

Genetic background of alkaptonuria, a prototypic inborn error of metabolism affecting connective tissues

Genetyczne podstawy alkaptonurii, prototypowego wrodzonego błędu metabolizmu wpływającego na tkankę łączną

Andrea Zatkova, Jan Radvanszky, Ludevit Kadasi

Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

Instytut Fizjologii Molekularnej i Genetyki, Słowacka Akademia Nauk, Bratysława, Słowacja

Key words: alkaptonuria, *HGD* mutations, *HGD* mutation database, homogentisate 1,2-dioxygenase.

Słowa kluczowe: alkaptonuria, mutacje *HGD*, baza mutacji *HGD*, 1,2-dioksygenaza homogentyzynianowa.

Summary

Alkaptonuria (AKU) is characterised by a typical bluish-black pigmentation in connective tissue (ochronosis) that usually occurs after the age of 30 years. AKU is the first inborn error of metabolism to be understood as a recessive trait. It is caused by mutations within the gene located on the human chromosome 3q13.33, coding for the enzyme homogentisate 1,2-dioxygenase (HGD). About 650 AKU patients have been reported worldwide, and mutation analysis performed so far in about 270 cases shows a rather high heterogeneity, since 117 AKU-causing mutations have been found, also summarized in a novel *HGD* mutation database. Several ethnicities have been reported in which an increased incidence of AKU is observed, compared to its worldwide low prevalence (1 : 250 000 – 1 : 1 000 000).

Streszczenie

Alkaptonuria (AKU) charakteryzuje się typowym niebieskawo-czarnym zabarwieniem tkanki łącznej (ochronozą), która zwykle pojawia się po ukończeniu 30. roku życia. Alkaptonuria jest pierwszym wrodzonym błędem metabolizmu, w przypadku którego zidentyfikowano recesywną drogę przenoszenia i który jest spowodowany przez mutacje w genie zlokalizowanym na ludzkim chromosomie 3q13.33, kodującym enzym 1,2-dioksygenazę homogentyzynianową (HGD). Na całym świecie zidentyfikowano ok. 650 pacjentów z AKU, a przeprowadzona dotychczas analiza mutacji u ok. 270 osób wykazała dość wysoką heterogenność, stwierdzone 117 mutacji sprawczych w AKU znalazło się także w nowej bazie mutacji *HGD*. W kilku grupach etnicznych zgłaszano zwiększoną częstość występowania AKU w porównaniu z niewielką częstością występowania tej choroby na świecie (1 : 250 000 – 1 : 1 000 000).

Alkaptonuria – history

Alkaptonuria (AKU) [MIM 203500] is an autosomal recessive disorder characterized by homogentisic aciduria, ochronosis and ochronotic arthritis. Sir Archibald Edward Garrod linked ochronosis with the accumulation of alkaptons as early as in 1902 [1] and his views on its mode of inheritance were summarized in a Croonian lecture at the Royal College of Physicians [2]. Only after 50 years was the enzymatic defect defined as homogentisate 1,2 dioxygenase (HGD) [E.C.1.13.11.5] deficiency [3].

Alkaptonuria – historia

Alkaptonuria (AKU) [MIM 203500] jest schorzeniem o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym, które charakteryzuje się kwasicą homogentyzynianową, ochronozą i ochronotycznym zapaleniem stawów. Sir Archibald Edward Garrod powiązał ochronozę z gromadzeniem alkaptonów już w 1902 r. [1], a jego opinie na temat sposobu dziedziczenia zostały przedstawione podczas prestiżowych wykładów w Królewskim Kolegium Lekarskim (*Royal College of Physicians*) [2]. Pięćdziesiąt lat później określono defekt enzy-

Address for correspondence:

Andrea Zatkova PhD, Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Vlarska 5, 833 34 Bratislava, Slovakia, tel. +421 911466599, e-mail: andrea.zatkova@savba.sk

Submitted: 13.07.2012

Another 35 years later, several groups worked on mapping the *HGD* gene in various organisms. Pollak et al. [4] mapped the human AKU gene to chromosome 3q21–q23 using homozygosity mapping in two highly inbred AKU families and also Janocha et al. [5] in 1994 mapped it to the same region in six pedigrees of Slovak origin, using the synteny between murine and human chromosomes.

The human *HGD* gene spans 54,363 bp of genomic sequence. Its 17,715 bp long *HGD* transcript is split into 14 exons and codes for the HGD protein composed of 445 amino acids that is expressed in liver, kidney, small intestine, colon and the prostate [6–8]. Recently, Laschi et al. [9] showed *HGD* gene expression in chondrocytes, synoviocytes and osteoblasts. This finding indicates that AKU osteoarticular cells produce the ochronotic pigment *in loco* and this may strongly contribute to induction of ochronotic arthropathy.

HGD mutations and their effect on enzyme function

The genetic basis of the disease was definitely elucidated when the first human *HGD* mutations were demonstrated in Spanish AKU families: missense mutations P230S in exon 10, and V300G affecting exon 12 [6]. For P230S, the authors also provided biochemical evidence that it is a loss of function mutation [6]. Mutation screening within the *HGD* gene has been performed in several countries and so far 117 mutations and 33 *HGD* polymorphisms have been encountered [10]. These include all mutations published so far in a new online *HGD* mutation database (<http://hgddatabase.cvtisr.sk/>) [10], as well as 2 novel mutations identified recently in our laboratory. One is a missense mutation within exon 9 identified in a Brazilian AKU patient, while another is an intron 2 splicing mutation found in patients from the gypsy community Narikurava in India.

The *HGD* mutation database is open for future submissions and at present it contains 327 patients, collected from the literature, from the original AKU database from Madrid (<http://www.alkaptonuria.cib.csic.es>), and also those analyzed in our laboratory. The database homepage also provides a section for browsing data using a simple search by type of variant and exon number, or a search based on the patient's origin. Furthermore, links to the websites of different national AKU societies are provided as well as to the find AKUre project, a joint collaborative research project of the AKU Society and the University of Liverpool.

Several mutational hot-spots have been described for the *HGD* gene, such as the “CCC” sequence motif and its inverted complement, “GGG” [11], c.342+1G [12] and CpG dinucleotides. Forty out of 117 (34.2%) *HGD* variants identified so far affect these sequences [10].

matyczny, definiowany jako niedobór 1,2-dioxygenazy homogentyzynianowej (HGD) [E.C.1.13.11.5] [3].

Po upływie kolejnych 35 lat kilka grup pracowało nad zmapowaniem genu *HGD* u różnych organizmów. Pollak i wsp. [4] zmapowali ludzki gen AKU na chromosomie 3q21–q23, wykorzystując mapowanie homozygotyczności w dwóch wysoce endogamicznych rodzinach obciążonych AKU; także Janocha i wsp. [5] w 1994 r. zmapowali ten gen w tym samym regionie na podstawie 6 rodowodów rodzin pochodzących ze Słowacji, wykorzystując syntonie chromosomów mysich i ludzkich.

Ludzki gen *HGD* obejmuje sekwencję genomową liczącą 54,363 bp (par zasad), jego liczący 17,715 bp transkrypt jest podzielony na 14 eksonów i koduje białko HGD złożone z 445 aminokwasów, które ulega ekspresji w wątrobie, nerkach, jelicie cienkim, jelicie grubym i gruczole krokowym [6–8]. Ostatnio Laschi i wsp. [9] wykazali ekspresję genu *HGD* w chondrocytach, synowocytach i osteoblastach. Obserwacja ta wskazuje, że komórki kości i stawów w AKU produkują barwnik ochronotyczny *in loco*, co może w zasadniczy sposób przyczynić się do indukcji artropatii ochronotycznej.

Mutacje HGD i ich wpływ na funkcje enzymu

Genetyczna podstawa choroby została ostatecznie ustalona, gdy pierwsze mutacje *HGD* stwierdzono w hiszpańskich rodzinach z AKU: mutacje typu zmiany sensu (*missense*) P230S w eksonie 10 oraz V300G w eksonie 12 [6]. W przypadku mutacji P230S autorzy przedstawili także biochemiczne dowody, że jest to mutacja powodująca utratę funkcji białka (*loss of function mutation*) [6]. Przesiewowe badanie genu *HGD* prowadzono w kilku krajach i do tej pory zidentyfikowano 117 mutacji i 33 polimorfizmy genu *HGD* [10]. Liczba ta obejmuje wszystkie mutacje opublikowane do tej pory w nowej internetowej bazie mutacji *HGD* (<http://hgddatabase.cvtisr.sk/>) [10], jak również 2 nowe mutacje zidentyfikowane ostatnio w laboratorium autorów niniejszej pracy. Jedną z nich to mutacja typu zmiany sensu w eksonie 9, stwierdzona u pacjenta z AKU z Brazylii, a druga to mutacja w intronie 2, wpływająca na różnicowe składanie eksonów, stwierdzona u pacjentów ze społeczności cygańskiej Narikurava, pochodzącej z Indii.

Baza mutacji *HGD* jest otwarta na kolejne zgłoszenia i obecnie obejmuje 327 pacjentów, których dane pochodzą z literatury, z oryginalnej bazy mutacji AKU w Madrycie (<http://www.alkaptonuria.cib.csic.es>), a także z naszej analizy. Strona z bazą danych zawiera także sekcję z wyszukiwarką danych, która pozwala wyszukiwać mutacje według rodzaju wariantu, numeru eksonu i pochodzenia pacjenta. Co więcej, podano na niej linki do stron internetowych różnych narodowych towarzystw AKU oraz projektu findAKUre, który jest wspólnym projektem badawczym Towarzystwa AKU i Uniwersytetu w Liverpoolu.

Alkaptonuria causing mutations are distributed throughout the entire *HGD* gene with some prevalence in exons 6, 8, 10, and 13. Missense mutations are the most numerous (78/117, 66.7%), followed by splicing (15/117, 12.8%), and frameshift (14/117, 12%), and finally nonsense mutations (7/117, 6%) (Fig. 1).

In year 2000 the crystal structure of HGD enzyme was established, which enabled studies of the pathogenic effect of the AKU mutations [13]. It has been shown that the active form of this enzyme is organized as a hexameric protein, a dimer of two disc-like trimers and that the active site is formed by the C-terminal domain and the trimer interface. Many non-covalent bonds between amino acid residues are required to maintain the spatial structure of the monomer, of the trimer and finally of the hexamer, thus also for the activity of the HGD enzyme. Rodríguez et al. [14] studied the impact of several mutations on the enzyme's function and showed that most of the mutants showed a complete lack or very low levels of enzyme activity, while five mutations led to a specific activity in about 22–37% of the wild type (E42A, Y62C, A122D, D153G, and M368V).

Mutations identified in *HGD* have been grouped according to predicted structural consequences as summarized in Table I according to results of Rodríguez et al. and Grasko et al. [14, 15].

DNA diagnostics and validation of novel alkaptonuria variants

DNA diagnosis of AKU is confirmed when on both alleles the *HGD* mutation is identified. Analysis is usually per-

W genie *HGD* opisano kilka tzw. gorących miejsc mutacji (*hot-spot*), np. motyw sekwencyjny “CCC” i odwróconą sekwencję komplementarną, “GGG” [11], c.342+1G [12] oraz dinukleotydy CpG. Czterdzieści ze 117 (34.2%) zidentyfikowanych dotychczas wariantów *HGD* dotyczy tych właśnie sekwencji [10].

Mutacje powodujące AKU są zlokalizowane na całej długości genu *HGD*, nieco częściej dotyczą eksonów 6, 8, 10 i 13. Najczęstsze są mutacje typu zmiany sensu (78/117, 66,7%), następnie wpływające na różnicowe składanie eksonów (15/117, 12,8%), z przesunięciem ramki odczytu (14/117, 12%) i na koniec mutacje nonsensowne (7/117, 6%) (ryc. 1).

W 2000 r. poznano krystaliczną strukturę enzymu HGD, co umożliwiło badania efektu patogennego mutacji AKU [13]. Wykazano, że aktywna forma tego enzymu jest zorganizowana jako białko heksameryczne, dimer dwóch podobnych do dysku trimerów, i że miejsce aktywne tworzy domena C-końcowa i interfejs trimeru. Aby utrzymać przestrzenną strukturę monomeru, trimeru, a na koniec heksamery, i co za tym idzie aktywność enzymatyczną HGD, koniecznych jest wiele wiązań niekowalencyjnych pomiędzy resztami aminokwasów. Rodríguez i wsp. [14] badali wpływ kilku mutacji na funkcje enzymu i wykazali, że większość mutantów charakteryzuje się bardzo niskim poziomem aktywności enzymatycznej lub jest jej całkowicie pozbawiona, podczas gdy 5 mutacji prowadziło do specyficznej aktywności, równej ok. 22–37% aktywności dzikiego białka (E42A, Y62C, A122D, D153G i M368V).

Mutacje zidentyfikowane w *HGD* pogrupowano według przewidywanego wpływu na strukturę białka, co przedstawiono w tabeli I, w której uwzględniono wyniki prac Rodrígueza i wsp. oraz Grasko i wsp. [14, 15].

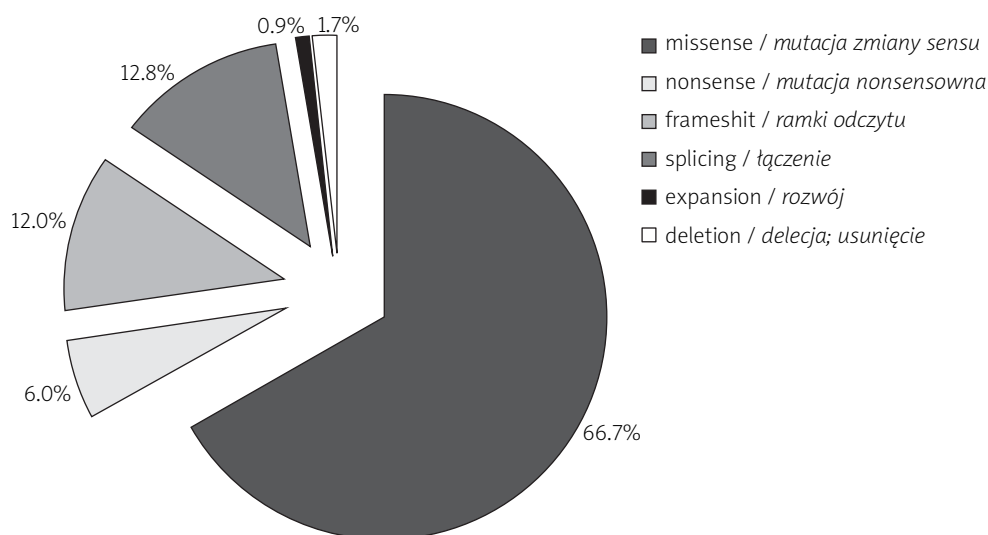


Fig. 1. Proportion of individual mutation types within *HGD* gene in AKU.

Ryc. 1. Odsetek poszczególnych typów mutacji w genie *HGD* w AKU.

Table I. Some HGD mutations divided according to the predicted structural effect as identified by Rodríguez *et al.* and Grasko *et al.* [14, 15]

Tabela I. Niektóre mutacje HGD podzielone według przewidywanego efektu strukturalnego, zidentyfikowane przez Rodrígueza i wsp. oraz Grasko i wsp. [14, 15]

Predicted structural effect / Przewidywany efekt strukturalny	More details / Szczegóły	Human HGD mutations / Mutacje HGD u człowieka
directly affecting active site residues / bezpośredni wpływ na reszty miejsca aktywnego	disrupting cofactor binding / zaburza wiązanie kofaktora	H371R, H292R
indirectly affecting the active site / pośredni wpływ na reszty miejsca aktywnego	disturbing the active site conformation / zaburza konformację miejsca aktywnego	R330S, W97G
interfering with the folding of the HGD subunit / interferuje z fałdowaniem podjednostki HGD	disrupting the intra-subunit hydrophobic structure / zaburza strukturę hydrofobową wewnątrz podjednostki	W97G, V300G, V181F, F227S, P230S, P230T
	disrupting electrostatic interactions / zaburza interakcje elektrostatyczne	D153G, K248R
	removing a polar amino acid from an important position / usuwa polarny aminokwas z ważnej pozycji	S189I
	introduction of unfavourable steric contacts / wprowadza niekorzystne kontakty przestrzenne	G161R, G270R, G360R
affecting intersubunit interactions / wpływa na interakcje między podjednostkami	within the trimer / wewnątrz trimeru	E42A, E168K, L25P, W60G, Y62C, A122D, M368V
	between trimers / pomiędzy trimerami	R225H, I216T, R53W, W322R, D294N
C-terminal truncating mutations / mutacje skracające koniec karboksylowy (C-koniec) białka	their loss leads to the loss of the interaction and to general structural defects, since C-terminal residues between Leu430 and Asn440 protrude away from the HGD subunit to contact the adjacent three-fold related subunit / utrata zaburza interakcje i zasadniczo prowadzi do defektów strukturalnych, gdyż reszty na końcu karbo- ksylowym białka w pozycjach Leu430-Asn440 wystają z podjednostki HGD, aby kontaktować się z sąsiadującą podjednostką w strukturze trzęciorzędowej białka	K431fs
interfering with substrate traffic at the active site / interferencja z przepływem substratu w miejscu aktywnym		K57N

formed by sequencing of the entire coding region, i.e. all exons, often also including the neighbouring intronic sequences. In order to prove that the identified mutation is indeed pathogenic it is important to show its segregation with the disease in the family, as well as to analyse the conservation among the species of the amino acid positions affected by the change.

Diagnostyka DNA i walidacja nowych wariantów alkaptonurii

Genetyczne rozpoznanie AKU jest potwierdzone wtedy, gdy na obu allelach zostanie zidentyfikowana mutacja HGD. Analizę zwykle przeprowadza się, sekwencjonując cały region kodujący genu, tj. wszystkie eksony wraz z sąsia-

When some novel variant is found, especially for the missense changes, several softwares are used in order to predict their possible pathogenic consequences for the structure and function of the protein. Since the HGD crystal structure is already known [13], POLYPHEN and SNAP prediction software that use information on 3D structure of the protein may be more reliable, as was also shown in the study of Vilboux et al. [16]. However, since the structure of HGD is rather complex, there are some limitations to the use of these programs and it is known that some amino acid substitutions, which would be benign if *HGD* functioned as a monomer, show deleterious effects due to disturbance of the higher organization of the functional hexamer (R225, I216, R53, and W322 side chains) [10]. If no cDNA of the patient is available for the test, the potential effect of splice-site variants can also be predicted using tools such as BDGP, NetGene2 or Human Splicing Finder, which in addition to the sequence analysis also enables a quick mutation check [16].

Genotype-phenotype relationship

So far no apparent correlation has been found between a patient's genotype and the level of excreted homogentisic acid [16]. It is important to note that the disease is caused by the apparently partial loss-of-function mutations [14]. On the other hand, the heterozygous carriers of AKU are healthy. The absence of a clear correlation between genotype and phenotype may be explained by the variability in residual HGD enzymatic activities [16]. Due to the complex structure of the HGD enzyme, genotype-phenotype correlation studies are complicated when patients with two different mutations are to be considered, since in that case the composition of the protein and contribution of individual mutations might vary and are difficult to evaluate.

AKU chromosomes with no HGD mutation identified and alkaptonuria with other types of inheritance

In the *HGD* mutation database there are at present about 32 AKU chromosomes reported in which no *HGD* mutation was identified [10]. These chromosomes might carry some deep intronic mutations affecting splicing or other types of mutations (in the promoter region or in other *cis*-regulatory sequences) that have not been captured using classic mutation detection methods.

Several families have previously been reported in which AKU appeared to be inherited dominantly [17–20]. In most of them this segregation was explained by extended consanguinity; however, in the case of the family presented by Oexle et al. [20], the authors discussed whether dominant mutations of a different gene, such as

dującymi sekwencjami intronów. W celu potwierdzenia, czy znaleziona mutacja jest rzeczywiście patogenna, ważne jest wykazanie jej segregacji z chorobą u poszczególnych członków rodziny oraz analiza konserwacji aminokwasu, którego dotyczy zmiana, u różnych gatunków.

W przypadku stwierdzenia nowego wariantu, szczególnie mutacji o typie zmiany sensu, wykorzystuje się wiele programów komputerowych, które pozwalają przewidywać jej możliwy patologiczny wpływ na strukturę i funkcję białka. Od czasu poznania krystalicznej struktury HGD [13] wykorzystuje się oprogramowania POLYPHEN i SNAP, które uwzględniają informacje o trójwymiarowej strukturze białka, przez co zyskują na wiarygodności, co wykazali Vilboux i wsp. [16]. Jednakże, struktura HGD jest raczej złożona, dlatego istnieją liczne ograniczenia w zastosowaniu tego oprogramowania i wiadomo, że niektóre substytucje aminokwasów, które byłyby łagodne, gdyby gen *HGD* funkcjonował jako monomer, wykazują szkodliwy wpływ na wyższą organizację funkcjonalnego heksameru (łańcuchy boczne R225, I216, R53 oraz W322) [10]. Jeśli cDNA pacjenta nie jest dostępne do badania, potencjalny efekt wariantów wpływających na różnicowe składowanie eksonów można także przewidywać za pomocą takich narzędzi, jak BDGP, NetGene2 lub Human Splicing Finder, które oprócz analizy sekwencji pozwalają także na szybkie sprawdzenie mutacji [16].

Korelacje genotypowo-fenotypowe

Dotychczas nie stwierdzono wyraźnej korelacji pomiędzy genotypem pacjenta i poziomem wydzielanego kwasu homogentyzynowego [16]. Należy podkreślić, że choroba jest spowodowana przez mutacje powodujące pozornie częściową utratę funkcji [14], jednak heterozygotyczni nosiciele AKU są zdrowi. Brak wyraźnej korelacji pomiędzy genotypem i fenotypem można wytłumaczyć zmiennością rezydualnych aktywności enzymatycznych HGD [16]. Z powodu złożonej struktury enzymu HGD badania korelacji genotypowo-fenotypowych są skomplikowane, gdy analiza ma dotyczyć pacjentów z dwiema różnymi mutacjami, ponieważ w takim przypadku budowa białka i udział poszczególnych mutacji mogą się różnić i są trudne do oceny.

Chromosomy AKU bez zidentyfikowanej mutacji HGD oraz alkaptonuria o innych typach dziedziczenia

W bazie mutacji *HGD* zgłoszono dotychczas 32 chromosomy AKU, w których nie zidentyfikowano żadnej mutacji *HGD* [10]. W chromosomach tych mogą się znajdować mutacje położone głęboko w intronach, które wpływają na różnicowe składowanie, oraz inne rodzaje mutacji (w regionie promotorowym lub w innych sekwencjach *cis*-regulatorowych), których nie można wykryć klasycznymi metodami.

a hitherto unrecognized cofactor, may be responsible for AKU.

Population genetics of alkaptonuria

Alkaptonuria has the very low prevalence of 1 : 100 000–250 000 in most countries. So far about 650 AKU patients have been reported worldwide [21]. Interestingly, countries such as Slovakia and the Dominican Republic exhibit an increased incidence of this disorder of up to 1 : 19 000 [22, 23]. Recently, several other ethnicities have been reported in which an increased incidence of AKU is observed (Jordan [24], India), indicating that the overall incidence of this disease in many countries might be underestimated.

The geographical distribution of all individual *HGD* mutations in the world has recently been published [25]. There are several mutations spread throughout the world, such as S59fs (R58fs), which was identified in patients from Finland, La Reunion, Slovakia, India, Turkey, UAE, the United Kingdom and the USA. One of the first identified AKU mutations, V300G, is found in France, Germany, La Reunion, Portugal, Slovakia, Spain, the USA and the United Kingdom. Missense change M368V is the most frequent mutation found mainly in Europe and present in 59 out of 526 AKU chromosomes (11.2%) [25]. It has so far been reported in Finland, France/Armenia, Germany, Portugal, Slovakia, Spain, Switzerland/Belgium, The Netherlands, the USA and the United Kingdom.

On the other hand, there are mutations that are rather specific for some countries or regions; for example IVS5+1G>A for Slovakia and the Czech Republic, H371fs (P370fs) for Slovakia, and C120W for the Dominican Republic.

In order to trace the origin of the identified AKU mutations, the allelic associations (haplotypes) of *HGD* intragenic polymorphisms are usually employed as shown in Fig. 2. Using this type of analysis it has been shown that patients from different countries who shared the same mutations – M368V, V300G, or P230S – also shared the same haplotype; alternatively, the slight differences in haplotypes could be explained by recombination events. The authors concluded that these were most likely old mutations introduced to Europe with the founder populations and they have spread throughout Western Europe along with the different migrations [26].

Similar analysis was used to study cases in countries with increased incidence of AKU. Two mutations were identified in 16 Dominican AKU chromosomes: C120W (14/16), which is the classical founder mutation, and G270R (2/16), which most likely represents a recurrent mutational event, since Dominican patients carrying this mutation showed a different haplotype to the Slovak and Italian ones [27].

Very specific is the situation in Slovakia. In the rather small population of 5 million, 208 patients have been registered

W kilku wcześniej opisanych rodzinach stwierdzono dominujące dziedziczenie AKU [17–20]. W większości z nich segregację taką wyjaśniono pokrewieństwem, jednakże w przypadku rodziny prezentowanej przez Oexle i wsp. [20] autorzy sugerowali, że za AKU mogą odpowiadać mutacje dominujące w innym genie, np. w jakimś dotychczas nieopisanym kofaktorze.

Genetyka populacyjna alkaptonurii

Alkaptonuria występuje z bardzo małą częstością, wynoszącą w większości krajów 1 : 100 000–250 000. Do tej pory na całym świecie zgłoszono ok. 650 pacjentów z AKU [21]. Co ciekawe, w takich krajach, jak Słowacja i Dominikana, stwierdzono zwiększoną częstość występowania tego schorzenia, wynoszącą do 1 : 19 000 [22, 23]. Ostatnio w kilku innych grupach etnicznych obserwowano zwiększoną częstość występowania AKU (Jordan [24], Indie), co wskazuje, że ogólna częstość tej choroby w wielu krajach może być niedoszacowana.

Ostatnio opublikowano informacje o geograficznej dystrybucji poszczególnych mutacji *HGD* [25]. Wiele mutacji rozprzestrzenionych jest po całym świecie, np. S59fs (R58fs), którą zidentyfikowano u pacjentów z Finlandii, La Reunion, Słowacji, Indii, Turcji, ZEA, Wielkiej Brytanii i Stanów Zjednoczonych. Jedną z pierwszych zidentyfikowanych mutacji AKU, V300G, została stwierdzona we Francji, Niemczech, La Reunion, Portugalii, Słowacji, Hiszpanii, Stanach Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii. Mutacja typu zmiany sensu M368V jest najczęstszą mutacją, stwierdzaną głównie w Europie i obecną w 59 z 526 chromosomów AKU (11,2%) [25]. Dotychczas stwierdzano ją w Finlandii, Francji/Armenii, Niemczech, Portugalii, Słowacji, Hiszpanii, Szwajcarii/Belgii, Holandii, Stanach Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii.

Istnieją jednak mutacje specyficzne dla niektórych krajów lub regionów, na przykład IVS5+1G>A dla Słowacji i Czech; H371fs (P370fs) dla Słowacji i C120W dla Dominikany.

W celu prześledzenia pochodzenia zidentyfikowanych mutacji AKU stosuje się badanie związków allelicznych (haplotypów) wewnątrzgenowych polimorfizmów *HGD*, co pokazano na rycinie 2. Za pomocą takiej analizy wykazano, że pacjenci z różnych krajów, noszący te same mutacje – M368V, V300G lub P230S – dzielą również taki sam haplotyp, alternatywnie niewielkie różnice w haplotypach można wyjaśnić rekombinacją. Autorzy konkludują, że były to z dużym prawdopodobieństwem stare mutacje, wprowadzone do Europy przez populacje założycieli, które rozprzestrzeniły się po Europie Zachodniej wraz z różnymi migracjami [26].

Podobną metodę zastosowano do analizy przypadków w krajach o zwiększonej częstości występowania AKU. Dwie mutacje zidentyfikowano w 16 chromosomach chorych z AKU z Dominikany: C120W (14/16), która jest klasyczną mutacją założycielską, oraz G270R (2/16), która z dużym prawdopodobieństwem reprezentuje mutację nawracającą

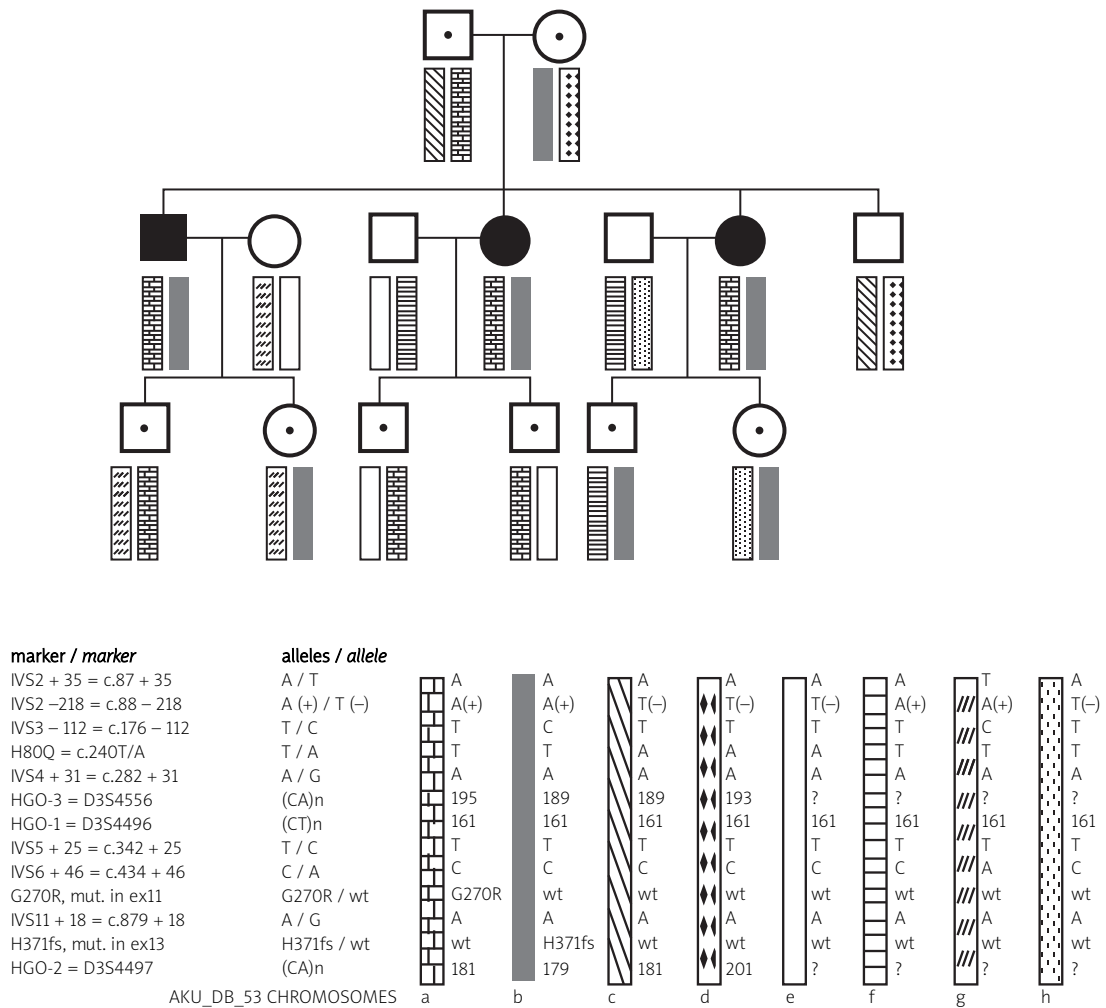


Fig. 2. Example of *HGD* gene haplotype analysis in a Slovak family. For all family members individual polymorphic markers are analysed and their segregation in the family is followed in order to assemble haplotypes. Assorted alleles associated with mutations G270R and H371fs are labelled as chromosome “a” or “b”. Chromosomes “c–h” are without AKU mutation but they differ by a combination of polymorphic alleles. In the pedigree a square indicates a man while a ring indicates a woman. Dark fill denotes AKU patients (in both chromosomes have *HGD* mutation). A dot in the middle of a square or circle indicates healthy carriers. AKU_DB_53 is the name of that family in the *HGD* mutation database.

Ryc. 2. Przykładowa analiza haplotypu genu *HGD* w słowackiej rodzinie. W przypadku wszystkich członków rodziny analizowano poszczególne markery polimorficzne, a następnie obserwowano ich segregację w celu ustalenia haplotypów. Różne allele związane z mutacjami G270R i H371fs znakowano jako chromosom „a” lub „b”. Chromosomy „c”–„h” są bez mutacji AKU, ale różnią się kombinacją alleli polimorficznych. W rodowodzie kwadrat oznacza mężczyznę, a kółko kobietę. Czarne wypełnienie wskazuje pacjentów z AKU (którzy na obu chromosomach mają mutację *HGD*). Kropka w środku kwadratu lub kółka wskazuje zdrowych nosicieli. AKU_DB_53 jest oznaczeniem rodziny w bazie mutacji *HGD*.

[28] and a total of 12 different *HGD* mutations have been established [10]. Thus, in Slovakia it is difficult to explain the increased incidence of AKU by a classical founder effect.

Based on the analysis and comparison of haplotypes, two groups of *HGD* mutations were observed in Slovakia.

ca, gdyż pacjenci z Dominikany, u których stwierdza się tę mutację, wykazują odmienny haplotyp od pacjentów ze Słowacji i Włoch [27].

Bardzo specyficzna sytuacja panuje na Słowacji. W raczej małej populacji, liczącej 5 mln osób, zarejestro-

Mutations of the first group are shared by different populations and have most likely been introduced into Slovakia by the founder populations that spread throughout Europe [10, 12]. The second group consists of 7 mutations found in the majority of Slovak patients that most likely originated in Slovakia (G161R (44.2%), D153fs (G152fs) (14.4%), H371fs (P370fs) (11.5%), G270R (7.7%), IVS5+1G>A, S47L and E178G), namely in a small area in north-west Slovakia, from where they then spread into other regions after the breakdown of genetic isolates in the 1950s [12].

As the combined sequence and haplotype analysis shows, 7 of the 12 AKU mutations (58.3%) present in Slovakia are associated with hyper-mutated sequences in *HGD*, while worldwide it is 40/117 (34.2%). Therefore, the high genetic heterogeneity in Slovak AKU might be caused by an increased mutation rate within this gene in a small geographical region [12]. Alternatively, it may be the result of random accumulation of mutations in the region, which might be related to the Valachian colonisation during the 14th–17th centuries [12, 28]. The preservation of the most prevalent AKU variants, which either arose in Slovakia or were brought there, may be the result of a founder effect and genetic drift, due to the geographic isolation of villages in north-west Slovakia.

Possible treatment strategies

Several treatment strategies have already been suggested for AKU. There are interesting recently published preclinical studies concerning antioxidant biomolecules and their effect in preventing pigment deposits in cartilaginous tissue [29].

The most promising seems to be nitisinone, the triketone herbicide which inhibits the 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase enzyme which produces HGA [30–33]. Thus, nitisinone can decrease HGA and should therefore potentially be able to modify AKU, but as yet this is unproven. In November 2012 an international collaborative FP7 study will be started, whose main objective will be to study the efficacy and safety of this orphan designated drug in order to obtain its marketing authorisation for the treatment of patients with AKU.

This work was funded by grant VEGA 2/0027/12.

The authors declare that they have no conflict of interest.

wano 208 pacjentów [28] i stwierdzono ogółem 12 różnych mutacji *HGD* [10]. Dlatego trudno wyjaśnić zwiększoną częstość występowania AKU na Słowacji klasycznym efektem założyciela.

Na podstawie tej analizy i porównania haplotypów na Słowacji zaobserwowano dwie grupy mutacji *HGD*. Mutacje pierwszej grupy stwierdzano w różnych populacjach i prawdopodobnie zostały one wprowadzone na Słowację przez populacje założycielskie, które migrowały po Europie [10, 12]. Druga grupa składa się z 7 mutacji stwierdzanych w większości u pacjentów słowackich i z dużym prawdopodobieństwem pochodzą one ze Słowacji (G161R (44,2%), D153fs (G152fs) (14,4%), H371fs (P370fs) (11,5%), G270R (7,7%), IVS5+1G>A, S47L oraz E178G), a konkretnie z niewielkiego obszaru północno-zachodniej Słowacji, skąd rozprzestrzeniły się na inne regiony po przetamaniu genetycznej izolacji w latach 50. XX wieku [12].

Złożona analiza sekwencji i haplotypu pokazuje, że 7 z 12 mutacji (58,3%) obecnych na Słowacji jest związanych z hipermutowanymi sekwencjami w *HGD*, natomiast na całym świecie jest to 40/117 (34,2%). Dlatego wysoka genetyczna heterogenność AKU w Słowaków może być spowodowana zwiększonym współczynnikiem mutacji w genie *HGD* w małym regionie geograficznym [12]. Alternatywnie może być wynikiem losowej akumulacji mutacji w regionie, który może być związany z kolonizacją Wołochów w XIV–XVII w. [12, 28]. Zachowanie najczęściej występujących wariantów AKU – zarówno pochodzących ze Słowacji, jak i przyniesionych – może być wynikiem efektu założyciela i dryftu genetycznego z powodu geograficznej izolacji wioski w północno-zachodniej Słowacji.

Możliwe strategie terapeutyczne

Dotychczas w leczeniu AKU sugerowano kilka strategii terapeutycznych. Interesujące są ostatnio opublikowane badania przedkliniczne dotyczące zastosowania biocząsteczek antyoksydantów i ich ochronnego wpływu na odkładanie barwnika w tkance chrzęstnej [29].

Najbardziej obiecujący wydaje się nitisinon, triketonowy herbicyd, który hamuje enzym dioksygenazę 4-hydroksyfenylopirogonianu, który produkuje HGA [30–33]. Nitisinon może zmniejszać stężenie HGA i dlatego potencjalnie powinien być zdolny do modyfikacji przebiegu AKU, ale efekt ten nie został jeszcze dowiedziony. Międzynarodowe badanie FP7 rozpocznie się w listopadzie 2012 r., a jego głównym celem będzie badanie skuteczności i bezpieczeństwa tego leku sierocznego, aby uzyskać zezwolenie na dopuszczenie do stosowania w leczeniu pacjentów z AKU.

Pracę sfinansowano dzięki wsparciu VEGA 2/0027/12. Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

References

Piśmiennictwo

- Garrod AE. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet* 1902; 2: 1616-1620.
- Garrod AE. Croonian lectures on inborn errors of metabolism, lecture II: alkaptonuria. *Lancet* 1908; 2: 73-79.
- La Du BN, Zannoni VG, Laster L, Seegmiller JE. The nature of the defect in tyrosine metabolism in alkaptonuria. *J Biol Chem* 1958; 230: 251-260.
- Pollak MR, Chou YH, Cerda JJ, et al. Homozygosity mapping of the gene for alkaptonuria to chromosome 3q2. *Nat Genet* 1993; 5: 201-204.
- Janocha S, Wolz W, Srsen S, et al. The human gene for alkaptonuria (AKU) maps to chromosome 3q. *Genomics* 1994; 19: 5-8.
- Fernández-Ca?ón JM, Granadino B, Beltrán-Valero de Bernabé D, et al. The molecular basis of alkaptonuria. *Nat Genet* 1996; 14: 19-24.
- Fernández-Cañón JM, Peñalva MA. Molecular characterization of a gene encoding a homogentisate dioxygenase from *Aspergillus nidulans* and identification of its human and plant homologues. *J Biol Chem* 1995; 270: 21199-21205.
- Granadino B, Beltrán-Valero de Bernabé D, Fernández-Ca?ón JM, et al. The human homogentisate 1,2-dioxygenase (HGO) gene. *Genomics* 1997; 43: 115-122.
- Laschi M, Tinti L, Braconi D, et al. Homogentisate 1,2 dioxygenase is expressed in human osteoarticular cells: Implications in alkaptonuria. *J Cell Physiol* 2012; 227: 3254-3257.
- Zatkova A, Sedlackova T, Radvansky J, et al. Identification of 11 Novel Homogentisate 1,2 Dioxygenase Variants in Alkaptonuria Patients and Establishment of a Novel LOVD-Based HGD Mutation Database. *JIMD Reports* 2012; 4: 55-65.
- Beltrán-Valero de Bernabé D, Jimenez FJ, Aquaron R, Rodríguez de Córdoba S. Analysis of alkaptonuria (AKU) mutations and polymorphisms reveals that the CCC sequence motif is a mutational hot spot in the homogentisate 1,2 dioxygenase gene (HGO). *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1316-1322.
- Zatkova A, Beltrán-Valero de Bernabé D, Polakova H, et al. High frequency of alkaptonuria in Slovakia: evidence for the appearance of multiple mutations in HGO involving different mutational hot spots. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1333-1339.
- Titus GP, Mueller HA, Burgner J, et al. Crystal structure of human homogentisate dioxygenase. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 542-546.
- Rodríguez JM, Timm DE, Titus GP, et al. Structural and functional analysis of mutations in alkaptonuria. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2341-2350.
- Grasko JM, Hooper AJ, Brown JW, et al. A novel missense HGD gene mutation, K57N, in a patient with alkaptonuria. *Clin Chim Acta* 2009; 403: 254-256.
- Vilboux T, Kayser M, Introne W, et al. Mutation spectrum of homogentisic acid oxidase (HGD) in alkaptonuria. *Hum Mutat* 2009; 30: 1611-1619.
- Khachadurian A, Feisal KA. Alkaptonuria; report of a family with seven cases appearing in four successive generations, with metabolic studies in one patient. *J Chronic Dis* 1958; 7: 455-465.
- La Du BN. Alkaptonuria. In: *The Metabolic and molecular bases of inherited disease*. Scriver CR, Beauder AL, Sly W, Valle D (eds.). McGraw Hill, New York 1958; 1371-1386.
- Milch RA. Direct inheritance of alkaptonuria. *Metabolism* 1955; 4: 513-518.
- Oexle K, Engel K, Tinschert S, et al. Three-generational alkaptonuria in a non-consanguineous family. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31 Suppl 2: S425-S430.
- Ranganath L, Taylor AM, Shenkin A, et al. Identification of alkaptonuria in the general population: a United Kingdom experience describing the challenges, possible solutions and persistent barriers. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34: 723-730.
- Milch RA. Studies of Alcaptonuria: Inheritance of 47 Cases in Eight Highly Inter-related Dominican Kindreds. *Am J Hum Genet* 1960; 12: 76-85.
- Srsen S, Varga F. Screening for alkaptonuria in the newborn in Slovakia. *Lancet* 1978; 2: 576.
- Al-Sbou M, Mwafi N. Nine cases of alkaptonuria in one family in southern Jordan. *Rheumatol Int* 2012; 32: 621-625.
- Zatkova A. An update on molecular genetics of alkaptonuria (AKU). *J Inherit Metab Dis* 2011; 34: 1127-1136.
- Beltrán-Valero de Bernabé D, Granadino B, Chiarelli I, et al. Mutation and polymorphism analysis of the human homogentisate 1, 2-dioxygenase gene in alkaptonuria patients. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 776-784.
- Goicoechea De Jorge E, Lorda I, Gallardo ME, et al. Alkaptonuria in the Dominican Republic: identification of the founder AKU mutation and further evidence of mutation hot spots in the HGO gene. *J Med Genet* 2002; 39: E40.
- Srsen S, Muller CR, Fregin A, Srsnova K. Alkaptonuria in Slovakia: thirty-two years of research on phenotype and genotype. *Mol Genet Metab* 2002; 75: 353-359.
- Tinti L, Spreafico A, Braconi D, et al. Evaluation of antioxidant drugs for the treatment of ochronotic alkaptonuria in an in vitro human cell model. *J Cell Physiol* 2010; 225: 84-91.
- Anikster Y, Nyhan WL, Gahl WA. NTBC and alkaptonuria. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 920-921.
- Phornphutkul C, Introne WJ, Perry MB, et al. Natural history of alkaptonuria. *N Engl J Med* 2002; 347: 2111-2121.
- Suwannarat P, O'Brien K, Perry MB, et al. Use of nitisinone in patients with alkaptonuria. *Metabolism* 2005; 54: 719-728.
- Suzuki Y, Oda K, Yoshikawa Y, et al. A novel therapeutic trial of homogentisic aciduria in a murine model of alkaptonuria. *J Hum Genet* 1999; 44: 79-84.