykę molekularną chorób uwarunkowanych genetycznie (tab. XIII). Organizacyjnie stanowią one część Zakładów Genetyki Medycznej lub Zakładów Biochemii Akademii Medycznych, Instytutów MZiOS oraz Polskiej Akademii Nauk. Sytuacja ta przypomina okres początkowy tworzenia systemu opieki genetycznej w USA, Kanadzie i krajach Europy Zachodniej.

Najpilniejszym zadaniem wydaje się więc wprowadzenie jednolitego w skali kraju systemu autoryzacji i kontroli zewnętrznej laboratoriów diagnostyki molekularnej. Istniejące w Polsce laboratoria prowadzące diagnostykę molekularną, różną się od odpowiednich służb w krajach rozwiniętych gospodarczo przede wszystkim brakiem sformalizowanych kryteriów wykonania i kontroli.

Coraz większa odpowiedzialność prawna i finansowa laboratoriów diagnostycznych działających w reformowanym systemie służby zdrowia, wymusza dbałość o jakość wykonywanych analiz. Podobną presję wywierały będą zapewne instytucje ubezpieczeniowe.

Wymienione w tabeli XIII w *Uzupełnieniach* jednostki organizacyjne są zdolne do wspólnego wypracowania ogólnokrajowego programu diagnostyki molekularnej chorób genetycznych, sformułowania wskazówek dla laboratoriów diagnostycznych, standardów wykonania testów oraz opracowania systemu akredytacji i kontroli zewnętrznej. Niemniej ważne jest opublikowanie przez koordynatorów programu listy chorób genetycznych, w których diagnostyka molekularna znajduje uzasadnienie kliniczne. Rolę koordynacyjną i integracyjną, ułatwiającą wymianę informacji, mogłyby pełnić Polskie Towarzystwo Genetyki Człowieka oraz Polskie Towarzystwo Diagnostyki Laboratoryjnej. W tworzeniu programu, z ważnym głosem doradczym, winni uczestniczyć filozofowie, etycy i teolodzy.

5.8. ... I PYTANIA ZASADNICZE

Istnienie reprezentatywnego „komitetu doradczego” wydaje się szczególnie istotne. Nadal bowiem bez odpowiedzi pozostaje pytanie *kto* decydował będzie, w *których* genach badać *jakie* mutacje. Wbrew pozorom nie jest to pytanie trywialne.

Na przykład: czy prenatalnie diagnozować mutacje łagodne, powodujące lekki przebieg choroby uwarunkowanej genetycznie, czy też mutacje prowadzące nieuchronnie do śmierci? A jeżeli do śmierci, to co z mutacjami powodującymi choroby manifestujące się w trzeciej lub czwartej dekadzie życia? Niektóre mutacje zaś są szkodliwe tylko w określonych warunkach środowiskowych. Np. mutacje powodujące hematochromatozę w bogatych społeczeństwach, zostały prawdopodobnie wyselekcjonowane w przeszłości dla kompensowania diety ubogiej w żelazo. Mutacje w genach kodujących chemokiny i ich receptory są szkodliwe, jednak mutacje receptora *CCR5* powodują w osobników homozygotycznych względną odporność na wirusa HIV-1. Czy należy diagnozować prawdopodobieństwo wystąpienia choroby, poprzez oznaczanie genotypów nadających podatność na określone schorzenia (*susceptibility-conferring genotypes*, SCG)?

Podobna sytuacja dotyczy chorób nowotworowych. Czy bowiem identyfikacja osób zagrożonych rozwojem choroby nowotworowej w populacji ogólnej leży w interesie jednostki i społeczeństwa? Możliwości profilaktyki są bardzo ograniczone i polegają przede wszystkim na unikaniu czynników muta- i kancerogennych. Trudno wyobrazić sobie szczególnie profilaktykę u nosicieli mutacji w genach supresorowych nowotworów. Diagnoza molekularna staje się istotna we wczesnej diagnozie nowotworu, w stadium przedrakowym, gdzie interwencja np. chirurgiczna, najczęściej kończy się wyleczeniem. Odmienna sytuacja ma miejsce w przypadku nowotworów rodzinnych. Lecz i tu diagnoza wskazująca

nawet wysokie prawdopodobieństwo zachorowania, rozłożone w czasie na kilkadziesiąt lat, może być kontrowersyjna z punktu widzenia dobra pacjenta (135).

Podobne pytanie o sensowność zadać można także w odniesieniu do poszukiwania nosicieli jednej kopii zmutowanego genu *PAH* lub *GALT*, w populacji ogólnej lub tylko w rodzinach ryzyka (136, 137). Czy na przykład znalezienie mutacji w jednym allelu genu *PAH*, u zdrowej siostry probanda nie stanie się źródłem dodatkowych, niepotrzebnych niepokojów? Wpierw dla matki, a później dla młodej kobiety zamierzającej zawrzeć związek małżeński? Nawet jeśli będzie to mutacja łagodna? Czy diagnostyka w rodzinie ryzyka nie będzie wymuszała poszukiwania mutacji u potencjalnych partnerów oznaczonych nosicieli? Jeśli zaś wykonana zostanie diagnostyka w kierunku mutacji w genie *PAH* u potencjalnego partnera, to czy wynik pozytywny coś zmieni? Czy powinien? A wynik negatywny? Nie oznaczał będzie przecież nieobecności szkodliwych, recesywnych alleli innych genów. Czy rodzice w ogóle mają prawo do decydowania o poszukiwaniu mutacji u zdrowego rodzeństwa chorego? Czy może prawo to powinno przysługiwać dziecku od określonego wieku?

Wydaje się, że zwłaszcza poszukiwanie mutacji wśród zdrowych krewnych osób chorych, może utorować drogę wymuszaniu przez towarzystwa ubezpieczeniowe rutynowej diagnostyki molekularnej np. ciężkich schorzeń genetycznych manifestujących się w trzeciej lub czwartej dekadzie życia, a nawet predyspozycji do wystąpienia chorób wieloczynnikowych. Już w tej chwili niektóre instytucje ubezpieczeniowe w USA wymagają badań prenatalnych w kierunku np. mukowiscydozy czy dystrofii miotonicznej. W Wielkiej Brytanii mają zaś prawo żądać wyników testów w kierunku niektórych chorób w różnym stopniu uwarunkowanych genetycznie.

Na przykład w 1997 roku, we wskazówkach opublikowanych przez Brytyjskie Stowarzyszenie Instytucji Ubezpieczeniowych można było przeczytać że, w razie ubiegania się o dowolną z postaci ubezpieczenia na życie, jeżeli klient wykonał test genetyczny na niektóre choroby dziedziczne, powinien podać wynik testu do wiadomości ubezpieczającego. Do chorób zaliczono m.in.: cukrzycę typu I oraz II, hipertriglicerolemię, hipercholesterolemię, nadciśnienie, rak sutka, jelita grubego (*FAP*, *HNPC*) i chorobę Alzheimera. W przypadku wielu z wymienionych chorób określa się jedynie predyspozycję, często pośrednio, przez oznaczenie markerów polimorficznych związanych z chorobą. Sytuacja ta została ostatnio usankcjonowana prawnie.

W tym miejscu nasuwa się pytanie, czy promując zatem (ze względu na poradnictwo genetyczne rodziny ryzyka) diagnostykę molekularną wśród rodzeństwa osoby chorej nie przybliżamy niebezpiecznie realizacji *społeczeństwa eugenicznego*, w którym np. pary dobierane będą na zasadzie „najodpowiedniejszego wyposażenia genetycznego”? Zastosowanie „układów scalonych DNA” czyni możliwość przeglądania całego genomu technicznie prawdopodobną już w bliskiej przyszłości (138, 139).

Wątpliwości pojawiają się zresztą w odniesieniu do prostszych technik. Na przykład wspomniana we *Wstępie* ustawa *Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA)* z 1988 nie nakłada na laboratoria w USA obowiązku dostarczenia dowodu na użyteczność kliniczną prowadzonego testu. Regulacje takie wprowadziła natomiast *Food and Drug Administration*. Niekonsekwentnie jednak. Jeżeli bowiem test genetyczny trafia na rynek jako „zestaw

diagnostyczny”, producent musi wpieryw udowodnić jego kliniczną przydatność, korzyści dla pacjenta, jak również udowodnić że nie wyolbrzymia użyteczności testu. Jednak gdy test trafia na rynek jako usługa (*clinical laboratory service*), wprowadzające ją laboratorium nie musi nawet informować o tym fakcie FDA. Większość laboratoriów wprowadzających testy typu SCG, nazywa je usługami laboratoryjnymi (140). Sytuacja w wyniku dyskusji i pod presją opinii publicznej ulegnie zapewne niebawem zmianie.

Decyzja *jakie mutacje, w których genach badać* określana jest zatem przez stan wiedzy, system prawny, światopogląd lekarza i pacjenta, stan środowiska naturalnego, zamożność (indywidualna i zbiorową) czy akceptowany ideał społeczeństwa przyszłości. Problem tak złożony nie może stać się problemem wyłącznie technicznym. Inna wersja postawionego pytania brzmi bowiem następująco: czy technika nie ustali kierunku zmian w dziedzinie moralnej? Na razie decyzja spoczywa zasadniczo w rękach naukowców i lekarzy. Jeżeli nawet są oni jedynie autorami ekspertyz, wpływają w istotny sposób na decyzję zasięgujących rady decydentów, urzędników i opinii publicznej. Wolny wybór, który często przywołuje się np. w dyskusjach o aborcji, ograniczony jest obecnie przede wszystkim przez rachunek ekonomiczny, naciski instytucji ubezpieczeniowych czy opinie i interesy przeważające w organizacjach zawodowych naukowców i lekarzy.

Oczywiście dużą rolę odgrywa także kalkulacja ekonomiczna konkretnych firm, ośrodków czy instytutów genetyki medycznej. Komercjalizacja i zysk zaczynają odgrywać istotną rolę w planowaniu i wdrażaniu molekularnych programów diagnostycznych. Jak na razie badania genetyczne są stosunkowo drogie i nadal towarzyszy im aura tajemniczości i skomplikowania. W takiej sytuacji łatwe staje się przekonywanie decydentów o niezbędności wykonywanych testów genetycznych, nawet w przypadku wątpliwej ich użyteczności. Zwłaszcza gdy brak uregulowań prawnych, dotyczących skomplikowanych procedur biomedycznych. Krytyka ustalonych (często nieformalnie) wzorców postępowania, podejmowana nawet z pozycji czysto naukowych, odbierana jest jako nielojalność, a nie wyraz postawy obywatelskiej.

Zarysowana sytuacja nie sprzyja prowadzeniu spokojnej, publicznej debaty. Wprowadzenie do rutynowej diagnostyki „układów scalonych DNA” może przyspieszyć jedynie akceptację przesiewowej diagnostyki molekularnej.

Powyższe uwagi nie dotyczą oczywiście wyłącznie genetyki medycznej. Ekonomia i technologia zmieniają cały obszar zależności pomiędzy pacjentem a lekarzem. Medycyna współczesna przekształcana zostaje przez zasady stosowane w wielkim biznesie: zasadę zysku, współzawodnictwa, odpowiedzialności przed udziałowcami, zasadę rynku usług oraz zasadę standardów zewnętrznych. Pacjenci stają się konsumentami, lekarze dostawcami usług medycznych, a horyzont decyzyjny wyznacza kryterium ograniczenia kosztów. Rzymska, handlowa dewiza *caveat emptor* („niech się strzeże kupujący”) zaczyna obowiązywać w szpitalu (141). Stąd odpowiedź w postaci ruchów obrony praw pacjenta, które nie mogą zastąpić jednak altruizmu i zaufania.

W Polsce nie istnieje forum, na którym pytania takie mogłyby być dyskutowane. Również fachowe pisma z zakresu medycyny i biologii nie są skłonne do podejmowania skomplikowanych kwestii na pograniczu genetyki, medycyny, ekonomii i etyki. Sytuacja ta odbiega zdecydowanie od standardów europejskich i amerykańskich.

* * *

Zarysowany program rozwoju i formalizacji diagnostyki molekularnej w Polsce wymaga także, by w porozumieniu z Akademią Medycznymi oraz uniwersyteckimi Wydziałami Biologii, opracować program kursów diagnostyki molekularnej, na wzór programu kształcenia lekarzy i genetyków w dziedzinie genetyki klinicznej, molekularnej oraz cytogenetyki, prowadzonego przez Federalny Związek Lekarzy oraz Niemieckie Towarzystwo Genetyki Człowieka. Ukończenie kursu autoryzowanego przez Ministerstwo Zdrowia przez lekarza genetyka lub biologa molekularnego z tytułem naukowym uprawniałoby w przyszłości do kierowania laboratoriami genetycznymi.

Zmiany powinny objąć również profil zatrudnienia w laboratoriach diagnostyki molekularnej, tak by był zgodny z zasadami wprowadzanej reformy służby zdrowia, przyznającej kryteriom efektywności ekonomicznej ważną rolę. W związku z tym większość analiz mogą wykonywać odpowiednio przeszkoleni technicy. Tytuł uniwersytecki (magistra lub doktora) wymagany byłby jedynie u osób dokonujących weryfikacji otrzymanych wyników i opracowania raportu końcowego. Działalność naukowa, związana z poznawaniem podłoża molekularnego chorób i wprowadzaniem nowych metod pozostałaby domeną laboratoriów referencyjnych. Pozostałe ośrodki powinny być podporządkowane bieżącym zadaniom, wynikającym z zapotrzebowania na testy diagnostyczne.

Nie bez znaczenia pozostaje także opracowanie zasad dobrego współdziałania laboratoriów diagnostyki molekularnej z laboratoriami zajmującymi się innymi rodzajami diagnostyki oraz z klinicystami. Wspomniane trudności w diagnostyce molekularnej łagodnej galaktozemii, wskazują dobitnie na konieczność poprawnej charakterystyki biochemicznej i klinicznej chorych. Należy pamiętać, że diagnostyka molekularna nie jest techniką absolutną i zawsze wymaga interpretacji w świetle pełnego obrazu klinicznego chorego lub rodziny ryzyka. Podobnie wprowadzenie nowych testów molekularnych, zwłaszcza na szeroką skalę, powinno być poprzedzone otwartą dyskusją nad ich użytecznością i znaczeniem dla dobra badanych osób.

Z tych powodów nie wydaje się racjonalne powstawanie publicznych instytucji zajmujących się wyłącznie genetyką kliniczną i diagnostyką molekularną, w organizacyjnym oderwaniu od Akademii Medycznych, uniwersyteckich Wydziałów Medycznych czy instytutów resortowych.

* * *

Realizacja programu, którego niektóre elementy określono powyżej wymaga współdziałania wielu jednostek: Ministerstwa Zdrowia, Ministerstwa Oświaty, istniejących ośrodków diagnostyki molekularnej, akademii medycznych i uniwersytetów, a także kościołów i związków religijnych. Dlatego wydaje się, że przynajmniej w pierwszym okresie powinien być on finansowany z budżetu centralnego.

Program ten jest logiczną konsekwencją dostosowania systemu służby zdrowia w Polsce do standardów jednoczącej się Europy. Mógłby on także stymulować współdziałanie ośrodków uprawiających filozofię, medycynę oraz biologię podstawową i stosowaną (142).

6. PODSUMOWANIE

W rozprawie przedstawiono wyniki analizy mutacji powodujących różne postaci hiperfenyloalaninemii i galaktozemii u ponad 200 chorych z terenu całej Polski.

Dla wszystkich chorych określono pełne genotypy w podstawowych genach powodujących chorobę. Wykazano, że heterogenność objawów klinicznych wspomnianych chorób zależy w różnym stopniu od heterogenności na poziomie molekularnym. Powiązано konkretne mutacje z przebiegiem klinicznym łagodnej fenylketonurii, łagodnej hiperfenyloalaninemii oraz deficytu syntazy tetrahydrobiopterynowej, co ma podstawowe znaczenie dla rutynowej diagnostyki różnicowej HPA. W grupie chorych z klasyczną galaktozemią nie znaleziono wyraźnych korelacji pomiędzy genotypem w *locus GALT*, a fenotypem biochemicznym i klinicznym chorych.

Zbadano wpływ mutacji R68G i R68S związanych z łagodną fenylketonurią na aktywność hydroksylazy fenylalaninowej w dwu układach *in vitro*. W badanych grupach chorych zidentyfikowano ponadto 21 nowych mutacji w genach *PAH* (8), *PTS* (3) i *GALT* (10). Wykryto zjawisko alternatywnego splicingu pre-mRNA genu *PTS* w leukocytach krwi obwodowej.

Określono użyteczność i ogólne zasady prowadzenia diagnostyki molekularnej do celów klinicznych w dziedzicznych hiperfenyloalaninemiach oraz klasycznej galaktozemi. Podkreślono znaczenie diagnostyki biochemicznej w ustaleniu pełnego rozpoznania galaktozemii.

W rozprawie przedstawiono istniejące w krajach rozwiniętych gospodarczo systemy diagnostyki molekularnej chorób uwarunkowanych genetycznie. Na tym tle zaproponowano możliwe kierunki zmian obecnej sytuacji diagnostyki molekularnej w Polsce. Podniesiono także kilka kwestii dotyczących zasadności poszukiwania mutacji w konkretnych chorobach genetycznych oraz aspektu etycznego wspomnianych działań.

7. UZUPEŁNIENIA

Tabela XI. Pary startery służące do powielania i sekwencjonowania 13 eksonów genu *PAH*.

powielany ekson	nazwa startera	sekwencja w orientacji 5' → 3'
1	PAH11 PAH12	CAAGAGACACCCTTTGTAAAC CAGCAGTCTTCGGATCTCTT
2	PAH21 PAH22	CTTGCTTTGTCCATGGAGGT CCTGTTCCAGATCCTGTGTT
3	PAH31 PAH32	TGGCCTGCGTTAGTTCAG TGAAGACAGTGTGGAGTTAC
4	PAH41 PAH42	CTGGAAGCCAGCCCACTTGCCA TCCCAGCCCTCGTGTAATAGGA
5	PAH51 PAH52	GGAGAGCTAAGTTAACCGAG CCATCCTCAACTGGATGAGG
6	PAH61 PAH62	CTCTGCTAACCTAACCTGC CTCTCCTCTGCCTCAATCCT
7	PAH71 PAH72	TGCCTCTGACTCAGTGGTGAT CCCAAACCTCATTCTTGCAGCA
8	PAH81 PAH82	CTGGGCTCAACTATTTGAG CTGCCATTCTCATGTAGA
9	PAH91 PAH92	ATGGCCAAGTACTAGGTTG AGTTTCAAAGACCTGAGGGC
10	PAH101 PAH102	GTATCCCTTCATCCAGTCA ATGGTTTTCTGTACCCACC
11	PAH111 PAH112	TGCAGCAGGGAATACTGATC TAGACATTGGAGTCCACTCTC
12	PAH121 PAH122	AGTCTTCGATTACTGAGAAA ATGCCACTGAGAACTCTCTT
13 (część kodująca białko)	PAH131 PAH132	GCACTGAGGACACTTGAAGA GTTTCTCCATCTTGTAAGG

Tabela XII. Pary startery służące do powielania i sekwencjonowania 11 eksonów genu *GALT*.

powielany ekson	nazwa startera	sekwencja w orientacji 5' → 3'
1+2	GALT21 GALT22	AGCGGATCCCCGGTGGCCTC CCGTGGCCCAGCCTGCAGATG
2+3	GALT31 GALT32	AGCTCTGAGGACTGATCTTGA AGCAGCAGTTGGAGCCAGGTT
3+4	GALT41 GALT42	GTACGATAGCACCTTCTGTT GCTGAGTCTCCAACCTCTGGTT
5	GALT51 GALT52	TTGGGGTTTCGCCCTGCCCGTA CAAAGCTTCATACCCCCCTCC
6	GALT61 GALT62	AGGAGGGAGTTGACTTGGTGT CTGTTCCCATGTCCACAGTGC
7	GALT71 GALT72	TGGGACAGAGGAAATATGCCA CCTTTACACACCTCTCTCATG
8	GALT81 GALT82	GGCTCCTATGTACCTTGATG CAACCTCCATCCAGTGCCTAG
9	GALT91 GALT92	GGTCAGCATCTGGACCCCAGG AGGTTGCAGTTCACTAGGCTG
10	GALT101 GALT102	AGGTGCTAACCTGGATAACTG CACATACTGCATGTGAGAGTC
11	GALT111 GALT112	TGGGCAACAGAGCAAGACCTC CAGGCCAGGATTCAAGGCCCT

Tabela XIII. Zestawienie głównych ośrodków prowadzących diagnostykę molekularną chorób uwarunkowanych genetycznie (stan z roku 1999)

nazwa jednostki organizacyjnej	diagnozowane choroby genetyczne
Zakład Genetyki Medycznej Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii Collegium Medicum UI (Kraków)	siatkówczak, mukowiscydoza, achondroplazja, hypochondroplazja
Zakład Genetyki Medycznej Lubelskiej AM (Lublin)	mukowiscydoza
Zakład Genetyki Medycznej Instytutu Endokrynologii Łódzkiej AM (Łódź)	zaburzenia rozwoju cielesno - płciowego (chromosom Y)
Pracownia Genetyki Nowotworów Instytut Chemii Bioorganicznej PAN (Poznań)	dziedziczna postać raka sutka i jajników (geny <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>)
Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademia Medyczna w Poznaniu (Poznań)	zespół Christa, Siemensa, Tourainea, testokortykocza dziedziczna (gen receptora lutropiny), zespół Reifensteina (gen receptora androgenów), psychoza afektywna, dwubiegunowa (gen <i>ADARBI</i> i <i>TRPC7</i>), wrodzony brak przedtrzonowców (gen <i>MSX1</i>), wrodzony przerost kory nadnerczy (gen 21-hydroksylazy steroidowej), zespół nadciśnienia tętniczego (gen 11-dehydrogenazy steroidowej), anhidrotyczna dysplazja ektodermalna (gen <i>EDA</i>)
Zakład Genetyki Człowieka PAN (Poznań)	dystrofia mięśniowa Duchennea i Beckera, fenylketonuria (gen <i>PAH</i>), mukowiscydoza, zaburzenia determinacji płci (chromosomy X i Y), cukrzyca insulinozależna, rodzinna polipowatość jelita (gen <i>APC</i>), stwardnienie guzowate (geny <i>TSCI</i> i <i>TSC2</i>), nieploność męska (region AZF chromosomu Y), osteoporoza (wielogenowo)
Zakład Genetyki i Patomorfologii Pomorska Akademia Medyczna (Szczecin)	hipercholesterolemia rodzinna, siatkówczak, dziedziczne postaci raka (sutka, jajnika, jelita grubego), zespół von Hippela-Lindaua
Zakład Genetyki Medycznej Instytut Centrum Zdrowia Dziecka (Warszawa)	rodzinna krzywica hipofosfatemiczna, zespół Lescha-Nyhana, mukopolisacharydoza typu II, zespół Pradera-Willego, zespół Angelimana, hiperamonemia typu II, wrodzony przerost kory nadnerczy, zespół Smitha, Lemlego i Optiza
Zakład Genetyki Medycznej Instytut Matki i Dziecka (Warszawa)	mukowiscydoza, hiperfenylalaninemia (geny <i>PAH</i> , <i>PTS</i> i <i>PCDH</i>), galaktozemia (gen <i>GALT1</i> i <i>GALE</i>), zespół tamiłowego chromosomu X, zespół Pradera-Willego, zespół Angelimana, choroba Friedreicha, rdzeniowy zanik mięśni (SMA), dziedziczna postać głuchoty (gen <i>GJB2</i>), obustronna niedrożność przewodów nasiennych (CBVAD, gen <i>CFTR</i>)
Zakład Genetyki Instytut Psychiatrii i Neurologii (Warszawa)	dystrofia mięśniowa Duchennea i Beckera, choroba Huntingtona, rdzeniowy zanik mięśni (SMA), ataksja rdzeniowo mózdkowa (typ I, II, III, IV), padaczka miokloniczna (DRPLA), pseudodeficyt arylosulfatazy A, fawizm, rodzinny defekt apob
Zakład Biochemii Instytut Hematologii (Warszawa)	hemofilia
Zakład Genetyki Katedra Patofizjologii Wrocławskiej AM (Wrocław)	zaburzenia determinacji płci, mukowiscydoza

8. WAŻNIEJSZE SKRÓTY

- $^1\text{H-NMR}$ – protonowy rezonans magnetyczny
6-MPH₄ – 6-metylotetrahydrobiopteryna
ACRS – technika sztucznie wprowadzanych miejsc restrykcyjnych
BH₄ – tetrahydrobiopteryna
CF – mukowiscydoza
COS – linia małych komórek, stransformowanych defektywnym wirusem SV40
D-1, D-2 – allele Duarte-1 i Duarte-2
EQA – zewnętrzna ocena jakości badań
GALE – 4-epimeraza urydynodifosfogalaktozowa
GALK – galaktokinaza
GALT – urydyliotransferaza galaktozo-1-fosforanowa
HA – analizy heterodupleksów
HPA – hiperfenyloalaninemia
MBP – białko wiążące maltozę
PAH – hydroksylaza fenyloalaninowa
PAH-MBP – białko fuzyjne PAH:MBP
PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy
PCR-RFLP – polimorfizm długości amplikonów
PKU – fenylketonuria
PTPS (*PTS*) syntaza 6-pirogronylotertahydrobiopterynowej (w nawiasie skrót nazwy genu kodującego białko PTPS)
RT-PCR – reakcja odwrotnej PCR
SDS/PAGE – elektroforeza poliakryloamidowa w obecności siarczanu dodecyłu sodu
SSCA – analiza polimorfizmu jednoniciowych fragmentów DNA
UDPgal, UDPglu – difosforydynogalaktoza, difosforydynoglukoza

9. PIŚMIENNICTWO

1. Holtzman NA (1999) Promoting safe and effective genetic tests in the United States: work of the Task Force on Genetic Testing. *Clin Chem* 45: 732-738
2. Amos J, Gold B (1998) Testing environment for single-gene disorders in US reference laboratories. *Hum Mutat* 12: 293-300.
3. Task Force on Genetic Testing – Promoting safe and effective genetic testing in the United States. raporty z lat 1997-1999 (<http://ww2.med.jhu.edu/tfgtelsi>)
4. *Methods in molecular medicine: molecular diagnosis of genetic diseases*. Ed. R.Elles, Humana Press, Totowa, 1997
5. EUCROMIC Quality Assessment Group (1997) Quality Guidelines and Standards for genetic laboratories / clinics in prenatal diagnosis on fetal samples obtained by invasive procedures. *Eur J Hum Genet* 5: 342-350.
6. European Molecular Genetics Quality Network (EMON), Newsletter 06-07.1999
7. Losekoot M i wsp (1999) A European pilot quality assessment scheme for molecular diagnosis of Huntington's disease. *Eur J Hum Genet* 7: 217-222.
8. Mulcahy GM (1999) The integration of molecular diagnostic methods into the clinical laboratory. *Ann Clin Lab Sci* 29: 43-54.
9. (red.) Słomski R – Postępy biologii molekularnej. *Post Biol Kom* 25, Supl 10 (1998)
10. Kiechle FL, Zhang X, Malinski T (1999) The molecular pathology laboratory of the 21st century. *Ann Clin Lab Sci* 29, 59-77.
11. Kricka LJ (1998) Miniaturization of analytical systems. *Clin Chem* 44: 2008-2014.
12. Bożkowska K i wsp (1999) Ocena użyteczności noworodkowych badań przesiewowych w świetle 35 letniego doświadczenia. *Med Wieku Rozwoj* 3:529-59.
13. Guttler F, Guldborg P (2000) Mutation analysis anticipates dietary requirements in phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159 (Suppl 2): S150-S153.
14. Scriver CR i wsp (1995) The hyperphenylalaninemia of man and mouse. *Ann Rev Genet* 28: 141-165.
15. Cabalska B, Nowaczewska I, Skorkowska-Zieleniewska J (1991) Nietypowe postaci fenylketonurii. *Przegl Pediatr* 21, 53-56.
16. Mańkowski T i wsp (1992) Fenylketonuria. Rozpoznawanie i Leczenie nietypowych postaci. Instytut Matki i Dziecka Warszawa.

17. Cabalska B (1998) Nietypowe postaci fenylketonurii. *Med Wieku Rozwoj* 2: 479-490.
18. Nowacka M. i wsp (1997) Ocena korelacji genotyp-fenotyp u dzieci z hiperfenyloalaninią. *Ped Pol* 1997, Suppl 6, 51-59.
19. Cabalska B i wsp (1994) Łagodna hiperfenyloalaninemia – częstość występowania, rozwój fizyczny i umysłowy pacjentów. *Ped Pol* LXIX: 339-344.
20. Hanihara T i wsp (1997) 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase deficiency with generalized dystonia and diurnal fluctuation of symptoms: a clinical and molecular study. *Movement Disorders* 12: 408-411.
21. Radomyśka B, Żekanowski C (1997) Kliniczne implikacje diagnostyki molekularnej galaktozemii. *Med Wieku Rozwoj* 1: 276-281.
22. Novelli G, Reichardt JK (2000) Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: past, present and future. *Mol Genet Metab* 71: 62-65.
23. Petry KG, Reichardt JKV. (1998) The fundamental importance of human galactose metabolism: lessons from genetics and biochemistry. *Trends Genet* 14: 98-102.
24. Schweitzer S i wsp (1993) Long-term outcome in 134 patients with galactosemia. *Eur J Pediatr* 152: 36-43.
25. Szczypka M (1996) Galaktozemia, problem ciągle nie rozwiązany. *Ped Pol* 71: 487-492.
26. Radomyśka B, Mańkowski T (1994) Ocena odległych wyników leczenia galaktozemii. *Ped Pol* 5: 345-349.
27. Gitzelmann R (1995) Galactose-1-phosphate in the pathophysiology of galactosemia. *Eur J Pediatr* 154 (Suppl. 2): 45-49.
28. Berry GT i wsp (1995) Endogenous synthesis of galactose in normal men and patients with hereditary galactosemia. *Lancet* 346: 1073-1074.
29. Elsas LJ i wsp (1995) Galactosemia: a strategy to identify new biochemical phenotypes and molecular genotypes. *Am J Hum Genet* 56: 630-639.
30. Elsas LJ i wsp (1994) A common mutation associated with the Duarte galactosemia allele. *Am J Hum Genet* 54: 1030-1036.
31. Podskarbi T i wsp (1996) Molecular characterization of Duarte-1 and Duarte-2 variants of galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *J Inher Metab Dis* 19: 638-644.
32. Reichardt JKV, Woo SLC (1991) Molecular basis of galactosemia: mutations and polymorphisms in the gene encoding human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *PNAS* 88: 2633-2637.
33. Fridovitch-Keil JL i wsp (1995) Characterisation of the N314D allele of human galactose-1-phosphate uridylyltransferase using a yeast expression system. *Biochem Mol Med* 56: 121-130.
34. Anderson MW i wsp (1984) Transferase-deficient galactosemia: Immunochemical studies of the Duarte and Los Angeles variants. *Hum Genet* 65: 287-290.
35. Lai K i wsp (1998) Duarte allele impairs biostability of galactose-1-phosphate uridylyltransferase in human lymphoblasts. *Hum Mutat* 11: 28-38.
36. Cramer DW i wsp (1996) Endometriosis associated with with N314D mutation of galactose-1-phosphate uridylyl transferase (GALT). *Mol Hum Reprod* 2: 149-152.

37. Cramer DW i wsp (1996) Vaginal agenesis (Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome) associated with N314D mutation of galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT). *Mol Hum Reprod* 2: 145-148.
38. Griffiths IR (1996) Myelin mutants: model system for the study of normal and abnormal myelination. *BioEssays* 18: 789-797.
39. Apold J i wsp (1993) Estimation of severity of individual hyperphenylalaninemia mutations from untreated serum phenylalanine concentration. *Devel Brain Dysf* 6: 109-113.
40. Trefz FK i wsp (1993) Genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Clin Chim Acta* 217: 15-21.
41. Guttler F (1980) Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of various types of phenylalanine hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr Scand* 280 (Suppl): 1-80.
42. Scriver CR i wsp: Phenylalanine hydroxylase locus database <http://www.mcgill.ca/pahdb/>
43. Blau N i wsp: International database of tetrahydrobiopterin deficiencies. <http://www.bh4.org/>
44. Tyfield L, Carmichael D: GALTdb <http://ich.bris.ac.uk/galtdb>
45. Scriver CR i wsp (2000) PAHdb: a locus specific knowledge. *Hum Mutat* 15: 88-104
46. Thony B i wsp (1994) Hyperphenylalaninemia due to defects in tetrahydrobiopterin metabolism: molecular characterization of mutations in 6-pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase. *Am J Hum Genet* 54: 782-792.
47. Kozak L i wsp (2000) Mutation analysis of the GALT gene in Czech and Slovak galactosemia populations: identification of six novel mutations, including a stop codon mutation (X380R). *Hum Mutat* 15: 206 (tekst dostępny on-line)
48. Hengen PN (1995) Reamplification of PCR fragments. *Trends Biochem Sci* 20: 124-125.
49. Oppliger T i wsp (1997) Identification of mutations causing 6-pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase deficiency in four Italian families. *Hum Mutat* 10: 25-35.
50. Romstadt A i wsp. (1999) Single-step mutation scanning of the 6-pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase gene in patients with hyperphenylalaninemia. *Clin Genet* 45: 2102-2108.
51. DiLella AG i wsp (1987) An amino acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. *Nature* 327: 333-336.
52. Leandro P i wsp (2000) The V388M mutation results in a kinetic variant form of phenylalanine hydroxylase. *Mol Genet Metab* 69: 204-212.
53. Żekanowski C i wsp (1997) Molecular basis of mild hyperphenylalaninemia in Poland. *J Med. Genet* 34, 1035-1036.
54. Thony B i wsp (1998) Hyperphenylalaninemia with high levels of 7-biopterin is associated with mutations in the PCBD gene encoding the bifunctional protein pterin-4a-carbinolamine dehydratase and transcriptional cofactor (DCoH). *Am J Hum Genet* 62: 1302-1311.
55. Ichinose H i wsp (1995) Characterization of mouse and human GTP cyclohydrolase I genes. *J Biol Chem* 270: 10062-10071.

56. Ichinose H, Nagatsu T (1998) Molecular genetics of hereditary dystonia – mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Brain Res Bull* 43: 35-38.
57. Żekanowski C i wsp (1999) Mutations in exon 3 of the PAH gene causing mild hyperphenylalaninemia. *Genet Testing* 3: 297-299.
58. Żekanowski C i wsp (2000) In vitro expression analysis of R68G and R68S mutations in phenylalanine hydroxylase gene. *Acta Biochim Pol* 47: 365-369.
59. Żekanowski C i wsp (1998) Identification of mutations causing 6-pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase deficiency in Polish patients with variant hyperphenylalaninemia. *Mol Diagn* 3: 237-240.
60. Żekanowski C, Radomska B, Bal J (1999) Molecular characterisation of Polish patients with classical galactosemia. *J Inher Metab Dis* 22: 679-682.
61. Waters PJ i wsp (2000) Characterization of phenylketonuria missense substitution distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanisms and potential modulations of phenotype. *Mol Gen Metab* 69: 101-110.
62. Waters PJ i wsp (1998) Alteration in protein aggregation and degradation due to mild and severe missense mutations (A104D, R157N) in the human phenylalanine hydroxylase gene (PAH). *Hum Mutat* 12: 344-354.
63. Bross P i wsp (1999) Protein misfolding and degradation in genetic diseases. *Hum Mutat* 14: 186-198.
64. Ellingsen S i wsp (1999) Diverse PAH transcripts in lymphocytes of PKU patients with putative nonsense (G272X, Y356X) and missense (P281L, R408Q) mutations. *FEBS Lett* 457, 505-508.
65. Shiga N i wsp (1997) Disruption of the splicing enhancer sequence within exon 27 of the dystrophin gene by a nonsense mutation induces partial skipping of the exon and is responsible for Becker muscular dystrophy. *Journal of Clinical Investigation*. 100: 2204-2210.
66. Hoffmeyer S (1998) Nearby stop codons in exons of the neurofibromatosis type 1 gene are disparate splice effectors. *American Journal of Human Genetics*. 62: 269-77.
67. Rao DN, Kaufmann S (1986) Purification and state of activation of rat kidney phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem* 261: 8866-8876.
68. Paszczuk M (1975) Phenylalanine hydroxylation in kidney. *J Iowa Med Assoc* 63: 1993-2001.
69. Young GA, Parsons FM (1973) Impairment of phenylalanine hydroxylation in chronic renal insufficiency. *Clin Sci Mol Med* 45: 89-97.
70. Lichter-Konecki U i wsp (1999) Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol Gen Metab* 67: 308-316.
71. Zieleński J (1997) Genetyczne determinanty zmienności fenotypowej w mukowiscydozie. *Med Wieku Rozwoj* 1: 649-665.
72. Weglage J, Rupp A, Schmidt E (1994) Personality characteristics in patients with phenylketonuria treated early. *Pediatric Res* 35: 611-613.
73. Weglage J i wsp (1992) Psychological and social findings in adolescents with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 151: 522-525.

74. Conne B, Stutz A, Vassalli (2000) The 3' untranslated region of messenger RNA: a molecular "hotspot" for pathology? *Nature Med* 6: 637-641.
75. Jennings IG, Cotton RGH, Kobe B (2000) Structural interpretation of mutations in phenylalanine hydroxylase protein aids genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Eur J Hum Genet* 8: 683-689.
76. Kobe B i wsp (1999) Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nature Struct Biol* 6: 442-448.
77. Erladsen H i wsp (1997) Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nature Struct Biol* 4: 995-1000.
78. Waters PJ i wsp (1998) In vitro expression analysis of mutations in phenylalanine hydroxylase: linking genotype to phenotype and structure to function. *Hum Mutat* 11: 4-17.
79. Kayaalp E i wsp (1997) Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 61: 1309-1317.
80. Rivera I i wsp (2000) The correlation of genotype and phenotype in Portuguese hyperphenylalaninemic patients. *Mol Genet Metab* 69: 195-203.
81. Desviat LR i wsp (1997) Relationship between mutation genotype and biochemical phenotype in a heterogeneous Spanish phenylketonuria population. *Eur J Hum Genet* 5: 196-202.
82. Mallolas J i wsp (1999) Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in the population resident in Catalonia: genotype-phenotype correlation. *Hum Genet* 105: 468-473.
83. Guzzetta V i wsp (1997) Phenylketonuria in Italy. *J Inher Metab Dis* 20: 619-624.
84. Romano V i wsp (1996) PAH deficiency in Italy: correlation of genotype with phenotype in the Sicilian population. *J Inher Metab Dis* 19: 15-24.
85. Koch R i wsp (1997) The relationship of genotype to phenotype in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Biochem Mol Med* 60: 92-101.
86. Eisensmith RC i wsp (1996) Molecular basis of phenylketonuria and correlation between genotype and phenotype in a heterogenous southwestern US population. *Pediatrics* 97: 512-516.
87. Kozak L i wsp (1995) Phenylketonuria mutations and their relation to RFLP haplotypes at the PAH locus in Czech PKU families. *Hum Genet* 96: 472-476.
88. Guldborg P, Henriksen KF, Guttler F (1993) Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by DGGE. *Genomics* 17: 141-146.
89. Guldborg P i wsp (1993) Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in Southern Europe. *Hum Mol Genet* 2: 1703-1707.
90. Guldborg P i wsp (1996) Phenylalanine hydroxylase deficiency in a population in Germany: mutational profile and nine novel mutations. *Hum Mutat* 8: 276-279.
91. Lo WHY i wsp (1993) Molecular basis of PKU in China. *Chin Med Sci J* 8: 180-185.
92. Zschocke J, Hoffmann GF (1999) Phenylketonuria mutations in Germany. *Hum Genet* 104: 390-398.

93. Hennermann JB i wsp (2000) Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in eastern Germany. *Human Mutat* 15: 254-260.
94. Carter KC i wsp (1998) Mutation at the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) and its use to document population genetic variation: the Quebec experience. *Eur J Hum Genet* 6: 61-70.
95. Jaruzelska J (1995) Molekularne podłoże fenylketonurii. Mutacje genu i zaburzenia dojrzewania pre-mRNA hydroksylazy fenylalaninowej. Wyd. Naukowe UAM, Poznań.
96. Francois B i wsp (1994) Heterogeneity of phenylketonuria in Belgium at the genotype-phenotype level. *J Inher Metab Dis* 17: 369-370.
97. Żekanowski C i wsp (1999) Mutacje powodujące dziedziczną hiperfenylalaninemię. *Med Wieku Rozwoj* 3: 55-66.
98. Żekanowski C, Nowacka M (1997) Molekularne podłoże łagodnych postaci hiperfenylalaninemii. *Ped Pol* LXXII/8: 659-664.
99. Desviat LR, Perez B, Ugarte M. (1996) Molecular basis of non-PKU hyperphenylalaninemia in Spain: prevalence of A403V, a mutation with high residual activity. *J Inher Metab Dis* 19: 227-230.
100. Ramus SJ i wsp (1993) Comparison of genotype and intellectual phenotype in untreated PKU patients. *J Med Genet* 30: 401-405.
101. Hommes FA (1991) On the mechanism of permanent brain dysfunction in hyperphenylalaninemia. *Biochem Med. Metab Biol* 46, 277-287.
102. Kleiman S i wsp (1993) Phenylketonuria: variable phenotypic outcome of the R261Q mutation and maternal PKU in the offspring of a healthy homozygote. *J Med Genet* 30: 284-288.
103. Usha R i wsp (1992) Late diagnosis of phenylketonuria in a Bedouin mother. *Am J Med Genet* 44: 713-715.
104. Novotny EJ i wsp (1995) In vivo measurement of phenylalanine in human brain by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 37: 244-249.
105. Moller HE i wsp (1998) Blood-brain barrier phenylalanine transport and individual vulnerability in phenylketonuria. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 1184-1191.
106. Moller HE, Ullrich K, Weglage J (2000) In vivo proton magnetic resonance spectroscopy in phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159 (Suppl 2): S121-S125.
107. Thony B, Blau N (1997) Mutations in the GTP cyclohydrolase I and 6-pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase genes. *Hum Mutat*: 10, 11-20.
108. Segal S (1998) Galactosaemia today: the enigma and the challenge. *J Inher Metab Dis* 21: 455-471.
109. Wells L, Fridovich-Keil JL (1997) Biochemical characterisation of the S135L allele of galactose-1-phosphate uridylyltransferase associated galactosemia. *J Inher Metab Dis* 20: 633-642.
110. Palmieri M i wsp (1999) Urine and plasma galactitol in patients with galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficient galactosemia. *Metabolism* 48: 1294-1302.
111. Berry GT i wsp (2000) Galactose breath testing distinguishes variant and severe galactose-1-phosphate uridylyltransferase genotypes. *Pediatr Res* 48: 323-328.

112. Berry GT i wsp (1997) Quantitative assessment of whole body galactose metabolism in galactosemic patients. *Eur J Pediatr* 156 (Suppl 1): S43-S49.
113. Scriver CR, Waters PJ (1999) Monogenic traits are not simple – lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 15: 267-272.
114. Hartwell LH i wsp (1999) From molecular to modular cell biology. *Nature* 402 (Suppl) C47-C52.
115. Ning C i wsp (2000) Apparent galactose appearance rate in human galactosemia based on plasma [¹³C]-galactose isotopic enrichment. *Mol Genet Metab* 70: 261-271.
116. Cotton RGH, Scriver CR (1998) Proof of “disease causing” mutation. *Hum Mutat* 12: 1-3.
117. Nollau P i wsp (1997) Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clin Chem* 43: 1114-1128.
118. Zschocke J, Hoffmann GF (2000) PAH gene mutations analysis in clinical practice – comments on mutation analysis anticipates dietary requirements in phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159 (Suppl 2): S154-S155.
119. Guldberg P i wsp (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.
120. Zschocke J i wsp (1994) Non-phenylketonuria hyperphenylalaninemia in Northern Ireland: frequent mutation allows screening and early diagnosis. *Hum Mutat* 4: 114-118.
121. Berlin CM, Levy HL, Hanley WB (1995) Delayed increase in blood phenylalanine concentration in phenylketonuric children initially classified as mild hyperphenylalaninemia. *Screening* 4: 35-39.
122. Koch R i wsp (1998) Mild hyperphenylalaninemia and heterozygosity of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol Genet Metab* 63: 148-150.
123. Rottoli A i wsp (1999) Should genetic analysis in newborn screening and heterozygote test for hyperphenylalaninemia be recommended? An Italian study. *J Med Screening* 6: 193-194.
124. Żekanowski C i wsp (1994) Frequencies of the most common mutations responsible for phenylketonuria in Poland. *Mol Cell Probes* 8: 323-324.
125. Jaruzelska J i wsp (1993) Genetic background of clinical homogeneity of phenylketonuria in Poland. *J Med Genet* 30: 232-234.
126. Maceratesi T i wsp (1996) Three new mutations (P183T, V150L, 528insG) and eleven sequence polymorphisms in Italian patients with galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) deficiency. *Hum Mutat* 8: 369-372.
127. Schuster V i wsp (1998) Simultaneous occurrence of various mutations and polymorphisms in cis and trans of GALT gene in a Turkish family with classical galactosemia. *J Mol Med* 76: 715-719.
128. Guldberg P i wsp (1996) Three prevalent mutations in a patient with phenylalanine hydroxylase deficiency: implications for diagnosis and genetic counselling. *J Med Genet* 33: 161-164.
129. Podskarbi T, Reichardt J, Shin YS (1994) Studies of DNA in galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency and the Duarte variant in Germany. *J Inher Metab Dis* 17: 149-150.

130. Tyfield L i wsp (1999) Classical galactosemia and mutations at the galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) gene. *Hum Mutat* 13: 417-430.
131. Dequeker E, Cassiman J-J (1998) Evaluation of CFTR gene mutation testing methods in 136 diagnostic laboratories: report of a large European external quality assessment. *Eur J Hum Genet* 6: 165-175.
132. Diagnostyka Laboratoryjna i Wiadomości PTDL 33, Supl 1 (1997)
133. Powszechny Program Zewnętrznej Oceny Jakości w Medycynie Laboratoryjnej (PPZOJMED 1997/1998) materiały informacyjne
134. Mazurczak T (1997) Organizacja specjalistycznej opieki genetycznej w Polsce. Zasady diagnostyki chorób genetycznych. (w:) Friedman JM, Dill FJ, Hayden MR, McGillivray BC – Genetyka. Urban & Partner, Wrocław
135. Sanak M (1997) Genetyka chorób o zasięgu społecznym. *Wszechświat* 98: 191-194.
136. Zschocke J, Hoffmann GF (2000) *Vademecum metabolicum. Manual of metabolic paediatrics.* Milupa, Stuttgart. Na stronie 23 autorzy piszą: „Analiza mutacji u dzieci może być prowadzona jedynie w przypadku ważnych konsekwencji klinicznych takiego postępowania, mających miejsce w okresie dziecięcym. Analiza nosicielstwa u zdrowego rodzeństwa dzieci z chorobami metabolicznymi nie jest wskazana i nie powinna być prowadzona nawet na prośbę rodziców”. Kilkuletnia praktyka w identyfikowaniu mutacji u chorych z hiperfenyloalaninemią i galaktozemią skłania mnie do takiej samej opinii.
137. Fryer A (2000) Inappropriate genetic testing of children. *Arch Disease Childhood* 83: 283-285.
138. Żekanowski C (2000) Nowa eugenika? (w:) Bioetyczne problemy inżynierii genetycznej. Materiały na III Krajową Konferencję z cyklu Nauka na Przełomie Wieków. red: Dyk W Uniwersytet Szczeciński, Szczecin.
139. Tawata M, Aida K, Onaya T (2000) Screening for genetic mutations. A review. *Combinat Chem High Throughput Screening* 3: 1-9
140. Holtzman NL (1999) Are genetic tests adequately regulated? *Science* 286: 409.
141. Chee YC (1999) No, no to the commercialisation of medicine. *Singapore Medical Journal* 40: 719-720.
142. Bowles Biesecker B, Marteau TM (1999) The future of genetic counselling: an international perspective. *Nature Genet* 22: 133-137 (1999)

10. SUMMARY

MOLECULAR DIAGNOSIS OF SELECTED INHERITED METABOLIC DISORDERS

Results of mutation detection and characterization in a group of 200 Polish patients with hyperphenylalaninemia and galactosemia were presented.

Genotypes at the disease causing genes were established for all patients. It was shown that heterogeneity of clinical symptoms depends to some extent on heterogeneity at the molecular level.

Different mutations were correlated with clinical outcome in case of mild hyperphenylalaninemia, mild phenylketonuria and pyruvoyl-tetrahydrobiopterin synthase deficiency, which is important for routine molecular differential diagnosis of hyperphenylalaninemia. In a group of classical galactosemic patients no obvious genotype – phenotype correlation was found.

Mutations R68G and R68S at the phenylalanine hydroxylase gene were analyzed using two in vitro expression systems. It was shown that both mutations do not affect phenylalanine hydroxylase activity and immunoreactivity in vitro.

Twenty one novel mutations were identified in the studied groups of patients. Alternative splicing of pre-mRNA of the PTS gene was detected in peripheral blood leucocytes.

Utility and general principles of molecular diagnosis for clinical purposes in case of hyperphenylalaninemia and galactosemia were established. It was stressed that comprehensive biochemical diagnostics is indispensable in case of galactosemia diagnosis.

Different nation-wide systems of molecular diagnosis of inherited diseases were presented. On this basis lines of possible changes in Polish system were presented. Additional bioethical aspects of molecular diagnosis were discussed.