

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ДІАГНОСТИКА МУТАЦІЙ ГЕНА *FGFR3* ПРИ АХОНДРОПЛАЗІЇ ТА ГІПОХОНДРОПЛАЗІЇ

Природжені аномалії — головна причина дитячої смертності, захворюваності і втрати плодів. Найуразливішими системами людського організму в процесі онтогенезу є кістяк, мозок і серце. Патогенетичні механізми природжених вад різноманітні. Вади, що є результатом порушеного розвитку, можуть виникати внаслідок хромосомних відхилень, дефектів генів чи зміненого балансу факторів, що керують станом гена протягом розвитку [1].

Ахондроплазія (АХ) — аутосомно-домінантне захворювання з повною пенетрантністю, яке є найбільш поширеною формою спадкової диспропорційної низької статури й одним із найпоширеніших захворювань (1 на 25 000–40 000 новонароджених), яке успадковується за моногенним менделівським типом. У понад 80% випадках, АХ виникає внаслідок мутації *de novo* в сперматозоїді чи яйцеклітині, а гомозиготна форма АХ, яка характеризується важкими аномаліями скелету, є фатальною в перші роки життя [2–6]. Причиною появи АХ є генетичний дефект у гені рецептора фактору росту фібробластів 3 (*FGFR3*), а саме: 98% випадків АХ спричинені мутацією *c.1138G > A*, в 1% усіх випадків детектовано мутацію *c.1138G > C* та 1% інших рідкісних мутацій, які викликають АХ [2, 3, 5, 7].

Гіпохондроплазія (ГХ), або нетипова ахондроплазія, — аутосомно-домінантне захворювання, яке входить до скелетних дисплазій. Захворювання часто проявляється після трирічного віку і фенотипово нагадує прояви АХ, що ускладнює діагностику та лікування цього захворювання. ГХ викликана трансверсією *C > A* або *C > G* в нуклеотиді 1620 гена *FGFR3* і спричинює мутацію *p.Asn540Lys* на білковому рівні, що зустрічається у 55–60% пробандів з усіх виявлених випадків ГХ [3, 8].

Молекулярно-генетичне тестування мутацій *c.1138G > A* та *c.1138G > C*, *c.1620C > A* та *c.1659C > G* гена *FGFR3* забезпечує можливість пренатального діагностування ахондроплазії та гіпохондроплазії, що є особливо важливим

у сім'ях, де батьки хворі на скелетну дисплазію. Диференційне діагностування ахондроплазії чи гіпохондроплазії дозволяє виключити нанізми іншої етіології, що відіграє важливу роль при призначенні ефективного лікування. Рання діагностика дозволяє застосовувати специфічні профілактичні заходи для полегшення перебігу медичних ускладнень при ахондроплазії, що характеризується важкими ускладненнями, ніж у пацієнтів із гіпохондропатією.

Таким чином, метою цієї роботи є розробка та впровадження молекулярно-генетичного тестування мутацій гена *FGFR3* для диференційної та пренатальної діагностики скелетних дисплазій серед українського населення.

Матеріали і методи

Групу обстеження склали 62 пробанди з підозрою на АХ чи ГХ, а також 99 членів їх сімей, включаючи батьків та сибсів. Вік пацієнтів становив від 3 місяців до 40 років. Пробанди з підозрою на АХ та ГХ відбиралися шляхом консультацій у спеціалізованих дитячих відділеннях (неврологічному, педіатричному) західноукраїнського спеціалізованого дитячого медичного центру (ЗУСДМЦ), Львівському міжобласному медико-генетичному центрі (ЛММГЦ) та активно скеровувались із 8 областей західного регіону України. Обстеження пробандів проводили за схемами індивідуальної карти клінічного огляду. Усім пацієнтам проводились обстеження, які включали збір генеалогічного анамнезу, клінічний огляд, опис фенотипу та молекулярно-генетичні дослідження.

Діагностичні обстеження були проведені у всіх 62 дітей у повному обсязі, ідентифіковані залежно від особливостей клінічних проявів у конкретної дитини. Зокрема, бралися до уваги основні діагностичні критерії: темпи росту, невідповідні до паспортного віку та стадії дозрівання; зріст, менший за 2–2,5 сигми від середнього зросту для даного паспортного віку; низькоросла дитина, батьки якої нормального зросту або

високі; дитина з відставанням кісткового віку (більше 2 років для цього паспортного віку); наявні дисморфічні риси, що вказували на можливі генетичні синдроми, що супроводжуються низькорослістю; дитина з диспропорційною будовою тіла, або аномаліями скелета (наприклад, прояви гіпохондроплазії чи ахондроплазії, інші скелетні дисплазії).

Матеріалом для дослідження служила ДНК, виділена з лейкоцитів периферійної крові методом висолювання [9]. Проводили ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro*, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для ідентифікації мутацій $1138G > A$ та $1138G > C$, $1659C > A$ та $1659C > G$ гена *FGFR3* застосовували метод поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) [10, 11]. Для детекції отриманих рестриктних фрагментів проводили електрофорез у 2% агарозному гелі. Після цього проводили візуалізацію на УФ-трансліюмінаторі та порівнювали з маркерами довжин. Результати сканування гелів знімали цифровою камерою «Gel Imager» при довжині хвилі 256 нм. Отримані сигнали порівнювали з маркерами довжин і на основі цього детектували розміри отриманих фрагментів.

Результати та обговорення

У результаті цієї роботи апробовано методику молекулярно-генетичного тестування мутацій $c.1138G > A$, $c.1138G > C$ та $p.Asn540Lys$ гена *FGFR3*. В результаті проведення ПДРФ аналізу ампліфікованого продукту у випадку присутності $1138A$ алеля продукт величиною 164 п.н. під дією рестриктази *SfeI* розщеплюється на два фрагменти розміром 109 п.н. та 55 п.н. (рис. 1). Мутацію $c.1138G > C$ детектовано з використанням рестриктази *MspI*, яка, за наявності мутації, розрізає продукт розміром 164 п.н. на два фрагменти — 107 п.н. та 57 п.н. (рис. 2).

При аналізі мутації $p.Asn540Lys$ гена *FGFR3* в продукті ПЛР створюється сайт ендонуклеази рестрикції *HindIII*. За наявності у пробандів мутації $p.Asn540Lys$ ($c.1620C > A$ або $c.1659C > G$) продукт ампліфікації розчепиться на фрагменти розміром 161 п.н., 136 п.н. та 25 п.н. (не відображається в гелі) (рис. 3). З'ясування, яка саме транзиція, $C > A$ чи $C > G$, присутня у пробандів, планується на подальшому етапі досліджень.

Проведено молекулярно-генетичний аналіз та встановлено частоти мутацій $c.1138G > A$,

$c.1138G > C$ та $p.Asn540Lys$ гена *FGFR3* у 160 осіб: 62 особи з підозрою на АХ чи ГХ та 99 членів їхніх родин (табл.).

У результаті проведеного дослідження у 27 пацієнтів виявлено мутації в гені *FGFR3*. У 22 осіб віком від 5 місяців до 40 років виявлено мажорну мутацію $c.1138G > A$ в гетерозиготному стані. Мутацію $c.1138G > C$ ідентифіковано в чотирьох пацієнтів віком від 3 місяців до 29 років, мутація $p.Asn540Lys$ виявлена у двох осіб віком 5 місяців та 1 пробанда віком 7 років. Серед родичів пробандів виявлено двох гетерозиготних носіїв мутації $c.1138G > A$ та $c.1138G > C$. Отже, два випадки успадковані від матері до сина (6,8%) та у 27 випадках відбулося виникнення мутації *de novo* (93%).

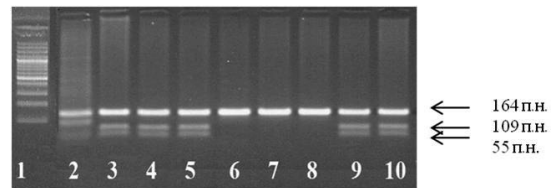


Рис. 1. Електрофореграма рестрикційного аналізу мутації $c.1138G > A$ гена *FGFR3* (2% агарозний гель): 1 — маркер молекулярної ваги 100 б.р.; 2, 3, 4, 5, 9, 10 — гетерозиготний носій мутації $c.1138G > A$; 6, 7, 8 — відсутність мутації $c.1138G > A$

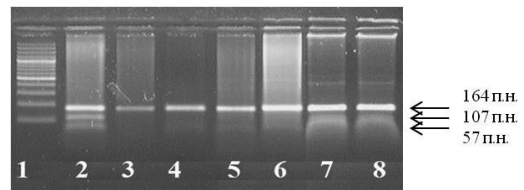


Рис. 2. Електрофореграма рестрикційного аналізу мутації $c.1138G > C$ гена *FGFR3* (2% агарозний гель): 1 — маркер молекулярної ваги 100 б.р.; 2 — гетерозиготний носій мутації $c.1138G > C$; 3, 4, 5, 6, 7, 8 — відсутність мутації $c.1138G > C$

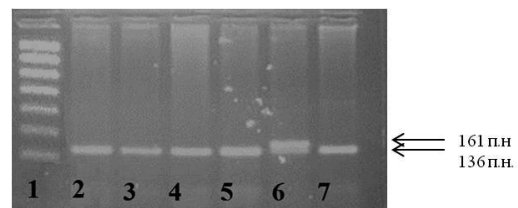


Рис. 3. Електрофореграма рестрикційного аналізу мутації $p.Asn540Lys$ гена *FGFR3* (2% агарозний гель): 1 — маркер молекулярної ваги 100 б.р.; 2, 3, 4, 5, 7 — відсутність мутації $p.Asn540Lys$; 6 — гетерозиготний носій мутації $p.Asn540Lys$

Частота мутацій *c.1138G > A*, *c.1138G > C* та *p.Asn540Lys* (*c.1620C > A* або *c.1659C > G*) гена *FGFR3* в обстежених пацієнтів

Генотипи	Пробанди N = 62		Родичі пробандів N = 99	
	n	%	N	%
1138GG / 1620 CC	35	56	97	98
1138GA	21	34	1	1
1138GC	3	5	1	1
1620CA або 1620CG	3	5	—	—

Примітка: N — кількість осіб у дослідній групі.

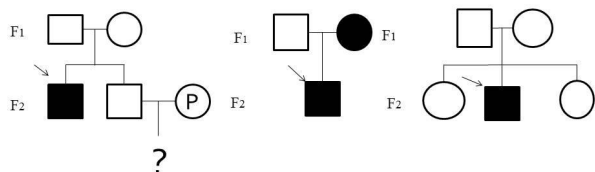


Рис. 4. Родоводи обстежених родин, у яких виявлено випадки нанізму

Таким чином, як видно із даних, наведених у табл., проведений молекулярно-генетичний аналіз підтвердив наявність мутації гена *FGFR3* в 44% пробандів. У 34% пацієнтів підтверджено наявність мутації *c.1138G > A*, у 5% — мутації *c.1138G > C*, а у 5% виявлено мутацію *p.Asn540Lys*. Серед групи родичів пробандів ідентифіковано один випадок успадкованої передачі мутації *c.1138G > A* та один випадок успадкування *c.1138G > A* мутації в гені *FGFR3*, що склало 2%.

У 34 пацієнтів з фенотиповими ознаками ахондроплазії не виявлено жодної мутації, хоча це не виключає наявності рідкісних мутацій, які викликають ахондроплазію. Як свідчать дані генеалогічних досліджень, у 25 із 27 досліджень випадки нанізму у пробанда були єдиними в родині. В одному випадку виявлено мутацію *c.1138G > A* гена *FGFR3* у матері, яка мала фенотипові ознаки ахондроплазії. Мутацію *c.1138G > C* виявлено у матері, яка, імовірно, успадкована від батька, в якого діагностовано хондродистрофію (помер у віці 41 рік). В інших батьків дітей мутацій не виявлено, що вказує про *de novo* походження виявлених мутацій. Родоводи обстежених родин наведено на рис. 4.

ЛІТЕРАТУРА

1. Макух Г.В., Гнатейко О.З., Заставна Д.В. Методики молекулярно-генетичного аналізу муковісцидозу, синдрому Ніймеген та фенілкетонурії: методичні рекомендації. — К., 2009. — 28 с.
2. Ахондроплазия — описание, причины, симптомы (признаки), лечение. Gipocrat.ru [Електронний ресурс]. — Режим доступу: http://gipocrat.ru/boleznid_id33835.phtml.

Отримані результати підтверджують діагноз ахондроплазії у пробанда за наявності мутацій *c.1138G > C* або *c.1138G > C* та гіпохондроплазії при виявленні мутації *p.Asn540Lys*., а також свідчать, що переважно випадки цього домінуючого захворювання зумовлені мутаціями, що виникли *de novo*. Таким чином, генетичне тестування мутацій *c.1138G > A*, *c.1138G > C* та *p.Asn540Lys*. гена *FGFR3* є високоінформативним дослідженням для верифікації діагнозу ахондроплазія та гіпохондроплазія і може використовуватися для диференційної діагностики нанізму у людини.

Висновки

Сформовано реєстр носіїв мутацій *c.1138G > A*, *c.1138G > C* та *p.Asn540Lys* гена *FGFR3* (27 пробандів) для ефективного прогнозування нових випадків ахондроплазії у родині.

Проведено молекулярно-генетичний аналіз мутацій *c.1138G > A*, *c.1138G > C* та *p.Asn540Lys* серед 161 особи: 62 дитини з підозрою на ахондроплазію та 99 членів їх родин. Виявлено мутацію *c.1138G > A* в гетерозиготному стані у 21 пробанда, *c.1138G > C* — у 3 дітей та мутацію *p.Asn540Lys* — у 3 осіб. Мутації гена *FGFR3* виявлено у 44% пробандів із різними типами нанізму та дизморфічними ознаками. У 34% випадків верифікації ахондроплазії виявлено мутацію *c.1138G > A* та в 5% мутацію *c.1138G > C* гена *FGFR3*. У 5% випадків підтверджено діагноз гіпохондроплазії наявною мутацією *p.Asn540Lys*.

На основі генеалогічного та молекулярно-генетичного аналізу встановлено, що мутації в гені *FGFR3* в 93% випадків виникають *de novo*.

3. Трансмембранна передача сигналу з участю RTK рецепторів // База знань по біології людини [Електронний ресурс].— Режим доступу: http://humbio.ru/humbio/cell_sign3/0003c36b.htm.
4. Fibroblast growth factor receptor 3; FGFR3 // [Електронний ресурс].— Режим доступу: <http://omim.org/entry/134934>.
5. Francomano C. A., Ortiz de Luna R. I., Hefferon T. W., Bellus G. A., Turner C. E., Taylor E., Meyers D. A., Blanton S. H., Murray J. C., McIntosh I. Localization of the achondroplasia gene to the distal 2.5 Mb of human chromosome 4p. // Hum. Mol. Genet.— 1994.— 3.— P. 787–792.
6. Galzie Z., Kinsella A. R., Smith J. A. Fibroblast growth factors and their receptors // Biochem. Cell Biology.— 1997.— 75.— P. 669–685.
7. Keegan K., Rooke L., Hayman M., Spurr N. K. The fibroblast growth factor receptor 3 gene (*FGFR3*) is assigned to human chromosome 4 // Cytogenet. Cell Genet.— 1993.— 62.— P. 172–175.
8. Givol D., Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity // FASEB.— 1992.— 6.— P. 3362–3369.
9. Макух Г. В., Заставна Д. В., Тиркус М. Я., Третяк Б. І., Чорна Л. Б. Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові. Пат. 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01). № у 200801896; заявл. 14.02.2008; опубл. 25.04.2008; Бюл. № 8.
10. Bellus G. A., Macintosh I., Smith E. A., Aylsworth A. S., Kaitila I., Horton W. A., Greenhaw G. A., Hecht J. T., Francomano C. A. A Recurrent Mutation in the Tyrosine Kinase Domain of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Causes Hypochondroplasia // Nature Genetics.— 1995.— N 10.— P. 357–359.
11. Pati S. J., Banerjee M., Phadke S. R., Mittal B. Mutation Analysis in Indian Children with Achondroplasia.— Utility of Molecular Diagnosis // Indian Journal of Pediatrics.— 2009.— 76.— P. 147–149.

DMYTRUK I., MAKUKH H., TURKYS M., MARKEVYCH N., SHUVARSKA V., LIALIUK O.

*Institute of Hereditary Pathology of the Ukrainian National Academy of Medical Sciences,
Ukraine, 79000, Lviv, Lysenko str., 31-a, e-mail: irynamdmytruk@gmail.com*

MOLECULAR GENETIC TESTING OF *FGFR3* GENE MUTATION IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ACHONDROPLASIA AND HYPOCHONDROPLASIA

Aims. The differential diagnosis of achondroplasia and hypochondroplasia in Ukraine is based on the typical clinical and radiologic features that limits accurate diagnosis and leads to many false-positive diagnoses when checked against a complete mutation search of the *FGFR3* gene. Thereby, we outline the necessity of implementation molecular-genetic test of *FGFR3* gene mutations. The implementation is necessary to carry out differential and prenatal diagnostic of achondroplasia and hypochondroplasia among Ukrainian population. **Methods.** The study included 62 patients with clinical things of achondroplasia or hypochondroplasia and 99 relatives including sibs and parents. The molecular-genetic analysis was performed by PCR (Polymerase Chain Reaction) and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis. We optimized the time and temperature conditions and chose specific primers for revealing the *c.1138G > A*, *c.1138G > C* and *p.Asn540Lys* mutations of *FGFR3* gene. **Results.** Mutation *c.1138G > A* was found at 21 (34%) individuals aged from 5 months to 40 years old with obvious phenotypical features of achondroplasia of which 25 cases was sporadic. Additionally the mutation *c.1138G > C* was detected at 3 (5%) probands. Major *p.Asn540Lys* mutation of the *FGFR3* receptor was identified at 3 (5%) probands which causes hypochondroplasia. **Conclusions.** We concluded that 93% of mutations were sporadic because no mutations were found at relatives; meanwhile we found 2 (2%) inheritable *c.1138G > A* and *c.1138G > C* mutations at both mother and son. Due to conducting of molecular-genetic diagnostics of *FGFR3* mutations *c.1138G > A*, *c.1138G > C* and *p.Asn540Lys* diagnosis achondroplasia and hypochondroplasia were confirmed at 27 (44%) observed patients and extensive gene analysis are required for the other patients to search for rare *FGFR3* rearrangements.

Keywords: hypochondroplasia, achondroplasia, mutation, molecular-genetic diagnostics.