UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DA FENILALANINA HIDROXILASE EM PACIENTES COM FENILCETONÚRIA

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de Doutor em Clínica Médica, Área de concentração: Clínica Médica

Aluna: Angelina Xavier Acosta

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Zago

Ribeirão Preto

2000

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto / USP

Acosta, Angelina Xavier
Análise Molecular do Gene da Fenilalanina Hidroxilase em Pacientes com Fenilcetonúria.
Ribeirão Preto, 2000.
87 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Clínica Médica.
Orientador: Zago, Marco Antonio.

1. Fenilalanina Hidroxilase – 2. Fenilcetonúria.

“O correr da vida embrulha

tudo, a vida é assim: esquenta,

esfria, aperta e afrouxa, sossega

e depois desinquieta. O que

ela pede da gente é coragem.”

(Guimarães Rosa)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo amor incontestável e confiança irrestrita.

Aos meus irmãos, Francisco e Luiz, que mesmo estando em outra dimensão, celebram comigo esta conquista.

À minha irmã Karina, pela sua alegria de viver.

À minha tia Vera, pelo seu exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Antonio Zago, pela oportunidade e aprendizagem oferecidas nessa etapa fundamental de formação científica da minha vida.

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior, pelo auxílio técnico e científico dedicados durante a realização deste trabalho, pela amizade e compreensão.

À APAE-SP (Associação de Pais e Amigos de Excepcionais de São Paulo), em nome de Márcia Marcucci, Tânia Carvalho, Iara Fernandes, Maria Christina Lagreca, Mônica Muoio, Ana Lúcia Potenza, Beatriz Frangipani e Marcelo Gomes, pessoas sem as quais este trabalho não teria sido realizado.

Às famílias com fenilcetonúria, que gentilmente cederam material biológico para esta pesquisa, sem o qual este trabalho não teria sido viável.

Aos amigos João Farias Guerreiro, Sidney Emanuel Batista dos Santos, Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos e Eduardo José Melo dos Santos, responsáveis pela minha iniciação científica e formação essencialmente humana para a vida profissional, com imensa gratidão e admiração a essas pessoas.

Ao setor de Hematologia do HCFMRP (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto), em especial à Marli e Amélia, pela paciência, atenção e competência na minha iniciação nas técnicas de biologia molecular, além do carinho e amizade constantes. À Júlia pela assessoria técnica também oferecida.

À Fundação Hemocentro, pelo suporte laboratorial, financeiro e de aprendizagem oferecidos, essenciais para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Hemocentro, especialmente Maria Cristina Costa, Dalvinha, Angélica Watanabe, Kiyoko, Giziani, Marlize, Adriana Marques, Fabiana Mattioli, Taísa, Simone Kashima, Hamilton, pela amizade, carinho, auxílios técnicos e científicos na realização deste trabalho.

À Sandra Navarro Bresciani, pela presteza com que auxiliou na execução de figuras, imagens, artes em geral e edição da tese.

Ao Centro de Biologia Molecular "Severo Ochoa" (CBMSO) da Universidad Autónoma de Madrid, em nome da Dra. Magdalena Ugarte, Lourdes Desviat, Belén Pérez, Alejandra Gámez e Ascen, que permitiram e auxiliaram, com muita presteza, gentileza e simpatia, a realização de estágio para desenvolvimento de atividades relacionadas a este trabalho.

Ao Dr. João Monteiro de Pina Neto, a minha imensa gratidão pelo aprendizado oferecido na minha formação de médica geneticista, pelo seu exemplo de sabedoria, humildade e amizade.

Ao amigo Victor Ferraz, que tanto me auxiliou e estimulou na minha formação de médica geneticista, companheiro de muitas jornadas e incentivador constante.

Aos amigos do Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia, em especial Juliana, pelo incentivo e colaboração na realização deste trabalho.

Ao Pedro Paes, pela participação constante em minha vida, exemplo de determinação, força e perseverança.

Às amigas Maria Verônica Muñoz Rojas, Telma Ribeiro Noce, Marta Regina Clivati, Ana Paula Ferreira, Greice Molfetta, Maria Aparecida de Almeida Salles, pela amizade, estímulo e carinho sempre dispensados.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico (SAME) do HCFMRP, pela colaboração com a pesquisa dos prontuários médicos.

À Profa. Dra. Carolina e Dra. Marlene, responsáveis pelo ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo do HCFMRP, que gentilmente permitiram o espaço físico desse ambulatório para a realização das entrevistas com os pacientes.

À FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa e Extensão do Estado de São Paulo), pelo suporte financeiro recebido.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

1 INTRODUÇÂO 1

1.1 Histórico: Descoberta da PKU 1

1.2 Fenilalanina hidroxilase em humanos 1

1.3 Aspectos clínicos da fenilcetonúria 3

1.4 Caracterização do gene da fenilalanina hidroxilase 6

1.5 Genética molecular da deficiência de PAH na PKU 7

1.5.1 Haplótipos polimórficos no *locus* da PAH humano 7

1.5.2 Distribuição dos haplótipos de PKU em populações humanas 9

1.5.3 Métodos de detecção de mutação 10

1.5.4 Mutações no gene da PAH humano 11

1.5.5 Classificação das hiperfenilalaninemias e correlação genótipo-fenótipo 12

1.6 OBJETIVOS 15

2 CASUÍSTICA E MÉTODOS 17

2.1 Caracterização da amostra 17

2.2 Análise laboratorial da amostra 19

2.2.1 Análise de DGGE 22

2.2.2 Análise de SSCP 28

2.2.3 Análise de seqüenciamento 30

2.2.4 Análise de haplótipo RFLP/VNTR 31

2.2.5 Análise de RFLP e análise populacional 31

2.3 Correlação genótipo-fenótipo 32

3 RESULTADOS 33
3.1 Análise de mutações 33
3.2 Genótipos 40
3.3 Associação entre mutações e polimorfismos intragênicos 43
3.4 Correlação genótipo-fenótipo 47
4 DISCUSSÃO 53
4.1 Análise de mutações 53
4.2 Genótipos 58
4.3 Associação entre mutações e polimorfismos intragênicos 59
4.4 Correlação genótipo-fenótipo 63
5 CONCLUSÕES 65
6 ANEXOS 68
6.1 PROTOCOLO DE ENTREVISTA 68
6.2 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – PARECER 69
6.3 ARTIGOS 70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71
SUMMARY

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Sistema de hidroxilação da fenilalanina em humanos, incluindo as vias sintéticas e regenerativas do cofator pterina. GTP, guanosina trifosfato; GTP-CH, GTP-cicloidrolase I; DHNP, D-eritro-diidroneopterina trifosfato; 6-PTS, 6-piruvoil-tetraidropterina sintetase; 6-PT, 6-pirovoil-tetraidropterina; qBH_2, quinonoide diidrobiopterina; qBH_4, L-eritro-tetraidrobiopterina.	pág. 2
Figura 2:	Estrutura do gene da PAH. As posições dos 8 sítios de ação de enzimas de restrição são mostradas relacionadas aos 13 exons do gene da PAH.	pág. 6
Figura 3:	Etapas para a caracterização das mutações no gene da PAH. As setas indicam presença de mutações pontuais em heterozigose.	pág. 21
Figura 4:	Esquema da eletroferese em gel com gradiente desnaturante utilizado na técnica de DGGE, juntamente com a representação do comportamento do DNA mutante e normal migrando nesse gel.	pág. 25
Figura 5:	Análise dos diferentes padrões de bandas correspondentes aos homoduplex e heteroduplex produzidos no DGGE, que indicam a identificação das mutações.	pág. 26
Figura 6:	Resultado de uma análise de simulação computacional para um determinado exon do gene da PAH, mostrando no gráfico, as curvas de *melting* da seqüência analisada antes e após a adição do clamp de GC; e as condições de migração ideais para o DGGE, também estão exibidas.	pág. 27
Figura 7:	Gel de DGGE fotografado após coloração em uma solução de brometo de etídio, contendo amostras de pacientes com PKU que apresentam padrões de bandas anômalas, que indicam a presença de mutações distintas.	pág. 28

Figura 8:	Figura 8: Gel de SSCP (coloração com nitrato de prata) mostrando, na seta, uma amostra com mobilidade eletroforética diferente das demais, indicando a presença de mutação.	pág. 29
Figura 9	Exemplos de seqüenciamentos realizados após triagem mutacional realizada pelo DGGE e/ou SSCP, mostrando duas mutações novas em heterozigose: a) F240S (exon 7); b) IVS11nt17g→a (intron 11).	pág. 34
Figura 10:	Exemplo de um gel de *Broad-range* DGGE, mostrando os padrões de bandas para os exons 4, 5, 9, 10 e 13 do gene da PAH, analisando 3 amostras distintas de pacientes com PKU. Neste caso, os pacientes não apresentam nenhuma mutação nesses exons estudados.	pág. 39
Figura 11:	Mapa das mutações caracterizadas no gene da PAH (adaptado do PAHdb – http://www.mcgill.ca/pahdb).	pág. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela I:	Composição da amostra.	pág. 17
Tabela II:	Procedência dos pacientes com PKU do presente estudo.	pág. 18
Tabela III:	Métodos de detecção de mutações utilizados no presente estudo.	pág. 22
Tabela IV:	Seqüências dos primers e condições da PCR para DGGE.	pág. 29
Tabela V:	Seqüências dos primers e condições da PCR para SSCP e seqüenciamento.	pág. 30
Tabela VI:	Freqüência das mutações causadoras de doença encontradas em 230 cromossomos: 38 mutações diferentes.	pág. 35
Tabela VII:	Mutações não patogênicas detectadas no presente estudo.	pág. 36
Tabela VIII:	Mutações prevalentes (acima de 4%) detectadas no presente trabalho.	pág. 36
Tabela IX:	Mutações novas encontradas no atual trabalho.	pág. 36
Tabela X:	Estudo populacional das mutações K274E, L321L, IVS11nt17g→a e N426N.	pág. 37
Tabela XI:	Perfil de definição dos cromossomos analisados, segundo método de estudo.	pág. 40
Tabela XII:	Freqüência dos genótipos nas 115 famílias estudadas.	pág. 41

Tabela XIII: Genótipos encontrados nos pacientes brasileiros com PKU. pág. 42

Tabela XIV: Mutações PKU associadas com polimorfismos intragênicos. pág. 44

Tabela XV: Haplótipos associados a diferentes mutações. pág. 45

Tabela XVI: Haplótipos mais freqüentes. pág. 46

Tabela XVII: Haplótipos das mutações novas. pág. 46

Tabela XVIII: Associações raras de mutações e haplótipos. pág. 46

Tabela XIX: Correlação genótipo-fenótipo observada em pacientes homozigotos para PKU. pág. 48

Tabela XX: Correlação genótipo-fenótipo observada em pacientes heterozigotos compostos para PKU. pág. 49

Tabela XXI: Classificação fenotípica PKU/HPA de 38 mutações no gene da PAH observadas no presente estudo. pág. 52

LISTA DE ABREVIATURAS

6-PTS	- 6- pirovoil-tetraidropterina sintetase
APAE-SP	- Associação de Pais e Amigos de Excepcionais de São Paulo
ARP	- Atividade Residual Prevista
BH4	- Cofator tetraidrobiopterina
BSA	- *Bovine serum albumine* (albumina sérica bovina)
cDNA	- DNA complementar
DGGE	- *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*
DHPR	- Diidropteridina redutase
DM	- Deficiência Mental
DNTP	- Desoxinucleotídeos trifosfato
EIM	- Erros Inatos do Metabolismo
GTP-CH	- Guanosina trifosfato cicloidrolase
HCFMRP-USP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HPA	- Hiperfenilalaninemia
Kb	- Quilo base
PAH	- Fenilalanina Hidroxilase
pb	- Pares de bases
PCR	- *Polymerase Chain Reaction*
PKU	- Fenilcetonúria
RFLP	- *Restriction Fragment Length Polymorphism*
SSCP	- *Single-Strand Conformation Polymorphism*
VNTR	- *Variable Number Tandem Repeats*

RESUMO

No presente estudo, foram analisadas 115 famílias com fenilcetonúria (PKU) predominantemente da região sudeste do Brasil, utilizando três métodos laboratoriais (DGGE, SSCP e seqüenciamento). Foram investigados todos os 13 exons do gene da fenilalanina hidroxilase (PAH), incluindo os sítios de *splicing* e região promotora. Foram identificadas 50 mutações distintas, caracterizando 91% dos alelos mutantes. Das 50 mutações identificadas, cinco foram mais prevalentes (50% dos alelos com PKU), sendo a mais comum a IVS10nt-11g→a (17,4%), seguida da R261Q (12,2%), V388M (9,1%), R252W (6,5%) e R270K (4,8%). As mutações restantes são raras. O espectro mutacional inclui dez mutações novas, IVS5nt-54a→g, IVS6nt17g→t, E205A, F240S, K274E, I318T, L321L, C357G, IVS11nt17g→a e S411X. Com a finalidade de caracterizar a origem e a distribuição dos alelos da PAH, também investigamos as associações das mutações detectadas com os haplótipos PCR/RFLP e alelos de VNTR localizados no gene da PAH. Para os pacientes cujos alelos mutantes foram detectados, realizou-se associação com os níveis de fenilalanina pré-tratamento, estabelecendo uma correlação genótipo-fenótipo. Os resultados apresentados no presente trabalho confirmam a heterogeneidade acentuada no *locus* da PAH e contribuem para o conhecimento da distribuição e freqüência das mutações de PKU na nossa população.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico: Descoberta da PKU:

A PKU clássica foi reconhecida pela primeira vez como uma doença metabólica distinta causando deficiência mental (DM) grave e irreversível, em 1934, por Asbjörn Fölling. Este pesquisador publicou dois artigos nos quais propôs a existência de uma alteração no metabolismo da fenilalanina transmitida por herança autossômica recessiva, que denominou de "imbecillitas phenylpyrouvica" (Fölling, 1934a,b). Penrose, em 1935, confirmou essa doença metabólica como sendo realmente herdada como uma característica autossômica recessiva, e o termo fenilcetonúria foi subseqüentemente introduzido para descrever essa anormalidade (Penrose & Quastel, 1937).

A deficiência bioquímica responsável pela fenilcetonúria clássica somente foi identificada em 1947, por George Jevis, mostrando que a administração de fenilalanina causava rápida elevação nos níveis séricos de tirosina em indivíduos normais, mas em indivíduos com PKU isso não era observado. Subseqüentemente, outros estudos (Udenfriend & Cooper, 1952; Jervis, 1953) forneceram a primeira evidência direta que a PKU era causada por uma deficiência grave no sistema enzimático hepático que convertia fenilalanina em tirosina.

1.2 Fenilalanina hidroxilase em humanos:

A hidroxilação da fenilalanina em humanos é uma reação complexa envolvendo pelo menos seis diferentes enzimas e seus cofatores, podendo ser

observada esquematicamente na Figura 1. A reação central, a oxidação da L-fenilalanina (aminoácido essencial) para L-tirosina (aminoácido não essencial), é catalisada pela fenilalanina hidroxilase (fenilalanina 4-monooxigenase; PAH; EC 1.14.16.1), sendo o passo limitante na degradação oxidativa da fenilalanina. Esta é a via principal de catabolização da fenilalanina dietética, responsável por cerca de 75% da eliminação desse aminoácido.

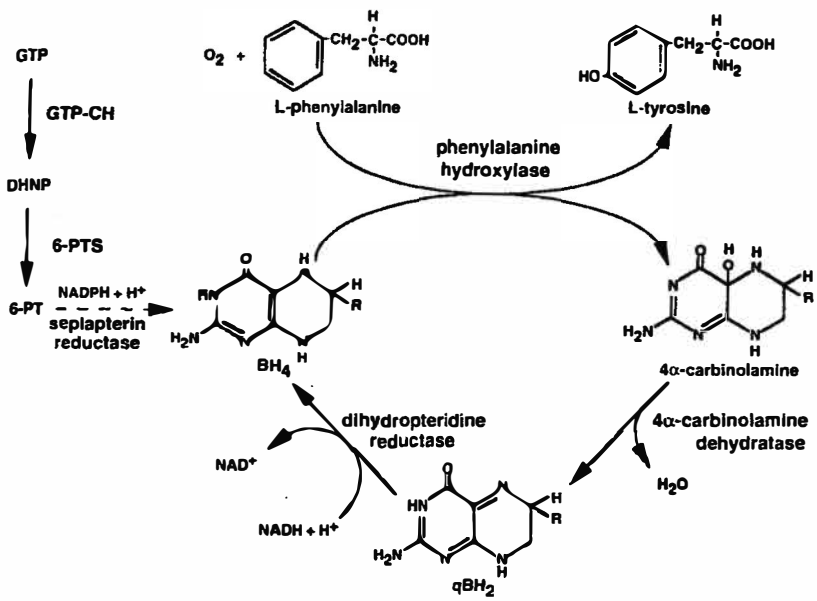


Figura 1: *Sistema de hidroxilação da fenilalanina em humanos, incluindo as vias sintéticas e regenerativas do cofator pterina. GTP, guanosina trifosfato; GTP-CH, GTP-cicloidrolase I; DHNP, D-eritro-diidroneopterina trifosfato; 6-PTS, 6-piruvoil-tetraidropterina sintetase; 6-PT, 6-pirovoil-tetraidropterina; qBH_2, quinonoide diidrobiopterina; qBH_4, L-eritro-tetraidrobiopterina.*

Apesar de estudos referirem a presença da PAH em tecidos humanos não hepáticos, uma expressão significativa só ocorre no fígado (Crawfurd et al., 1981).

A presença da PAH, 0_2, L-fenilalanina e do cofator tetraidrobiopterina (BH4) são requisitos básicos para que ocorra a reação de hidroxilação. Para a regeneração

do cofator BH4, são necessários diidropteridina redutase (DHPR), nucleotídeo piridina reduzido, 4α-carbinolamina desidratase. Na síntese de BH_4 participam a GTP-CH (guanosina trifosfato cicloidrolase) e 6-PTS (6- pirovoil-tetraidropterina sintetase).

As hiperfenilalaninemias são distúrbios da hidroxilação da fenilalanina, sendo 99% decorrentes de defeitos na PAH e 1% relacionados à deficiência na biossíntese (deficiência de GTP-CH ou 6-PTS) ou na regeneração do cofator BH_4 (atividade deficiente de DHPR ou 4α-carbinolamina desidratase).

1.3 Aspectos clínicos da fenilcetonúria:

A fenilcetonúria clássica (PKU; MIM# 261600) é o mais comum dos erros inatos do metabolismo (EIM) dos aminoácidos, com herança autossômica recessiva, resultante de mutação no gene da fenilalanina hidroxilase (PAH; MIM# 251580). A alteração no gene da PAH leva à deficiência de seu produto, promovendo, com isso, o aumento dos níveis séricos de fenilalanina e de seus metabólitos secundários, além do ácido fenilpirúvico na urina (Scriver et al., 1995). A hiperfenilalaninemia é definida como um valor plasmático de fenilalanina acima de 120μM (2mg/dl). A hiperfenilalaninemia prejudica os processos celulares cerebrais essenciais, principalmente mielinização, síntese de proteínas e as conseqüências da deficiência de suplemento de neurotransmissores. A PKU foi o primeiro EIM descrito com comprometimento do sistema nervoso central e a primeira forma de deficiência mental (DM) relacionada com um defeito enzimático específico.

O recém-nascido com PKU geralmente apresenta-se normal durante os primeiros meses de vida. Porém, por volta dos 6 meses de idade, retardo do desenvolvimento neuropsicomotor é freqüentemente observado. Os pacientes não tratados desenvolvem DM grave, microcefalia, epilepsia, irritabilidade, hipertonia, pecularíedades na marcha, eczema e tendem a ser menos pigmentados. A deficiência mental pode ser prevenida pelo uso de uma dieta pobre em fenilalanina, a partir de proteínas hidrolisadas modificadas ou aminoácidos livres suplementados com vitaminas adicionais e nutrientes, instituída a partir de poucas semanas de vida e mantida até a idade escolar. Há algumas evidências do benefício de sua manutenção por toda a vida, uma vez que com a interrupção da dieta ocorre declínio nas funções neuropsicológicas. A terapia gênica somática utilizando gene recombinante funcional ainda se encontra em fase experimental, existindo modelo animal para teste de diferentes vetores e estratégias para transferência gênica.

A possibilidade de tratamento para PKU, evitando a manifestação da doença, desde que instituída precocemente, levou ao estabelecimento de programas de *screening* neonatal em muitos países, sendo os primeiros iniciados na Califórnia, na cidade Center Wall no ano de 1957, e em seguida por britânicos baseados no teste do cloreto férrico que detecta fenilpiruvato urinário. O teste semiquantitativo para medir fenilalanina sérica desenvolvido por Guthrie & Susi (1963) aperfeiçoou o método, sendo a hiperfenilalaninemia (HPA) detectada através de sangue do calcanhar ("teste do pezinho") (Scriver et al., 1989). A triagem neonatal é o melhor método de detecção precoce de PKU.

O programa de triagem neonatal para PKU no Brasil teve início na cidade de São Paulo a partir de junho de 1976, numa instituição assistencial para deficientes

mentais (APAE/SP – Associação de Pais e Amigos de Excepcionais). Desde então outros programas têm sido implementados em outros estados do Brasil. A APAE/SP realiza aproximadamente 40.000 exames por mês, detectando PKU clássica na freqüência de 1/10.900 recém-nascidos (Pérez et al., 1994a). O valor da fenilalanina a partir do qual se considera alterado (valor de corte) é de 4mg/dl. Esses programas realizam o diagnóstico bioquímico convencional de PKU, não havendo em nosso país estudo de caracterização molecular para deficiências da PAH utilizando uma abordagem ampla de investigação.

A freqüência de PKU varia amplamente entre as populações - de 1/4500 na Irlanda, 1/16000 na Suíça (DiLella et al., 1986), a 1/50000 nos negros dos EUA (Hofman et al., 1991). Sua incidência é estimada em 1/10.000 em caucasóides (Bickel et al., 1981).

Os defeitos na DHPR, GTP-CH, 6-PTS e 4α-carbinolamina desidratase, que correspondem a 1-2% das HPAs, exigem diagnóstico diferencial com avaliação cuidadosa do metabolismo da biopterina após detecção de uma elevação dos níveis séricos de fenilalanina.

Uma outra forma de HPA relaciona-se com a ocorrência de uma síndrome conhecida com PKU materna (Lenke & Levy, 1980), caracterizada por deficiência mental, microcefalia, déficit de crescimento e malformações, particularmente cardíaca, em filhos de mães afetadas por PKU que não realizam uma terapia adequada durante a gravidez. O controle rigoroso dos níveis de fenilalanina durante a gravidez permite desenvolvimento normal do feto.

1.4 Caracterização do gene da fenilalanina hidroxilase:

A PAH humana é codificada por um gene de cópia única, que foi clonado e está mapeado no cromossomo 12, região 12q22-q24.1 (Lidsky et al., 1985), sendo altamente polimórfico (Woo, 1989). O gene possui uma extensão de 125 kb, contendo 13 exons, os quais ocupam uma seqüência de DNA de 90 kb. O RNA mensageiro maduro possui um tamanho de aproximadamente 2.4 kb. A maioria dos exons ocorre na metade 3' do gene. Os exons 6-13 estão agrupados num fragmento de 20 kb do gene, enquanto que os exons 1-5 são separados por introns grandes, cujo tamanho varia de 3 a 23 kb (DiLella et al., 1986). A estrutura do gene da PAH está esquematicamente demonstrada na Figura 2.

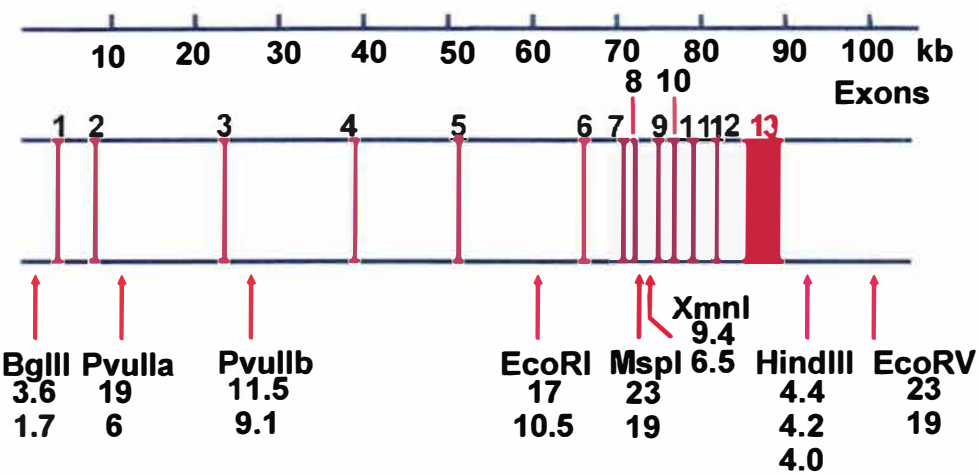


Figura 2: *Estrutura do gene da PAH. As posições dos 8 sítios de ação de enzimas de restrição são mostradas relacionadas aos 13 exons do gene da PAH.*

1.5 Genética molecular da deficiência de PAH na PKU:

1.5.1 Haplótipos polimórficos no *locus* da PAH humana:

A partir da clonagem do DNA complementar (cDNA) do gene da PAH humana, foi possível o estudo direto da estrutura do seu *locus*. Esses estudos promovem a identificação de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) dentro ou próximo do gene (Woo et al., 1983; Lidsky et al., 1985). Esses RFLPs resultam de substituições nucleotídicas no DNA genômico, sem manifestação fenotípica e podem ser detectadas com o uso de endonucleases de restrição (*Bgl*II, *Pvu*IIa, *Pvu*IIb, *Eco*RI, *Msp*I, *Xmn*I, *Hind*III e *Eco*RV). Como os RFLPs estão ligados ao gene da PAH, eles podem ser usados para seguir a transmissão dos alelos de PAH nas família com PKU, permitindo o diagnóstico pré-natal da doença na maioria dessas famílias (Lidsky et al., 1985).

A análise por *Southern Blotting* (Southern, 1978) do DNA genômico digerido com endonucleases de restrição específicas, freqüentemente demonstra 2 alelos, refletindo a presença (+) ou ausência (-) de um sítio de restrição particular. A análise da seqüência direta tem demonstrado que pelo menos 6 dos 8 RFLPs (Lidsky et al., 1985) no gene PAH humano resultam de apenas 1 substituição nucleotídica, alterando o sítio de restrição.

O perfil da composição individual do RFLP de um determinado alelo define um haplótipo de RFLP e mais de 80 haplótipos têm sido documentados no *locus* da PAH (Scriver et al., 2000). Estudos de população têm mostrado freqüências maiores de determinados haplótipos, levando à hipótese de existir uma associação entre certos alelos e mutações específicas do *locus* da PAH humano. De uma maneira geral, mutações distintas estão associadas com haplótipos específicos de DNA,

embora mais de uma mutação possa estar associada com um haplótipo particular. Isto é especialmente verdadeiro em relação aos haplótipos mais freqüentes em populações diferentes, ou seja, mutação e alelos do gene PAH também exibem distribuição populacional específica (Konecki and Litchter-Konecki, 1991). Existe uma correlação entre haplótipo específico de RFLP com o fenótipo clínico em pacientes com PKU (Güttler et al., 1987; Lichter-Konecki et al., 1988). Muitos dos pacientes que possuem qualquer combinação com alelos mutantes da PAH do haplótipo de RFLP 2 ou 3 possuem uma forma grave da doença, enquanto que pacientes com formas mutantes do haplótipo 1 ou 4 possuem fenótipos variados.

Apesar do desenvolvimento de métodos baseados na PCR (*Polymerase Chain Reaction*; Saiki et al., 1985) para a haplotipagem do *locus* da PAH ter permitido um aumento dramático no número de haplótipos possíveis, a análise completa por PCR/RFLP dos 8 sítios polimórficos (Figura 1) não é possível. O sítio para *Eco*RV está localizado a aproximadamente 20 kb de regiões com seqüências conhecidas do gene da PAH e a determinação da informação da seqüência que flanqueia esse sítio ainda não foi descrita. O sítio para a *Eco*RI está localizado mais de 1 kb de cada final do elemento repetitivo LINE-1, e a amplificação específica dessa região ainda não foi conseguida. Apesar dos problemas técnicos, os métodos baseados na PCR facilitaram muito a aplicação clínica da análise de haplótipo.

O RFLP *Hind*III no gene PAH humano é causado pela presença de uma região de minissatélite rica em AT (70%). Esta região contém vários múltiplos de repetições em tandem (VNTR - *Variable Number Tandem Repeats*) de 30 pb e dista 3kb do extremo 3' do último exon do gene. A amplificação por PCR desta região para haplotipagem, indica os alelos 4.0 Kb *Hind*III, contendo 3 das repetições; alelo

4.4 Kb *Hind*III contendo 12 das repetições e o fragmento de 4.2 Kb *Hind*III podendo conter 6, 7, 8 ou 9 cópias da repetição. A análise de famílias com PKU demonstra segregação mendeliana desses alelos de VNTR, bem como associação desses alelos com certas mutações de PAH. O uso combinado do sistema de VNTR e sistema haplotípico de RFLP aumenta a performance do diagnóstico pré-natal. Além do mais, este VNTR pode promover estudos úteis quanto origem e distribuição das mutações de PAH em diferentes populações humanas (Goltsov et al., 1992a).

1.5.2 Distribuição dos haplótipos de PKU em populações humanas:

Em caucasóides (norte da Europa), 90% de todos os alelos mutantes (DiLella et al., 1986) estão associados com apenas 4 haplótipos (1 a 4), sendo que o haplótipo 3 é o mais freqüente e está mais associado com a mutação IVS12nt1g→a (norte) e o haplótipo 2 (leste) com a mutação R408W (Einsensmith et al., 1992). Na Itália (Dianzani et al., 1990) o haplótipo 1 é o mais freqüente, seguido do haplótipo 6 (associado com IVS10nt-11g→a). Em Portugal (Caillaud et al., 1992) o haplótipo 1 é o mais freqüente. De uma maneira geral, o haplótipo 2 diminui sua freqüência do leste da Europa em direção ao oeste; o 2 e o 3 diminuem em direção ao sul, com aumento de outros, principalmente do 6 na Itália e Turquia. Na Espanha (Desviat et al., 1993) os haplótipos 1, 6 e 9 correspondem a 66% do total de alelos mutantes, sendo a mutação IVS10-11g→a a mais comum. Em negros americanos (Hofman et al., 1991) o haplótipo 36 sobressai. No Oriente médio (Okano et al., 1994), para os polinésicos e asiáticos, o haplótipo 4 corresponde a 74-80% do total de mutantes,

sendo que em japoneses a mutação R413P é a mais freqüente e não foram detectados os haplótipos 2 e 3.

Essas diversas associações entre mutações e haplótipos podem ser explicadas por mutação, recombinação, conversão gênica e outros processos de transferência de mutações de um cromossomo para outros haplótipos, sabendo que as mutações novas irão ocorrer em haplótipos já existentes (Eisensmith & Woo, 1995).

A origem e a distribuição dos alelos mutantes de PAH em populações humanas sofrem influências de diversos mecanismos de seleção, como efeito fundador, deriva genética, vantagem do heterozigoto, não sendo conhecida exatamente a contribuição de cada um desses fatores.

1.5.3 Métodos de detecção de mutação:

Um método rápido e viável para a detecção de uma única alteração de base em fragmentos de DNA é o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Em combinação com o PCR, o DGGE tem se tornado um dos métodos mais amplamente aplicados na detecção de mutações de ponto de genes humanos. As mutações são localizadas em regiões limitadas do gene por DGGE e subseqüentemente identificadas por análise de seqüenciamento.

Em 1994, Guldberg & Güttler realizaram uma modificação no método convencional do DGGE, chamada "*Broad-range*" DGGE, a qual permite a análise simultânea dos fragmentos de DNA amplificados por PCR, num gradiente desnaturante único e amplo (0 a 80%) para todos os exons.

Um método alternativo de detecção de mutações pontuais é o SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*). Esta técnica baseia-se no fato de que fitas simples de DNA possuem uma estrutura secundária com seqüência específica. Pequenas diferenças nessa seqüência, como uma mudança de uma única base, podem afetar a estrutura secundária, podendo ser detectadas por eletroforese em um gel não desnaturante (Labrune et al., 1991).

Na minoria (10 a 15%) dos pacientes com PKU as mutações não podem ser identificadas pelos métodos presentes de análise. As razões possíveis para isso decorrem de erros no seqüenciamento, a presença de mutações em regiões de difícil análise, como a região promotora, *cap site*, sítio de poliadenilação, e em sítios crípticos de *splicing* escondidos em regiões intrônicas.

1.5.4 Mutações no gene da PAH humana:

A PKU é um distúrbio altamente heterogêneo, havendo mais de 400 mutações identificadas no gene da PAH, embora apenas um número limitado dessas mutações esteja presente em determinada população, incluindo mutações tipo *missense*, deleções, *splicing*, silenciosas, *nonsense* e inserção (Nowacki et al., 1998; Scriver et al., 2000).

A estatística de mutações contida no banco de dados da PAH (http://www.mcgill.ca/pahdb) mostra que a maioria das mutações descritas está localizada no exon 7 do gene da PAH, porém a mutação R408W, localizada no exon 12, é a mais freqüentemente identificada das mutações em diversos estudos realizados em diferentes populações, seguida da IVS10nt-11g→a, I65T e R261Q,

sendo as demais mutações menos freqüentes. Os países com maior número de mutações descritas são a Inglaterra, Espanha, Canadá, EUA, Itália, Noruega, Bélgica e Alemanha (Scriver et al., 2000).

A elevada freqüência relativa de mutações associadas à PKU no exon 7 do gene da PAH não significa que esta região do gene seja hipermutável. Os cálculos de freqüência de mutação relacionados ao tamanho do exon e à sua composição não dão apoio à hipótese de que esse exon seja um *hot spot* para mutações associadas à PKU (Dworniczak et al., 1992). Na realidade, esse exon confere uma função essencial para a hidroxilação da fenilalanina, e qualquer mudança no domínio codificado pelo exon 7 altera a função e manifesta-se clinicamente como hiperfenilalaninemia.

1.5.5- Classificação das hiperfenilalaninemias e correlação genótipo-fenótipo:

As mutações identificadas na deficiência da PAH geralmente resultam em deficiência enzimática grave, produzindo o fenótipo de PKU. Porém, algumas mutações causam uma perda menos importante da atividade enzimática, sendo associada com um fenótipo "hiperfenilalaninemia não-fenilcetonúria" ("HPA não-PKU"). Há ainda alelos silenciosos (Hoang et al., 1996).

A HPA é altamente variável, indo de uma elevação moderada de fenilalanina no plasma sem conseqüências clínicas, até a manifestação da doença, ou seja, PKU clássica. Está claro que não há uma alteração única no DNA do gene da PAH responsável por este grupo de doenças metabólicas. Várias mutações no gene da PAH já foram estudadas em análise de expressão *in vitro* (Scriver et al.,

2000), que demonstram de fato que a alteração genética observada altera a função da proteína.

A realização de estudo de expressão confirma se a mutação realmente interfere na atividade enzimática da PAH, prediz a gravidade do fenótipo metabólico correspondente, e identifica a participação dos resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise, função e regulação da atividade enzimática. Apesar de o genótipo ser fundamental na determinação do fenótipo, estudos de correlação genótipo-fenótipo têm revelado que os genótipos de PAH não explicam suficientemente o fenótipo mutante em todos os casos, implicando que outros fatores estejam envolvidos na propriedade da homeostase plasmática.

Análise de expressão em sistemas *in vitro* revelou pelo menos 3 grupos de mutações que diferem no comportamento da cinética e/ou estabilidade *in vivo*: a) mutações afetando ambas as propriedades; b) mutações afetando a propriedade cinética; c) mutações reduzindo a estabilidade *in vitro* e *in vivo*.

O valor da atividade residual da PAH, medido em estudos de expressão *in vitro,* das mutações de PKU, é utilizado na predição do fenótipo da doença (Okano et al., 1991). Existe uma correlação significativa entre atividade residual prevista da PAH e níveis de fenilalanina sérica pré-tratamento, bem como com a tolerância à fenilalanina, havendo uma correspondência dessa correlação com as classificações fenotípicas de PKU. Essa correlação tende a ser mais forte quando um número suficientemente grande de pacientes de diferentes fenótipos for examinado.

As mutações no gene da PAH levam a uma variedade de fenótipos clínicos e bioquímicos com diferentes graus de gravidade dependendo dos diferentes resíduos de PAH com atividade variada. Além disso, muitas das variações da forma

clássica da PKU são devidas à heterogeneidade dos alelos mutantes, havendo mais pacientes heterozigotos compostos do que homozigotos para um alelo mutante particular (Avigad et al., 1991). Nesses indivíduos, a mutação moderada se expressa apenas quando interage com mutações graves. Esse dado é importante na distinção entre PKU e HPA não-PKU no diagnóstico pré-natal e pós-natal precoce, pois essas duas condições não são diferenciadas corretamente baseando-se apenas no nível sérico de fenilalanina.

Para fins de diagnóstico e tratamento, as formas de PKU são divididas em quatro categorias arbitrárias, denominadas de PKU clássica, PKU moderada, PKU leve e HPA benigna. A PKU clássica é determinada por uma deficiência grave da atividade da PAH, resultando em DM profunda e irreversível, a menos que a exposição à ingestão de fenilalanina seja reduzida drasticamente. Os pacientes que apresentam a PKU clássica toleram uma ingestão de 250-350mg/d de fenilalanina; para a PKU moderada a tolerância é de 350-400mg/d; 400-600mg/d é a tolerância da PKU leve, e para a HPA, a dieta não é necessária para prevenir sintomas neurológicos (Scriver et al., 1995). Os valores de fenilalanina ao diagnóstico são utilizados para a predição da forma clínica de PKU (Guldberg et al., 1998): a forma clássica resulta de um valor de fenilalanina pré-tratamento >20mg/dl ou >1200μM; a moderada correlaciona-se a um valor de 15-20mg/dl ou 900-1200μM de fenilalanina ao diagnóstico; a forma leve geralmente apresenta valores de fenilanina ao diagnóstico <15mg/dl ou <900μM, e a forma de HPA benigna possui níveis de fenilalanina pré-tratamento de 4-15mg/dl ou 250-800μM. Guldberg et al. (1998) propuseram e testaram um modelo simples de correlação genótipo-fenótipo, no qual cada mutação recebe um valor arbitrário (VA: 1 = mutações para PKU clássica; 2 =

mutações para PKU moderada; 4 = mutações para PKU leve; e 8 = mutações para HPA benigna), cujo fenótipo resulta da combinação dos dois alelos mutantes da PAH, expressado numericamente pela soma dos VAs das duas mutações.

Em nosso país, não há referência de estudos de caracterização molecular da PKU utilizando a metodologia de DGGE, existindo o diagnóstico convencional de PKU e de deficiências de PAH relacionadas. Sabe-se que este é um diagnóstico diferencial indireto necessitando exclusão de outras causas possíveis de HPA. Além disso, a determinação da gravidade da doença por testes de fenilalanina não podem ser aplicados antes de a criança completar 6 meses de idade, e estudos de tolerância dietética não podem revelar o fenótipo metabólico antes de a criança ter 5 anos.

Pela metodologia molecular, esses problemas podem ser resolvidos, tornando-se viável o diagnóstico precoce e a definição do genótipo para correlação fenotípica. Com isso, um regime dietético correto pode ser calculado e implementado nas primeiras semanas de vida no sentido de prevenir o dano intelectual, e a manutenção persistente dos níveis séricos de fenilalanina com a terapia, deve ser atingida através de controle freqüente dos seus níveis em resposta ao grau de restrição da fenilalanina.

1.6 OBJETIVOS

Objetivou-se neste estudo definir as bases moleculares responsáveis pela PKU em pacientes com essa doença atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto/SP e na APAE/SP, procedentes, em sua maioria, da região sudeste do país, a

partir da identificação e definição das mutações apresentadas pelos pacientes. Para tanto, utilizamos dois métodos laboratoriais de triagem mutacional, o DGGE e o SSCP, seguidos do seqüenciamento. Com essa metodologia investigou-se todos os 13 exons do gene da PAH, incluindo os sítios de *splicing* e região promotora. A definição dos haplótipos dos pacientes com PKU também foi realizada a partir da análise dos polimorfismos intrônicos do *locus* da PAH. Para os pacientes completamente genotipados, realizou-se a correlação com o fenótipo a partir dos valores de fenilalanina ao diagnóstico.

Com essa caracterização, objetivou-se também, demonstrar a distribuição das mutações do gene da PAH na população da região Sudeste do país, contribuindo para a compreensão da composição molecular da PKU em pacientes dessa região brasileira.

Após essa caracterização, tornar-se-á viável a realização de diagnóstico pré-natal para famílias com afetados e diagnóstico de portador (heterozigoto), com vistas ao aconselhamento genético familiar, além de oferecer a genotipagem para correlação com a gravidade clínica permitindo a instituição de melhor terapêutica.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS:

2.1 Caracterização da amostra:

A amostra estudada é composta de 115 famílias com PKU (total de 292 indivíduos) provenientes da APAE/SP (Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais de São Paulo) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), conforme indicado na Tabela I. Para a definição da composição molecular relacionada à doença, realizou-se a caracterização molecular do afetado (126 pacientes), e de outros membros da família (166 parentes, sendo a maioria representada pelos pais dos pacientes), totalizando 292 indivíduos estudados. Para efeitos de análise, foi considerado apenas um paciente nas famílias com vários membros afetados, totalizando 115 pacientes. Dentre estes, 20 pacientes pertencem a famílias consangüíneas.

Tabela I: Composição da amostra:

Amostra	APAE	HCFMRP-USP	Total
Pacientes e Famílias	106 (98)	20 (17)	126 (115)
Parentes	141	25	166
Total de indivíduos	247	45	**292**

**11 irmãos afetados*
O número de famílias está em parênteses

Para cada família foi preenchido uma ficha protocolada (Anexos), onde consta a identificação completa, inclusive ascendência, de cada membro da família submetido ao estudo, registro do número de afetados nas famílias, consangüinidade

parental, data e forma de diagnóstico, valor da fenilalanina ao diagnóstico, manifestação clínica da doença e tratamento.

A maioria dos pacientes (84,4%) foi proveniente da região Sudeste do país, sendo o estado de São Paulo o mais representado, seguido da região Sul (9,6%), Nordeste (4,3%) e Centro-Oeste (1,7%), não havendo representantes da região Norte (Tabela II).

Tabela II: Procedência dos pacientes com PKU do presente estudo.

Região (n)	Estados (n)	Freqüência (%)
Sudeste (97)	SP (85)	84,4
	MG (11)	
	RJ (1)	
Sul (11)	RS (2)	9,6
	PR (8)	
	SC (1)	
Nordeste (5)	SE (1)	4,3
	PE (2)	
	AL (1)	
	BA(1)	
Centro-Oeste (2)	MS (2)	1,7

Os pacientes foram considerados afetados para PKU ou HPA quando os níveis séricos de fenilalanina estavam acima de 4mg/dl. Alguns pacientes foram diagnosticados tardiamente, devido à ausência de programa de detecção massiva de PKU à época do seu nascimento. Desse modo, 69,6% dos pacientes (80 famílias) apresentou diagnóstico precoce, e 30,4% (35 pacientes) tardiamente. A maior parte dos pacientes recebe tratamento, sendo a maioria (59,1%) assintomática (68 pacientes), 13,1% (15 pacientes) apresenta DM leve, 11,3% (13 pacientes) com DM

grave, 8,7% (10 pacientes) com DM moderada e 7,8% (9 pacientes) com variação normal da inteligência (indivíduos *borderline*).

A distribuição da amostra em relação ao sexo foi eqüitativa, sendo 58 pacientes (50,4%) do sexo feminino e 57 (49,6%) do sexo masculino. Em relação à cor da pele 92,2% (106 pacientes) são brancos, e o restante, 7,8% (9 pacientes) são pardos.

Para a classificação das formas de hiperfenilalaninemia foram utilizados os valores de fenilalanina ao diagnóstico. A forma clássica foi a preponderante, representada por 64 pacientes (55,7%), seguida da moderada com 32 pacientes (27,8%), 15 com a forma leve (13,0%) e 4 casos (3,5%) de formas de hiperfenilalaninemia benigna.

2.2 Análise laboratorial da amostra:

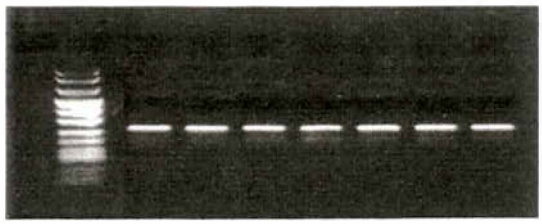
De cada indivíduo foi coletado 5 a 10 ml de sangue venoso em tubo de Vacutainer contendo anticoagulante EDTA. As amostras de sangue coletadas dos pacientes com PKU foram processadas no Laboratório de Biologia Molecular da Hematologia do HCFMRP-USP e no Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

O DNA de cada paciente foi isolado dos leucócitos através de procedimentos convencionais (Kunkel et al., 1977) e analisado para mutações por amplificação com PCR de 13 fragmentos genômicos cobrindo toda a seqüência codificante e funções de *splicing* do gene PAH, e também da região promotora, seguida de DGGE e/ou

SSCP e seqüenciamento. Os *primers* e as condições de PCR utilizados estão demonstrados nas Tabelas IV e V.

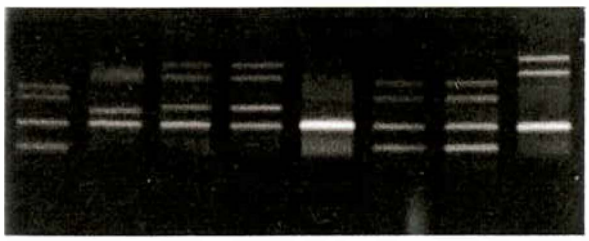
Em resumo, a genotipagem (Figura 3) dos pacientes com PKU envolveu uma triagem inicial das mutações no gene da PAH com base na metodologia de DGGE e/ou SSCP, seguida de seqüenciamento para definição da mutação. Na Tabela III estão demonstrados os métodos de detecção de mutação utilizados para a caracterização molecular dos pacientes com PKU do presente estudo.

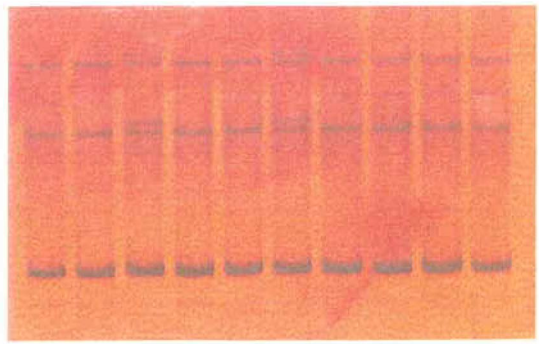
PCR



↓

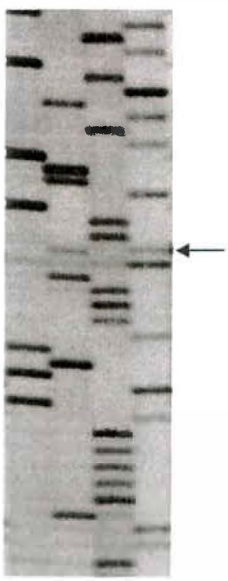
DGGE **ou** **SSCP**





↓

Seqüenciamento (manual ou automático)



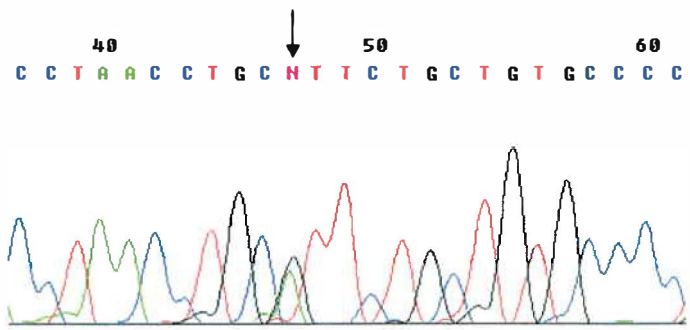


Figura 3: *Etapas para a caracterização das mutações no gene da PAH. As setas indicam presença de mutações pontuais em heterozigose.*

Tabela III: Métodos de detecção de mutações utilizados no presente estudo:

Regiões	Métodos
Região promotora	Seqüenciamento
Exon 1	*Broad-range* DGGE* e SSCP
Exon 2	DGGE
Exon 3	DGGE
Exon 4	*Broad-range* DGGE* e SSCP
Exon 5	*Broad-range* DGGE* e SSCP
Exon 6	DGGE
Exon 7	DGGE e RFLP
Exon 8	*Broad-range* DGGE* e SSCP
Exon 9	*Broad-range* DGGE* e SSCP
Exon 10	*Broad-range* DGGE* e SSCP
Exon 11	DGGE
Exon 12	DGGE
Exon 13	*Broad-range* DGGE* e SSCP

**Estudo realizado em 26 amostras, no Centro de Biologia Molecular "Severo Ochoa" da Universidad Autónoma de Madrid.*

2.2.1 Análise por DGGE:

O poder de resolução desta técnica depende da separação física entre os fragmentos de DNA que diferem em propriedades de desnaturação das suas fitas devido a diferenças na composição dos nucleotídeos, em géis desnaturantes (Myers et al., 1987). Duas modificações aumentaram a sensibilidade da técnica: a união com seqüência de GC termoestáveis numa das extremidades do fragmento de DNA (Sheffield et al., 1989) e a análise de heteroduplexes, que consistem em híbridos formados pelas fitas normais e mutantes (Lerman & Silverstein, 1987).

A capacidade de detectar mutação pelo DGGE está baseada no fato de que o fragmento de DNA similar ao normal diferindo apenas por uma alteração na

seqüência, tal como uma substituição de uma base, tem migração diferente no gel com gradiente de desnaturação (Figura 4), devido a diferenças nas características de *melting* (temperatura de *melting*). A resolução eletroforética aumenta com a análise de heteroduplexes os quais são formados durante a PCR quando o DNA alvo contém 2 alelos diferentes. Moléculas heteroduplexes apresentam uma base com amplificação inespecífica (*mismatch*) e isto irá, devido a sua baixa termoestabilidade, retardar a migração no gel ao se debater com uma concentração de desnaturante menor que a do correspondente homoduplex. Cada substituição de base possui uma influência particular nas propriedades de *melting* do fragmento de DNA. Cada mutação é caracterizada por um *fingerprint* no gel pela formação de um padrão composto de bandas homoduplex e heteroduplex, produzindo indicação da identidade da mutação (Guldberg et al., 1993a) (Figura 5). São usados programas de computador para definir o tamanho do *clamp* de GC que será integrado aos *primers* na PCR, para equilibrar a temperatura de *melting* de todo o exon a ser analisado (Lerman & Silverstein, 1987), além de definir as condições de migração (Figura 6).

Cada fragmento foi obtido após PCR utilizando *primers* com *clamp* de GC. As seqüências de primers estão descritas em Guldberg et al (1993a), e algumas adaptações realizadas estão demonstradas na Tabela IV. O DNA genômico (100ng) foi amplificado em uma mistura contendo 2,5 μl de tampão (10 mM de Tris HCl; pH 8,3, 50 nM de KCl e 1,5 mM de $MgCl_2$), 2,0 μl de dNTP, 8 μl de cada primer, 0,2 μl de Taq polimerase e qsp 25 μl de água. As condições de PCR consistem em 40 ciclos de 94^{0}C por 1 min., 49-61^{0}C por 1 min. e 72^{0}C por 1 min. Após a amplificação, houve a formação de heteroduplexes. A análise de DGGE foi realizada com a

aplicação de uma alíquota do produto da amplificação em gel a 6% de poliacrilamida, contendo um gradiente de uréia e formamida (100% de desnaturante: 7M de uréia e 40% de formamida). A eletroforese realizou-se a 150V em tampão TAE (Tris, Ácido acético glacial e EDTA) sob uma temperatura constante de 60^{0}C. Após a migração, o gel era colocado em uma solução de brometo de etídio para sua visualização em transiluminação UV e fotografado (Figura 7).

No estudo de alguns exons, utilizou-se o *Broad-range* DGGE (Guldberg & Güttler, 1994), que consiste na análise simultânea de múltiplos fragmentos de DNA amplificados pela PCR, em um só gel com gradiente amplo de desnaturante, à temperatura constante e única. O programa utilizado para a amplificação foi: 1 ciclo (94ºC por 15 min., 50ºC por 3 min., 63ºC por 1 min.), 40 ciclos (94ºC por 30 seg., 48 - 55ºC por 30 seg., 63ºC por 30 seg) e 1 ciclo de 72ºC por 7 min., pelo qual se procedeu a formação de heteroduplex segundo descrito por Guldberg et al. (1993). Uma alíquota do produto amplificado de cada exon da PAH foi analisada em gel de poliacrilamida a 6%, com um gradiente desnaturante uréia-formamida de 0 a 80%, e eletroforese a 150V e à temperatura constante de 60ºC.

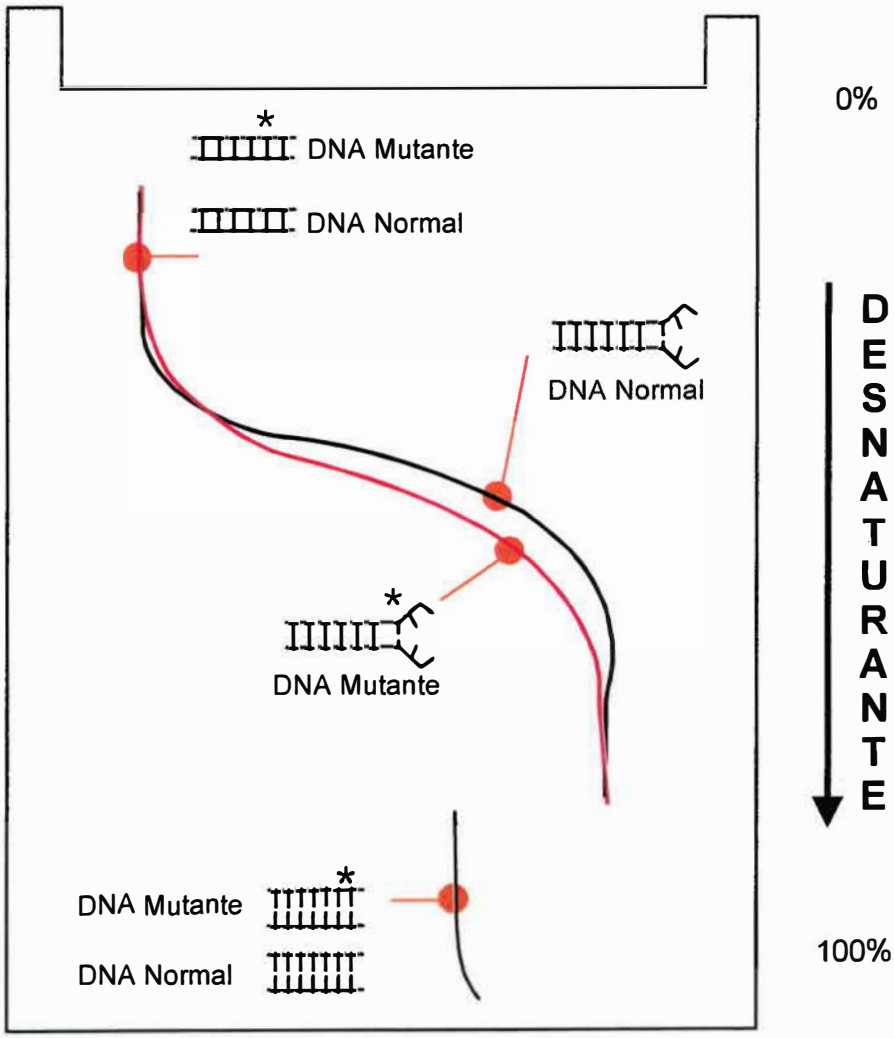


Figura 4: *Esquema da eletroferese em gel com gradiente desnaturante utilizado na técnica de DGGE, juntamente com a representação do comportamento do DNA mutante e normal migrando nesse gel.*

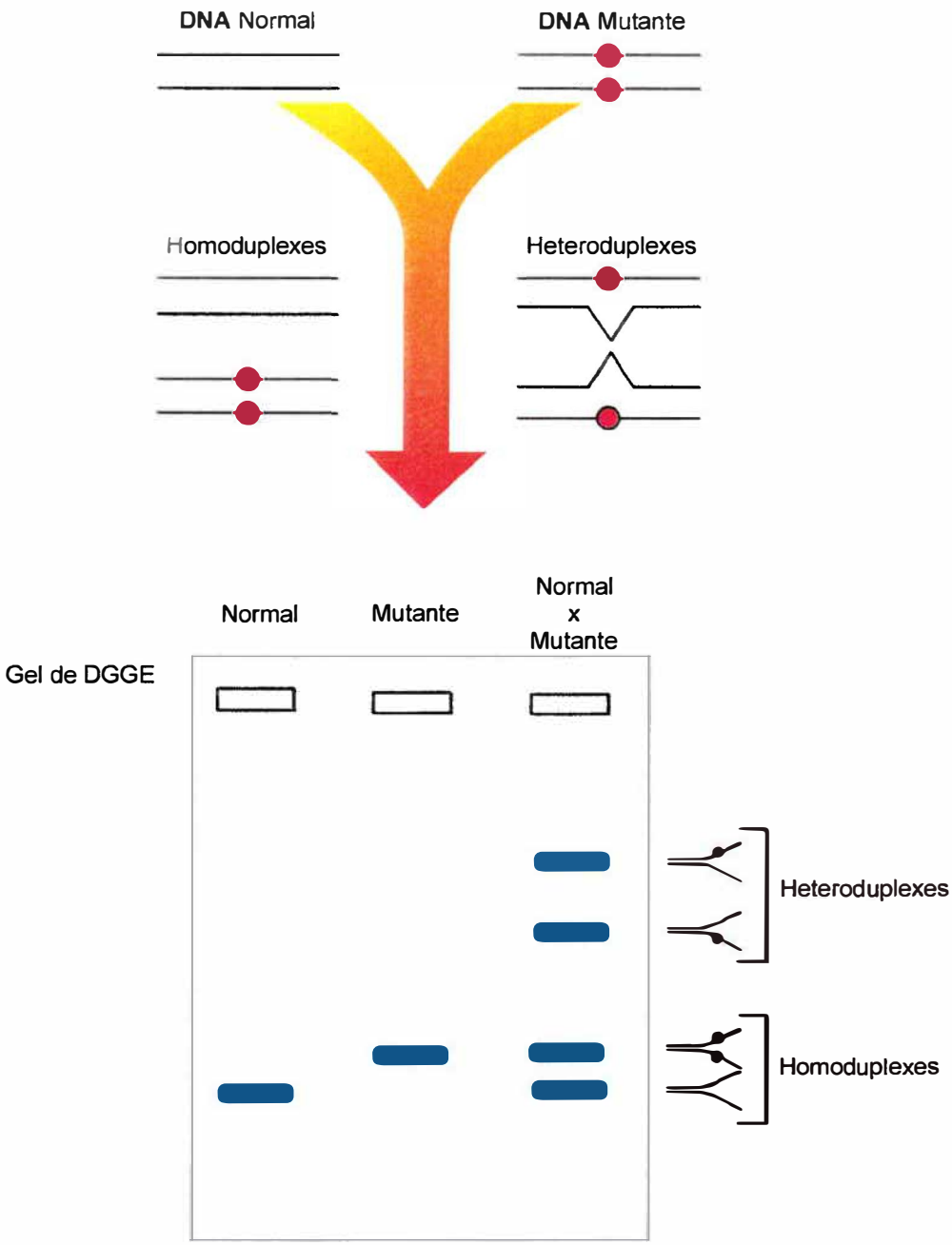
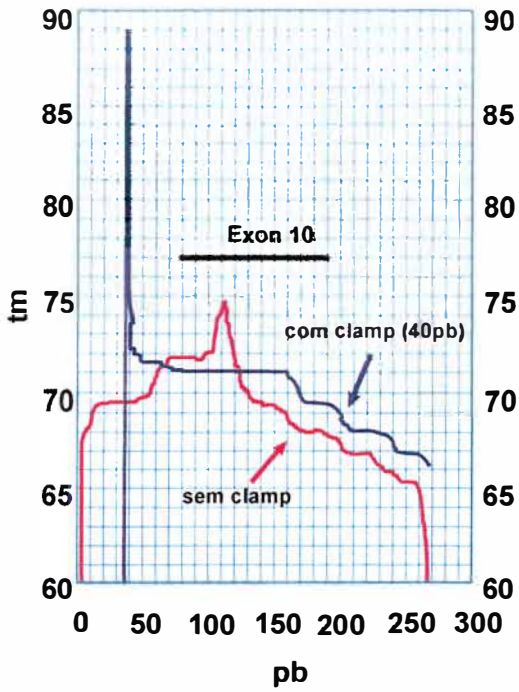


Figura 5: *Análise dos diferentes padrões de bandas correspondentes aos homoduplex e heteroduplex produzidos no DGGE, que indicam a identificação das mutações.*



SITE	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00
2	-.017	-.025	-.032	-.037	-.042	-.044	-.037	-.032	-.027	-.024
27	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
52	-.001	-.001	-.003	-.008	-.049	-.163	-.305	-.407	-.465	-.512
77	-.001	-.002	-.006	-.023	-.096	-.252	-.403	-.497	-.559	-.593
102	-.000	-.001	-.003	-.022	-.103	-.263	-.415	-.512	-.571	-.603
127	-.000	-.001	-.009	-.041	-.134	-.286	-.430	-.521	-.573	-.599
152	-.001	-.009	-.038	-.100	-.203	-.334	-.453	-.526	-.562	-.578
177	-.180	-.426	-.601	-.711	-.773	-.789	-.736	-.615	-.478	-.386
202	-.380	-.587	-.668	-.690	-.680	-.645	-.561	-.434	-.320	-.253
227	-.421	-.584	-.611	-.586	-.546	-.492	-.406	-.294	-.218	-.175
252	-.242	-.261	-.233	-.206	-.185	-.160	-.125	-.084	-.062	-.055
277	-.083	-.074	-.061	-.054	-.048	-.041	-.029	-.022	-.016	-.013
302	-.019	-.016	-.013	-.011	-.010	-.009	-.006	-.005	-.003	-.003
0	67.579	68.412	69.053	69.593	70.068	70.486	70.824	71.069	71.249	71.396

```
LENGTH=          307     RETARDATION LENGTH=       75.000000
INITIAL TEMPERATURE=       66.370000    VELZERO=        2.690000
T for logKd=       -8.000000    =        71.924960
T for logKd=       -7.000000    =        72.839520
T for logKd=       -6.000000    =     0.000000E+00
T for logKd=       -5.000000    =     0.000000E+00
T for logKd=       -4.000000    =     0.000000E+00
```

Gradiente 30 - 70%; com 6 horas de migração

Figura 6: *Resultado de uma análise de simulação computacional para um determinado exon do gene da PAH, mostrando no gráfico, as curvas de melting da seqüência analisada antes e após a adição do clamp de GC; e as condições de migração ideais para o DGGE, também estão exibidas.*

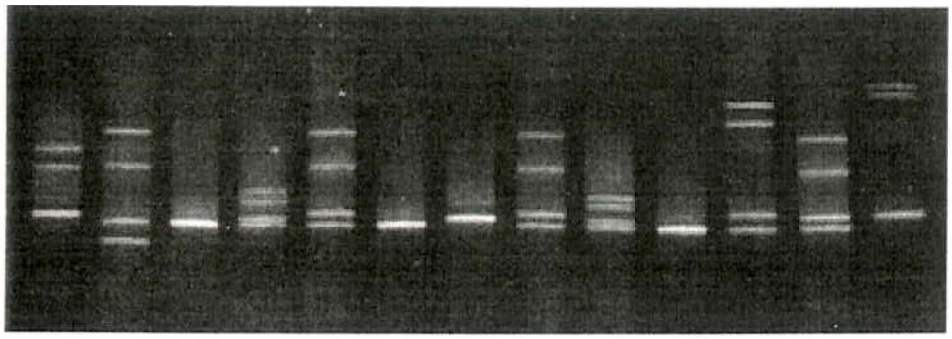


Figura 7: *Gel de DGGE fotografado após coloração em uma solução de brometo de etídio, contendo amostras de pacientes com PKU que apresentam padrões de bandas anômalas, que indicam a presença de mutações distintas.*

2.2.2 Análise de SSCP:

Esta técnica baseia-se no fato de que fitas simples de DNA possuem uma estrutura secundária com seqüência específica. Pequenas diferenças na seqüência, como uma mudança de uma única base, podem afetar a estrutura secundária, podendo ser detectada por eletroforese em um gel não desnaturante (Labrune et al., 1991). As amostras amplificadas para cada exon (seqüências dos *primers* e condições da PCR descritas por van der Sijs-Bos et al., 1996 e Zschocke et al., 1995, também mostradas na Tabela V) são inicialmente desnaturadas em fita simples, pela adição de formamida seguida de aquecimento, e posteriormente aplicadas no gel de poliacrilamida a 8%. A eletroforese foi feita a 150 V, à temperatura constante de 8ºC. As amostras que apresentaram diferenças na mobilidade das fitas simples com as do DNA do controle normal, indicaram a presença de mutação (Figura 8).

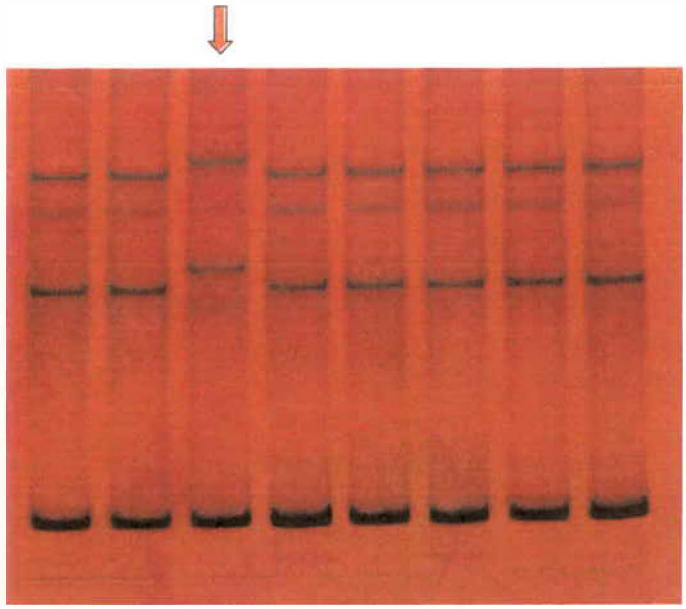


Figura 8: *Gel de SSCP (coloração com nitrato de prata) mostrando, na seta, uma amostra com mobilidade eletroforética diferente das demais, indicando a presença de mutação.*

Tabela IV: Seqüências dos *primers* e condições da PCR para DGGE.

Exon / (pb)	Seqüências dos primers	PCR	DGGE
2 / 304	5´ GAGGTTTAACAGGAATGAATTGCT 3´ 5´ [GC]-TCCTGTGTTCTTTTCATTGC 3´	*TA=57ºC	Gradiente: 15-55% Eletroforese: 6h
3 / 307	5´ [GC]-CTTATGTTGCAAAATTCCTC 3´ 5´ GCCTGCGTTAGTTCCTGTGA 3´	*TA=57ºC	Gradiente: 20-60% Eletroforese: 5h
6 / 366	5´ [GC]-CCGACTCCCTCTGCTAACCT 3´ 5´ CAATCCTCCCCCAACTTTCT 3´	*TA=57ºC	Gradiente: 15-60% Eletroforese: 5h
7 / 318	5´ [GC]-GGTGATGAGCTTTTAGTTTTCTTTC 3´ 5´ AGCAAATGAACCCAAACCTC 3´	*TA=59ºC	Gradiente: 25-65% Eletroforese: 6h
11 / 341	5´ TGAGAGAAGGGGCACAAATG 3´ 5´ [GC]-GCCAACCACCCACAGATGAG 3´	*TA=57ºC	Gradiente: 15-60% Eletroforese: 6h
12 / 278	5´ ATGCCACTGAGAACTCTCTT 3´ 5´ [GC]-GATTACTGAGAAACCGAGTGGCCT 3´	*TA=59ºC	Gradiente: 20-60% Eletroforese: 5h

[GC] = CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG
*TA = temperatura de *annealing*

Tabela V: Seqüências dos *primers* e condições da PCR para SSCP e seqüenciamento.

Região / (pb)	Seqüências dos primers	Condições da PCR
Promotor / 446	5´ CAGACGGTCGCAGGCTTAG 3´ 5´ CAGGACCGCAGTGGACAT 3´	*TA=50ºC
Exon 1 / 197	5´ TTAAAACCTTCAGCCCCACG 3´ 5´ TGGAGGCCCAAATTCCCCTAACTG 3´	*TA=61ºC
Exon 4 / 159	5´ ATGTTCTGCCAATCTGTACTCAGGA 3´ 5´ CAAGACATAGGCCATGGACT 3´	*TA=61ºC
Exon 5 / 213	5´ TCATGGCTTTAGAGCCCCCA 3´ 5´ AGGCTAGGGGTGTGTTTTTC 3´	*TA=56ºC
Exon 8 / 260	5´ TGAGTCTGGCTTGGCTTAAACC 3´ 5´ GGTGGGATCATAGAACTGTACC 3´	*TA=54ºC
Exon 9 / 185	5´ ATGGCCAAGTACTAGGTTGG 3´ 5´ GAGGGCCATAGCCTATAGCA 3´	*TA=56ºC
Exon 10 / 268	5´ TTAACCATCATAGAGTGTGC 3´ 5´ ACAAATAGGGTTTCAACAAT 3´	*TA=49ºC
Exon 13 / 197	5´ GACACTTGAAGAGTTTTTGC 3´ 5´ TTTTCGGACTTTTTCTGATG 3´	*TA=49ºC

**TA = temperatura de annealing*

2.2.3 Análise de seqüenciamento:

As amostras que mostraram um padrão de banda aberrante no gel de DGGE e SSCP foram seqüenciadas diretamente, segundo métodos descritos previamente (Wong et al., 1987) e também utilizando o kit ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin Elmer). A eletroforese foi realizada no aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer), em gel de poliacrilamida a 4%, uréia a 6M, eletroforese a 1500V, temperatura de 51ºC, durante 6 a 8 horas. Os eletroferogramas obtidos foram analisados pelo programa ABI Analysis Data

Collection e as seqüências foram posteriormente analisadas pelo software "Sequencher versão 3.1", e "PolyPhred" (Nickerson et al., 1997).

A região promotora do gene da PAH foi estudada diretamente pelo seqüenciamento. As seqüências dos *primers* e condições da PCR utilizadas estão descritas nas tabelas IV (*primers* sem *clamp* de GC) e V.

2.2.4 Análise de haplótipo RFLP/VNTR:

Cinco dos polimorfismos dialélicos presentes no gene da PAH foram determinados por digestão dos fragmentos de DNA amplificados por PCR, utilizando endonucleases de restrição específicas, como previamente descritas: *Pvu*II(a) (Dworniczak et al., 1991a), *Pvu*II(b), *Msp*I (Wedemeyer et al., 1991), *Bgl*II (Dworniczak et al., 1991b) e *Xmn*I (Goltsov et al., 1992b). O minissatélite multialélico de 30-pb repetições variáveis em tandem (VNTR) a 3´ do final do gene da PAH foi analisado por PCR de acordo com o método de Goltsov et al., (1992a). Os haplótipos RFLP/VNTR foram numerados de acordo com Eisensmith & Woo (1992).

2.2.5 Análise de RFLP e análise populacional:

No estudo do exon 7 do gene da PAH, algumas mutações distintas (R261X, R261Q, V245V, R252W e G272X) apresentaram o mesmo padrão no gel, sendo necessária a realização de digestão com enzimas de restrição (*Dde*I, *Hinf*I, *Alu*I, *Ava*I e *Bam*HI, respectivamente) para a correta definição da mutação. Para o estudo

populacional das mutações, C357G, L321L, F240S e IVS11nt17g→a, foram utilizadas as enzimas de restrição *Sca*I, *Hind*III, *Nla*IV e *Hph*I, respectivamente; e para as demais mutações novas detectadas foi utilizado o DGGE. As seqüências dos primers e condições de PCR utilizados estão demonstradas nas Tabelas IV (*primers* sem *clamp* de GC) e V.

2.3 Correlação genótipo-fenótipo:

Para a avaliação da correlação genótipo-fenótipo foram utilizados os valores de fenilalanina ao diagnóstico (valores pré-tratamento), e os valores de atividade residual prevista (ARP) da PAH. A ARP foi calculada com base nos valores de atividade da PAH *in vitro* de ambos os alelos determinados por análise de expressão, representada como percentagem do valor normal, como descrito por Okano et al. (1991). Uma lista de mutações com estudos de expressão pode ser consultada no *PAH Mutation Analysis Consortium Database*, acessível via Internet no endereço http://www.mcgill.ca/pahdb. As mutações (*nonsense, frameshift* e de *splicing*) que tornam inviável a síntese da proteína normal foram consideradas como tendo atividade da PAH nula. Com esses valores, cada paciente completamente genotipado foi classificado nas diferentes formas clínicas de PKU (clássica, moderada, leve e HPA). As mutações existentes nesses pacientes foram classificadas nessas mesmas categorias.

3. RESULTADOS

3.1 Análise de mutações:

A investigação molecular das 115 famílias estudadas demonstrou a presença de 50 mutações distintas, das quais 38 são potencialmente causadoras de doença (Tabela VI), e as 12 restantes são aparentemente não relacionadas com a gênese da PKU (Tabela VII). A Tabela VI demonstra a freqüência das mutações causadoras de PKU detectadas no presente estudo. A mutação IVS10nt-11g→a foi a mais freqüente (17,2%), seguida da R261Q (12,1%), V388M (9,0%), R252W (6,5%) e R270K (4,7%), perfazendo 50% do total das mutações (Tabela VIII).

Foram detectadas 10 mutações novas (Tabela IX); dentre elas, cinco correspondem a mutações não causadores de doença: IVS5nt-54a→g, IVS6nt17g→t, K274E, L321L e a IVS11nt17g→a. Para as mutações novas com possibilidade de serem causadoras de doença, foi realizado um estudo populacional com 50 indivíduos (amostra referência) sem PKU. Para as mutações E205A e S411X, utilizou-se o DGGE como método de estudo. Para as mutações F240S e C357G, utilizou-se análise de RFLP através do uso das enzimas de restrição *Nla*IV e *Sca*I, respectivamente. Nessa investigação, não houve presença dessas mutações novas na amostra referência analisada. Essas mutações novas são esporádicas, sendo encontradas, cada uma delas, em apenas uma família com PKU.

As mutações silenciosas K274E e L321L foram detectadas numa mesma família, ambas co-segregando com outra mutação nova, a I318T. Após vários estudos de expressão utilizando diferentes sistemas eucarioto e procarioto, a

mutação K274E está sendo considerada como o primeiro polimorfismo de aminoácido descrito no gene da PAH (Gjetting et al., no prelo). Esses mesmos pesquisadores realizaram estudo de expressão *in vitro* para a mutação I318T, comprovando que é causadora de deficiência da enzima PAH.

a)

b)

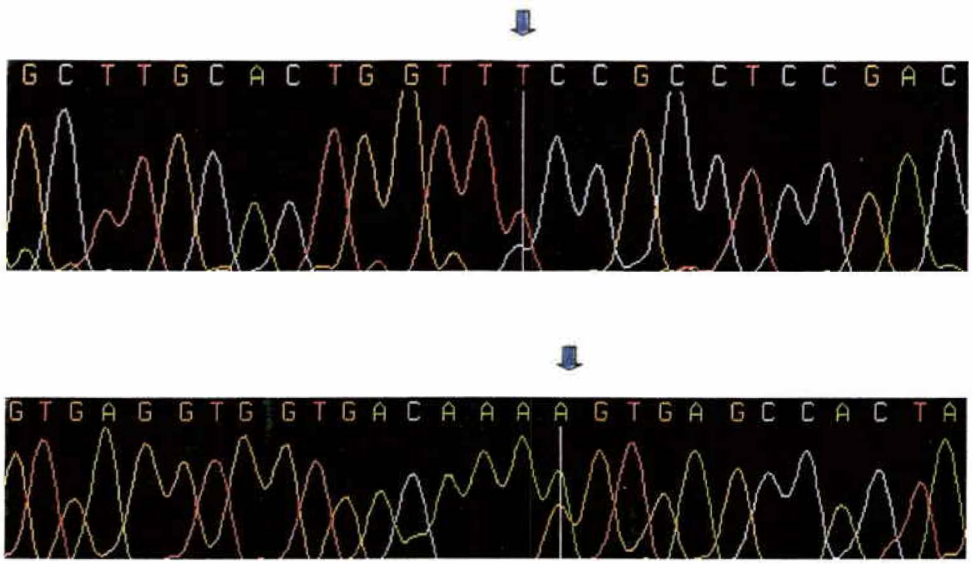


Figura 9: *Exemplos de seqüenciamentos realizados após triagem mutacional realizada pelo DGGE e/ou SSCP, mostrando duas mutações novas em heterozigose: a) F240S (exon 7); b) IVS11nt17g→a (intron 11).*

Tabela VI: Freqüência das mutações causadoras de doença encontradas em 230 cromossomos: 38 mutações diferentes.

Localização	Mutação	n (cromossomos)	Freqüência (%)
Intron 1	IVS1nt5g→t	1	0,4
Exon 2	delF39	1	0,4
Exon 2	L48S	2	0,8
Intron 2	IVS2nt5g→c	8	3,5
Exon 3	I65T	8	3,5
Exon 3	R68S	3	1,3
Exon 3	P89fsincC	1	0,4
Exon 4	D145V	4	1,7
Exon 5	R158Q	8	3,5
Exon 6	R176L	4	1,7
Exon 6	R176X	4	1,7
Exon 6	E205A	1	0,4
Exon 6	Y206X	2	0,8
Exon 7	F240S	1	0,4
Exon 7	R241C	1	0,4
Exon 7	R243Q	3	1,3
Exon 7	R252W	15	6,5
Exon 7	R261Q	28	12,2
Exon 7	R261X	7	3,0
Exon 7	I269N	1	0,4
Exon 7	R270K	11	4,8
Exon 7	G272X	1	0,4
Exon 7	P275R	1	0,4
Exon 7	P281L	5	2,1
Exon 8	A300S	1	0,4
Intron 8	IVS8nt-7a→g	1	0,4
Exon 9	L311P	1	0,4
Exon 9	I318T	1	0,4
Exon 10	G352fsdelG	4	1,7
Exon 10	L348V	3	1,3
Intron 10	IVS10nt-11g→a	40	17,4
Exon 11	C357G	1	0,4
Exon 11	V388M	21	9,1
Exon 11	E390G	2	0,8
Exon 12	R408W	8	3,5
Exon 12	S411X	1	0,4
Exon 12	Y414C	3	1,3
Intron 12	IVS12nt1g→a	3	1,3
Total	38 mutantes	209/230	90,8

Tabela VII: Mutações não patogênicas detectadas no presente estudo:

Localização	Mutações
Intron 2	IVS2nt19t→c
Intron 4	IVS3nt-22c→t
Intron 5	IVS5nt-54a→g
Exon 6	Q232Q
Intron 6	IVS6nt17g→t
Exon 7	V245V
Exon 7	K274E
Exon 9	L321L
Exon 11	L385L
Exon 11	IVS11nt17g→a
Exon 12	N426N
Exon 13	IVS12nt-35g→c

Tabela VIII: Mutações prevalentes (acima de 4%) detectadas no presente trabalho:

Exon	Mutação	Freqüência (%)
11	IVS10nt-11g→a	17,4
7	R261Q	12,2
11	V388M	9,1
7	R252W	6,5
7	R270K	4,8
Total		**50,0**

Tabela IX: Mutações novas encontradas no atual trabalho:

Localização	Troca de nucleotídeo	Troca de aminoácido	Tipo de mutação
Intron 5	*510 - 54 a→g	-	Substituição/Não patogênica
Intron 6	*706 + 17 g→t	-	Substituição/Não patogênica
Exon 6	614A→C	E205A	*Missense*
Exon 7	719T→C	F240S	*Missense*
Exon 7	820A→G	**K274E	*Missense*/Não patogênica
Exon 9	953T→C	**I318T	*Missense*
Exon 9	963C→T	**L321L	Silenciosa/Não patogênica
Exon 11	1069T→G	C357G	*Missense*
Intron 11	1199 + 17 g→a	-	Substituição/Não patogênica
Exon 12	1232C→G	S411X	*Nonsense*

**mutações no mesmo alelo*
***mutações no mesmo alelo*

Para as mutações K274E, L321L, IVS11nt17g→a e N426N, foi realizado estudo populacional, utilizando populações caucasóides, asiáticas e negróides, exceto para a mutação K274E, para a qual utilizou-se um grupo referência de 50 indivíduos sem PKU, pois se pensava que ela era causadora de PKU. Os resultados demonstrados na Tabela X mostram que as mutações L321L e N426N são mais restritas à população negra. A mutação IVS11nt17g→a não foi detectada em nenhuma população estudada, levando a supor que a mesma possa estar associada à PKU.

A distribuição das mutações encontradas no presente estudo é representativa da região sudeste do país, uma vez que a maioria dos pacientes (97) é procedente dessa região, principalmente da cidade de São Paulo, além dos resultados da análise realizada somente com a região sudeste, praticamente coincidirem com os valores totais. Uma análise regional da distribuição das mutações torna-se impossibilitada, devido ao número reduzido (18) de pacientes das regiões Sul, Nordeste e Centro-Oeste, e porque o sistema de seleção da amostra favorece a maior representação dos pacientes do sudeste.

Tabela X: Estudo populacional das mutações K274E, L321L, IVS11nt17g→a e N426N:

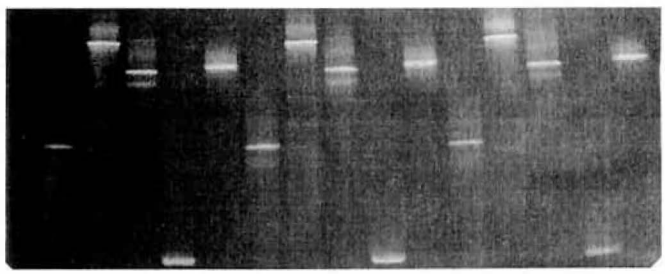
Exon	Mutação	Variação	Método de estudo	Estudo populacional (n/cromossomos)
7	K274E	AAG/GAG	DGGE	2/100 (2%)
9	L321L	CTC/CTT	RFLP /*Hind*III	1/100 Brancos; 8/100 Negros; 0/80 Asiáticos
11	IVS11nt17g→a	1199 + 17g/a	RFLP/*Hph*I	0/100 Brancos; 0/80 Asiáticos; 0/100 Negros
12	N426N	AAT/AAC	DGGE	0/100 Brancos; 0/80 Asiáticos; 13/100 Negros

Do total de 115 famílias (230 cromossomos), utilizando os métodos DGGE, *Broad-range* DGGE e SSCP, foi possível definir 91% dos alelos mutantes, sendo 99 (86%) famílias com as 2 mutações definidas, 11 (9,6%) com 1 alelo mutante caracterizado, e 5 (4,4%) sem nenhuma mutação definida. O desempenho de cada método está demonstrado na tabela XI. A análise molecular iniciou-se com a metodologia do DGGE investigando a maioria dos pacientes para os exons 2, 3, 6, 7, 11 e 12. Iniciamos o estudo por esses exons por serem os que possuem o maior número de mutações descritas em populações de origem européia (Eisensmith & Woo, 1995). Os diferentes padrões anômalos que apareceram nos géis desnaturantes foram seqüenciados, mostrando que cada mutação possui um padrão específico e constante no gel, sendo necessário o seqüenciamento de apenas um exemplar de cada padrão.

Em vista da grande heterogeneidade apresentada pelo exon 7 do gene da PAH, foi necessária a realização de digestão com endonucleases (*Dde*I, *Hinf*I, *Alu*I, *Ava*I e *Bam*HI), para esclarecimento de mutações (R261X, R261Q, V245V, R252W e G272X, respectivamente) que não diferiram nos padrões apresentados no DGGE, ou seja, houve para essas mutações um mesmo padrão no DGGE, percebidos pela análise de segregação familiar e, depois, pelo seqüenciamento. Essas mutações foram as seguintes: R270K em heterozigose com mesmo padrão no DGGE que a G272X em heterozigose; R261Q e R261X, ambas em heterozigose; R270K e R261Q quando em homozigose; V245V, R252W e R243Q, todas em heterozigose; P281L em homozigose e R261X/V245V em homozigose composta; R252W e V245V quando ambas em homozigose. Para a definição das mutações R270K e R243Q foi necessário o seqüenciamento, já que não havia sítios para enzimas de restrição que

reconhecessem essas mutações. Já a digestão para o exon 6 com a enzima *Dde*I foi necessária apenas para confirmar uma mutação, o polimorfismo Q232Q, que mostrou-se duvidosa no seqüenciamento de alguns padrões.

Utilizamos os métodos SSCP e *Broad-range* DGGE (Figura 7) para o estudo dos 36 pacientes restantes que não tiveram a conclusão genotípica dos seus alelos mutantes, investigando os exons restantes: 1, 4, 5, 8, 9, 10 e 13. Nas amostras estudadas pelo SSCP, foram seqüenciados todos os padrões aberrantes detectados no gel, uma vez que diferentemente do DGGE, cada mutação pode comportar-se de diferentes modos no gel, além de um mesmo padrão poder corresponder a mutações distintas. As amostras dos dezesseis pacientes que não foram completamente genotipadas foram diretamente seqüenciadas para os exons estudados por SSCP, para se averiguar a sensibilidade desse método: o resultado não revelou nenhuma outra mutação que não tivesse sido detectada anteriormente, demonstrando desse modo, a eficácia do método SSCP.



4 5 9 10 13 4 5 9 10 13 4 5 9 10 13

Paciente 1 Paciente 2 Paciente 3

Figura 10: *Exemplo de um gel de Broad-range DGGE, mostrando os padrões de bandas para os exons 4, 5, 9, 10 e 13 do gene da PAH, analisando 3 amostras distintas de pacientes com PKU. Neste caso, os pacientes não apresentam nenhuma mutação nesses exons estudados.*

A região promotora dessas mesmas dezesseis amostras também foi seqüenciada, na tentativa de se detectar mutação nos alelos mutantes ainda não caracterizados, porém a análise não demonstrou nenhum paciente com seqüência mutante na região promotora a 5´ do gene da PAH.

Com a utilização de diferentes metodologias de investigação mutacional, padronizamos suas técnicas e estabelecemos a validação do uso desses distintos métodos de triagem de mutação orientados para a análise molecular do gene da PAH em indivíduos com PKU em nossa população.

Tabela XI: Perfil de definição dos cromossomos analisados, segundo método de estudo:

	DGGE	SSCP *Broad-range* DGGE	Total
Nº de famílias estudadas	115	36	115
Nº de cromossomos	230	72	230
Nº de famílias definidas	79 (68,7%)	20 (55,5%)	99 (86,0%)
Nº de famílias heterozigotas	26 (22,6%)	11 (30,5%)	11 (9,6%)
Nº de famílias sem mutação	10 (8,7%)	5 (14,0%)	5 (4,4%)
Total de cromossomos genotipados	80%	70,7%	90,8%

3.2 Genótipos:

A grande maioria dos genótipos encontrados (Tabela XII) apresentou um caráter heterozigoto, resultando da aquisição de duas mutações distintas (heterozigoto composto). Das 115 famílias estudadas, 72 apresentaram os alelos

mutantes em heterozigose composta, 26 em homozigose (destas, 16 pertencem a famílias consangüíneas), 11 eram heterozigotas (apenas 1 alelo mutante identificado), 1 família em homozigose composta e nas cinco famílias restantes (destas, 3 são consangüíneas), não foi possível detectar as mutações causadoras da PKU. Na família que se apresentou em homozigose composta, ambas as mutações R261X e IVS10nt-11g→a estão presentes em homozigose em quatro membros afetados, e em heterozigose composta nos seus pais que são consangüíneos. Na Tabela XIII estão distribuídos os 78 diferentes genótipos detectados.

Tabela XII: Freqüência dos genótipos nas 115 famílias estudadas:

Genótipos	n (cromossomos)	Freqüência (%)
Homozigoto	26	22,6
Homozigoto composto	1	0,9
Heterozigoto composto	72	62,6
Heterozigoto	11	9,6
Sem mutação	5	4,3
Total	115	100,0

Tabela XIII: Genótipos encontrados nos pacientes brasileiros com PKU:

Mutações	Nº pacientes
L48S	1
Y206X/G352fsdelG	1
R270K / IVS10nt-11g→a	1
R270K / R70K	2
L48S / R261Q	1
R252W / Y414C	1
IVS2nt5g→c / R261Q	1
V388M / IVS10nt-11g→a	6
IVS10nt-11g→a	3
R252W / R252W	2
V388M	1
V388M/A300S	1
R176X / C357G	1
IVS10nt-11g→a / IVS10nt-11g→a	7
R270K / V388M	1
P281L / IVS12nt1g→a	1
R261Q / IVS12nt1g→a	1
R261Q	3
R261Q / IVS10nt-11g→a	2
V388M / R408W	1
E205A/ R252W	1
R176X / V388M	1
D145V / D145V	1
IVS2nt5g→c / D145V	1
R261Q / R261Q	4
R261X / IVS10nt-11g→a	2
IVS10nt-11g→a / R408W	2
I65T / I65T	2
R408W/R176L	2
R261Q / R408W	2
R241C / R252W	1
P281L	1
R270K/L311P	1
P281L / G272X	1
R176X / R261Q	1
L348V/L348V	1
IVS10nt-11g→a/R158Q	3
R270K/L348V	1
V388M / V388M	2
IVS2nt5g→c/IVS2nt5g→c	2

Mutações	Nº pacientes
IVS10nt-11g→a/E390G	1
R261Q/F240S	1
I65T / R252W	1
I65T / R408W	1
R261Q / V388M	2
R252W / R261Q	1
R252W/R176L	1
I65T / R270K	1
delF39 / IVS10nt-11g→a	1
R252W / I318T	1
R68S / R252W	1
IVS12nt1g→a	1
IVS10nt-11g→a/R261X / IVS10nt-11g→a/R261X	1
R261Q / R270K	1
R252W / V388M	2
R261X / R261Q	1
P89fsincC/IVS1nt5g→t	1
IVS2nt5g→c / IVS10nt-11g→a	1
IVS10nt-11g→a / Y414C	2
P281L / P281L	1
IVS2nt5g→c / R261Q	1
R68S / R243Q	2
R261X / R261X	1
R261Q / P275R	1
V388M / S411X	1
R158Q/R158Q	1
R270K/G352fsdelG	1
R158Q / R158Q	1
G352fsdelG	1
R261Q/R158Q	1
V388M/IVS8nt-7a→g	1
R158Q/E390G	1
R176L/R243Q	1
R252W / I269N	1
I65T/G352fsdelG	1
R176X / Y206X	1
Sem mutação	5
Total	115

3.3 Associação entre mutações e polimorfismos intragênicos:

Com a finalidade de caracterizar a origem e a distribuição dos alelos da PAH investigamos as associações das mutações detectadas com os haplótipos PCR/RFLP e alelos de VNTR localizados no gene da PAH. Foram detectados quinze diferentes haplótipos nos 230 cromossomos analisados, sendo possível determinar os haplótipos de 198 (86%) alelos, dos quais 192 (97%) associados a alelos mutantes (Tabela XIV) e 6 (3%) a alelos sem mutação caracterizada. Não foram definidos todos os haplótipos porque os sítios polimórficos *Eco*RI e *Eco*RV, não foram investigados. Dos 32 cromossomos (14%) com haplótipos não definidos, 17 apresentavam alelos mutantes caracterizados e 15 sem definição dos alelos mutantes. A maioria dos alelos de PKU (Tabela XV) apresentou associação com os haplótipos 1.8, 6.7, 4.3, 1.7 e 9.8, sendo o haplótipo 1.8 (Tabela XVI) o mais freqüente (27,4%) e também o que mais esteve associado com mutações variadas. Das dez mutações novas detectadas (Tabela XVII), foi possível definir o haplótipo de seis delas, a partir da dedução das suas associações com os polimorfismos Q232Q, V245V, L385L e IVS12nt-35c→t, que, segundo Lichter-Konecki et al. (1994a), confirmam com uma alta probabilidade o haplótipo ligado. Na tabela XVIII estão destacadas as associações raras de mutação e haplótipo encontradas. Apesar da maioria dos pacientes estudados no presente estudo, ser oriundo da região sudeste, analisou-se a distribuição dos haplótipos dos pacientes das diferentes regiões estudadas, verificando-se que as mutações detectadas estão, de uma maneira geral, associadas aos mesmos haplótipos, apresentando uma mesma distribuição nas diferentes procedências dos pacientes.

Tabela XIV: Mutações PKU associadas com polimorfismos intragênicos:

Mutação	n (cromossomos)	Freqüência (%)	Haplótipo
IVS1nt5g→t	1	0,4	4.3
delF39	1	0,4	39.9 ou 60.9
L48S	1; 1	0,4 / 0,4	4.3 / X.8
IVS2nt5g→c	8	3,5	5.9
I65T	8	3,5	9.8
R68S	1;2	0,4 / 0,8	7.8 / 1.8
P89fsincC	1	0,4	11.8
D145V	4	1,7	4.3
R158Q	7; 1	3,0 / 0,4	4.3 / X.8
R176L	4	1,7	4.3
R176X	4	1,7	1.8
E205A	1	0,4	4.3
Y206X	2	0,8	1.8
F240S	1	0,4	6.9
R241C	1	0,4	34.1
R243Q	3	1,3	1.8
R252W	1; 12; 2	0,4 / 5,2 / 0,8	6.7 / 1.8 / 52.8
R261Q	25; 2; 1	11,0 / 0,8 / 0,4	1.8 / 2.3 ou 24.3 / 1.9
R261X	1; 1; 2; 1; 2	0,4 / 0,4 / 0,8 / 0,4 / 0,8	6.9 / 1.8 / 6.7 / 11, 33 ou 34.9 / 4.3
I269N	1	0,4	3.8
R270K	11	4,8	1.8
G272X	1	0,4	7.8
P275R	1	0,4	7.8
P281L	1; 2; 2	0,4 / 0,8 / 0,8	1.7 / 1.8 / 2.3, 24.3 ou 41.3
A300S	1	0,4	1.8
IVS8nt-7a→g	1	0,4	4.3
L311P	1	0,4	1.7
I318T	1	0,4	15.9, 37.9 ou 80.9
G352fsdelG	4	1,7	2.3
L348V	3	1,3	9.8
IVS10nt-11g→a	36; 4	15,6 / 1,7	6.7 / 39.7 ou 60.7
C357G	1	0,4	4.3
V388M	26	11,3	1.7
E390G	2	0,8	2.3, 24.3 ou 41.3
R408W	5; 1; 1; 1	2,1 / 0,4 / 0,4 / 0,4	2.3 / 1.8 / 27.9 / X.14
S411X	1	0,4	15.9 ou 37.9
Y414C	3	1,3	4.3
IVS12nt1g→a	3	1,3	3.8

Tabela XV: Haplótipos associados a diferentes mutações:

Haplótipos	Mutações
1.8	Y206X
	R261Q
	R252W
	R176X
	R270K
	P281L
	R408W
	R261X
	R68S
	R243Q
	A300S
4.3	L48S
	D145V
	Y414C
	E205A
	R176L
	C357G
	R261X
	R158Q
	IVS1nt5g→t
	IVS8nt-7a→g
6.7	IVS10nt-11g→a
	R252W
	R261X
7.8	G272X
	R68S
	P275R
1.7	V388M
	P281L
	L311P
3.8	IVS12nt1g→a
	I269N
2.3	R408W
	G352fsdelG
6.9	R261X
	F240S
5.9	IVS2nt5g→c
1.9	R261Q
9.8	I65T
11.8	P89fsinC
27.9	R408W
34.10	R241C
52.8	R252W

Tabela XVI: Haplótipos mais freqüentes:

Haplótipo	Freqüência (%)
1.8	27,6
6.7	16,0
1.7	12,1
4.3	9,7
9.8	4,8
Total	**70,2**

Tabela XVII: Haplótipos das mutações novas:

Mutação	Haplótipo
E205A	4.3
*K274E/*L321L/*I318T	15.9 ou 37.9 ou 80.9
C357G	4.3
S411X	15.9 ou 37.9
**IVS5nt-54a→g	4.3
**IVS6nt17g→t	4.3
F240S	6.9
IVS11nt17g→a	7.8

**mutações no mesmo alelo*
***mutações no mesmo alelo*

Tabela XVIII: Associações raras de mutações e haplótipos:

Mutações	Haplótipos
IVS10nt-11g→a	39.7 ou 60.7
R261Q	2.3 ou 24.3
R252W	52.8
P281L	2.3, 24.3 ou 41.3
L48S	X.8
R408W	27.9; X.14
R261X	11.9, 33.9 ou 34.9
delF39	39.9 ou 60.9
R158Q	X.8
I318T	15.9, 37.9 ou 80.9
S411X	15.9 ou 39.9

3.4 Correlação genótipo-fenótipo:

Para a correlação genótipo-fenótipo, foram analisados apenas os pacientes completamente genotipados, totalizando 99 pacientes, sendo 69 genótipos diferentes, a maioria (72) em heterozigose composta, 26 em homozigose e 1 paciente em homozigose composta. A classificação fenotípica das mutações detectadas, levando em consideração os valores de fenilalanina ao diagnóstico (pré-tratamento), demonstrou a presença de 4 grupos: PKU clássica, PKU moderada, PKU leve e HPA. Cinqüenta e sete pacientes exibiram a forma clássica da PKU, com níveis médios de fenilalanina ao diagnóstico de 29,63mg/dl. A forma moderada é representada por 26 pacientes (26%) cujo valor médio da fenilalanina ao diagnóstico é de 17,2mg/dl. Doze pacientes (12%) pertenceram à forma leve (média de fenilalanina ao diagnóstico de 10mg/dl), e quatro pacientes (4%) eram HPA (média de fenilalanina ao diagnóstico de 10mg/dl).

Os genótipos, os valores de fenilalanina e de atividade residual prevista da PAH estão demonstrados nas Tabela XIX e XX, para os casos de homozigose e heterozigose composta, respectivamente. As mutações que resultam em alteração funcional importante da PAH (mutação de *splicing*, mutações que inserem um códon prematuro de parada ou causam *frameshift*), foram consideradas como possuindo atividade residual nula da PAH.

Tabela XIX: Correlação genótipo-fenótipo observada em pacientes homozigotos para PKU.

Mutação	ARP %	Fenilalanina ao diagnóstico	Fenótipo
R270K	0	39mg/dl	clássica
V388M	15	22mg/dl	clássica
R252W	<1	20mg/dl	clássica
IVS10nt-11g→a	0	29mg/dl	clássica
IVS2nt5g→c	0*	22,5mg/dl	clássica
IVS10nt-11g→a	0	36,5mg/dl	clássica
I65T	26	22mg/dl	clássica
I65T	26	25,4mg/dl	clássica
IVS2nt5g→c	0*	25mg/dl	clássica
IVS10nt-11g→a/ R261X	0	26,4mg/dl	clássica
R261Q	30	30mg/dl	clássica
IVS10nt-11g→a	0	50mg/dl	clássica
IVS10nt-11g→a	0	37,6mg/dl	clássica
V388M	15	21mg/dl	clássica
R261Q	30	31,8mg/dl	clássica
P281L	0	20,8mg/dl	clássica
R261X	0*	30mg/dl	clássica
R261Q	30	15mg/dl	moderada
R261Q	30	20mg/dl	moderada
R158Q	10	16mg/dl	moderada
IVS10nt-11g→a	0/0	16mg/dl	moderada
L348V	25	16,5mg/dl	moderada
R270K	0	18,9mg/dl	moderada
IVS10nt-11g→a	0	15mg/dl	moderada
IVS10nt-11g→a	0	17,63mg/dl	moderada
R252W	<1	7,5mg/dl	leve
D145V	?	13mg/dl	HPA

ARP: atividade residual prevista da PAH
**Atividade residual da PAH estimada como nula em virtude da característica da mutação.*

Tabela XX: Correlação genótipo-fenótipo observada em pacientes heterozigotos compostos para PKU.

Alelo 1	Alelo 2	ARP %	Fenilalanina ao diagnóstico	Fenótipo
R270K	IVS10nt-11g→a	0/0	24,15mg/dl	clássica
R270K	G352fsdelG	0/0*	24mg/dl	clássica
IVS2nt5g→c	IVS10nt-11g→a	0*/0	21mg/dl	clássica
P89fsincC	IVS1nt5g→t	0*/0	27mg/dl	clássica
IVS2nt5g→c	R261Q	0*/30	20,4mg/dl	clássica
V388M	IVS10nt-11g→a	15/0	30mg/dl	clássica
IVS10nt-11g→a	R158Q	0/10	23mg/dl	clássica
IVS10nt-11g→a	R408W	0/<1	25mg/dl	clássica
R261Q	IVS10nt-11g→a	30/0	23mg/dl	clássica
R261X	IVS10nt-11g→a	0*/0	24mg/dl	clássica
IVS10nt-11g→a	R158Q	0/10	32,3mg/dl	clássica
P281L	G272X	0/0	25mg/dl	clássica
R176X	C357G	0*/?	28,3mg/dl	clássica
R261X	R261Q	0*/30	32mg/dl	clássica
I65T	G352fsdelG	26/0*	40mg/dl	clássica
V388M	S411X	15/0*	29mg/dl	clássica
P281L	IVS12nt1g→a	0/<1	30mg/dl	clássica
R261Q	IVS12nt1g→a	30/<1	27mg/dl	clássica
R252W	I269N	<1/?	50mg/dl	clássica
R261Q	R270K	30/0	31,5mg/dl	clássica
R176X	V388M	0*/15	40,2mg/dl	clássica
IVS10nt-11g→a	R408W	0/<1	52mg/dl	clássica
R261Q	R158Q	30/10´	31,4mg/dl	clássica
R68S	R252W	?/<1	23,4mg/dl	clássica
V388M	IVS10nt-11g→a	15/0	24mg/dl	clássica
IVS10nt-11g→a	R158Q	0/10	39mg/dl	clássica
R252W	I318T	<1/?	37,5mg/dl	clássica
R261X	IVS10nt-11g→a	0*/0	42,6mg/dl	clássica
R270K	L311P	0/0	39mg/dl	clássica
delF39	IVS10nt-11g→a	0*/0	48mg/dl	clássica
R176X	R261Q	0*/30	24mg/dl	clássica
R261Q	R408W	30/<1	22,4mg/dl	clássica
V388M	IVS10nt-11g→a	15/0	24,8mg/dl	clássica
I65T	R252W	26/<1	26,5mg/dl	clássica
I65T	R270K	26/0	57,6mg/dl	clássica
R261Q	V388M	30/15	24mg/dl	clássica
V388M	IVS10nt-11g→a	15/0	37mg/dl	clássica
R252W	V388M	<1/15	25mg/dl	clássica
R261Q	F240S	30/?	38,4mg/dl	clássica

continua...

Alelo 1	Alelo 2	ARP %	Fenilalanina ao diagnóstico	Fenótipo
V388M	IVS10nt-11g→a	15/0	27m/dl	clássica
R261Q	IVS10nt-11g→a	30/0	17mg/dl	moderada
V388M	IVS10nt-11g→a	15/0	19,9mg/dl	moderada
L48S	R261Q	?/30	17,85mg/dl	moderada
R252W	R176L	<1/?	20mg/dl	moderada
R261Q	P275R	30/?	18mg/dl	moderada
R68S	R243Q	?/10	17mg/dl	moderada
R261Q	V388M	30/15	15mg/dl	moderada
R408W	R176L	<1/?	20,4mg/dl	moderada
R270K	L348V	0/25	19,2mg/dl	moderada
V388M	IVS8nt-7a→g	15/0	17,5mg/dl	moderada
R241C	R252W	25/<1	17mg/dl	moderada
R252W	V388M	<1/15	17mg/dl	moderada
R261Q	R408W	30/<1	16,5mg/dl	moderada
E205A	R252W	?/<1	15,8mg/dl	moderada
R270K	V388M	0/15	19,2mg/dl	moderada
R252W	Y414C	<1/50	15mg/dl	moderada
IVS2nt5g→c	R261Q	0*/30	17,4mg/dl	moderada
IVS10nt-11g→a	Y414C	0/50	17,7mg/dl	moderada
Y206X	G352fsdelG	0*/0*	11mg/dl	leve
V388M	R408W	15/<1	14mg/dl	leve
R408W	R176L	<1/?	13mg/dl	leve
R252W	R261Q	<1/30	11mg/dl	leve
IVS2nt5g→c	D145V	0*/?	14,5mg/dl	leve
IVS10nt-11g→a	E390G	0/?	12,5mg/dl	leve
IVS10nt-11g→a	Y414C	0/50	14,7mg/dl	leve
R68S	R243Q	?/10	12mg/dl	leve
R176X	Y206X	0*/0*	10,4mg/dl	leve
R176L	R243Q	?/10	10,62mg/dl	leve
I65T	R408W	26/<1	14,7mg/dl	leve
R158Q	E390G	10/?	11mg/dl	HPA
R158Q	D145V	10/?	5,2mg/dl	HPA
V388M	A300S	15/?	9mg/dl	HPA

ARP: atividade residual prevista da PAH.
**Atividade residual da PAH estimada como nula em virtude da característica da mutação.*

Nos pacientes homozigotos (Tabela XIX) observa-se que a maioria das mutações com atividade residual <3% resultam nas formas clássica ou moderada de PKU, que são as formas mais graves da doença. A combinação dessas mutações nos pacientes heterozigotos compostos (Tabela XX) também está associada às formas graves de PKU.

A exemplo de Güttler et al. (1999) e Guldberg et al. (1998) realizamos a classificação fenotípica das mutações detectadas (tabela XXI).

Tabela XXI: Classificação fenotípica PKU/HPA de 38 mutações no gene da PAH observadas no presente estudo:

PKU Clássica	PKU Moderada	PKU Leve	HPA
IVS1nt5g→t	IVS2nt5g/c	D145V	D145V
IVS2nt5g→c	L48S	R158Q	R176L
DelF39	I65T	R176L	A300S
I65T	R68S	Y206X	
R68S	R158Q	R243Q	
P89fsincC	E205A	R252W	
R158Q	R241C	E390G	
R176X	R243Q	Y414C	
F240S	R252W		
R252W	R261Q		
R261Q	R270K		
R261X	P275R		
I269N	IVS10nt-11g→a		
R270K	L348V		
G272X	V388M		
P281L	R408W		
IVS8nt-7a→g	Y414C		
L311P			
I318T			
IVS10nt-11g→a			
G352fsdelG			
C357G			
V388M			
R408W			
S411X			
IVS12nt1g→a			

HPA: hiperfenilalaninemia

4. DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos as bases moleculares da PKU em famílias provenientes principalmente da região sudeste do Brasil. Para avaliar a heterogeneidade genética dessa doença, analisamos as mutações do gene da PAH e os haplótipos associados, realizando também a correlação genótipo-fenótipo baseada nos níveis de fenilalanina pré-tratamento e da ARP da PAH medida *in vitro*.

4.1 Análise de mutações:

No presente trabalho, utilizamos uma metodologia de triagem mutacional eficiente, o DGGE e o *Broad-range* DGGE, largamente utilizada na investigação de mutações em várias populações (Guldberg et al., 1993a; Guldberg et al., 1993b; Hennermann et al., 2000), bem como o SSCP para análise de alguns exons do gene da PAH (Labrune et al., 1991; Zschocke et al., 1995; van der Sijs-Bos et al., 1996). Estudamos também a região promotora do gene da PAH (Svensson et al., 1993) na tentativa de elucidar os casos sem definição dos alelos mutantes, previamente analisados para todas as 13 regiões codificantes e sítios de *splicing* do gene da PAH.

Essa abordagem de investigação, inédita em nosso país, permitiu a identificação de 91% dos alelos mutantes, de um total de 230 cromossomos (115 famílias) investigados, o que está de acordo com a literatura (Pérez et al., 1997). Os alelos mutantes de 99 famílias (86%) foram completamente genotipados, e nas demais, 11 (9,6%) foram heterozigotas e em 4 (4,4%), nenhuma mutação foi

identificada. A afirmação de que a porcentagem de alelos não caracterizados seja maior na América Latina e Espanha (10%, Pérez et al., 1997), que em outros países como a Dinamarca (Guldberg et al., 1993b), pode dever-se à heterogeneidade genética específica de cada população. Por outro lado, o seqüenciamento de todos os exons realizados em pacientes não completamente caracterizados em outros países (Pérez et al., 1997) não tem permitido determinar as mutações não detectadas por DGGE, demonstrando que essas mutações devem estar presentes em regiões não estudadas mediante essa técnica e não se deve a uma falha no sistema de detecção. As mutações não identificadas provavelmente se encontram fora da região estudada, podendo localizar-se em região de poli-adenilação ou seqüências intrônicas extensas cuja composição de bases é desconhecida (Hennermann et al., 2000), pois toda a região codificante cobrindo funções de *splicing* e região promotora do gene da PAH, foram investigadas no presente estudo. Pérez et al., (1996) realizou um estudo com 79 pacientes com PKU oriundos de São Paulo, porém sua abordagem de detecção de mutação foi muito limitada, pois o estudo foi dirigido para algumas mutações (IVS10nt-11g→a, I65T, V388M, R408W e IVS12nt1g→a), com alta incidência na Europa.

O espectro mutacional (Tabelas VI e VII) inclui a identificação de 50 mutações distintas, sendo 38 mutações potencialmente causadoras de doença (Tabela VI) e 12 não relacionadas com a origem da doença: IVS2nt19t→c, IVS3nt-22c→t, IVS5nt-54a→g, Q232Q, IVS6nt17g→t, K274E, V245V, L321L, L385L, IVS11nt17g→a, N426N e IVS12nt17g→c. Como anteriormente observado por Tyfield et al., (1997) e Guldberg et al., (1996), três a seis mutações geralmente são

responsáveis por quase 65% dos alelos mutantes em uma população específica. Essa afirmação está em concordância com os nossos dados de freqüência de mutações, pois cinco mutações são responsáveis por 50% do total do espectro mutacional, sendo elas a IVS10nt-11g→a (17,2%), R261Q (12,1%), V388M (9,0%), R252W (6,5%) e R270K (4,7%). O exon 7 do gene da PAH foi o que apresentou o maior número (onze) de mutações detectadas. Esta região da PAH é altamente conservada, sugerindo que esta parte da proteína possui uma função crucial dentro das famílias das hidroxilases e que a substituição de um aminoácido nessa região poderá afetar gravemente a atividade catalítica da enzima (Dworniczak et al., 1992).

Dentre as mutações detectadas, 10 são consideradas novas (Acosta et al., no prelo), havendo cinco não relacionados à doença: IVS5nt-54a→g, IVS6nt17g→t, K274E, L321L e IVS11nt17g→a; e, as cinco demais, são consideradas causadoras de doença, sendo que quatro delas causam substituição de um aminoácido: E205A, F240S, I318T e C357G; e a décima, a S411X, interrompe a leitura pela inserção de um códon prematuro de parada. O potencial, dessas mutações novas, de serem causadoras de doença, foi corroborado pela busca de cada uma delas numa população referência de 50 indivíduos sem PKU, sem que nenhuma delas tenha sido detectada. A mutação K274E, apesar de mudar o aminoácido, não altera a atividade da enzima PAH, fato constatado em sucessivos estudos de expressão em diferentes sistemas, empregando material por nós obtido no presente estudo, sendo considerada o primeiro polimorfismo de aminoácido descrito no gene da PAH (Gjetting et al., *in press*). Também em colaboração com esses mesmos pesquisadores, foram realizados estudos de expressão *in vitro* para a mutação nova I318T, comprovando que causa deficiência da atividade de PAH. Para os

polimorfismos N426N, L321L e IVS11nt17g→a, foram realizados estudos populacionais (Tabela X), cujos resultados demonstram que os dois primeiros são freqüentes em populações negras (13% e 8%, respectivamente). Estudos realizados por Güttler (dados não publicados) corroboram nossos achados, mostrando que os polimorfismos N426N e L321L são encontrados em 20% e em 10% de negros americanos, respectivamente.

A mutação IVS11nt17g→a não foi detectada em nenhuma amostra do estudo populacional realizado, indicando que a mesma pode estar relacionada com a doença. Faz-se necessário o estudo do transcrito do gene da PAH para verificar se essa substituição provoca alguma alteração em sítio de *splicing*.

Os métodos de detecção de mutação utilizados no presente estudo demonstraram ser sensíveis, específicos e reprodutíveis, podendo ser utilizados no diagnóstico molecular da PKU e na confirmação definitiva do seu diagnóstico bioquímico, para a distinção entre recém-nascidos que necessitam de terapia dietética daqueles que não a necessitam.

A enorme heterogeneidade genética encontrada neste trabalho contribui para o conhecimento da distribuição das mutações de PKU em nossa população, como pode ser observada na Figura 11. A população brasileira apresenta uma complexa mistura racial, podendo variar a freqüência de mutação encontrada no presente estudo, dependendo da região a ser estudada com seus padrões demográficos distintos.

Com base nos achados e na precisão dos métodos de triagem mutacional empregados, sugerimos, para análise de novos casos de PKU da região sudeste do país, o início da investigação diagnóstica direcionada para o intron 11 e exons 7 e 11

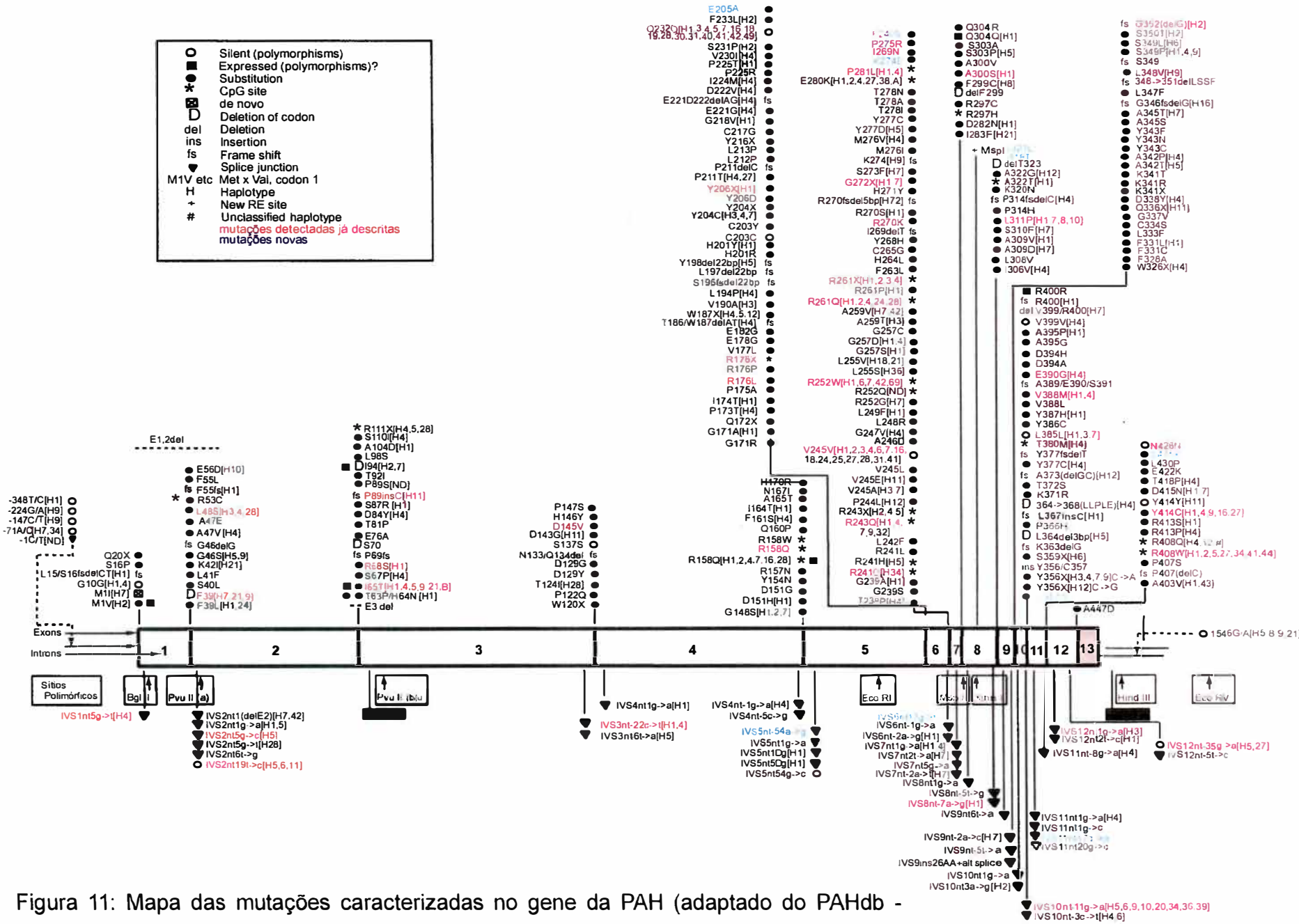


Figura 11: Mapa das mutações caracterizadas no gene da PAH (adaptado do PAHdb - http://www.mcgill.ca/pahdb)

do gene da PAH, pois os nossos resultados demonstraram que mutações nessas regiões correspondem a 50% do total de mutações detectadas (Tabela VIII). Após essa análise, para os casos não concluídos, as demais regiões codificantes do gene, incluindo funções de *splicing* e região promotora, devem ser investigadas. Um dos métodos laboratoriais de escolha seria o DGGE, uma vez que de posse de amostras controles para diversas mutações, a etapa do seqüenciamento não se faz necessária; e o outro seria o RFLP, numa investigação inicial direcionada para as mutações mais prevalentes, no caso, as mutações IVS10nt-11g→a, R261Q, V388M, R252W e R270K.

4.2 Genótipos:

Em vista da enorme heterogeneidade genética encontrada em nosso estudo, determinando o aparecimento de 78 diferentes genótipos (Tabela XIII), a maioria das mutações foi identificada em heterozigose nos pacientes com PKU, concordando com os dados da literatura (Scriver et al., 2000) quanto à afirmação que grande parte dos pacientes com PKU resulta da aquisição de duas mutações distintas (heterozigoto composto), sendo muitas das vezes localizadas em exons diferentes. Das 115 famílias estudadas, 72 são heterozigotas compostas, 26 homozigotas, 11 heterozigotas (apenas 1 alelo mutante caracterizado), 5 sem nenhuma mutação identificada e 1 em homozigose composta. Neste último caso, este trabalho descreve pela primeira vez a co-segregação das mutações R261X e IVS10nt-11g→a, ambas em homozigose. Nos genótipos homozigotos está concentrada a maioria das famílias consangüíneas, justificando assim a presença

das mutações em homozigose. Nas cinco famílias sem nenhuma mutação detectada, três delas são consangüíneas, o que indica que provavelmente apresentarão seus alelos mutantes em homozigose. Essa suposição é corroborada pelo fato de todos os pacientes dessas famílias apresentarem os seus cromossomos mutantes em homozigose para todos os sítios polimórficos intrônicos estudados no gene da PAH que definem o haplótipo.

Nossos dados reafirmam a enorme heterogeneidade genética existente no *locus* da PAH, responsável pelo grande número de genótipos possíveis, sendo a maioria deles formados por diferentes mutações oriundas de exons distintos, determinando o genótipo heterozigoto composto. Essa informação é de muita importância para a compreensão da heterogeneidade bioquímica e clínica encontrada na PKU.

4.3 Associação entre mutações e polimorfismos intragênicos:

Com a finalidade de se conhecer as bases moleculares da heterogeneidade clínica e bioquímica da PKU em nossa população, estudamos a distribuição dos haplótipos em pacientes com PKU procedentes principalmente da região sudeste do Brasil. Este estudo traz informações essenciais para o conhecimento da origem e propagação da PKU em nossa população analisada. Os haplótipos 1, 6, 4 e 9 foram os mais freqüentes encontrados em nosso estudo, sendo o 1 e o 4 os que mais apresentaram-se associados a diferentes mutações. Os haplótipos 1 e o 4 são também os mais freqüentes em populações européias (Daiger et al., 1989), e são considerados os mais antigos, encontrando-se em todas as populações analisadas

(Lichter-Konecki et al., 1994b), sugerindo que se originaram antes da divergência das raças (Hertzberg et al., 1989). Devido a isso, tais haplótipos possuem uma alta probabilidade de sofrer eventos mutacionais ao acaso, explicando a grande diversidade de mutações de PKU associados a eles (Nowacki et al., 1998). O haplótipo 6 é o segundo mais freqüente em nosso estudo, sendo encontrado em 16% dos alelos estudados, e o fato de ser freqüente em países do Mediterrâneo (Dianzani et al., 1994) indica fortemente ter sido essa a origem dos cromossomos com haplótipo 6 encontrados no Novo Mundo, provavelmente a partir de várias ondas de migração ao longo da história. O haplótipo 9, o quarto mais freqüente e associado exclusivamente com a mutação I65T, tem sido descrito no sul da Europa. Os demais haplótipos foram raros, aparecendo em geral uma única vez. Os dados apresentados neste trabalho apontam para uma origem múltipla da PKU na nossa população, pela observação tanto de mutações procedentes do Mediterrâneo (IVS10nt-11g→a, V388M, R261Q, I65T e R270K, entre outras), como do norte e centro da Europa, a exemplo da presença das mutações IVS12nt1g→a e R408W, estando associadas preferencialmente aos haplótipos 3.8 e 2.3, respectivamente, confirmando a heterogeneidade genética observada no estudo de haplótipos.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a mutação mais freqüente observada na população brasileira com PKU é a IVS10nt-11g→a, com freqüência relativa de 17,4%, estando associada aos haplótipos 39 ou 60 (4 cromossomos), e ao 6 (36 cromossomos). A presença dessa mutação é amplamente descrita em populações do Mediterrâneo (Dworniczak et al., 1991c; Guldberg et al., 1993a; Dianzani et al., 1995; Özgüç et al., 1993; Rivera et al., 1998), indicando fortemente essa origem. Pérez et al. (1996) obtiveram uma freqüência relativa similar

à nossa, de 16%, para a mutação IVS10nt-11g→a. A associação dessa mutação com o haplótipo 39 ou 60 pode ser explicada por um evento único de recombinação ocorrendo entre os sítios *Pvu*IIa e *Pvu*IIb do haplótipo mutante 6.7 com o haplótipo normal correspondente (Pérez et al., 1996).

A segunda mutação mais freqüente em nosso estudo foi a R261Q (12,2%), estando em concordância com estudos realizados em população de origem portuguesa (Rivera et al., 1998). Essa mutação apresenta uma alta freqüência relativa na Suíça, onde possivelmente ela se originou (Einsensmith et al., 1992), mas com incidência muito baixa na Espanha (Pérez et al., 1994b). O nosso estudo revelou que a mutação R261Q está associada principalmente ao haplótipo 1.8. Até o momento a segunda mutação mais freqüente em São Paulo é a R261Q e não a V388M, como relatada por Pérez et al., (1996).

A mutação V388M, descrita pela primeira vez por Leandro et al. (1995) em população branca de Portugal foi a terceira mais freqüente em nosso estudo (9,1%), associada exclusivamente ao haplótipo 1.7. Essa incidência está em acordo com a descrita por Pérez et al. (1996). A associação dessa mutação somente com o haplótipo 1 e o alelo de VNTR de 7 repetições, observada em nosso resultados, demonstra que sua origem é de Portugal já que na Espanha essa mutação não se encontra associada a esse mesmo haplótipo (Pérez et al., 1997).

As duas outras mutações mais freqüentes foram a R252W (6,5%) e a R270K (4,8%), estando associadas predominantemente ao haplótipo 1.8. Essas mutações apresentam incidência semelhante com os trabalhos de Okano et al. (1989) e Leandro et al., (1995), respectivamente.

As demais mutações encontradas na população analisada apresentaram freqüências relativamente baixas, estando descritas também em outras populações (Tyfield et al., 1997; Okano et al., 1998).

Algumas mutações apresentaram-se associadas a haplótipos raros, afirmando a enorme heterogeneidade genética e diversidade de origem das mutações identificadas no presente trabalho. Para as dez mutações novas detectadas, foi possível definir o haplótipo de seis delas, a partir da dedução das suas associações com os polimorfismos Q232Q, V245V, L385L e IVS12nt-35c→t, que confirmam com uma grande probabilidade o haplótipo associado (Lichter-Konecki et al., 1994a).

Nossos resultados mostraram que as mutações R261Q, R261X, R252W, P281L e R408W, estiveram associadas a diferentes haplótipos, podendo ser explicado por recorrência (Eisensmith et al. 1995), pelo fato dessas mutações afetarem um dinucleotídeo CpG.

A análise de associação entre mutações e haplótipos realizada no presente trabalho, reflete uma origem predominantemente européia das mutações encontradas, como conseqüência de migrações históricas também descritas em outras populações latino-americanas (Desviat et al., 1993; Pérez et al., 1996; De Lucca et al., 1998; Pérez et al., 1999). Esses resultados refletem uma grande heterogeneidade genética presente em nossa população, devido a uma composição étnica procedente de diferentes populações.

4.4 Correlação genótipo-fenótipo:

Sabendo que os dados da literatura (Bénit et al., 1999; Okano et al., 1998) afirmam que o genótipo mutante é o determinante no fenótipo metabólico da deficiência da PAH, realizamos uma análise da correlação genótipo-fenótipo, visando fornecer essa informação estudando pacientes com PKU em nossa população. Esse estudo foi baseado nos níveis de fenilalanina pré-tratamento e nos valores de ARP da PAH obtidos a partir de estudos de expressão realizados *in vitro*, segundo Güttler et al. (1999) e Guldberg et al. (1998).

A correlação genótipo-fenótipo foi realizada apenas nas 99 famílias que foram completamente genotipadas, sendo 72 famílias com seus alelos mutantes em heterozigose composta, e as 27 restantes em homozigose, destas, uma é homozigota composta.

Os pacientes foram classificados em 4 formas clínicas: clássica, moderada, leve e HPA. É interessante notar que algumas mutações foram encontradas em mais de uma classificação de PKU/HPA (Tabela XXI), indicando que a gravidade do fenótipo da PKU pode ser modificada por outros fatores genéticos e não-genéticos.

As mutações, IVS10nt-11g→a e R252W, reconhecidas como graves, quando em homozigose resultaram tanto em formas graves quanto em moderadas, havendo um paciente que apresentou a forma leve possuindo a R252W em homozigose. Por outro lado, as mutações R261Q e V388M consideradas leves, quando em homozigose, resultaram em formas clássicas ou moderadas; apresentando-se como leve quando em combinação com mutações moderadas ou leves. A mutação Y414C também considerada como leve, resultou em forma moderada quando associada à mutação R252W, e em forma leve quando associada

à mutação IVS10nt-11g→a. Duas mutações, a R158Q e a R252W, estiveram presentes em 3 diferentes combinações, nas formas clássicas, moderadas e leves.

Nas formas leves de PKU e de HPA, encontram-se as mutações D145V, R176L, Y206X, R243Q, R252W, E390G e Y414C. A mutação A300S esteve presente apenas na forma de HPA. A mutação Y206X que esteve presente apenas associado à mutação grave R176X, teoricamente causaria a forma clássica da PKU, mas como esteve presente num paciente com a forma leve da PKU, podemos considerá-la como sendo leve.

Com esse estudo fornecemos informações importantes quanto às correlações genótipo-fenótipo, analisadas numa população brasileira. O presente trabalho indica que determinando os genótipos de pacientes com PKU, detectados logo após a triagem neonatal, pode ser estabelecida uma predição rápida dos fenótipos bioquímico e clínico, permitindo uma otimização na implementação da dieta para cada indivíduo afetado.

Em resumo, a análise molecular de indivíduos com PKU predominantemente da região sudeste do Brasil, realizada no presente trabalho, revela um espectro heterogêneo das mutações, indicando diferentes origens étnicas e geográficas. É de grande importância do ponto de vista de confirmação diagnóstica, auxilia no prognóstico e otimiza a terapia dietética a ser implementada nos pacientes com PKU. Esse estudo também possibilita a realização de um aconselhamento genético adequado às famílias de risco, como a possibilidade de detecção de portadores e de diagnóstico pré-natal.

5. CONCLUSÕES

Para a investigação das bases moleculares da PKU, faz-se necessária a utilização de uma abordagem de investigação laboratorial muito ampla, como a utilizada neste trabalho, visando cobrir toda região codificante, incluindo funções de *splicing* e a região promotora do gene. Porém, baseando-se em nossos resultados, a estratégia de investigação pode ser mais focalizada, levando-se em consideração o panorama mutacional encontrado na população analisada.

Os resultados do presente estudo demonstram uma heterogeneidade genética na população de PKU analisada, em virtude da grande quantidade de mutações detectadas, com distribuição heterogênea das mutações ao longo do gene da PAH, freqüências relativamente raras das mutações encontradas e detecção de mutações novas.

A mutação para PKU predominante na região sudeste do país é a IVS10nt-11g→a, sendo as demais relativamente raras. As cinco mutações mais freqüentes, IVS10nt-11g→a, R261Q, V388M, R252W e R270K, representam 50% do total das mutações detectadas. Com isso, numa investigação de casos novos, sugerimos o início da investigação direcionada para essas mutações.

Os métodos de triagem mutacional utilizados neste trabalho, DGGE e SSCP, mostraram-se eficazes, com taxas de detecção de mutação em concordância com a da literatura. A porcentagem de não detecção (9%) reflete a heterogeneidade genética da PKU em nossa população, indicando que os alelos mutantes não definidos devem corresponder a mutações muito raras de difícil detecção, possivelmente não descritas.

A diversidade de haplótipos detectada neste trabalho está em concordância com o grande número de mutações encontradas, sendo o haplótipo 1.8 o mais freqüente e o que mais esteve associado com mutações variadas.

As mutações mais prevalentes observadas neste trabalho refletem uma origem predominantemente européia, principalmente da região Mediterrânea, concordando com os dados de associação das mutações com os haplótipos de PKU encontrados em nossa investigação.

A maioria dos genótipos encontrados nos pacientes com PKU é de heterozigotos compostos, em concordância com a enorme heterogeneidade genética encontrada. Os casos de homozigose foram provenientes, na sua maioria, de famílias consangüíneas.

Os dados de correlação genótipo-fenótipo determinados por este estudo, devem ser utilizados no manejo clínico dos pacientes com PKU, auxiliando na otimização da terapia dietética. Para os casos novos, servirão também para

estabelecer o prognóstico e orientação da dieta a ser implementada no início do tratamento.

Nosso trabalho possibilita ainda o diagnóstico de certeza da PKU, permitindo aconselhamento genético adequado às famílias de risco, viabilizando a detecção de portadores e a realização de diagnóstico pré-natal.

6. ANEXOS

6.1 PROTOCOLO DE ENTREVISTA:

I- IDENTIFICAÇÃO (dos indivíduos com amostras de sangue coletadas):

NOME:

PACIENTE:_____

PAI:_____

MÃE: _____

OUTROS (especificar parentesco):

_____

IDADE: ____ DATA DE NASCIMENTO: _____ DATA DA COLETA: ___

II- ENDEREÇO:_____

III- NATURALIDADE:_____ IV- ASCENDÊNCIA:_____

V- RAÇA: ( ) branco ( ) negro ( ) índio ( ) mulato ( ) amarelo/asiático

VI- CONSANGÜINIDADE PARENTAL: ( ) SIM NÃO ( )

VII- OUTROS CASOS NA FAMÍLIA: ( ) SIM/especificar quantos e parentesco:
( ) NÃO

VIII- FORMA DO DIAGNÓSTICO: ( ) screening neonatal ( ) doença ( ) outros/especificar: _____

IX- DOSAGEM DA FENILALANINA (ao diagnóstico): _____

X- MANIFESTAÇÃO CLÍNICA: ( ) assintomático ( ) leve ( ) moderado ( ) grave

XI- TRATAMENTO: início (data ou idade):_____/duração:_____
resposta terapêutica: ( ) melhora ( ) piora ( )inalterada

6.2 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – PARECER:

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 16 de março de 1998

Ofício nº 534/98
CEP/SPC

Senhor Professor:

O trabalho intitulado **"ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DA FENILALANINA HIDROXILASE EM PACIENTES COM FENILCETONÚRIA"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 26ª Reunião Ordinária realizada em 16.03.98 e foi enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 4176/96.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de consideração.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de
Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. MARCO ANTONIO ZAGO
Depto. de Clínica Médica

6.3 ARTIGOS:

A phenylalanine hydroxylase amino acid polymorphism with implications for molecular diagnostics

Torben Gjetting[1], Anne Romstad[1], Jan Haavik[2], Per M. Knappskog[3], Angelina X. Acosta[4], W. Araújа Silva Jr[5], Marco A. Zago[4], Per Guldberg[1] and Flemming Güttler[1]

[1]The John F. Kennedy Institute, Glostrup, Denmark; [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Bergen, Norway; [3]Department of Medical Genetics, Haukeland Hospital, Bergen, Norway; [4]Department of Medical Clinics, Faculty of Medicine of São Paulo University, Ribeirão Preto, SP, Brazil, [5]Department of Genetics, Federal University of Para, Belém, PA, Brazil.

Running title: Silent PAH amino acid polymorphism

Address correspondence to:
Flemming Güttler, M.D., Ph.D.,
The John F. Kennedy Institute,
Gl. Landevej 7, DK-2600 Glostrup, Denmark.
Phone +45 4326 0100.
Fax +45 4343 1130.

Abstract

Phenylalanine hydroxylase (PAH) catalyses the conversion of phenylalanine to tyrosine. Mutations in the *PAH* gene are associated with various degrees of hyperphenylalaninemia, including classical phenylketonuria (PKU). We examined the *PAH* gene in a PKU family from Brazil and identified three missense variants, of which two (K274E and I318T) were transmitted in *cis*. Expression analyses in two different in vitro systems showed that I318T is associated with partially impaired enzyme activity, consistent with the mild phenotype of the patient, whereas the enzyme activity of K274E is indistinguishable from that of the wild-type protein. Detailed kinetic analyses of PAH expressed in *E. coli* showed that the K274E mutant protein has kinetic properties similar to the wild-type protein. Population studies have suggested that the K274E variant occurs on approximately four percent of African-American *PAH* alleles, whereas the neonatal screening incidence of PKU among African-Americans is only 1:100,000. This is to our knowledge the first demonstration of a PAH missense variant with no apparent association to PAH deficiency. Awareness of this common variant may be helpful to laboratories that perform molecular diagnosis of PAH deficiency in populations of southern American or African origin.

Human phenylalanine hydroxylase (PAH, EC 1.14.16.1) is a hepatic enzyme that catalyses the irreversible conversion of phenylalanine to tyrosine. Mutations in the *PAH* gene segregate in an autosomal recessive pattern in families with phenylketonuria (PKU), a disorder characterised by hyperphenylalaninemia and development of mental retardation in patients exposed to normal amounts of dietary phenylalanine. The frequency of PAH deficiency varies considerably among different ethnic groups, from 1 in 4,000 in Ireland to 1 in 119,000 in Japan.[1]

More than 400 different sequence variants at the *PAH* locus have been identified worldwide, the vast majority being missense mutations (PAHdb; www.mcgill.ca/pahdb). The multitude of mutations is reflected in the phenotypic variability of PAH deficiency, spanning from classical PKU requiring rigorous phenylalanine restriction to mild hyperphenylalaninemia with no need for dietary correction.[2] In most cases, there is a direct correlation between the *PAH* mutation genotype and the metabolic phenotype, and large-scale studies have established the phenotype associations for a large number of *PAH* mutations.[3 4] This systematic compilation of data has made mutational analysis of the *PAH* gene in hyperphenylalaninemic newborns a powerful diagnostic tool, not only for establishing PAH deficiency as the cause of hyperphenylalaninemia, but also for predicting the phenotype, for designing an optimal dietary therapy, and for highly informative genetic counselling.

One potential pitfall inherent in the use of genetic data in the diagnosis and treatment of PAH deficiency is that only a minority of known mutations have unambiguously been shown to cause enzyme impairment. Due to the relatively large size of the *PAH* gene (13 exons and a 1453-bp open reading frame), mutations have

usually been identified by partial gene analysis, implying that the search for mutations is stopped once two putative disease causing sequence variants have been identified. Furthermore, only few *PAH* mutations have been examined by in vitro expression analysis to further support their pathogenic nature. In this report we describe a missense variant in the *PAH* gene, which was initially considered disease causing on the basis of partial gene analysis and family studies, but on the basis of complete gene analysis, expression studies and population studies appears to be a silent polymorphism.

During screening for neonatal hyperphenylalaninemia in Brazil, we identified a patient with an elevated blood phenylalanine concentration of 16 mg/dl (970 μmol/l), corresponding to a mild PKU phenotype. Initially, PCR amplification and direct sequence analysis of exon 7 of the *PAH* gene had revealed two mutations; the known classical-PKU mutation, R252W, and a novel mutation, K274E.[5] Examination of the parents' *PAH* alleles showed that R252W was inherited from the father and K274E from the mother. However, by exhaustively scanning the *PAH* gene by PCR in combination with denaturing gradient gel electrophoresis,[6] we later identified an additional mutation in exon 9; a T-to-C transition at the second base of codon 318, resulting in the substitution of isoleucine with threonine (fig 1a). The I318T variant was present in DNA from both the patient and her mother, and thus was inherited in *cis* with the K274E mutation (fig 1b).

To further investigate the implications of the three mutations, K274E, R252W and I318T, on PAH activity, mutant and wild-type forms of the human PAH cDNA (bases 223-1578) were inserted into a bacterial expression vector (pET-11) and expressed in *E. coli*. Western blot analysis of bacterial extracts showed a major band corresponding to the full length protein of 52 kDa, and additional bands migrating 5-7

kDa faster, corresponding to truncated proteolytic PAH polypeptides made by *E. coli*.[7] Because the pathogenic effect of *PAH* missense mutations is often due to misfolding and increased degradation of PAH,[8 9] it usually is not reasonable to accurately calculate residual activities associated with mutant PAH enzymes. Nevertheless, incubation of *E. coli* extracts in the presence of the substrate L-phenylalanine and the natural cofactor, tetrahydrobiopterin (BH_4), clearly showed that PAH-252W is completely devoid of enzyme activity and that PAH-318T has significantly reduced enzyme activity. In contrast, PAH-274E has a level of activity that is similar to that of the wild-type protein (fig 2a). Similar results were obtained when the mutant and wild-type forms of PAH cDNA were examined by in vitro translation in rabbit reticulocyte lysates (fig 2b).

In order to obtain pure enzyme for detailed kinetic analyses, the K274E mutant enzyme was expressed as a fusion protein in *E. coli* (pMAL-system), cleaved from the fusion partner and purified to homogenity. The purified protein showed a specific activity and kinetic properties comparable to the wild-type enzyme (table 1). The mutant enzyme showed a positive cooperativity of phenylalanine binding (Hill coefficient ~ 2.4) and was inhibited at substrate concentrations > 0.5 mM, that is similar to the wild-type enzyme (fig 3).[10]

Most of the known PKU-associated PAH mutants appear to suffer from a decreased stability in vivo and in vitro and an increased intrinsic tendency to aggregate. Thus, although the K274E mutant was expressed at similar levels and had kinetic properties similar to the wild-type protein, a decreased stability in situ could affect its catalytic efficiency under in vivo conditions. We have recently determined the thermodynamic stability and oligomeric structure of wild-type human PAH and found that in the presence of increasing concentrations of urea, a stepwise dissociation occurs

of the native tetrameric protein to increasingly denatured dimeric and monomeric forms.[11] In the present study, we determined the molecular dimensions of either wild-type PAH or the K274E mutant, which previously had been exposed to 0-8 M urea. In these experiments, no significant differences between the wild-type and mutant forms were observed, indicating that the two enzymes had similar oligomeric structures and thermodynamic stabilities.

In a recent study of the *PAH* gene in African Americans, we identified the K274E variant in 8% of individuals (n=13) with no family history of PAH deficiency (unpublished data). Although we have not identified a K274E homozygote among normal controls and therefore cannot formally exclude that K274E is associated with PAH deficiency, several lines of evidence strongly suggest that it is a silent variant that should be classified as an amino acid polymorphism. First, a carrier frequency of 8% for a disease causing mutation would not be compatible with the low incidence of PAH deficiency (1:100,000) among African Americans. Second, K274E is associated with normal enzyme activity in two different in vitro expression systems and has kinetic properties similar to the wild-type protein. Third, in a patient with PAH deficiency, K274E was inherited in *cis* with a second putative disease causing mutation, I318T, that was not present on normal K274E alleles and caused reduced enzyme activity in vitro. Fourth, lysine at residue 274 of human PAH is not highly conserved during evolution and is substituted with various other hydrophilic amino acids in other species, most notably glutamic acid in *Pseudomonas aeruginosa.*[12]

Double mutant alleles have been reported in a wide range of inherited disorders and represent a significant problem in molecular diagnostics. At least three double mutant *PAH* alleles have been identified in patients with PAH deficiency, including

R413P-Y414C,[13] R252W-R408W[14] and E183Q-R408W.[15] These alleles are all rare and probably arose by the coincidental introduction of a second mutation into one of the common Y414C or R408W mutant *PAH* alleles. The K274E mutation described in this report is to our knowledge the first example of a missense variant that occurs on normal *PAH* alleles at a relatively high frequency. Our findings underscore the importance of examining the entire disease associated gene in diagnostic settings, and suggest that the disease causing status of many mutations must be revisited, for example by vitro expression analysis or sequence alignment of related genes of the same or other species.[16]

Acknowledgements

We thank Marie Petersen and Sidsel E. Rise for technical assistance. This work was supported by The Danish Health Insurance Foundation (11/220-99), The Danish Medical Research Counsil (9902901), The Research Council of Norway, The Lundbeck Foundation, The Novo Foundation, The Plasmid Foundation, Franz Hoffmann's Memorial Fund, Ernst and Vibeke Husman's Fund and Direktør Jacob Madsen and hustru Olga Madsen's Fund.

References

1 Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC. The hyperphenylalaninemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill, 1995: 1015-1075.

2 Güttler F. Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr Scand* 1980;**Suppl. 280:**1-80.

3 Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR. Human PAH mutation and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 1997;1309-1317.

4 Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B, Michiels L, Ullrich K, Burgard P, Schmidt H, Meli C, Riva E, Dianzani I, Ponzone A, Rey J, Güttler F. 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* 1998;**63:**71-79.

5 Acosta AX, Silva Jr WA, Marcucci M, Carvalho TM, Zago MA. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in the Brazilian population. *Am J Hum Genet* 1998;**63, Supplement:**A348.

6 Guldberg P, Levy HL, Hanley WB, Koch R, Matalon R, Rouse BM, Trefz F, de la Cruz F, Henriksen KF, Güttler F. Phenylalanine hydroxylase gene mutations in

the United States. Report from the Maternal PKU Collaborative Study. *Am J Hum Genet* 1996;**59:**84-94.

7 Knappskog PM, Eiken HG, Martinez A, Olafsdotti S, Haavik J, Flatmark T, Apold J. Expression of wild type and mutant forms of human phenylalanine hydroxylase in E. coli. *Adv Exp Med Biol* 1993;**338:**59-62.

8 Eiken HG, Knappskog PM, Apold J, Flatmark T. PKU mutation G46S is associated with increased aggregation and degradation of the phenylalanine hydroxylase enzyme. *Hum Mutat* 1996;**7:**228-238.

9 Waters PJ, Parniak MA, Hewson AS, Scriver CR. Alterations in protein aggregation and degradation due to mild and severe missense mutations (A104D, R157N) in the human phenylalanine hydroxylase gene (PAH). *Hum Mutat* 1998;**12:**344-354.

10 Knappskog PM, Haavik J. Tryptophan fluorescence of human phenylalanine hydroxylase produced in Escherichia coli. *Biochemistry* 1995;**34:**11790-11799.

11 Kleppe R, Uhlemann K, Knappskog PM, Haavik J. Urea-induced denaturation of human phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem* 1999;**274:**33251-33258.

12 Zhao G, Xia T, Song J, Jensen RA. Pseudomonas aeruginosa possesses homologues of mammalian phenylalanine hydroxylase and 4 alpha-carbinolamine dehydratase/DCoH as part of a three-component gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;**91:**1366-1370.

13 Guldberg P, Levy HL, Henriksen KF, Güttler F. Three prevalent mutations in a patient with phenylalanine hydroxylase deficiency: implications for diagnosis and genetic counselling. *J Med Genet* 1996;**33:**161-164.

14 Svensson E, von Döbeln U, Eisensmith RC, Hagenfeldt L, Woo SL. Relation between genotype and phenotype in Swedish phenylketonuria and hyperphenylalaninemia patients. *Eur J Pediatr* 1993;**152:**132-139.

15 Hennermann JB, Vetter B, Wolf C, Windt E, Buhrdel P, Seidel J, Monch E, Kulozik AE. Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in eastern Germany: A characteristic molecular profile and 15 novel mutations. *Hum Mutat* 2000;**15:**254-260.

16 Bottema CDK, Ketterling RP, Li S, Yonn HS, Phillips III, Sommer SS. Missense mutations and evolutionary conservation of amino acids: Evidence that many of the amino acids inh factor. *Am J Hum Genet* 1991;**49:**820-838.

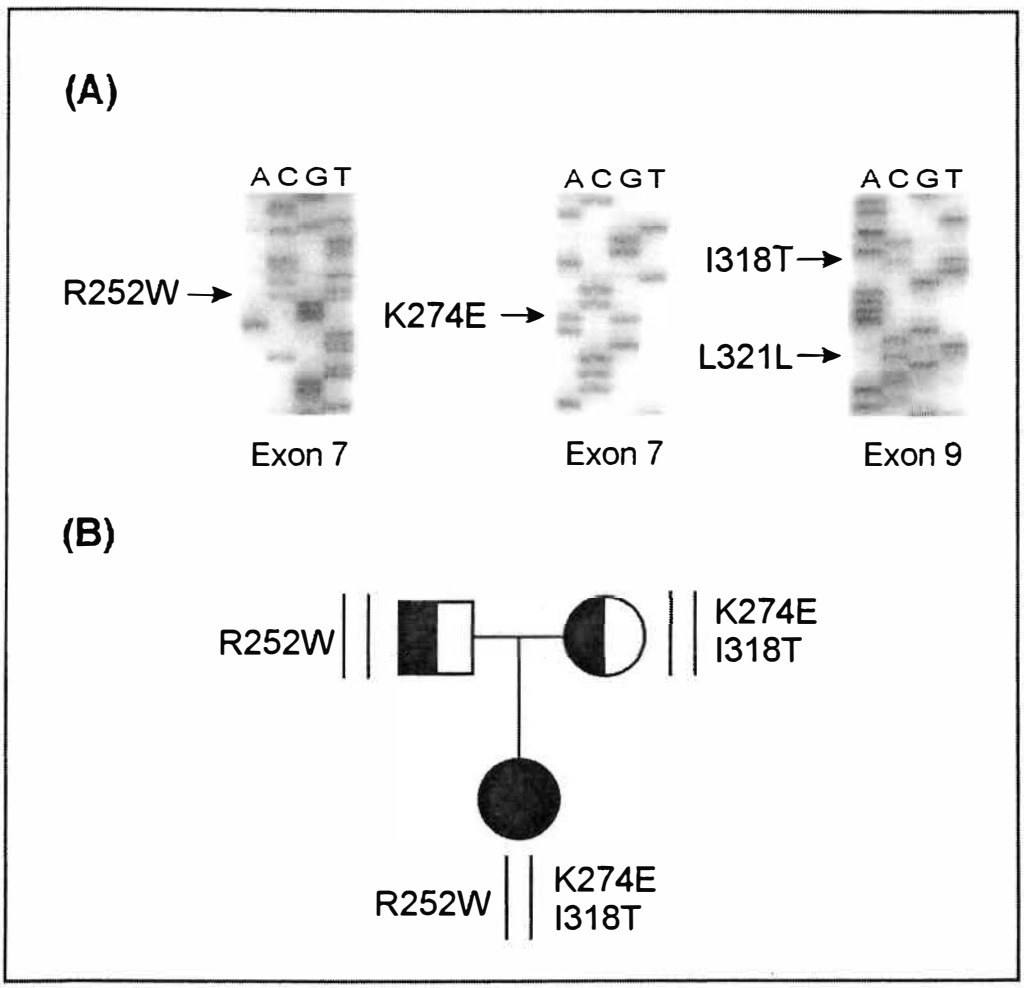
17 Knappskog PM, Eiken HG, Martínez A, Bruland O, Apold J, Flatmark T. PKU mutation (D143G) associated with an apparent high residual activity: expression of a kinetic variant form of phenylalanine hydroxylase in three different systems. *Hum Mutat* 1996;**8:**236-246.

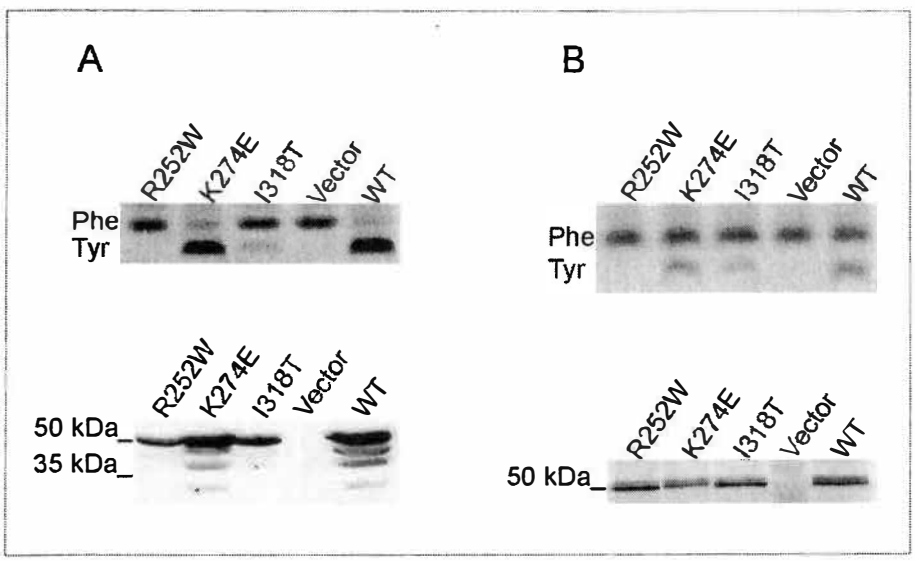
Legends to figures

Figure 1. Segregation *in cis* of *PAH* mutations K274E and I318T in a Brazilian PKU family. (a) Partial sequence ladders of *PAH* exons 7 and 9, showing the R252W (C-to-T), K274E (A-to-G) and I318T (T-to-C) variants in the proband. (b) Pedigree showing the segregation of the mutant K274E-I318T and R252W *PAH* alleles.

Figure 2. In vitro expression analysis of wild-type PAH and the mutant variants, R252W, K274E and I318T. (a) Expression in *E. coli*. Wild-type and mutant pET-hPAH constructs[7] were expressed in the *E. coli* strain, HMS174 DE3 (Novagen). Upper panel, SDS-PAGE analysis of *E. coli* extracts followed by immunoblotting using the monoclonal anti-PAH antibody PH8 (PharMingen). Lower panel, PAH enzyme assay measuring the conversion of [^{14}C]phenylalanine to [^{14}C]tyrosine in extracts from *E. coli*. (b) Expression in rabbit reticulocyte lysates. Wild-type and mutant pcDNA3-PAH constructs[17] were expressed using the T7-based coupled transcription-translation system (Promega), according to the manufacturer's instructions. Upper panel, SDS-PAGE analysis of in vitro translation reactions. Lower panel, PAH enzyme assay.

Figure 3. The effect of L-phenylalanine on the activity of wild-type hPAH (○) and the K274E mutant (●). The purified enzymes (30 ug/ml) were incubated for 5 min at 30 °C in the presence of 0.2 mM tetrahydrobiopterin, 1 mg/ml catalase, 0.1 mM Fe(II)SO_4, and different concentrations of phenylalanine in 100 mM NaHepes pH 7.0, as previously described.[10]


(A)
A C G T
A C G T
A C G T
R252W
K274E
I318T
L321L
Exon 7
Exon 7
Exon 9
(B)
R252W
K274E
I318T
R252W
K274E
I318T


A
R252W
K274E
I318T
Vector
WT
Phe
Tyr
R252W
K274E
I318T
Vector
WT
50 kDa
35 kDa
B
R252W
K274E
I318T
Vector
WT
Phe
Tyr
R252W
K274E
I318T
Vector
WT
50 kDa

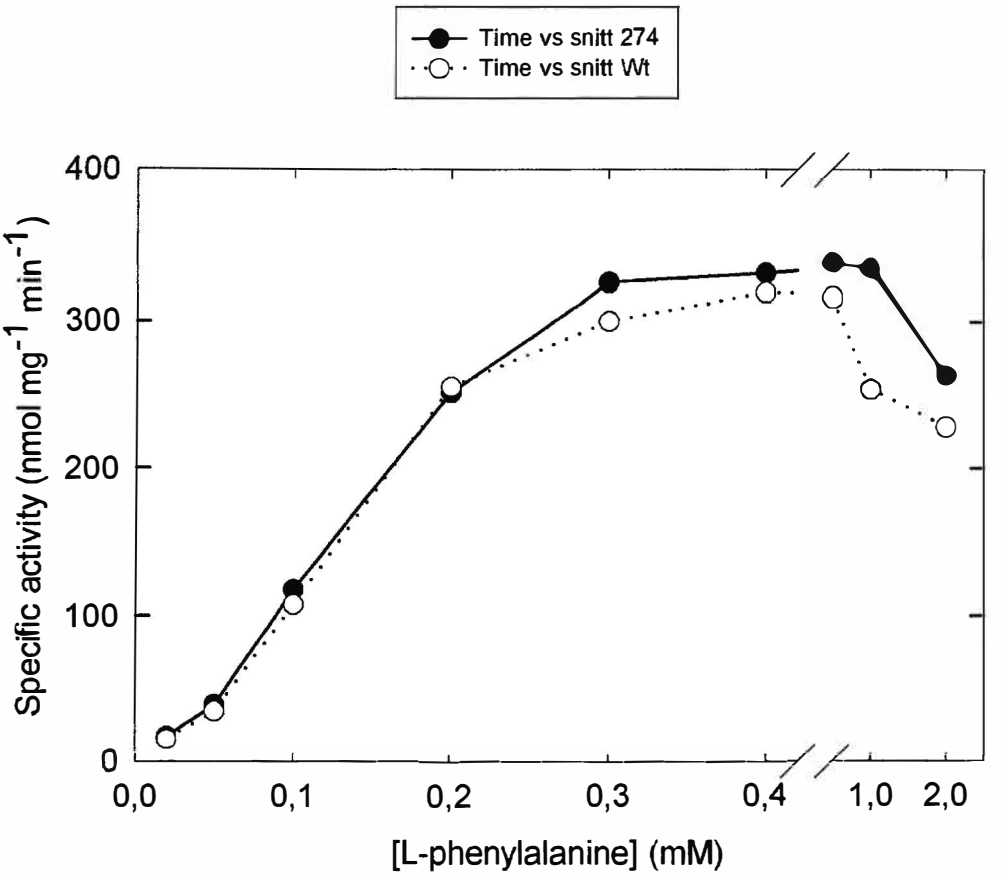

Time vs snitt 274
Time vs snitt Wt
Specific activity (nmol mg-1 min-1)
400
300
200
100
0
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
1,0
2,0
[L-phenylalanine] (mM)

Table 1. Kinetic parameters

	$[S]_{0.5}$ (L-Phe)	Km (BH_4)	Hill coeficient (L-Phe)
PAH-WT	121	24	2.4
PAH-274E	125	22	2.4

Kinetic parameters for the wild-type (WT) enzyme are from Knappskog and Haavik (1995).[10] Data for the K274E mutant represent average values from triplicate experiments with less than 10% difference beteen measurements.

HUMAN MUTATION

Publisher: Wiley-Liss • A Division of John Wiley & Sons, In

Managing Editor:
Mark H. Paalman, Ph.D.

Editorial Assistant:
Kathleen Gantenume

Human Mutation Editorial Office
John Wiley & Sons, Inc.
605 Third Avenue
New York, NY 10158-0012
Telephone: (212) 850-6404
Fax: (212) 850-6398
E-mail: humu@wiley.com
www.wiley.com/humanmutation

Editors:
Dr. Richard G.H. Cotton
Head, Mutation Research Centre
St. Vincent's Hospital
Melbourne, Australia

Dr. Haig H. Kazazian, Jr.
Chairman, Department of Genetics
University of Pennsylvania
Philadelphia, Pennsylvania, USA

Electronic Editors:
Riccardo Fodde
Daniel F. Schorderet

Advisory Editors:
Stylianos E. Antonarakis
Sir Walter F. Bodmer
C. Thomas Caskey
Francis S. Collins
Leroy E. Hood
Y.W. Kan
Eric S. Lander
Victor A. McKusick
Leon E. Rosenberg
Charles R. Scriver
Douglas C. Wallace
David Weatherall

Communicating Editors:
Stylianos E. Antonarakis
Norman Arnheim
Arleen Auerbach
Vladislav Baranov
Jacques S. Beckmann
Martin Bobrow
Anne-Lise Børresen-Dale
Peter Byers
Farid F. Chehab
David N. Cooper
Garry R. Cutting
Henrik Dahl
Albert de la Chapelle
Mireille Claustres
Robert J. Desnick
Randy C. Eisensmith
Riccardo Fodde
Paolo M. Fortina
Uta Francke
Andreas Gal
Michel Goossens
Kenshi Hayashi
Jürgen Horst
Peter Humphries
Y.W. Kan
Jean-Claude Kaplan
Jan P. Kraus
Ulf Landegren
Jean-Louis Mandel
Christopher G. Mathew
Iain McIntosh
Elizabeth F. Neufeld
Sergio Ottolenghi
Peter L. Pearson
Leena Peltonen
Darwin J. Prockop
David L. Rimoin
Daniel F. Schorderet
Gregg L. Semenza
Nobuyoshi Shimizu
William S. Sly
Ellen Solomon
Steve S. Sommer
Graham Taylor
Lap-Chee Tsui
Edward G.D. Tuddenham
Linda Tyfield
Christine Van Broeckhoven
David W. Yandell
Johannes Zschocke

13 November, 7000

Dr. A.X. Acosta
Fundacao Hemocentro de Ribeirao Preto
Rua Tenente Catao Roxo, 2501
CEP14051-140-Ribeirao Preto-SP
Brazil
Fax: 55-16-633-40.09

web/2000/182

Dear Dr. Acosta:

We are pleased to inform you that your manuscript "Novel Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene observed in Brazilian patients with phenylketonuria" by Acosta et al., has completed the review process and has been accepted for publication as a Mutation in Brief in *Human Mutation* (Acceptance date: 11/10/00).

Please complete the attached copyright transfer agreement and return it by fax to the address above. *Please note that we must receive your signed copyright transfer agreement in order to be able to publish your manuscript.*

You will be receiving proofs from our production department. Please check them carefully and return them promptly to the publisher.

Thank you for contributing to *Human Mutation*.

Sincerely,

Mark Paalman

Mark H. Paalman, Ph.D.
Managing Editor

MHP/kg

copyright transfer agreement/enclosures
/cc

Ten novel mutations in the phenylalanine hydroxylase gene observed in Brazilian patients with phenylketonuria

AX Acosta[1], WA Silva Jr[1], TM Carvalho[2], and M.A. Zago[1]

[1]Faculty of Medicine of Ribeirão Preto and Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, [2]APAE-SP (Associação de Pais e Amigos de Excepcionais).

*Correspondence to Angelina X. Acosta

Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Rua Tenente Catão Roxo, 2501, CEP14051-140 - Ribeirão Preto-SP.

E-mail: axacosta@usp.br

Fax: 55 16 6334009

Contract grant sponsor: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo); Contract grant number: 98/09083-4.

Short Title: Novel Mutations in PAH gene

Communicated by <Please don't enter>

ABSTRACT

In the present study we report on the identification of ten novel mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene of Brazilian patients with phenylketonuria (PKU):IVS5nt-54a→g, IVS6nt17g→t, E205A, F240S, K274E, I318T, L321L, C357G, IVS11nt17g→a and S411X. These mutations were detected during the characterization of the PAH genotypes of 115 patients with PKU from the southeast region of Brazil. The results obtained confirm the high heterogeneity of the PAH gene and provide information about the distribution of PKU mutations in the Brazilian population.

2000 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS **PAH, PKU, new mutations**

INTRODUCTION

Phenylketonuria (PKU) is the most prevalent disorder of amino acid metabolism, with a frequency of 1 in 10,000 Caucasians, and is caused by a defect in the hepatic enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH; MIM#261600), which converts phenylalanine to tyrosine (Scriver et al., 1995). PKU is highly heterogeneous at the molecular level. To date more then 400 different mutations in the PAH gene (Nowacki et al. 1998; Scriver et al. 2000) have been described associated with different geographical and ethnic groups.

In the present study we report on the identification of ten novel mutations in Brazilian patients with hyperphenylalaninemia using PCR, DGGE analysis and direct sequencing of PCR products, including both disease-associated mutations and single nucleotide polymorphisms.

PATIENTS & METHODS

1- Patients

A total of 115 PKU families (292 individuals, 126 of them being patients and 166 relatives) mainly from the southeast region of Brazil were investigated. The patients were identified by a neonatal screening program and were considered to have PKU when the phenylalanine levels were above 4 mg/dl.

2- Methods

DNA from each individual was extracted from peripheral blood leukocytes by standard techniques (Kunkel et al., 1977) and screened for mutations by PCR amplification of the entire PAH gene, including all 13 exons, splice regions and promoter region, using DGGE, SSCP and sequence analysis. To evaluate the prevalence of single nucleotide polymorphisms (L321L, N426N and IVS11nt17g→a) we performed a population study on 50 Caucasian, 40 Asian and 50 African-American individuals. For the disease-associated mutations we tested a control sample of 50 individuals without PKU. Haplotypes and VNTRs were determined as described by Goltsov et al. (1992).

RESULTS AND DISCUSSION

In this study we detected ten novel mutations including both disease-associated mutations and single nucleotide polymorphisms: IVS5nt-54a→g, IVS6nt17g→t, E205A, F240S, K274E, I318T, L321L, C357G, IVS11nt17g→a and S411X (Table 1).

The novel polymorphism IVS5nt-54a/g (c.510–54a→g) was observed in PKU patients from three independent families. The disease was identified during neonatal diagnosis and the patients received diet therapy promptly, and are asymptomatic. In all families, IVS5nt-54a/g (frequency of 8 chromosomes) occurred in *cis* with two other reported polymorphisms of the PAH gene: Q232Q, localized in exon 6, and V245V localized in exon 7, and a well known substitution - R176L – localized in exon 6. IVS5nt-54a/g was in homozygosis in the patient of family 2 and in the patient's mother of family 3. IVS6nt17g/t (c.706+17g→t) was observed only in the patient's mother of family 1. The novel polymorphisms (IVS5nt-54a/g and IVS6nt17g/t) present the 4.3 haplotype due the other known associated substitutions. Although we did not perform a population study we can assume that these mutations are polymorphisms because all the patients of all families have two other well known substitutions in the PAH gene that cause PKU, and the patient´s mother of family 3 does not have PKU, in spite of having the IVS5 in homozygosis.

In one family a PKU patient (sporadic case) presented the E205A mutation, which was an a614c substitution in the PAH gene in exon 6 at amino acid 205, resulting in a missense mutation. The patient had a neonatal diagnosis, with phenylalanine level indicating moderate PKU, and received diet therapy soon after, being currently asymptomatic. This mutation was not observed in the 50 normal subjects tested. This mutation was inherited from her father and occurred in *cis* with a N426N polymorphism (Aulehla-Scholz 1999). A population analysis suggests that this polymorphism is limited to black populations, with a frequency of 13% (13/100 chromosomes), and was not found in a control population of

Caucasians (0/100) and Asians (0/80). The 4.3 haplotype was linked with the E205A mutation and the N426N polymorphism.

The t719c substitution in exon 7 of the PAH gene at amino acid 240 results in a missense mutation. The F240S mutation creates a restriction site for the *Nla*IV enzyme, and the RFLP study of 50 normal individuals did not reveal any sample with this mutation. This substitution was found in a PKU patient (sporadic case) and her mother. One reported IVS2nt19t→c polymorphism occurred in *cis* to the F240S mutation, as the mother had these substitutions in the same status. The presence of this polymorphism was important to help the definition of the linked haplotype, since according to Lichter-Konecki et al. (1994) some polymorphisms confirm with high probability the linked haplotype, which in this case was 6.9. The patient is asymptomatic due to early diagnosis and diet therapy started at the age of 3 months.

The substitutions K274E (c.820A→G), L321L (c.963C→T) and I318T (c.953T→C) were detected in only one PKU family transmitted in *cis* (Gjetting et al., *in press*), probably associated with the 15.9, 37.9 or 80.9 haplotype. A population study of the polymorphism L321L showed a frequency of 8% (8/100 chromosomes) in a black population. The K274E is an amino acid polymorphism, and the substitution I318T is a disease-causing mutation (Gjetting et al., *in press*).

The t1069g substitution in the PAH gene in exon 11 at amino acid 357 results in a missense mutation. The C357G mutation abolishes a restriction site for the *Sca*I enzyme. The normal individuals tested did not reveal this mutation. This mutation was found in a PKU patient (sporadic case) and his father. Two reported V245V and Q232Q polymorphisms occurred in *cis* to the C357G mutation, as the father had these substitutions in homozygous state. The presence of these polymorphisms was important to define the associated haplotype, which in this case was 4.3 (Lichter-Konecki et al., 1994). The patient has mild mental retardation due to a late diagnosis, with diet therapy started after the age of 10 years.

The c1232g substitution in the PAH gene interrupts the reading frame in exon 12 at amino acid 411, resulting in a stop codon. Two possible haplotypes, 15.9 or 37.9, can be associated with S411X, with the need to study the *EcoR*I and *EcoR*V restriction sites to define the correct haplotype. The substitution was found in a PKU patient (sporadic case) and her mother. A reported IVS2nt19t/c polymorphism occurred in *cis* to the S411X mutation. The patient has been receiving diet therapy since the neonatal diagnosis and is asymptomatic. The normal individuals tested for this mutation did not present it.

The c.1199+17g→a substitution in intron 11 of the PAH gene results in a mutation. IVS11nt17g→a abolishes a restriction site for the *Hph*I enzyme. This substitution was found in a PKU patient (sporadic case) and her mother. Two reported L385L and Q232Q polymorphisms occurred in *cis* to the IVS11nt17g→a mutation, as the mother had these polymorphisms (Q232Q and L385L) in homozygosis. The presence of these polymorphisms was important to help the definition of the linked haplotype, which in this case was 7.8 (Lichter-Konecki et al., 1994). The patient is asymptomatic due to early diagnosis and diet therapy started at the age of 2 months. In the population study with Caucasians, Asians and African-Americans, this mutation was not detected.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP).

REFERENCES

Aulehla-Scholz: Jan. 22 1999 Communication to PAHdb to CR Scriver.

Gjetting T, Romstad A, Haavik J, Knappskog PM, Acosta AX, Silva-Jr WA, Zago MA, Guldberg P, Güttler F. A phenylalanine hydroxylase amino acid polymorphism with implications for molecular diagnostics. *J Med Genet IN PRESS*

Goltsov AA, Eisensmith RC, Konecki DS, Lichter-Konecki U, Woo SLC (1992). Association between mutations and a VNTR in the human phenyalanine hydroxylase gene. *Am J Hum Genet* 51:627-636.

Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH (1977). Analyses of human y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:1245-9.

Lichter-Konecki, U.; Rupp, A.; Konecki, D.S.; Trefz, F.K., Schmidt, H.; Burgard, P. Relation between phenylalanine hydroxylase genotypes and phenotypic parameters of diagnosis and treatment of hyperphenylalaninaemic disorders. German Collaborative Study of PKU. J. Inherit. Metab. Dis., v.17, n.3, p.362-365, 1994.

Nowacki PM, Byck S, Prevost L, Scriver CR. (1998). PAH Mutation Analysis Consortium Database 1997: prototype for relational locus-specific mutation databases. Nucleic Acids Res 26:220-225.

Scriver CR, Kaufman S, Einsensmith RC, Woo SLC (1995). The Hyperphenylalaninemias. In Scriver CR, Beaudet AL, SlyWS, Valle D (eds): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7th ed. New York: McGraw-Hill, pp 1015-1075.

Scriver CR, Waters P, Sarkissian C, Ryan S, Prevost L, Côté D, Novak J, Teebi S, Nowacki PM (2000). PAHdb: A locus-specific knowledgebase. Hum Mutat 15:99-104.

Table 1: Novel mutations identified in PKU Brazilian patients:

Localization	Nucleotide change	Amino acid change	Type of mutation	Haplotype association	Clinical phenotype	Homologous allele
Intron 5	510 - 54 a→g	-	substitution/ polymorphism	4.3	mild PKU family 1 classic PKU families 2 and 3	R408W families 1 and 3 R252W; L385L; Q232Q family 2
Intron 6	706 + 17 g→t	-	substitution/ polymorphism	4.3	patient´s mother of family 1	IVS5nt-54a→g; V245V; R176L; Q232Q
Exon 6	614A→C	E205A	missense	4.3	moderate PKU	R252W; Q232Q
Exon 7	719T→C	F240S	missense	6.9	classic PKU	R261Q
Exon 7	820A→G	**K274E	missense/ polymorphism	15.9 or 37.9 or 80.9	*classic PKU	R252W; V245V
Exon 9	953T→C	**I318T	missense	15.9 or 37.9 or 80.9	*classic PKU	R252W; V245V
Exon 9	963C→T	**L321L	silent/ polymorphism	15.9 or 37.9 or 80.9	*classic PKU	R252W; V245V
Exon 11	1069T→G	C357G	missense	4.3	classic PKU	R176X
Intron 11	1199 + 17 g→a	-	substitution/ polymorphism	7.8	moderate PKU	R261Q
Exon 12	1232C→G	S411X	nonsense	15.9 or 37.9	classic PKU	V388M

*same patient

Date: Thu, 9 Nov 2000 15:34:09 -0500
From: humu@wiley.com
To: axacosta@usp.br
Subject: Human Mutation MS/2000/118
Attachments:

Dear Dr. Acosta,

Thank you for resubmitting your manuscript "The Mutations of the Phenylalanine Hydroxylase Gene in Brazilian Patients with Phenylketonuria" by Acosta et al. Once the paper has be reevaluated, we will be in touch. In the meantime, please do not hesitate to contact our office.

Thank you for submitting to Human Mutation.

Sincerely,

Kathleen Ganteaume
Editorial Assistant for Human Mutation
John Wiley & Sons, Inc.
605 Third Avenue
NY NY 10158
(212) 850-6404
(212) 850-6398
humu@wiley.com

The Mutations of the Phenylalanine Hydroxylase Gene in Brazilian Patients with Phenylketonuria

A.X. Acosta[1], W.A. Silva Jr[1], T.M. Carvalho[2], M. Gomes[2], and M.A. Zago[1]

[1]Faculty of Medicine of Ribeirão Preto and [1]Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, [2]APAE-SP (Association of Parents and Friends of Handicapped People)

Corresponding Author Address and E-mail:

Angelina X. Acosta

Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Rua Tenente Catão Roxo, 2501, CEP14051-140 - Ribeirão Preto-SP.

E-mail: axacosta@usp.br

Fax: 55 16 6334009

ABSTRACT

In the present study, 115 Brazilian families with phenylketonuria (PKU), mainly from the Southeast of the country, were studied using three laboratory methods (DGGE, SSCP and sequencing). All 13 exons of the PAH gene were analysed, including the splicing sites and the promoter region. We identified 50 distinct mutations and characterized 91% of the mutant alleles. The 5 most prevalent mutations of the 50 mutations identified (50% of the PKU alleles) were IVS10nt-11g→a (17.4%), followed by R261Q (12.2%), V388M (9.1%), R252W (6.5%) and R270K (4.8%). The other mutations were rare. The mutation spectrum included 10 new mutations (IVS5nt-54a→g, IVS6nt17g→t, E205A, F240S, K274E, I318T, L321L, C357G, IVS11nt17g→a and S411X). To characterize the origin and distribution of the PAH alleles we determined the association between the detected mutations and the PCR/RFLP haplotypes and VNTR alleles located on the PAH gene. For those patients whose mutant alleles were detected we calculated the correlation with pretreatment phenylalanine levels, thus establishing a genotype/phenotype correlation. The present results confirm the marked heterogeneity observed at the PAH locus and contribute to the understanding of the distribution and frequency of PKU mutations in the Brazilian population.

Key Words: PAH, PKU, mutation analysis, Brazilian population.

Databases:
Genbank accession number: 742330
OMIM accession number: 261600
Locus specific database: http://www.mcgill.ca/pahdb/

INTRODUCTION

Classic phenylketonuria (PKU), inherited as an autosomal recessive trait, is one of the most common inborn errors of amino acid metabolism, resulting from mutation in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. The alteration in this gene leads to PAH deficiency, causing an increase in serum levels of phenylalanine and its secondary metabolites, as well as in urine phenylpyruvic acid (Scriver et al., 1995).

PKU is a highly heterogeneous disorder, with more than 400 mutations being identified in the PAH gene; however, only a limited number of these mutations are present in each different populations (Nowacki et al., 1998; Scriver et al., 2000).

The neonatal screening program for PKU in Brazil was started in the city of São Paulo in June 1976 at an institution for mentally retarded persons (APAE/SP - Association of Parents and Friends of Handicapped People). Since then other programs have been implemented in other states in Brazil. APAE/SP performs about 40,000 exams per month, resulting in a frequency of classic PKU of 1/10,900 neonates (Pérez et al., 1994a). These programs use the conventional biochemical diagnosis of PKU, since there are no studies in Brazil on the molecular characterization of PAH deficiencies using an extensive investigative approach.

The objective of the present study was to determine the molecular basis of PKU in Brazilian patients, predominantly from the Southeast of the country, in order to contribute to the identification of the molecular composition of PKU in this region. Two laboratory methods for mutational screening were used for this purpose, i.e., DGGE and SSCP followed by sequencing. Using this methodology all 13 exons of the PAH gene were analyzed, including splicing sites and the promoter region. In

addition, the haplotypes of patients with PKU were determined by analysis of intronic polymorphisms at the PAH locus. For patients for whom the complete genotype was obtained a correlation was established with the phenotype based on the phenylalanine values at diagnosis.

MATERIAL & METHODS

1- Patients

A total of 115 families with PKU (292 individuals, i.e., 126 patients and 166 relatives) from the APAE/SP and from the University Hospital, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (HCFMRP-USP) were studied, with 20 patients having consanguineous parents. Most of the families (84.4%) were from the Southeast of Brazil, followed by families from the South (9.6%), Northeast (4.3%) and 2 families from the Center-West region (1.7%). No families from the North were included in the study.

The patients were considered to have PKU when serum phenylalanine levels were above 4 mg/dl. Some patients had been diagnosed late due to the absence of a massive PKU detection program at the time of birth. Thus, 69.6% of the patients presented an early diagnosis and 30.4% a late diagnosis. Most of the patients are being treated, with the majority (59.1%) being asymptomatic, 7.8% showing normal variation of intelligence, and 13.1% presenting mild, 8.7% moderate and 11.3% severe mental retardation.

The phenylalanine values at diagnosis were used for the classification of the different forms of hyperphenylalaninemia. The classic form was the most predominant one (55.7%), followed by the moderate (27.8%) and mild (13.0%) forms and 4 cases (3.5%) of benign hyperphenylalaninemia.

2- Methods

DNA was isolated from leukocytes by standard methods (Kunkel et al., 1977) and analyzed for mutations by PCR amplification of the 13 genomic fragments comprising the entire coding sequence, splicing functions and the promoter region of the PAH gene, followed by DGGE and/or SSCP and sequencing.

2.1- DGGE

Each fragment was obtained by PCR using primers with a GC clamp, as described by Guldberg et al. (1993a). Genomic DNA (100 ng) was amplified in a mixture containing 2.5 µl buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 nM KCl and 1.5 mM $MgCl_2$), 2.0 µl dNTP, 8 µl of each primer, 0.2 µl *Taq* polymerase and 25 µl water. The PCR conditions consisted of 40 cycles at 94°C for 1 min, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min. After amplification, heteroduplexes were formed. DGGE analysis was performed by applying an aliquot of the amplification product to a 6% polyacrylamide gel consisting of a urea and formamide gradient (100% of the denaturing reagent: 7 M urea and 40% formamide). Electrophoresis was performed at 150 V in TAE buffer (Tris, acetic acid and EDTA) at a constant temperature of 60°C and the gel was stained with ethidium bromide for UV detection and photographed. This method was used for the analysis of exons 2, 3, 6, 7, 11 and 12. Some samples were submitted to broad-range DGGE (Guldberg & Güttler, 1994), which consists of the simultaneous analysis of multiple DNA fragments amplified by PCR on a gel containing an ample gradient of the denaturing reagent at a single, constant temperature.

2.2- SSCP

The amplified samples of each exon (primer sequences and PCR conditions were as described by van der Sijs-Bos et al., 1996 and Zschocke et al., 1995) were initially denatured into single strands by the addition of formamide and subsequent heating and then applied to an 8% non-denaturing polyacrylamide gel and separated electrophoretically at 150 V and 8°C. Samples showing different mobility of the single strands compared to normal control DNA indicated the presence of mutation. This method was used for the analysis of exons 1, 4, 5, 8, 9, 10 and 13.

2.3- Sequencing

Samples showing an aberrant band pattern were directly sequenced using the ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin Elmer). Electrophoresis was performed with the ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer) on a 4% polyacrylamide gel (6 M urea) at 1500 V and 51°C for 6 to 8 hours. The electropherograms obtained were analyzed with the ABI Analysis Data Collection program, and the sequences by the Sequencher version 3.1 software and PolyPhred (Nickerson et al., 1997). The promoter region of the PAH gene was directly studied by sequencing.

2.4- Analysis of the RFLP/VNTR haplotypes

Five of the diallelic polymorphisms present in the PAH gene were determined by digestion of the PCR-amplified DNA fragments using the following specific restriction endonucleases, as described previously: PvuII(a) (Dworniczak et al., 1991a), PvuII(b), MspI (Wedemeyer et al., 1991), BglII (Dworniczak et al., 1991b),

and XmnI (Goltsov et al., 1992a). The multiallelic minisatellite of the 30-bp variable number tandem repeats (VNTR) at the 3'-end of the PAH gene was analyzed by PCR according to the method of Goltsov et al. (1992b). The RFPL/VNTR haplotypes were numbered according to Eisensmith & Woo (1992a).

2.4- Genotype-Phenotype correlation

Following the example described by Güttler et al. (1999) and Guldberg et al. (1998), the identified mutations were classified phenotypically using the phenylalanine values at diagnosis (before treatment). They proposed and tested a simple model for correlation between genotype and phenotype outcome, in which each mutation receives an arbitrary assigned value (AV: 1 = classic-PKU mutations; 2 = moderate-PKU mutations; 4 = mild-PKU mutations; and 8 = mild hyperphenylalaninemia mutations), and the phenotype resulting from the combination of two mutant PAH alleles is expressed numerically as the sum of the Avs for the two mutations.

RESULTS

Fifty mutations were detected in the 115 families studied, 38 of them being disease-causing mutations (Table 1), and the remaining ones being polymorphisms apparently unrelated to PKU genesis: IVS2nt19t→c, IVS3nt-22c→t, IVS5nt-54a→g, Q232Q, IVS6nt17g→t, V245V, K274E, L321L, L385L, IVS11nt17g→a, N426N and IVS12nt-35g→c (http://www.mcgill.ca/pahdb/).

Table 1 shows the frequencies of the PKU-causing mutations detected in the present study. The IVS10nt-11g→a mutation was the most frequent (17.2%), followed by R261Q (12.1%), V388M (9.0%), R252W (6.5%) and R270K (4.7%), accounting for 50% of all mutations.

Ten new mutations were identified (Table 2), five of them unlikely to cause the disease: IVS5nt-54a→g, IVS6nt17g→t, K274E, L321L and IVS11nt17g→a. All novel mutations which may cause the disease were investigated in a population study on 50 control individuals without PKU who did not present any of these mutations. The K274E and L321L mutations were detected in only one family in cis association with another new mutation, I318T. After various expression studies using different eukaryotic and prokaryotic systems, the K274E mutation is considered to be the first amino acid polymorphism described for the PAH gene (Gjetting et al., *in press*). A population study using normal chromosomes with the K274E, L321L, IVS11nt17g→a and N426N polymorphisms was performed and the results are shown in Table 3.

Using DGGE, broad-range DGGE and SSCP, it was possible to characterize 91% of the mutant alleles in the 115 families (230 chromosomes) studied, with 99 (86%) of the families having 2 defined mutations, 11 (9.6%) having one mutant allele

characterized and 5 (4.4%) without any defined mutation. For the PKU patients with uncharacterised mutant alleles all the regions studied by DGGE and SSCP were sequenced, and no false negatives were detected.

Most of the genotypes determined presented a heterozygous character, resulting from the acquisition of two distinct mutations (compound heterozygote). Of the 115 families studied, 72 (62.6%) showed compound heterozygous mutant alleles, 26 (22.6%) were homozygotes (17 of them belonging to consanguineous families), 11 (9.6%) heterozygotes (only one mutant allele identified), 1 family (0.9%) was compound homozygous, and no PKU-causing mutations were detected in the remaining 5 families (4.3%) (3 of them being consanguineous).

To characterize the origin and distribution of the PAH alleles, we studied the association between the detected mutations and the PCR/RFLP haplotypes and VNTR alleles located on the PAH gene. A total of 198 (86%) haplotypes were determined for the 230 chromosomes analyzed, 192 (97%) of them being associated with mutant alleles (Table 1) and 6 (3%) with alleles without any characterized mutation. The finding that not all haplotypes could be determined, including the normal haplotypes of the relatives, is due to the fact that the polymorphic *Eco*RI and *Eco*RV sites were not analyzed. Of the 32 chromosomes (14%) with undetermined haplotypes, 17 showed characterized and 15 uncharacterized mutant alleles. Most of the PKU alleles were associated with haplotypes 1.8, 6.7, 4.3, 1.7 and 9.8, with haplotype 1.8 being the most frequent (27.4%) and also the one most frequently associated with different mutations. In addition, the haplotype of 6 of the 10 new mutations (Table 2) was determined by deducing its association with the Q232Q, V245V, L385L and IVS2nt-35c→t

polymorphisms, a method which, according to Lichter-Konecki et al. (1994), shows a high probability of identifying the associated haplotype.

DISCUSSION

In the present study, we determined the molecular basis of PKU in Brazilian patients. To evaluate the genetic heterogeneity of the disease, we analyzed mutations in the PAH gene and the associated haplotypes, and correlated the genotype with the phenotype based on pretreatment phenylalanine levels.

Pérez et al. (1996) conducted a study on 79 patients with PKU from São Paulo, but their approach to the detection of mutations was very limited since the study was directed only to the search of some mutations (IVS10nt-11g→a, I65T, V388M, R408W and IVS12nt1g→a) with a high incidence in Europe. In the present study, we used a methodology for efficient mutational screening, i.e., DGGE and broad-range DGGE, which are widely employed for the study of mutations in various populations (Guldberg et al., 1993a; Guldberg et al., 1993b; Hennermann et al., 2000), as well as SSCP for the analysis of some exons of the PAH gene (Labrune et al., 1991; Zschocke et al., 1995; van der Sijs-Bos et al., 1996). We also analyzed the promoter region of the PAH gene in an attempt to clarify the cases with undefined mutant alleles after the analysis of all 13 coding regions and splicing sites of the PAH gene.

This study approach, not previously used in Brazil, led to the identification of 91% mutant alleles in a total of 230 chromosomes (115 families) studied, which is in agreement with other large scale population studies (Pérez et al., 1997). The mutant alleles of 99 families (86%) were completely genotyped, and of the remaining families, 11 (9.6%) were heterozygotes and in 5 (4.4%) no mutation was identified. The unidentified mutations are probably located in introns (Hennermann et al., 2000), since the entire coding region, including splicing functions and the promoter

region of the PAH gene, was analyzed in the present study. The mutation spectrum included 50 distinct mutations, with 38 potentially disease-causing mutations and 12 polymorphisms unrelated to the origin of the disease. Among these mutations, the following 10 were considered to be new mutations: IVS5nt-54a→g, IVS6nt17g→t, E205A, F240S, K274E, I318T, L321L, C357G, IVS11nt17g→a and S411X.

In view of the enormous genetic heterogeneity observed in the present study, most of the identified mutations showed a heterozygous character upon analysis of the genotype of patients with PKU, in agreement with literature data (Scriver et al., 2000), showing that in many patients PKU results from the acquisition of two distinct mutations (compound heterozygote) which are often located in different exons.

Moreover, 5 mutations accounted for 50% of the total mutation spectrum, a finding observed also for other populations, in whom 3 to 6 mutations are responsible for about 65% of the mutant alleles, as observed by Tyfield et al., (1997) and Guldberg et al., (1996).

The most frequent mutation observed in the Brazilian population studied here was IVS10nt-11g→a, with a relative frequency of 17.4% and associated with haplotypes 39 or 60, and 6. This mutation is frequently observed in Mediterranean populations (Dworniczak et al., 1991c; Guldberg et al., 1993a; Dianzani et al., 1995; Özgüç et al., 1993; Rivera et al., 1998), strongly indicating these populations as the origin of the IVS10nt-11g→a mutation in our population. Pérez et al. (1996) obtained a relative frequency of 16% for the IVS10nt-11g→a mutation, which is similar to that observed in the present study.

The second most frequent mutation observed in the present study was R261Q (12.2%), which is similar to the data obtained in a population of Portuguese

origin (Rivera et al., 1998). This mutation shows a high relative frequency in Switzerland where it probably originated (Einsensmith et al., 1992b), but has a very low incidence in Spain (Pérez et al., 1994b). The present study shows that the R261Q mutation is mainly associated with haplotype 1.8. Until now, the second most frequent mutation observed in São Paulo was R261Q and not V388M, as reported by Pérez et al. (1996).

The V388M mutation, described for the first time by Leandro et al. (1995) in a white population from Portugal, was the third most frequent mutation observed in the present study (9.1%) and was exclusively associated with haplotype 1.7. This incidence is in agreement with that observed by Pérez et al. (1996).

The two other more frequent mutations were R252W (6.5%) and R270K (4.8%), which were predominantly associated with haplotype 1.8. These mutations showed incidences similar to those reported by Okano et al. (1989) and Leandro et al. (1995), respectively.

The other mutations observed in the present study showed relatively low frequencies, as also reported for other populations (Tyfield et al., 1997; Okano et al., 1998).

The results of the most frequent mutations and different haplotypes associated analysis are consistent with Southern Europeans as the major source of PAH mutations. The wide genetic heterogeneity observed in the present study and the analysis of the association between mutations and haplotype indicate a predominantly European origin of these mutations as a consequence of historical migrations, a fact that has also been described for other Latin-American populations (Desviat et al., 1993; Pérez et al., 1996; De Lucca et al., 1998; Pérez et al., 1999). The Brazilian population originates from a complex racial mixture predominantly of

western and southern Europeans, African blacks and Amerindians. The proportions of the three main parent populations as well as other minor contributions varies significantly in the different regions of the country, and therefore the frequency of mutation observed in the present study may vary depending on the study region with its distinct demographic patterns.

For some polymorphisms detected (Table III) we performed a population study analysing individuals with different ethnic origins. The N426N and L321L polymorphisms seem to be limited to black population. The IVS11nt17g→a, a mutation was not observed in anyone chromosome of the population study, indicating that it could be a very rare substitution or a mutation presented only in PKU population. For the mutation K274E we noted a frequency of 2% in a population without PKU.

We also analysed the association between the mutations and specific phenotypes (Table 4), according to the method described by Güttler et al. (1999) and Guldberg et al. (1998), taking into account the pretreatment phenylalanine levels. Literature data (Bénit et al., 1999) show that the mutant genotype determines the metabolic phenotype of PAH deficiency. It is interesting to note that some mutations were found in more than one PKU/HPA classification, indicating that the severity of the PKU phenotype can be modified by other genetic and non-genetic factors. The results we have obtained on the genotype-phenotype associations demonstrated generally a good correlation, but in some results are discrepant. Examples of some inconsistencies were observed for the mutations Y414C, R261Q, V388M, R258Q, R252W, and Y206X. The Y206X mutation is expected to cause a classic phenotype based on the nature of the mutation, but in the present study it was observed in a patient with a mild phenotype whose homologous allele is a

severe reported mutation R176X. The isolate nature of the present observation does not allow any additional conclusion.

The majority of the novel mutations associated with disease was presented in patients with classic PKU, and was associated with homologous alleles described in this same phenotype classification. The exception occurred with the E205A mutation (homologous allele: R252W) that was observed in a patient with moderate PKU.

In summary, the molecular analysis of Brazilian individuals with PKU, demonstrated a heterogeneous spectrum of mutations, indicating different ethnic and geographical origins. This approach is of great importance for the diagnostic confirmation and prognosis and for the optimization of the diet therapy to be implemented in patients with PKU. This study also permits adequate genetic counselling for families at risk, with the possibility of detecting disease-carriers and of prenatal diagnosis.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - process no. 98/09083-4) and Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP). We thank APAE-SP (Associação de Pais e Amigos de Excepcionais) for kindly providing the patient samples for this study.

REFERENCES

Bénit P, Rey F, Blandin-Savoja F, Munnich A, Abadie V, Rey J (1999). The mutant genotype is the main determinant of the metabolic phenotype in phenylalanine hydroxylase deficiency. Mol Genet Metab 68(1):43-47.

De Lucca M, Pérez B, Desviat LR, Ugarte M (1998). Molecular basis of phenylketonuria in Venezuela: presence of two novel null mutations. Hum Mutat 11(5):354-359.

Desviat LR, Pérez B, Ugarte M (1993). Phenylketonuria and Linked Mutations. *Hum Genet* 92:254-258.

Dianzani I, Giannattasio S, de Sanctis L, Alliaudi C, Lattanzio P, Vici CD, Burlina A, Burroni M, Sebastio G, Carnevale F (1995). Characterization of phenylketonuria alleles in the Italian population. Eur J Hum Genet 3(5):294-302.

Dworniczak B, Wedemeyer N, Eigel A, Horst J (1991a). PCR detection of the PvuII (Ea) RFLP at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. Nucleic Acids Res 19(8):1958.

Dworniczak B, Wedemeyer N, Horst J (1991b). PCR detection of the Bg1II RFLP at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. Nucleic Acids Res 19(8):1958.

Dworniczak B, Aulehla-Scholz C, Kalaydjieva L, Bartholomé K, Grudda K, Horst J (1991c). Aberrant splicing of phenylalanine hydroxylase mRNA: the major cause for phenylketonuria in parts of southern Europe. Genomics 11(2):242-246.

Eisensmith RC, Woo SL (1992a). Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemias: mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Hum Mutat* 1(1):13-23

Eisensmith RC, Okano Y, Dasovich M, Wang T, Güttler F, Lou H, Guldberg P, Llichter-Konecki U, Koneckii DS, Svensson E, Hagenfeldt L, Rey F, Munnich A, Lyonnet S, Cockburn F, Connor JM, Pembrey ME, Smith I, Gitzelmann R, Steinmann B, Apold J, Eiken HG, Giovannini M, Riva E, Longhi R, Romano C, Cerone R, Naughten ER, Mullins C, Cahalane S, Ozalp I, Fekete G, Schuler D, Berencsi GY, Nász I, Brdicka R, Kamaryt J, Pijackova A, Cabalska B, Boszkowa K, Schwarzt E, Kalinin VN, Jin L, Chakraborty R, Woo SLC (1992b). Multiple Origins for Phenylketonuria in Europe. *Am J Hum Genet* 51:1355-1365.

Gjetting T, Romstad A, Haavik J, Knappskog PM, Acosta AX, Silva-Jr WA, Zago MA, Guldberg P, Güttler F. A phenylalanine hydroxylase amino acid polymorphism with implications for molecular diagnostics. IN PRESS

Goltsov AA, Eisensmith RC, Woo SL (1992a). Detection of the XmnI RFLP at the human PAH locus by PCR. Nucleic Acids Res 20(4):927.

Goltsov AA, Eisensmith RC, Konecki DS, Lichter-Konecki U, Woo SLC (1992b). Association between Mutations and a VNTR in the Human Phenyalanine Hydroxylase Gene. *Am J Hum Genet* 51:627-636.

Guldberg P, Romano V, Ceratto N, Bosco P, Cluna M, Indelicato A, Moliica F, Mell C, Giovannini M, Riva E, Biassucci G, Henrikeen KF, Güttler F (1993a). Mutational Spectrum of Phenylalanine Hydroxylase Deficiency in Sicily: Implications for Diagnosis of Hyperphenylalaninemia in Southern Europe. *Hum Mol Genet* 2(10):1703-1707.

Guldberg P, Henriksen KF, Güttler F (1993b). Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. Genomics 17(1):141-146.

Guldberg P, and Güttler,F (1994). "Broad-range" DGGE for single-step mutation scanning of entire genes: application to human phenylalanine hydroxylase gene. *Nucleic Acids Res* 22(5):880-881.

Guldberg P, Levy HL, Hanley WB, Koch R, Matalon R, Rouse BM, Trefz F, de la Cruz F, Henriksen KF, Güttler F (1996). Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: Report from the Maternal PKU Collaborative Study. Am J Hum Genet 59(1):84-94.

Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, François B, Michiels L, Ullrich K, Hoffmann GF, Burgard P, Schmidt H, Meli C, Riva E, Dianzani I, Ponzone A, Rey J, Güttler F (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(1):71-79.

Güttler F, Azen C, Guldberg P, Romstad A, Hanley WB, Levy HL, Matalon R, Rouse BM, Trefz F, de la Cruz F, Koch R (1999). Relationship among genotype, biochemical phenotype, and cognitive performance in females with phenylalanine hydroxylase deficiency: report from the Maternal Phenylketonuria Collaborative Study. Pediatrics 104(2):258-262.

Hennermann JB, Vetter B, Wolf C, Windt E, Bührdel P, Seidel J, Mönch E, Kulozik A (2000). Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in eastern Germany: A characteristic molecular profile and 15 novel mutations. Hum Mutat 15:254-260.

Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH (1977). Analyses of Human Y-Chromosome-Specific Reiterated DNA in Chromosome Variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:1245-9.

Labrune, P., Melle, D., Rey, F., Berthelon, M., Caillaud, C., Rey, J., Munnich, A., & Lyonnet, S (1991). Single-Strand Conformation Polymorphism for Detection of Mutations and Base Substitution in Phenylketonuria. *Am J Hum Genet* 48:1115-1120.

Leandro P, Rivera I, Ribeiro V, Tavares de Almeida I, da Silveira C, Lechner MC (1995). Mutation analysis of phenylketonuria in south and central Portugal: prevalence of V388M mutation. Hum Mutat 6:192-194.

Lichter-Konecki U, Rupp A, Konecki DS, Trefz FK, Schmidt H, Burgard P (1994). Relation between phenylalanine hydroxylase genotypes and phenotypicparameters of diagnosis and treatment of hyperphenylalaninaemic disorders. German Collaborative Study of PKU. J Inherit Metab Dis 17(3):362-365.

Nickerson, DA, Tobe VO, Taylor SL (1997). PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic Acids Res* 25(14):2745-2751.

Nowacki PM, Byck S, Prevost L, Scriver CR. (1998). PAH Mutation Analysis Consortium Database 1997: prototype for relational locus-specific mutation databases. Nucleic Acids Res 26:220-225.

Okano Y, Wang T, Eisensmith RC, Woo SLC (1989). PKU mutations among caucasians. Am J Hum Genet, 1989;45:A211.

Okano Y, Asada M, Kang Y, Nishi Y, Hase Y, Oura T, Isshiki G (1998). Molecular characterization of phenylketonuria in Japanese patients. Hum Genet 103(5):613-618.

Ozgüç M, Ozalp I, Coskun T, Yilmaz E, Erdem H, Ayter S (1993). Mutation analysis in Turkish phenylketonuria patients. J Med Genet 30(2):129-130.

Pérez B, Desviat LR, De Lucca M, Carvalho P, Vargas P, Costa MMR, Loghin-Grosso N, Schimidt, Ugarte M (1994a). Mass screening of PKU in São Paulo and analysis of IVS1) mutation. VI International Congress on Inborn Errors of Metabolism, Milan, Italy.

Pérez B, Desviat LR, De Lucca M, Ugarte M (1994b). Spectrum and origin of phenylketonuria mutations in Spain. Acta Paediatr Suppl 407:34-36.

Pérez B, Desviat LR, De Lucca M, Schmidt B, Loghin-Grosso N, Giugliani R, Pires RF, Ugarte M (1996). Mutation analysis of phenylketonuria in south Brazil. Hum Mutat, 1996;8(3):262-264.

Pérez B, Desviat LR, Ugarte M (1997). Analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in the Spanish population: mutation profile and association with intragenic polymorphic markers. Am J Hum Genet 60(1):95-102.

Pérez B, Desviat LR, De Lucca M, Cornejo V, Raimann E, Ugarte M (1999). Molecular characterization of phenylalanine hydroxylase deficiency in Chile. Mutations in brief no. 243. Online. Hum Mutat 13(6):503.

Rivera I, Leandro P, Lichter-Konecki U, Tavares de Almeida, Lechner MC (1998). Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. J Med Genet 35(4):301-304.

Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC (1995). The Hiperphenyalaninemias. In: Scriver CR., Beaudet AL, SLY WS, Valle D (eds) The Metabolic basis of inherited disease, 7th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1015-1076.

Scriver CR, Waters P, Sarkissian C, Ryan S, Prevost L, Côté D, Novak J, Teebi S, Nowacki PM (2000). PAHdb: A locus-specific knowledgebase. Hum Mutat 15:99-104.

Svensson E, Wang Y, Eisensmith RC, Hagenfeldt L, Woo SL (1993). Three polymorphisms but no disease-causing mutations in the proximal part of the promoter of the phenylalanine hydroxylase gene. Eur J Hum Genet 1(4):306-313.

Tyfield LA, Stephenson A, Cockburn F, Harvie A, Bidwell JL, Wood NA, Pilz DT, Harper P, Smith I (1997). Sequence variation at the phenylalanine hydroxylase gene in the British Isles. Am J Hum Genet 60(2):388-396.

Van der Sijs-Bos CJM, Diepstraten CM, Juyn JA, Plaisier M, Giltay JC, van Spronsen FJ, Smit GPA, Berger R, Smeitink JAM, Poll-The BT, Ploos van Amstel JK (1996). Phenylketonuria in The Netherlands: 93% of the mutations are detected by single-strand conformation analysis. Hum Hered 46(4):185-190.

Wedemeyer N, Dworniczak B, Horst J (1991). PCR detection of the MspI (Aa) RFLP at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. Nucleic Acids Res 19(8):1959.

Zschocke J, Graham CA, Carson DJ, Nevin NC (1995). Phenylketonuria mutation analysis in Northern Ireland: a rapid stepwise approach. Am J Hum Genet 57:1311-1317.

Table 1: Frequencies of the 38 different disease-causing mutations and the associated haplotypes in 230 chromosomes analyzed.

Localization	Mutation	n	%	Haplotype	n	%
Intron 1	IVS1nt5g→t	1	0.4	4.3	1	0.4
Exon 2	L48S	2	0.8	4.3 / X.8	1; 1	0.4 / 0.4
Intron 2	IVS2nt5g→c	8	3.5	5.9	8	3.5
Exon 2	delF39	1	0.4	X.9	1	0.4
Exon 3	I65T	8	3.5	9.8	8	3.5
Exon 3	R68S	3	1.3	7.8 / 1.8	1;2	0.4 / 0.8
Exon 3	P89fsincC	1	0.4	11.8	1	0.4
Exon 4	D145V	4	1.7	4.3	4	1.7
Exon 5	R158Q	8	3.5	4.3 / X.8	7; 1	3.0 / 0.4
Exon 6	Y206X	2	0.8	1.8	2	0.8
Exon 6	R176X	4	1.7	1.8	4	1.7
Exon 6	E205A	1	0.4	4.3	1	0.4
Exon 6	R176L	4	1.7	4.3	4	1.7
Exon 7	**R270K**	**11**	**4.8**	1.8	11	4.8
Exon 7	G272X	1	0.4	7.8	1	0.4
Exon 7	**R261Q**	**28**	**12.2**	1.8 / X.3 / 1.9	25; 2; 1	11.0 / 0.8 / 0.4
Exon 7	R261X	7	3.0	6.9 / 1.8 / 6.7 / X.9 / 4.3	1; 1; 2; 1; 2	0.4 / 0.4 / 0.8 / 0.4 / 0.8
Exon 7	**R252W**	**15**	**6.5**	6.7 / 1.8 / 52.8	1; 12; 2	0.4 / 5.2 / 0.8
Exon 7	P281L	5	2.1	1.7 / 1.8 / X.3	1; 2; 2	0.4 / 0.8 / 0.8
Exon 7	P275R	1	0.4	7.8	1	0.4
Exon 7	I269N	1	0.4	3.8	1	0.4
Exon 7	F240S	1	0.4	6.9	1	0.4
Exon 7	R241C	1	0.4	34.1	1	0.4
Exon 7	R243Q	3	1.3	1.8	3	1.3
Exon 8	A300S	1	0.4	1.8	1	0.4
Exon 9	L311P	1	0.4	1.7	1	0.4
Exon 9	I318T	1	0.4	X.9	1	0.4
Intron 9	IVS8nt-7a→g	1	0.4	4.3	1	0.4
Exon 10	G352fsdelG	4	1.7	2.3	4	1.7
Exon 10	L348V	3	1.3	9.8	3	1.3
Exon 11	E390G	2	0.8	X.3	2	0.8
Exon 11	**V388M**	**21**	**9.1**	1.7	26	11.3
Exon 11	C357G	1	0.4	4.3	1	0.4
Intron 11	**IVS10nt-11g→a**	**40**	**17.4**	6.7 / X.7	36; 4	15.6 / 1.7
Exon 12	Y414C	3	1.3	4.3	3	1.3
Exon 12	R408W	8	3.5	2.3 / 1.8 / 27.9 / X.14	5; 1; 1; 1	2.1 / 0.4 / 0.4 / 0.4
Exon 12	S411X	1	0.4	X.9	1	0.4
Intron 12	IVS12nt1g→a	3	1.3	3.8	3	1.3
Total	**38 mutants**	**230**	**90.8**		**192**	**83.5**

X: haplotypes possibilities - delF39: 39.9 or 60.9; R261Q: 2.3 or 24.3; R261X: 11, 33 or 34.9; P281L: 2.3. 24.3 or 41.3; I318T: 15.9. 37.9 or 80.9; E390G: 2.3. 24.3 or 41.3; S411X: 15.9 or 37.9; IVS10nt-11g→a: 39.7 or 60.7

Table 2: New mutations and associated haplotypes.

Localization	Nucleotide change	Amino acid change	Type of mutation	Haplotype
Intron 5	*510 - 54 a→g	-	Substitution/Polymorphism	4.3
Intron 6	*706 + 17 g→t	-	Substitution/Polymorphism	4.3
Exon 6	614A→C	E205A	Missense	4.3
Exon 7	719T→C	F240S	Missense	6.9
Exon 7	820A→G	**K274E	Missense/ Polymorphism	X.9
Exon 9	953T→C	**I318T	Missense	X.9
Exon 9	963C→T	**L321L	Silent/ Polymorphism	X.9
Exon 11	1069T→G	C357G	Missense	4.3
Intron 11	1199 + 17 g→a	-	Substitution/ Polymorphism	7.8
Exon 12	1232C→G	S411X	Nonsense	X.9

*Mutations in the same allele
**Mutations in the same allele
X: haplotypes possibilities – K274E, I318T and L321L:15.9 or 37.9 or 80.9; S411X: 15.9 or 37.9.

Table 3: Population study of the N426N, L321L, IVS11nt17g/a and K274E polymorphisms performed in general population (not PKU patients) of different ethnic origin.

Mutation	Population	Present study No. detected / No. of chromosomes studied
N426N	Caucasian	0 /100
	Asian	0/80
	Black	13/ 100
L321L	Caucasian	1/100
	Asian	0/80
	Black	8/100
IVS11nt17g→a	Caucasian	0/100
	Asian	0/80
	Black	0/100
K274E		2/100 Individuals without PKU

Table 4: Phenotypic classification of PKU/HPA of the 38 mutations in the PAH gene identified in the present study.

Classic PKU	Moderate PKU	Mild PKU	HPA
IVS1nt5g→t	L48S	D145V	D145V
IVS2nt5g→c	I65T	R158Q	R176L
delF39	R68S	R176L	A300S
I65T	R158Q	Y206X	
R68S	E205A	R243Q	
P89fsincC	R241C	R252W	
R158Q	R243Q	E390G	
R176X	R252W	Y414C	
F240S	R261Q		
R252W	R270K		
R261Q	P275R		
R261X	IVS10nt-11g→a		
I269N	L348V		
R270K	V388M		
G272X	R408W		
P281L	Y414C		
IVS8nt-7a→g			
L311P			
I318T			
IVS10nt-11g→a			
G352fsdelG			
C357G			
V388M			
R408W			
S411X			
IVS12nt1g→a			

HPA: Hyperphenylalaninemia

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, A.X.; SILVA JR, W.A.; CARVALHO, T.M.; ZAGO, M.A. Novel mutations in the phenylalanine hydroxylase gene observed in Brazilian patients with phenylketonuria. **Hum. Mutat.** /no prelo/

AVIGAD, S.; KLEIMAN, S.; WEINSTEIN, M.; COHEN, B.E.; SCHWARTZ, G.; WOO, S.L.C.; SHILOH, Y. Compound heterozygosity in nonphenylketonuria hyperphenylalaninemia: the contribution of mutations for classical phenylketonuria. **Am. J. Hum. Genet.**, v.49, p.393-399, 1991.

BÉNIT, P.; REY, F.; BLANDIN-SAVOJA, F.; MUNNICH, A.; ABADIE, V.; REY, J. The mutant genotype is the main determinant of the metabolic phenotype in phenylalanine hydroxylase deficiency. **Mol. Genet. Metab.**, v. 68, n.1, p.43-47, 1999.

BICKEL, H.; BACHMANN, C.; BECKERS, R.; BRANDT, N.J.; CLAYTON, B.E.; CORRADO, G.; FEINGOLD, H.J. Neonatal mass screening for metabolic disorders. **Eur. J. Pediatr.**, v.137, p.133-139, 1981.

CAILLAUD, C.; VILARINHO, L.; VILARINHO, A.; REY, F.; BERTHELON, M.; SANTOS, R.; LYONNET, S.; BRIARD, M.L.; OSORIO, R.V.; REY, J.; MUNNICH,

A. Linkage disequilibrium between phenylketonuria and RFLP haplotype 1 at the phenyalanine hydroxylase locus in Portugal. **Hum. Genet.**, v.89, p.69-72, 1992.

CRAWFURD, M.; GIBBS, D.; SHEPPARD, D. Studies on human phenylalanine monooxygenase: restricted expression. **J. Inherited. Metab. Dis.**, v.4, p.191-195, 1981.

DAIGER, S.P.; CHAKRABORTY, R.; REED, L.; FEKETE, G.; SCHULER, D.; BERENCSI, G.; NASZ, I.; BRDICKA, R.; KAMARYT, J.; PIJACKOVA, A.; MOORE, S.; SULLIVAN, S.; WOO, S.L.C. Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase (PAH) locus in European families with phenylketonuria (PKU). **Am. J. Hum. Genet.**, v.45, p.310-318, 1989.

DE LUCCA, M.; PÉREZ, B.; DESVIAT, L.R.; UGARTE, M. Molecular basis of phenylketonuria in Venezuela: presence of two novel null mutations. **Hum. Mutat.**, v.11, n.5, p.354-359, 1989.

DESVIAT, L.R.; PÉREZ, B.; UGARTE, M. Phenyketonuria and linked mutations. **Hum. Genet.**, v.92, p.254-258, 1993.

DIANZANI, I.; DEVOTO, M.; CAMASCHELLA, C.; SAGLIO, G.; FERRERO, G.B.; CERONE, R.; ROMANO, C.; ROMEO, G.; GIOVANNINI, M.; RIVA, E.; ANGENEYDT, F.; TRFZ, F.K.; OKANO, Y.; WOO, S.L.C. Haplotype distribution

and molecular defects at the phenylalanine hydroxylase locus in Italy. **Hum. Genet.**, v.86, p.69-72, 1990.

DIANZANI, I.; GIANNATTASIO, S.; DE SANCTIS, L.; MARRA, E.; PONZONE, A.; CAMASCHELLA, C.; PIAZZA, A. Genetic history of phenylketonuria mutations in Italy. **Am. J. Hum. Genet.**, v.55, n.4, p.851-853, 1994.

DIANZANI, I.; GIANNATTASIO, S.; DE SANCTIS, L.; ALLIAUDI, C.; LATTANZIO, P.; VICI, C.D.; BURLINA, A.; BURRONI, M.; SEBASTIO, G.; CARNEVALE, F. Characterization of phenylketonuria alleles in the Italian population. **Eur. J. Hum. Genet.**, v.3, n.5, p.294-302, 1995.

DILELLA, A.G.; KWOK, S.C.M.; LEDLEY, F.D.; MARVIT, J.; WOO, S.L.C. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. **Biochemistry**, v.25, n.4, p.743-749, 1986.

DWORNICZAK, B.; WEDEMEYER, N.; EIGEL, A.; HORST, J. PCR detection of the PvuII (Ea) RFLP at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. **Nucleic Acids Res.**, v.19, n.8, p.1958, 1991a.

DWORNICZAK, B.; WEDEMEYER, N.; HORST, J. PCR detection of the Bg1II RFLP at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. **Nucleic Acids Res.**, v.19, n.8, p.1958, 1991b.

DWORNICZAK, B.; AULEHLA-SCHOLZ, C.; KALAYDJIEVA, L.; BARTHOLOMÉ, K.; GRUDDA, K.; HORST, J. Aberrant splicing of phenylalanine hydroxylase mRNA: the major cause for phenylketonuria in parts of southern Europe. **Genomics**, v.11, n.2, p.242-246, 1991c.

DWORNICZAK, B.; KALAYDJIEVA, L.; PANKOKE, S.; AULEHLA-SCHOLZ, C.; ALLEN, G.; HORST, J. Analysis of exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene: A mutation hot spot? **Hum. Mutat.**, v.1, p.138-146, 1992.

EISENSMITH, R.C.; WOO, S.L. Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemias: mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. **Hum. Mutat.**, v.1, n.1, p.13-23, 1992.

EISENSMITH, R.C.; OKANO, Y.; DASOVICH, M.; WANG, T.; GÜTTLER, F.; LOU, H.; GULDBERG, P.; LIICHTER-KONECKI, U.; KONECKII, D.S.; SVENSSON, E.; HAGENFELDT, L.; REY, F.; MUNNICH, A.; LYONNET, S.; COCKBURN, F.; CONNOR, J.M.; PEMBREY, M.E.; SMITH, I.; GITZELMANN, R.; STEINMANN, B.; APOLD, J.; EIKEN HG, GIOVANNINI, M.; RIVA, E.; LONGHI, R.; ROMANO, C.; CERONE, R.; NAUGHTEN, E.R.; MULLINS, C.; CAHALANE, S.; OZALP, I.; FEKETE, G.; SCHULER, D.; BERENCSI, G.Y.; NÁSZ, I.; BRDICKA, R.; KAMARYT, J.; PIJACKOVA, A.; CABALSKA, B.; BOSZKOWA, K.; SCHWARZT,

E.; KALININ, V.N.; JIN, L.; CHAKRABORTY, R.; WOO, S.L.C. Multiple Origins for Phenylketonuria in Europe. **Am. J. Hum. Genet.**, v.51, p.1355-1365, 1992.

EISENSMITH, R.C.; WOO, S.L.C. Molecular genetics of phenylketonuria: from molecular anthropology to gene therapy. **Adv. Genet.**, v.32, p.199-271, 1995.

ERLANDSEN, H.; STEVENS, R.C. The structural basis of phenylketonuria. **Mol. Genet. Metab.**, v.68, n.2, p.103-125, 1999.

FÖLLING, A. Utskillelse av fenylpyrodruesyre I urinen som stoffskifteabomali I forbindelse med imbecillitet. **Nord. Med. Tidskr.**, v.8, p.1054-1059, 1934a.

FÖLLING, A. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. **Ztschr. Physiol. Chem.**, v.227, p.169-176, 1934b.

FUSETTI, F.; ERLANDSEN, H.; FLATMARK, T.; STEVENS, R.C. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. **J. Biol. Chem.**, v.273, n.27, p.16962-16967, 1998.

GJETTING, T.; ROMSTAD, A.; HAAVIK, J.; KNAPPSKOG, P.M.; ACOSTA, A.X.; SILVA-JR, W.A.; ZAGO, M.A.; GULDBERG, P.; GÜTTLER, F. A phenylalanine

hydroxylase amino acid polymorphism with implications for molecular diagnostics. **J. Med. Genet.**, /no prelo/

GOLTSOV, A.A.; EISENSMITH, R.C.; KONECKI, D.S.; LICHTER-KONECKI, U.; WOO, S.L.C. Association between mutations and a VNTR in the human phenyalanine hydroxylase gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v.51, p.627-636, 1992a.

GOLTSOV, A.A.; EISENSMITH, R.C.; WOO, S.L.C. Detection of the XmnI RFLP at the human PAH locus by PCR. **Nucleic Acids Res.**, v.20, n.4, p.927, 1992b.

GULDBERG, P.; ROMANO, V.; CERATTO, N.; BOSCO, P.; CLUNA, M.; INDELICATO, A.; MOLIICA, F.; MELL, C.; GIOVANNINI, M.; RIVA, E.; BIASSUCCI, G.; HENRIKEEN, K.F.; GÜTTLER, F. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in southern Europe. **Hum. Mol. Genet.**, v.2, n.10, p.1703-1707, 1993a.

GULDBERG, P.; HENRIKSEN, K.F.; GÜTTLER, F. Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Genomics**, v.17, n.1, p.141-146, 1993b.

GULDBERG, P.; GÜTTLER, F. "Broad-range" DGGE for single-step mutation scanning of entire genes: application to human phenylalanine hydroxylase gene. **Nucleic Acids Res.**, v.22, n.5, p.880-881, 1994.

GULDBERG, P.; LEVY, H.L.; HANLEY, W.B.; KOCH, R.; MATALON, R.; ROUSE, B.M.; TREFZ, F.; DE LA CRUZ, F.; HENRIKSEN, K.F.; GÜTTLER, F. Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: report from the Maternal PKU Collaborative Study. **Am. J. Hum. Genet.**, v.59, n.1, p.84-94, 1996.

GULDBERG, P.; REY, F.; ZSCHOCKE, J.; ROMANO, V.; FRANÇOIS, B.; MICHIELS, L.; ULLRICH, K.; HOFFMANN, G.F.; BURGARD, P.; SCHMIDT, H.; MELI, C.; RIVA, E.; DIANZANI, I.; PONZONE, A.; REY, J.; GÜTTLER, F. 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.**, v.63, n.1, p.71-79, 1998.

GUTHRIE, R.; SUSI, A. A simple method for the detection of phenylketonuria in large populations of newborn infants. **Pediatrics**, v.32, p.338-343, 1963.

GÜTTLER, F.; LEDLEY, F.D.; LIDSKY, A.S.; DILELLA, A.G.; SULLIVAN, S.E.; WOO, S.L.C. Correlation between polymorphic DNA haplotypes at phenilalanine hydroxylase locus and clinical phenotypes of phenylketonuria. **J. Pediatr.**, v.110, p.68-71, 1987.

GÜTTLER, F.; AZEN, C.; GULDBERG, P.; ROMSTAD, A.; HANLEY, W.B.; LEVY, H.L.; MATALON, R.; ROUSE, B.M.; TREFZ, F.; DE LA CRUZ, F.; KOCH, R. Relationship among genotype, biochemical phenotype, and cognitive performance in females with phenylalanine hydroxylase deficiency: report from the Maternal Phenylketonuria Collaborative Study. **Pediatrics**, v.104, n.2, p.258-262, 1999.

HENNERMANN, J.B.; VETTER, B.; WOLF, C.; WINDT, E.; BÜHRDEL, P.; SEIDEL, J.; MÖNCH, E.; KULOZIK, A. Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in eastern Germany: A characteristic molecular profile and 15 novel mutations. **Hum. Mutat.**, v.15, p.254-260, 2000.

HERTZBERG, M.; JAHROMI, K.; FERGUSON, V.; DAHL, H.H.M.; MERCER, J.; MICKLESON, K.N.P.; TRENT, R.J. Phenylalanine hydrozylase gene haplotypes in Polynesians: evolutionary origins and absence of alleles associated with severe phenylketonuria. **Am. J. Hum. Genet.**, v.44, p.382-387, 1989.

HOANG, L.; BYCK, S.; PREVOST, L.; SCRIVER, C.R. PAH Mutation Analysis Consortium Database: A database for disease-producing and other allelic variation at the human PAH locus. **Nucleic Acids Res.**, v.24, n.1, p.127-131, 1996.

HOFMAN, K.J.; STEEL, G.; KAZAZIAN, H.H.; VALLE, D. Phenylketonuria in U.S. Blacks: molecular analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v.48, p.791-798, 1991.

JERVIS, G.A. Studies on phenypyruvic oligophrenia. (A contribution to the study of the influence of hereditary on mental defect). **J. Ment. Sci. (London)** , v.85, p.719-762, 1947.

JERVIS, G.A. Phenypyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.82, p.514-515, 1953.

KONECKI, D.S.; LICHTER-KONECKI, U. The phenylketonuria locus: current knowledge about alleles and mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in various populations. **Hum. Genet.**, v.87, p.377-388, 1991.

KUNKEL, L.M.; SMITH, K.D.; BOYER, S.H. Analyses of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.74, p.1245-9, 1977.

LABRUNE, P.; MELLE, D.; REY, F.; BERTHELON, M.; CAILLAUD, C.; REY, J.; MUNNICH, A.; LYONNET, S. Single-strand conformation polymorphism for detection of mutations and base substitution in phenylketonuria. **Am. J. Hum. Genet.**, v.48, p.1115-1120, 1991.

LEANDRO, P.; RIVERA, I.; RIBEIRO, V.; TAVARES DE ALMEIDA, I.; DA SILVEIRA, C.; LECHNER, M.C. Mutation analysis of phenylketonuria in south and central Portugal: prevalence of V388M mutation. **Hum. Mutat.**, v.6, p.192-194, 1995.

LENKE, R.R.; LEVY, H.L. Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia: international survey of the outcome of untreated and treated pregnancies. **N. Engl. J. Med.**, v.303, p.1202-1208, 1980.

LERMAN, L.S.; SILVERSTEIN, K. Computacional simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis. **Methods Enzymol.**, v.155, p.482-501, 1987.

LICHTER-KONECKI, U.; KONECKI, D.S.; DILELLA, A.G.; BRAYTON, K.; MARVIT, J.; HAHN, T.M.; TREFZ, F.K.; WOO, S.L.C. Phenylalanine hydroxilase deficiency caused by a single base substitution in an exon of the human phenylalanine hydroxilase Gene. **Biochemistry**, v.27, p.2881-2885, 1988.

LICHTER-KONECKI, U.; RUPP, A.; KONECKI, D.S.; TREFZ, F.K., SCHMIDT, H.; BURGARD, P. Relation between phenylalanine hydroxylase genotypes and phenotypic parameters of diagnosis and treatment of hyperphenylalaninaemic disorders. German Collaborative Study of PKU. **J. Inherit. Metab. Dis.**, v.17, n.3, p.362-365, 1994a.

LICHTER-KONECKI; SCHLOTTER, M.; KONECKI, D.S. DNA sequence plymorphisms in exonic and intronic regions of the human phenylalanine hydroxylase gene aid in the identification of alleles. **Hum. Genet.**, v.94, p.307-310, 1994b.

LIDSKY, A.S.; LEDLEY, F.D.; DIELLA, A.G.; KWOK, S.C.M.; DAIGER, S.P.; ROBSON, K.J.H.; WOO, S.L.C. Extensive restriction site polymorphism at the human phenylalanine hydroxylase locus and application in prenatal diagnosis of phenylketonuria. **Am. J. Hum. Genet.**, v.37, p.619-634, 1985.

MYERS, R.M.; MANIATIS, T.; LERMAN, L.S. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient-gel electrophoresis. **Methods Enzymol.**, v.155, p.501-527, 1987.

NICKERSON, D.A.; TOBE, V.O.; TAYLOR, S.L. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. **Nucleic. Acids. Res.**, v.25, n.14, p.2745-2751, 1997.

NOWACKI, P.M.; BYCK, S.; PREVOST, L.; SCRIVER, C.R. PAH mutation analysis consortium database 1997: prototype for relational locus-specific mutation databases. **Nucleic Acids Res.**, v.26, p.220-225, 1998.

OKANO, Y.; WANG, T.; EISENSMITH, R.C.; WOO, S.L.C. PKU mutations among caucasians. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 45, p.A211, 1989.

OKANO, Y.; EISENSMITH, R.C.; GÜTTLER, F.; LICHTER-KONECKI, U.; KONECKI, D.S.; TREFZ, F.K.; DASOVICH, M.; WANG, T.; HENRIKSEN, K.; LOU, H. Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. **N. Engl. J. Med.**, v.324, n.18, p.1232-1238, 1991.

OKANO, Y.; HASE, Y.; LEE, D-H.; TAKADA, G.; SHIGEMATSU, Y.; OURA, T.; ISSHIKI, G. Molecular and population genetics of phenylketonuria in Orientals: correlation between phenotype and genotype. **J. Inher. Metab. Dis.**, v.17, p.156-159, 1994.

OKANO, Y.; ASADA, M.; KANG, Y.; NISHI, Y.; HASE, Y.; OURA, T.; ISSHIKI, G. Molecular characterization of phenylketonuria in Japanese patients. **Hum. Genet.**, v.103, n.5, p.613-618, 1998.

OZGÜÇ, M.; OZALP, I.; COSKUN, T.; YILMAZ, E.; ERDEM, H.; AYTER, S. Mutation analysis in Turkish phenylketonuria patients. **J. Med. Genet.**, v.30, n.2, p.129-130, 1993.

PENROSE, L.S. Inheritance of phenylpyruvic amentia (phenylketonuria). **Lancet**, v.2, p.192-194, 1935.

PENROSE, L.S.; QUASTEL, J.H. Metabolic studies in phenylketonuria. **Biochem. J.**, v.31, p.266-274, 1937.

PÉREZ, B.; DESVIAT, L.R.; DE LUCCA, M.; CARVALHO, P.; VARGAS, P.; COSTA, M.M.R.; LOGHIN-GROSSO, N.; SCHIMIDT; UGARTE, M. Mass screening of PKU in São Paulo and analysis of IVS10 mutation. VI International Congress on Inborn Errors of Metabolism, Milan, Italy, 1994a.

PÉREZ, B.; DESVIAT, L.R.; DE LUCCA, M.; UGARTE, M. Spectrum and origin of phenylketonuria mutations in Spain. **Acta Paediatr. Suppl.**, v. 407, p.34-36, 1994b.

PÉREZ, B.; DESVIAT, L.R.; DE LUCCA, M.; SCHMIDT, B.; LOGHIN-GROSSO, N.; GIUGLIANI, R.; PIRES, R.F.; UGARTE, M. Mutation analysis of phenylketonuria in south Brazil. **Hum. Mutat.**, v.8, n.3, p.262-264, 1996.

PÉREZ, B.; DESVIAT, L.R.; UGARTE, M. Analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in the Spanish population: mutation profile and association with intragenic polymorphic markers. **Am. J. Hum. Genet.**, v.60, n.1, p.95-102, 1997.

PÉREZ, B.; DESVIAT, L.R.; DE LUCCA, M.; CORNEJO, V.; RAIMANN, E.; UGARTE, M. Molecular characterization of phenylalanine hydroxylase deficiency in Chile. Mutations in brief no. 243. Online. **Hum. Mutat.**, v.13, n.6, p.503, 1999.

RIVERA, I.; LEANDRO, P.; LICHTER-KONECKI, U.; TAVARES DE ALMEIDA; LECHNER, M.C. Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. **J. Med. Genet.**, v.35, n.4, p.301-304, 1998.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. Enzymatic amplification of beta-blobin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-4, 1985.

SCRIVER, C.R.; KAUFMAN, S.; WOO, S.L.C. The Hiperphenyalaninemias. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S. (eds) The metabolic basis of inherited disease, v.1. McGraw-Hill, p.495-546, 1989.

SCRIVER, C.R.; KAUFMAN, S.; EISENSMITH, R.C.; WOO, S.L.C. The Hiperphenyalaninemias. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S., VALLE, D (eds) The metabolic basis of inherited disease, 7ª ed. McGraw-Hill, New York, p.1015-1076, 1995.

SCRIVER, C.R.; WATERS, P.; SARKISSIAN, C.; RYAN, S.; PREVOST, L.; CÔTÉ, D.; NOVAK, J.; TEEBI, S.; NOWACKI, P.M. PAHdb: A locus-specific knowledgebase. **Hum. Mutat.**, v.15, p.99-104, 2000.

SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R.; LERMAN, L.S.; MYERS, R.M. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.232-236, 1989.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, v.98, p.503-517, 1978.

SVENSSON, E.; WANG, Y.; EISENSMITH, R.C.; HAGENFELDT, L.; WOO, S.L. Three polymorphisms but no disease-causing mutations in the proximal part of the promoter of the phenylalanine hydroxylase gene. **Eur. J. Hum. Genet.**, v.1, n.4, p.306-313, 1993.

TYFIELD, L.A.; STEPHENSON, A.; COCKBURN, F.; HARVIE, A.; BIDWELL, J.L.; WOOD, N.A.; PILZ, D.T.; HARPER, P.; SMITH, I. Sequence variation at the phenylalanine hydroxylase gene in the British Isles. **Am. J. Hum. Genet.**, v.60, n.2, p.388-396, 1997.

UDENFRIEND, S, COOPRE, J.R. The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. **J. Biol. Chem.**, v.194, p.503-511, 1952.

VAN DER SIJS-BOS, C.J.M.; DIEPSTRATEN, C.M.; JUYN, J.A.; PLAISIER, M.; GILTAY, J.C.; VAN SPRONSEN, F.J.; SMIT, G.P.A.; BERGER, R.; SMEITINK; JAM; POLL-THE. B.T.; PLOOS VAN AMSTEL, J.K. Phenylketonuria in the Netherlands: 93% of the mutations are detected by single-strand conformation analysis. **Hum. Hered.**, v.46, n.4, p.185-190, 1996.

WEDEMEYER, N.; DWORNICZAK, B.; HORST, J. PCR detection of the MspI (Aa) RFLP at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. **Nucleic Acids Res.**v.19, n.8, p.1959, 1991.

WONG, C.; DOWLING, C.E.; SAIKI, R.K.; HIGUCHI, R.G.; ERLICH, H.A.; KAZAZIAN, H.H.J.R. Characterization of beta-thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. **Nature**, v.330, p.384-386, 1987.

WOO, S.L.C.; LIDSKY, A.S.; GÜTTLER, F.; CHANDRA, T.; ROBSON, J.H. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. **Nature**, v.306, n.10, p.151-155, 1983.

WOO, S.L.C. Molecular basis and population genetics of phenylketonuria. **Biochemistry**, v.28, n.1, p.1-7, 1989.

ZSCHOCKE, J.; GRAHAM, C.A.; CARSON, D.J.; NEVIN, N.C. Phenylketonuria mutation analysis in Northern Ireland: a rapid stepwise approach. **Am. J. Hum. Genet.**, v.57, p.1311-1317, 1995.

SUMMARY

In the present study, 115 Brazilian families with phenylketonuria (PKU), mainly from the Southeast, were studied using three laboratory methods (DGGE, SSCP and sequencing). All 13 exons of the PAH gene were analyzed, including the splicing sites and the promoter region. We identified 50 distinct mutations and characterized 91% of the mutant alleles. The 5 most prevalent mutations of the 50 mutations identified (50% of the PKU alleles) were IVS10nt-11g→a (17.4%), followed by R261Q (12.2%), V388M (9.1%), R252W (6.5%) and R270K (4.8%). The other mutations were rare. The mutation spectrum included 10 new mutations (IVS5nt-54a→g, IVS6nt17g→t, E205A, F240S, K274E, I318T, L321L, C357G, IVS11nt17g→a and S411X). To characterize the origin and distribution of the PAH alleles we determined the association between the detected mutations and the PCR/RFLP haplotypes and VNTR alleles located on the PAH gene. For those patients whose mutant alleles were detected we calculated the correlation with pretreatment phenylalanine levels, thus establishing a genotype/phenotype correlation. The present results confirm the marked heterogeneity observed at the PAH locus and contribute to the understanding of the distribution and frequency of PKU mutations in the Brazilian population.