

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
BIOQUÍMICA

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES FREQUENTES
NO GENE DA FENILALANINA HIDROXILASE POR PCR EM
TEMPO REAL**

TAMARA DA SILVA VACCARO

Porto Alegre, junho de 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
BIOQUÍMICA

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES FREQUENTES
NO GENE DA FENILALANINA HIDROXILASE POR PCR EM
TEMPO REAL**

TAMARA DA SILVA VACCARO

Orientador

Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Saraiva Pereira

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre.

Porto Alegre, junho de 2008

Pensamento

Todos os caminhos conduzem ao mesmo objetivo: comunicar aos outros o que somos. Devemos atravessar a solidão e a dificuldade, o isolamento e o silêncio, a fim de chegar ao local encantado onde podemos dançar nossa dança desajeitada e cantar nossa canção melancólica - mas nessa dança ou nessa canção são cumpridos os ritos mais antigos de nossa consciência, na percepção de sermos humanos e de crermos em um destino comum.

Pablo Neruda, 1971

Agradecimentos

Quero expressar meus agradecimentos, pois ao lembrar destas pessoas tive a certeza que escolhi o caminho certo.

Quero agradecer especialmente a minha orientadora Maria Luiza por ter acreditado em mim, pelo apoio, por todo o conhecimento compartilhado, pelo exemplo e, principalmente, pelas conversas de incentivo.

Agradeço às agências financiadoras do projeto - CNPq, FAPERGS e FIPE-HCPA - que foram essenciais para a realização da pesquisa.

Agradeço aos meus primeiros professores de Bioquímica na graduação em Farmácia, pois foram aqueles que me contaram que a Bioquímica era linda.

Agradeço a todos os pesquisadores e colegas do Departamento de Bioquímica da UFRGS, em especial, aos meus primeiros orientadores: Richard Rodnight, Sirlene Cechin, Carmem Gottfried e Carlos Alberto Gonçalves, pelo incentivo e aprendizado de bancada e também pelos primeiros passos.

Agradeço a todos os integrantes do Serviço de Genética Médica e aos colegas que estão no Laboratório de Identificação Genética, ou que passaram por ele no decorrer de minha pesquisa. Agradeço as palavras de apoio e carinho do Dr. Júlio César Leite. Agradeço enormemente à Dr.^a Cristina Netto, por ter me conduzido ao mundo da Genética Molecular e pela amizade.

Agradeço àqueles que me deram a vida e me ensinaram a amar, pelo amor incondicional e o apoio irrestrito de meu pai e minha mãe. Agradeço ao meu irmão pelo aprendizado de compartilhar e pela grande amizade que nos une.

Agradeço à pessoa que me incentiva todos os dias, que, com palavras e ações, me mostra o caminho da felicidade. Obrigada, meu amor, Rafael.

Enfim, agradeço a Deus e a todos os meus amigos e familiares que contribuíram para que eu pudesse trilhar este caminho e fizeram parte dele.

RESUMO

Fenilcetonúria (PKU) é uma doença autossômica recessiva caracterizada pela deficiência da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). Mutações no gene da PAH são responsáveis por PKU e uma grande heterogeneidade alélica é observada em pacientes em todo o mundo. Até o momento, mais de 500 diferentes alterações no gene *PAH* são encontradas no *PAHdb*. A maioria dessas mutações são raras e/ou específicas nas populações estudadas. O espectro de mutações de PKU em pacientes do sul do Brasil foi definido anteriormente e 6 mutações (IVS2+5G>C, p.I65T, p.R261X, p.R261Q, p.R408W e IVS12+1G>A) foram identificadas como responsáveis por 63,6% dos alelos mutantes. Este trabalho apresenta uma estratégia baseada no sistema *TaqMan*[®] (*Applied Biosystems*) para uma identificação rápida e específica das mutações listadas acima. Esta estratégia foi aplicada a uma amostra populacional que anteriormente foi caracterizada por diferentes técnicas. Os testes mostraram-se altamente sensíveis e são potencialmente aplicáveis à identificação de amostras de sangue impregnadas em papel filtro, podendo ser utilizados na triagem neonatal.

Palavras-chave: análise molecular, mutação, PKU, sistema *TaqMan*[®]

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive disease characterized by phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency. Mutations in the PAH gene are responsible for PKU, and an extensive allelic heterogeneity was observed in patients worldwide. Up to date, more than 500 different alterations can be found in PAHdb, the majority being rare mutations and/or specific to a genetic background. Our group was able to define mutation spectrum in PKU patients in Southern Brazil, and identified six mutations, named IVS2+5G>C, p.I65T, p.R261X, p.R261Q, p.R408W and IVS12+1G>A, that are responsible for 63.6% of mutant alleles. This work introduced a strategy, based in the TaqMan[®] System (Applied Biosystems), for a fast and specific identification of the above mutations. This strategy was applied to a sample population that was previously characterized by different techniques. Assays were shown to be highly sensitive and are potentially applicable to blood spots in order to be used in neonatal screening.

Key words: molecular analysis, mutation, PKU, TaqMan[®] system

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	adenosina monofosfato cíclico
APAE/SP	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais/São Paulo
BH ₄	tetrahydrobiopterina
BIA	bacterial inhibition assay
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
DNA	ácido desoxirribonucléico
EIM	erro inato do metabolismo
HPA	hiperfenilalaninemia
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
kb	quilobase
nt	nucleotídeo
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAH	fenilalanina hidroxilase
<i>PAH</i>	gene da fenilalanina hidroxilase
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)
PKU	fenilcetonúria
RFLP	polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (restriction fragment length polymorphism)
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
SGM	Serviço de Genética Médica
SNP	polimorfismos de nucleotídeos únicos (single nucleotide polymorphism)
SSCP	conformação de polimorfismo de fita simples (single strand conformacional polymorphism)
SUS	Sistema Único de Saúde
<i>Taq</i> DNA Polimerase	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rota de metabolização da fenilalanina no organismo humano.....	3
Figura 2 – Modelo tetramérico da fenilalanina hidroxilase.....	6

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico	1
1.2. Fenilcetonúria.....	2
1.3. Manifestações Clínicas.....	4
1.4. Proteína PAH.....	5
1.5. Gene <i>PAH</i>	7
1.6. Diagnóstico de PKU	9
1.6.1. Diagnóstico Sintomático	9
1.6.2 Diagnóstico Assintomático	9
1.6.3 Diagnóstico Bioquímico.....	9
1.6.3.1 Triagem neonatal.....	9
1.6.3.2 Análise Quantitativa.....	10
1.6.4 Análise Molecular	11
1.7. Tratamento	11
1.8. Caracterização molecular da PKU	12
1.8.1. Caracterização molecular dos pacientes com PKU no sul do Brasil. 12	
1.8.2. Mutações freqüentes.....	12
1.9. PCR em tempo real e identificação de mutações	15
1.9.1. Sistema <i>Sybr Green</i> ®.....	16
1.9.2. Sistema <i>TaqMan</i> ®.....	17
1.10. Justificativa.....	17
2. OBJETIVOS.....	19

2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Artigo: Validation of a molecular protocol for identification of common mutations in the fenilhydroxylase gene of PKU patients from Southern Brazil	22
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS	44
8. ANEXOS.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A Fenilcetonúria (PKU) foi identificada devido à busca incessante de uma mãe para saber a causa do retardo mental de seus dois filhos e ao espírito empírico de um cientista norueguês chamado Asbjörn Fölling que, em 1934, identificou a presença do ácido fenilpirúvico na urina desses pacientes e o relacionou com o retardo mental (Centerwall and Centerwall, 2000). Na época, a doença foi denominada oligofrenia fenilpirúvica, passando a ser conhecida como PKU em 1937, quando Penrose e Quastel assim a denominaram para associar ao fenótipo metabólico (Penrose and Quastel, 1937).

Em 1947, Jervis demonstrou que a doença era causada por um erro metabólico na oxidação da fenilalanina em tirosina e, em 1953, esse mesmo pesquisador descreveu que os pacientes fenilcetonúricos apresentavam uma inativação da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). Foi também em 1953, que Bickel e colaboradores iniciaram estudos sobre os efeitos de uma dieta pobre em fenilalanina em uma criança de dois anos portadora da doença (Bickel *et al.*, 1953). Mais tarde, o tratamento de outros pacientes permitiu verificar que a restrição alimentar precoce da fenilalanina evitava o retardo mental. PKU tornava-se a primeira doença hereditária a ser tratada (Scriver and Kaufman, 2001). Nos anos 70, foram observados pacientes com hiperfenilalaninemia (HPA), porém sem deficiência da enzima PAH. Desta forma, foram descobertas desordens em enzimas envolvidas na síntese e na reciclagem do co-fator de PAH, denominado tetrahidrobiopterina (BH₄) (Kaufman *et al.*, 1975; Niederwieser *et al.*, 1979). Na década seguinte, o gene da PAH humana foi mapeado no cromossomo 12 e catalogado no GenBank (PAH; GeneID: 5053; cDNA: U49897). Já nos anos 90, um consórcio de análise de mutações de PAH (PAHdb *phenylalanine hydroxylase locus knowledgebase*) foi

constituído, registrando a análise de mutações de diversas populações humanas (Hoang *et al.*, 1996).

1.2. Fenilcetonúria

A PKU (abreviatura do inglês *Phenylketonuria*) é a desordem mais comum no metabolismo dos aminoácidos, apresentando incidência variável nas populações, sendo bastante freqüente na Turquia (1:2.600 nascidos vivos) e pouco freqüente no Japão (1:120.000 nascidos vivos) (Scriver and Kaufman, 2001). A freqüência média de PKU em eurodescendentes é de 1:10.000 nascidos vivos, portanto a freqüência estimada de heterozigotos seria de 1:50 a 1:70 (Scriver and Kaufman, 2001).

A PKU (OMIM 261600) é uma hiperfenilalaninemia (HPA), herdada de forma autossômica recessiva, do grupo de desordens denominado Erros Inatos do Metabolismo (EIM). Essa doença se caracteriza pela deficiência total ou parcial da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH; E.C. 1.14.16.1), a qual é codificada pelo gene fenilalanina hidroxilase (*PAH*) (Scriver and Kaufman, 2001).

HPA é o nome genérico dado a um conjunto de desordens que levam ao aumento da concentração de fenilalanina no sangue, causado pelo comprometimento da reação de hidroxilação da fenilalanina para formar tirosina. Em humanos, esta reação de hidroxilação ocorre principalmente nos hepatócitos e requer as seguintes moléculas: a enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), o oxigênio, o substrato fenilalanina e o co-fator tetrahidrobiopterina (BH₄).

A grande maioria dos casos de HPA, em torno de 98%, está associada a mutações no gene *PAH*, porém, nos casos restantes, mutações em *loci* de pelo menos duas enzimas envolvidas na síntese do co-fator BH₄ e de outras duas enzimas que regeneram o co-fator após a reação de hidroxilação já foram descritas (Scriver and Kaufman, 2001).

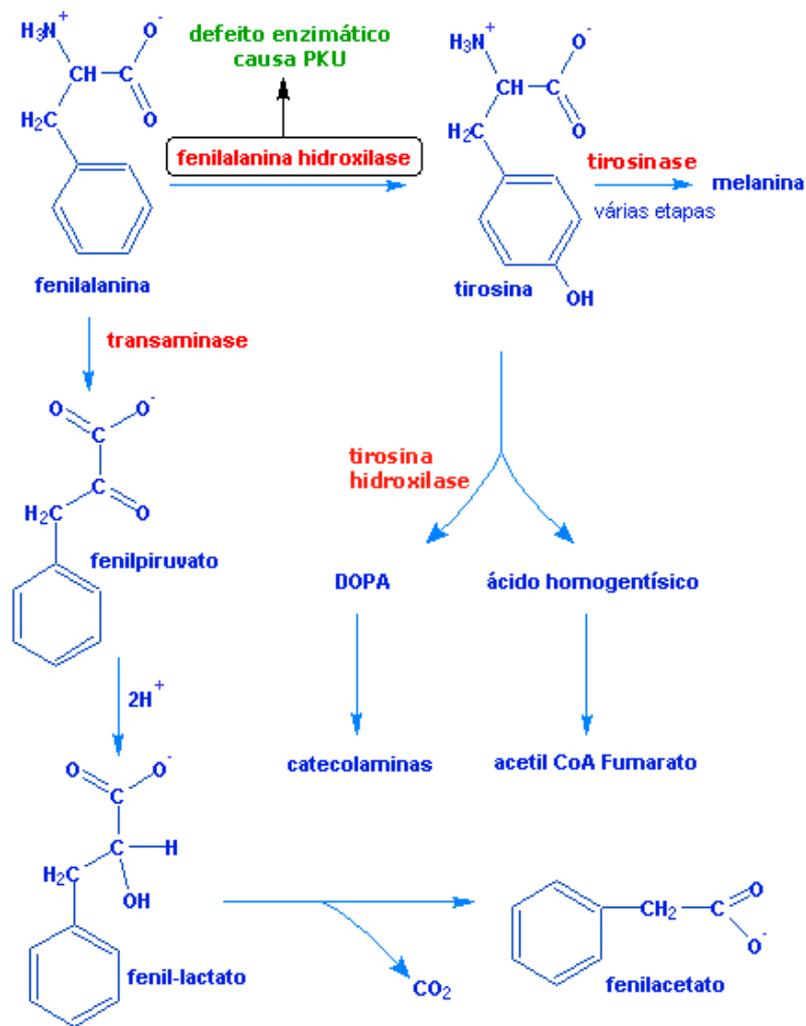


Figura 1 – Rota de metabolização da fenilalanina no organismo humano. (www.ciadaescola.com.br/zoom/materia.asp?materia=249)

O passo inicial e limitante do catabolismo completo da fenilalanina a CO_2 e água é a hidroxilação de fenilalanina para formar tirosina. Em condições fisiológicas normais, a formação de tirosina utiliza 75% da fenilalanina livre (Scriver and Kaufman, 2001). Em casos de deficiência da PAH, a fenilalanina pode ser metabolizada por uma via alternativa, como demonstra a figura 1, sofrendo inicialmente transaminação, para a formação de fenilpiruvato, seguida da sua conversão em outros compostos como fenil-lactato e fenilacetato. Os produtos

da via da fenilalanina transaminase são excretados na urina (Kaufman, 1993).

A fenilalanina é um aminoácido essencial para seres humanos e sua conversão em tirosina é também a primeira reação para a síntese de melanina, molécula responsável pela pigmentação da pele e cabelos, e catecolaminas que, por sua vez, dão origem a neurotransmissores, como a dopamina e a noradrenalina no sistema nervoso e a adrenalina nas glândulas supra-renais. Na deficiência de PAH, tirosina passa a ser um aminoácido essencial e deve ser obtido a partir da dieta alimentar (Scriver and Kaufman, 2001).

O principal destino da enzima PAH mutante é a degradação em qualquer estágio após a tradução, resultado da perda de estabilidade. Por isso, PKU pode ser classificada como um exemplo de doença conformacional (Gregersen *et al.*, 2001).

1.3. Manifestações Clínicas

A PKU apresenta uma grande heterogeneidade alélica, portanto o efeito sobre o fenótipo tem que ser avaliado em três níveis: (a) integridade e função da enzima, (b) concentração e homeostase da fenilalanina nos fluidos corporais e (c) função e desenvolvimento cerebral.

A principal manifestação clínica de PKU em pacientes não tratados é o retardo mental. Embora a reação de PAH ocorra principalmente no fígado, os danos causados pelo acúmulo de fenilalanina são observados no desenvolvimento e na função cerebral. Até o momento não é conhecida a forma de ação deste acúmulo, mas possivelmente o dano estaria envolvido nas três seguintes hipóteses, (a) deficiência de tirosina no cérebro, (b) distribuição de metabólitos da fenilalanina no cérebro e (c) efeito da fenilalanina nos processos neuroquímicos. Após várias pesquisas, a única comprovação que se tem é que o acúmulo da fenilalanina é necessário para o dano cerebral, mas talvez não seja o suficiente para explicar a

neurotoxicidade (Scriver and Kaufman, 2001).

A grande maioria dos pacientes, tratados ou não, tem como característica principal a falta de pigmentação da pele e dos cabelos, apresentando um fenótipo mais claro que seus irmãos não afetados (Scriver e Kaufman, 2001). Outras manifestações clínicas descritas em pacientes não tratados são eczema, epilepsia, convulsões, problemas na postura e na marcha, urina com odor de urina de “rato” (Paine, 1957). Além disso, pacientes não tratados podem desenvolver microcefalia e anomalias comportamentais (Kaye and Committee on Genetics, 2006).

1.4. Proteína PAH

O nome oficial da PAH é fenilalanina-4-mono-oxigenase, com função de oxi-redutase. Essa proteína é constituída por 452 aminoácidos, apresentando-se na forma tetramérica quando ativa e dimérica em seu estado inativo (Fusetti *et al.*, 1998). Cada monômero da PAH apresenta três domínios: o regulatório, o catalítico e o de tetramerização (Erlandsen and Stevens, 2001).

O domínio regulatório é formado pelos resíduos 1 a 142, apresentando uma seqüência interna de auto-regulação. Os resíduos 143 a 410 formam o domínio catalítico. Nessa região ocorre a ligação de uma molécula de ferro e de três moléculas de água, formando um centro de ligação ao co-fator natural BH_4 . Já o domínio de tetramerização abrange os resíduos 411 a 452. Esse domínio é responsável pela conformação para formar um tetrâmero intacto da PAH e proporcionar um centro de interações com os outros três monômeros (Erlandsen and Stevens, 2001).

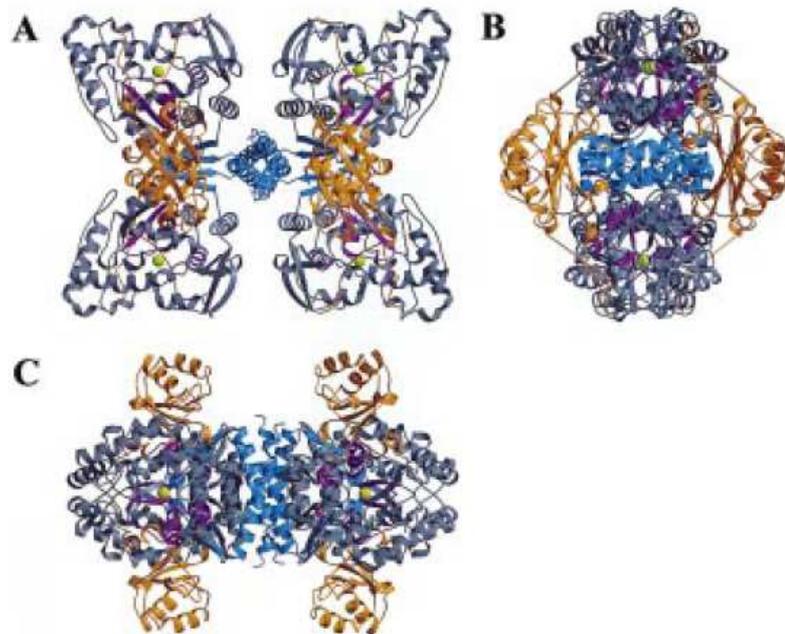


Figura 2 – **Modelo tetramérico da fenilalanina hidroxilase**. O domínio regulatório está representado em laranja, o domínio catalítico está representado em cinza, e o domínio de tetramerização está representado em azul. (A) Vista frontal. (B) Vista lateral. (C) Vista superior (Erlandsen and Stevens, 2001).

A atividade catalítica da PAH é o principal mecanismo de regulação da homeostase da fenilalanina no corpo humano e sua atividade é regulada pela concentração de fenilalanina (Kaufman, 1999). O papel regulatório da fenilalanina sobre a atividade de PAH pode ser comprovado pela mudança de concentração do co-fator BH_4 : a inibição da PAH é observada na presença de altas concentrações de BH_4 ; por outro lado, em concentrações altas de fenilalanina, a PAH é ativada na mesma dosagem alta do co-fator (Okano *et al.*, 2007).

Além disso, a PAH pode ser regulada por fosforilação através da via de sinalização de uma proteína quinase dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (Wretborn *et al.*, 1980; Kaufman, 1993). A regulação da PAH por fosforilação e pelo substrato fenilalanina são possivelmente rotas sinérgicas para a ativação enzimática, tanto que o co-fator BH_4 desempenha um papel de efetor negativo para a fosforilação de PAH em concentrações baixas

de fenilalanina. Possivelmente, a fosforilação da PAH é estimulada por fenilalanina (Doskeland *et al.*, 1984).

1.5. Gene *PAH*

O *PAH* está localizado no cromossomo 12, região q22-q24.1 (Lidsky *et al.*, 1985), sendo constituído por 13 exons. Este gene abrange 90 kb de DNA genômico e dá origem a um ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) maduro de 2,4 kb (Kwok *et al.*, 1985). A seqüência nucleotídica completa do cDNA (Kwok *et al.*, 1985; Konecki *et al.*, 1992) e gênica (Konecki, *PAHdb*, 2001) estão no GenBank e no *PAHdb*.

O *PAH* é rico em marcadores polimórficos intragênicos, incluindo polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) bialélicos, polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP), além de um grande número de repetições em *tandem* (Kwok *et al.*, 1985). Por essas características, o *PAH* apresenta múltiplos haplótipos associados a diferentes mutações que causam a deficiência enzimática (DiLella *et al.*, 1986).

A primeira mutação identificada no gene *PAH* foi uma simples troca de base (G>A) em uma região de *splicing* no intron 12 (DiLella *et al.*, 1986). Essa mutação causa a deleção do exon 12 durante o processamento do mRNA, levando à tradução de uma proteína truncada (Marvit *et al.*, 1987). Desde então, várias mutações foram identificadas no gene *PAH*, totalizando mais de 500 alterações, até o momento (<http://www.pahdb.mcgill.ca>).

A análise molecular identificou um pequeno número de mutações como prevalentes; o restante, que representa a grande maioria, são raras ou freqüentes em populações específicas (Scriver, 2007). Portanto, aproximadamente 75% dos casos de PKU são o resultado de duas mutações diferentes, uma em cada alelo (Scriver and Kaufman, 2001).

Os vários tipos de mutações identificados no *PAH* estão disponíveis no *PAHdb* e estão

distribuídas da seguinte forma: mutações de sentido trocado (61,47%); deleções (13,53%); mutação de *splicing* (11,47%); mutações silenciosas (6,02%); mutações sem sentido (4,89%); pequenas inserções (1,88%) e outras (0,75%) (<http://www.pahdb.mcgill.ca> acesso em 16/06/2008).

A maioria dos alelos patogênicos apresenta mutações de sentido trocado, causando erro na tradução da proteína PAH. O comportamento cinético e/ou a estabilidade da enzima PAH pode categorizar, pelo menos, três tipos de mutações: o primeiro tipo envolve mutações que afetam a estabilidade e a cinética enzimática; o segundo altera somente as propriedades cinéticas da enzima; o terceiro afeta a estabilidade de PAH *in vivo* e *in vitro*, sem alteração da cinética. De acordo com a estrutura tridimensional de PAH, as mutações podem alterar os resíduos presentes: (a) no sítio ativo, (b) na preservação da estrutura protéica, (c) nos motivos de interação de interdomínios, (d) na interação com o N-terminal e (e) nas regiões que estruturam o dímero e o tetrâmero PAH (Erlandsen *et al.*, 2003).

Estudos de estrutura protéica e de expressão gênica (*in vitro*) têm sido realizados com o intuito de caracterizar os alelos patogênicos. As mutações são classificadas de acordo com a modificação na cinética e na estabilidade enzimática (Flatmark *et al.*, 1997). A associação das proteínas mutantes para formar o tetrâmero ativo depende da estrutura de cada proteína PAH individualmente e da composição do tetrâmero (Leandro *et al.*, 2006). Por isso, a deficiência da enzima mutante (PAH) pode apresentar diversos níveis de severidade (Zschocke, 2003).

O rendimento e a atividade de determinadas proteínas PAH mutantes podem ser modulados por fatores externos, como temperatura e o uso de moléculas do tipo chaperonas (Gamez *et al.*, 2000). Com a análise estrutural de alelos mutantes de PAH, foi demonstrado que o co-fator BH₄ pode ter atividade de uma chaperona natural, estabilizando a enzima mutada (Erlandsen and Stevens, 2001). Essa característica do co-fator pode ser utilizada como um agente terapêutico em certos genótipos de PAH analisados (Erlandsen *et al.*, 2004).

1.6. Diagnóstico de PKU

1.6.1. Diagnóstico Sintomático

A suspeita clínica de PKU ocorre somente quando surgem os primeiros atrasos no desenvolvimento da criança, podendo acarretar inquietação, irritabilidade e a ocorrência de episódios de convulsão, além de outros sintomas (Scriver and Kaufman, 2001). Sem a triagem neonatal, PKU é raramente diagnosticada antes dos seis meses de vida do paciente, pois o atraso no desenvolvimento mental só é percebido com o acúmulo do metabólito (Kaye and Committee on Genetics, 2006).

1.6.2 Diagnóstico Assintomático

PKU é uma doença metabólica que deve ter diagnóstico precoce, pois os sinais/sintomas serão percebidos somente no curso da doença (Scriver and Kaufman, 2001).

1.6.3 Diagnóstico Bioquímico

1.6.3.1 Triagem neonatal

A triagem neonatal de PKU, que é, em geral, incluída no “Teste do Pezinho”, é o primeiro passo para o diagnóstico assintomático de PKU. No Brasil, a PKU foi a primeira doença a ser rastreada em um trabalho realizado pela APAE/SP no ano de 1976, sendo que a triagem tornou-se obrigatória em todo o território nacional a partir de 13 de julho de 1990 (Lei Federal nº 8.069 – Estatuto da Criança e do Adolescente) (Marini *et al.*, 2007).

Atualmente, o Sistema Único de Saúde (SUS) é o responsável pela triagem neonatal, disponibilizando o teste para hiperfenilalaninemias, hipotireoidismo congênito, hemoglobinopatias e fibrose cística (Marini *et al.*, 2007).

Normalmente, fenilcetonúricos apresentam concentrações plasmáticas de fenilalanina normais ao nascimento, pois a mãe depura a quantidade aumentada de fenilalanina do feto através da placenta. Assim, os testes realizados no momento do nascimento podem demonstrar resultado falso negativo. Portanto, a coleta da amostra para a realização do teste deve ser realizada entre o terceiro e o sétimo dia de vida (Committee on Genetics, 1996). A triagem neonatal de PKU pode ser realizada por diferentes metodologias. O primeiro método utilizado foi o semiquantitativo de *Guthrie bacterial inhibition assay* (BIA) (Guthrie and Susi, 1963). A coleta do sangue é realizada por impregnação sangüínea em papel filtro.

1.6.3.2 Análise Quantitativa

Resultados positivos de amostras coletadas na triagem neonatal devem ser confirmados por métodos quantitativos, que apresentam maior sensibilidade e especificidade (Scriver and Kaufman, 2001). Entre eles, podemos citar a análise fluorimétrica (McCaman and Robins, 1992), a espectrometria de massa *in tandem* (Chace *et al.*, 1993) e o método enzimático (Campbell *et al.*, 1992), os quais podem ser utilizados para a confirmação e o monitoramento da concentração de fenilalanina plasmática dos pacientes (Scriver and Kaufman, 2001). Por se tratar primariamente de uma hiperfenilalaninemia, uma possível deficiência do co-fator BH₄ deve ser avaliada (Güttler, 1980).

1.6.4 Análise Molecular

A análise molecular, de uma forma geral, permite o estudo genético das populações, podendo demonstrar os tipos e as frequências de alterações em um determinado gene. O conhecimento específico da alteração gênica proporciona uma série de informações importantes (Scriver and Kaufman, 2001).

Os alelos da PKU podem ser analisados tanto para mutações que causam a doença como para associação de haplótipos polimórficos. Os métodos utilizados incluem: *Southern blotting*, análise de heteroduplex, conformação de polimorfismo de fita simples (SSCP), digestão com enzima de restrição (RFLP), hibridização com oligonucleotídeo alelo-específico, além de outros (Cotton, 1993). O diagnóstico de mutações no *PAH* colabora no aconselhamento genético para a família, caso os portadores queiram saber precisamente a alteração gênica responsável pela atividade enzimática baixa.

1.7. Tratamento

A PKU foi a primeira doença metabólica hereditária em que a restrição da ingesta do substrato evita as terríveis conseqüências clínicas do distúrbio (Scriver and Kaufman, 2001). Esse tratamento pode ser efetuado por meio de uma dieta com baixo teor de fenilalanina (Bickel *et al.*, 1953) e suplementada pela tirosina (Brouwer *et al.*, 1977). O monitoramento constante dos níveis sanguíneos de fenilalanina é o principal parâmetro para evitar problemas no tratamento. Pacientes bem tratados apresentam desenvolvimento intelectual normal ou próximo da normalidade, dependendo da época do início do tratamento. Quanto mais precoce for a sua introdução, melhor será a resposta terapêutica (Smith and Beasley, 1990).

1.8. Caracterização molecular da PKU

Estudos de caracterização molecular da PKU já foram realizados em diversas populações. Esses estudos demonstraram um amplo espectro de mutações com diferentes frequências entre as populações (www.pahdb.mcgill.ca).

1.8.1. Caracterização molecular dos pacientes com PKU no sul do Brasil

No nosso laboratório foi realizado um estudo para identificar o espectro de alterações no *PAH* em 23 pacientes com PKU não aparentados. Como resultado, 17 mutações e 4 polimorfismos foram identificados, incluindo duas seqüências variantes novas. Algumas mutações comuns, identificadas previamente, como a p.I65T, a p.R252W, a p.R261X, a p.R261Q, a IVS10-11G>A, a p.V388M, a p.R408W, a IVS12+1G>A e a IVS2+5G>C, fazem parte do espectro de variações encontradas neste estudo (Silva *et al.*, 2003). Além de encontrar um polimorfismo novo (IVS12+15T>C), este estudo identificou uma mutação nova (1738G>T) (Silva *et al.*, 2003). A nomenclatura das mutações neste trabalho segue as recomendações sugeridas internacionalmente (den Dunnen and Antonarakis, 2000).

As alterações identificadas têm grande importância para o estudo molecular da PKU nesta população.

1.8.2. Mutações freqüentes

Mutação IVS2+5G>C

A mutação IVS2+5G>C está localizada no nucleotídeo c.168+5 do intron 2 do gene *PAH* (Gulberg *et al.*, 1993) e se caracteriza pela transição de G para C. Esta mutação promove

uma alteração no *splicing* e conseqüente produção de um mRNA maduro alterado. É uma mutação severa, pois altera toda a tradução da proteína PAH (Jennings *et al.*, 2000). O estudo realizado previamente no nosso laboratório estabeleceu uma frequência de 9,8% desta alteração (Silva *et al.*, 2003).

Mutação p.I65T

A mutação p.I65T gera uma substituição de leucina por treonina no códon 65 da proteína PAH, causada pela transição de T para C na posição 194 do cDNA, no exon 3 do gene *PAH* (John *et al.*, 1992). A modificação no domínio regulatório da proteína causa aumento da degradação e agregação da proteína *in vivo*, não afetando o sítio ativo. A mutação p.I65T em genótipo homocigoto ou heterocigoto pode estar associada à PKU clássica e intermediária, como também à HPA não-PKU (John *et al.*, 1992). O amplo espectro de fenótipos pode ser explicado pela natureza da mutação, a qual se localiza em uma região de regulação e não de catálise (Erlandsen *et al.*, 2003), e também pela diferença na modulação dos níveis de proteína em cada indivíduo, que pode ter papel crucial para a síntese aumentada de proteína mutante (Waters *et al.*, 2000). Essa alteração é uma das mais frequentes na região da Península Ibérica (Rivera *et al.*, 1998; Desviat *et al.*, 1999) e na Itália (Dianzani *et al.*, 1995) e foi identificada como a mais frequente (19,5%) (Silva *et al.*, 2003) na população do sul do Brasil.

Mutação p.R261X

A mutação p.R261X é caracterizada por uma transição de C para T no nucleotídeo 781 do cDNA, no exon 7 do gene *PAH*, onde a alteração gênica provoca um códon de parada (*stop codon*) (Dworniczak *et al.*, 1991). Por estar localizada no domínio catalítico, essa alteração gera uma proteína truncada, com efeito deletério para a enzima PAH, gerando somente

fenótipo de PKU clássica (Jennings *et al.*, 2000). Essa mutação é bastante freqüente na região da Península Ibérica (Rivera *et al.*, 1998; Desviat *et al.*, 1999) e na Itália (Dianzani *et al.*, 1995), apresentando uma freqüência de 9,8% na população com PKU do sul do Brasil (Silva *et al.*, 2003).

Mutação p.R261Q

A mutação p.R261Q é causada por uma transição de G para A no nucleotídeo 782 do cDNA, no exon 7 do gene *PAH*, promovendo a substituição do aminoácido arginina pela glutamina no códon 261 da proteína PAH (Tyfield *et al.*, 1991). Esta alteração está localizada no domínio catalítico da enzima e pode ser encontrada em fenótipos variantes de PKU até PKU clássica (Erlandsen *et al.*, 2003). A mutação p.R261Q apresenta uma freqüência alta na Suíça (Eisensmith *et al.*, 1992) e é relativamente freqüente na Itália (Dianzani *et al.*, 1995). Em pacientes provenientes do sul do Brasil, no estudo realizado no nosso laboratório, essa alteração apresentou uma freqüência de 9,8% (Silva *et al.*, 2003).

Mutação p.R408W

A mutação p.R408W é caracterizada pela troca de uma C por uma T no nucleotídeo 1222 da seqüência codificante do gene *PAH*, que causa a substituição de uma arginina por um triptofano no resíduo 408 da proteína PAH (DiLella *et al.*, 1987). A mutação p.R408W está localizada no domínio de tetramerização da proteína e resulta em fenótipo clássico de PKU (DiLella *et al.*, 1987). A alta freqüência dessa mutação em diferentes populações está relacionada a sua localização em um dinucleotídeo CpG, que é um local recorrente de mutações no genoma humano (Murphy *et al.*, 2006). Essa é a mutação mais freqüente em europeus (Zschocke, 2003) e uma freqüência de 9,8% foi estabelecida na população proveniente do sul do Brasil (Silva *et al.*, 2003).

Mutação IVS12+1G>A

A mutação IVS12+1G>A é causada pela substituição de G para A na posição c.1315+1 do gene *PAH* (DiLella *et al.*, 1986). Essa mutação, localizada no intron 12, gera um defeito no *splicing* no processamento do mRNA. O fenótipo metabólico é de PKU clássica, pois essa alteração leva à síntese de uma proteína truncada, sem os últimos 52 aminoácidos da porção C-terminal, incluindo o domínio de tetramerização (Fusetti *et al.*, 1998). É conhecida como a alteração de *splicing* mais prevalente dos alelos de PKU em caucasianos (Marvit *et al.*, 1987). É a alteração mais freqüente na Dinamarca e na Inglaterra (Zschocke *et al.*, 1997), além de ser prevalente em diversos países europeus (Zschocke, 2003). No estudo realizado na população do sul do Brasil apresenta freqüência de 4,9% (Silva *et al.*, 2003).

1.9. PCR em tempo real e identificação de mutações

Com o desenvolvimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) na década de 80 (Mullis and Faloona, 1987), aumentou consideravelmente o número de estudos moleculares e, atualmente, existem várias técnicas baseadas nesse procedimento. A automação gradativa dos protocolos implica um menor tempo de execução e um número maior de amostras analisadas.

A PCR em tempo real é um sistema semi-automatizado que permite monitorar o progresso da reação a cada ciclo até o término da mesma (Wittwer *et al.*, 1997). Com o aumento do número de cópias da seqüência alvo, há um aumento direto e específico no sinal de fluorescência (Higuchi *et al.*, 1993). O acúmulo espontâneo da quantidade dos produtos é verificado nos primeiros 20 a 35 ciclos da reação. A fase do platô reflete a eficiência da reação, que é resultado da inativação parcial da enzima *Taq* DNA polimerase e da saturação dos outros reagentes (Morrison and Gannon, 1994). A PCR em tempo real é uma técnica

altamente sensível que pode ser usada para quantificar expressão gênica (Tan *et al.*, 1994), determinar o número de cópias de genes (Slamon *et al.*, 1987), detectar SNP e identificar e quantificar ácidos nucleicos provenientes de microorganismos como vírus e bactérias (Connor *et al.*, 1993).

Existem vários sistemas de detecção de seqüências utilizados na PCR em tempo real, entre os mais utilizados, atualmente, estão o sistema *Sybr Green*[®] e o sistema *TaqMan*[®] (Tse and Capeau, 2003).

1.9.1. Sistema *Sybr Green*[®]

O composto fluorescente *Sybr Green*[®] apresenta a característica de se intercalar entre a dupla fita de DNA (Vitzthum and Bernhagen, 2002). Diversas metodologias utilizam essa propriedade para a detecção e quantificação de dupla fita (Zipper *et al.*, 2004). Durante os ciclos da PCR, o *Sybr Green*[®] se liga a cada nova cópia de dupla fita gerada. A detecção direta dos amplicons é monitorada pela medida do aumento da fluorescência causada pela ligação do composto às novas duplas fitas de DNA. Portanto, o aumento na intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de produto gerado na reação. A desvantagem desse sistema são os eventuais resultados falsos positivos que podem ocorrer, já que o fluoróforo pode se ligar a seqüências não específicas da reação (Kwok and Higuchi, 1989). Este sistema é utilizado principalmente para quantificação de amplicons grandes e com alto conteúdo GC (Giglio *et al.*, 2003). Em menor escala, pode ser utilizado para discriminação alélica entre amplicons que apresentem diferentes temperaturas de anelamento, pois, ao variar a temperatura ao final da reação, o sistema discrimina os amplicons, levando à desnaturação da fita dupla e conseqüente liberação do composto *Sybr Green*[®], medido diretamente pelo sinal de fluorescência. Portanto, para a identificação de mutações, este sistema é utilizado para diferenciar alelos com deleções

ou inserções (Giglio *et al.*, 2003).

1.9.2. Sistema *TaqMan*[®]

O sistema *TaqMan*[®] é baseado na atividade 5' nucleásica associada à atividade de síntese da *Taq* DNA Polimerase (Holland *et al.*, 1991). A principal característica desse sistema é a utilização de sondas específicas para identificação e conseqüente quantificação da região de interesse. Cada sonda contém um fluoróforo repórter diferente, ligado na extremidade 5', e um fluoróforo “apagador” (*quencher*), ligado na extremidade 3' (Heid *et al.*, 1996). Enquanto a sonda está intacta, a aproximação do fluoróforo repórter com o *quencher* reduz substancialmente a fluorescência emitida pelo repórter devido à transferência de energia ressonante (Heid *et al.*, 1996). No momento da reação, o anelamento das sondas ocorre antes do anelamento dos primers, portanto, ao sintetizar a cadeia de nucleotídeos, a *Taq* DNA Polimerase remove a primeira base da sonda, onde está localizado o fluoróforo repórter, que, ao ser retirado e se distanciar do *quencher*, emite fluorescência específica. Com o progresso da reação, o aumento da intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de produto gerado (Tse and Capeau, 2003). A vantagem desse sistema é a hibridização específica entre a sonda e a seqüência alvo, além da eliminação de processos pós-reação, pois o resultado é verificado no término da mesma (Kutyavin *et al.*, 2000). Portanto, o sistema *TaqMan*[®] pode diferenciar alelos através da especificidade das sondas e caracterizá-los como normal ou mutante, com a ocorrência de uma simples troca de nucleotídeo na seqüência alvo.

1.10. Justificativa

A caracterização molecular em pacientes com PKU do sul do Brasil foi determinada

anteriormente no nosso laboratório (Silva *et al.*, 2003). As mutações e suas frequências foram identificadas em pacientes com PKU não aparentados. O estudo revelou que as seis mutações mais frequentes representam 63,6% dos alelos mutantes, podendo ser utilizadas como alvo principal em uma triagem inicial nos pacientes com PKU que ainda não foram incluídos na análise molecular.

A análise molecular de PKU realizada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA) contempla a investigação dessas mutações mais frequentes. Porém, a metodologia empregada para o diagnóstico é um procedimento que tem como característica analisar cada mutação separadamente, com reações específicas de PCR para cada região e a utilização de enzimas de restrição (RFLP) para a identificação de cada mutação. Após a detecção por RFLP, utiliza-se eletroforese em gel de agarose e o coramento com brometo de etídio, tornando a metodologia utilizada trabalhosa e demorada. Além disso, o método em uso necessita de maior concentração de amostra (DNA) para sua realização.

Para a rotina laboratorial, esse tipo de metodologia torna a análise um pouco mais complicada e trabalhosa, pois são necessárias diversas etapas específicas e o uso de vários procedimentos em seqüência. Soma-se a isso, a utilização de um espaço laboratorial, onde são realizadas outras análises em paralelo para a identificação de alterações em diversas doenças estudadas no laboratório.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar protocolos baseados no sistema *TaqMan*[®] por PCR em tempo real, para a identificação das mutações mais freqüentes encontradas em pacientes do sul do Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenhar e testar primers e sondas fluorescentes para a amplificação e discriminação alélica das mutações IVS2+5G>C, p.I65T, p.R261X, p.R261Q, p.R408W e IVS12+1G>A no gene da PAH;
- Validar a técnica, testando amostras controle de cada mutação e comparando com o resultado obtido pela técnica do seqüenciamento (padrão-ouro);
- Testar a precisão do método, por repetição da análise em amostras testadas previamente por outras metodologias;
- Incorporar o protocolo de análise molecular para pacientes com PKU, na rotina do Laboratório de Identificação Genética do SGM/HCPA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais utilizados e os métodos usados nesta dissertação estão descritos no item correspondente do artigo científico apresentado a seguir.

4. RESULTADOS

Este item será desenvolvido em forma de artigo a ser submetido à revista *Molecular and Cellular Biochemistry*, cujas instruções se encontram no anexo.

Validation of a molecular protocol for identification of common mutations in the phenylhydroxylase gene of PKU patients from Southern Brazil

Tamara da S. Vaccaro^{1,2}, Fernanda M. S. Godinho^{1,2}, Hugo Bock¹, Luiz C. S. da Silva¹, Roberto Giugliani^{1,3}, Maria Luiza Saraiva-Pereira^{1,2,4}

¹Genetic Identification Laboratory, Research Centre and Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil;

²Pos-Graduation Program in Biological Science – Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

³Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

⁴Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

Running Title: Molecular protocol for common mutation in the PAH gene

Corresponding author:

Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD

Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos 2350 – CEP 90035 – 903

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

e-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

Phone: + 55 51 21018011

Fax: + 55 51 21018010

Abstract

Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive disease characterized by phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency. Mutations in the PAH gene are responsible for PKU, and an extensive allelic heterogeneity was observed in patients worldwide. Up to date, more than 500 different alterations can be found in PAHdb, the majority being rare mutations and/or specific to a genetic background. Our group was able to define mutation spectrum in PKU patients in Southern Brazil, and identified six mutations, named IVS2+5G>C, p.I65T, p.R261X, p.R261Q, p.R408W and IVS12+1G>A, that are responsible for 63.6% of mutant alleles. This work introduced a strategy, based in the TaqMan[®] System (Applied Biosystems), for a fast and specific identification of the above mutations. This strategy was applied to a sample population that was previously characterized by different techniques. Assays were shown to be highly sensitive and are potentially applicable to blood spots in order to be used in neonatal screening.

Key words: molecular analysis, mutation, PKU, TaqMan[®] system

Introduction

PKU (OMIM 261600) is characterized by deficiency of phenylalanine hydroxylase (PAH; E.C.1.14.16.1), an enzyme encoded by phenylalanine hydroxylase gene (PAH) [1]. This enzyme promotes conversion of phenylalanine (Phe) in tyrosine (Tyr), in the presence of the cofactor, tetrahydrobiopterin (BH₄). This reaction is the limiting step in the Phe catabolism, and is responsible for maintaining normal level of Phe in plasma [2]. Therefore, PKU is also called a hyperphenylalaninemia, being the most common inborn error of amino acid metabolism, with a frequency estimated to be 1:10,000 in Caucasians [1]. Although PAH reaction occurs mainly in liver, accumulation of Phe causes severe effects in the brain function. These damages can be prevented with a diet based on restricted Phe intake that should be introduced shortly after the diagnosis. Therefore, the establishment of an early diagnosis is essential for preventing severe mental retardation in PKU cases [1].

Mutations in the PAH gene are responsible for PKU, and to date over 500 mutations have been identified. Interindividual variation in PKU cases is the result of a wide allele heterogeneity at the PAH locus [3]. Resulting phenotype vary from severe classical form of PKU to mild hyperphenylalaninaemia (MHP), which requires no dietary correction [4,5].

Molecular studies have elucidated mutation spectrum in PKU patients in different populations, using various laboratory techniques. Attempts of establishing genotype-phenotype correlations are still taking place worldwide [6]. As observed in other genetic disorders, mutation analysis indicates that PKU is more prevalent in some populations, and spectrum of mutations can be variable from place to place. Recent studies in Brazilian PKU patients showed a marked heterogeneity in the PAH locus with different mutation types as

well as prevalence in different parts of Brazil [7,8,9]. These results indicate the importance of carrying out studies to determine mutation panels as well as specific strategies to identify common mutant alleles in PKU patients from different regions of Brazil as well as in other mixed populations around the world.

A previous study carried out by our group established that six different mutations in the PAH gene was responsible for 63.6% of mutant alleles [7]. Therefore, the aim of this work was to introduce a strategy based on TaqMan[®] system to identify these common mutations in our region.

Materials and Methods

Samples

As positive control samples, genomic DNA known to be the homozygous for the wild sequence, heterozygous, and homozygous for mutations IVS2+5G>C, p.I65T, p.R261X, p.R261Q, p.R408W, and homozygous for the wild sequence and heterozygous for IVS12+1G>A were used for assay standardization. Genotype of these samples was previously defined by two different methods: restriction fragment length polymorphism (RFLP) and sequencing analysis. For negative control, purified H₂O (reverse osmosis, deionization, and a 0.2 mm filtered) was used in place of DNA template in PCR amplifications. The validation was performed as part of standard procedures of the laboratory prior to introducing an assay for clinical use.

We have included in this study 113 mutant PKU alleles from unrelated PKU patients (29 DNA samples – 58 mutant alleles) and obligate heterozygotes (55 DNA samples – 55 mutant alleles) that were previously analyzed in the Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre for mutation tested in this study. All samples were previously tested by RFLP. We have also tested 13 PKU patients (26 mutant alleles) who were never tested before.

DNA isolation

Venous blood was used as source of genomic DNA. Leukocytes were isolated by centrifugation, and DNA isolation was performed by salting-out technique as previously

described [10], and kept at -20°C until further analysis. DNA quantification was carried out using the fluorometric system (Quant-ItTM ds DNA BR Assay Kit, Invitrogen) in the QubitTM fluorometer equipment (Invitrogen).

Mutation detection

Frequent PKU-associated mutations in Southern Brazil, named IVS2+5G>C, p.I65T, p.R261Q, p.R261X, p.R408W and IVS12+1G>A, were analyzed by real time PCR using the TaqMan[®] system. Primers and probes were designed according to Primer ExpressTM Software (version 2.0 – Applied Biosystems), and each sequence is shown in table 1.

PCR reaction was performed according to manufacture's instructions and different reaction volumes were tested. Amplification program included an initial step at 50°C for 2 min (activation of AmpErase UNG function), AmpliTaq[®] Gold activation at 95°C for 10 min, followed by cycles of denaturation at 95°C for 15s and annealing/extension at 60°C for 1 min. Allelic discrimination step was performed at 60°C for 1 min. PCR products were analyzed by Sequence Detection System software (Applied Biosystems) through allelic discrimination plot.

Results

Reaction volume and optimum amount of DNA

Control DNA samples were used for standardization, optimization and validation of each assay. Direct sequencing constitutes the gold standard in sequence validation. Assay accuracy was determined through control DNA samples of each mutation. Thus, each control was previously submitted to sequencing protocol to confirm genotypes (data not shown).

Initially, reaction protocol was performed in different volumes (20 μ L, 12 μ L and 8 μ L) using 50 ng of DNA. As similar results were obtained in all different volumes (data not shown), primer extension was undertaken in a total volume of 8 μ L per reaction. Amplification with no DNA was used as negative control in every assay, and confirmed absence of cross contamination within detection limit of our measurements.

In order to determine optimum DNA amount in each reaction, dilutions of same DNA samples were tested for each mutation. Quantities tested were 100, 50, 25, 10, 5, 2, and 1 ng of DNA in a final volume of 8 μ L per PCR reaction. Amplification curves of p.I65T mutation detection are shown in figure 1.

Allelic discrimination and method validation

Final step was allelic discrimination that was performed through Sequence Detection Systems software (Applied Biosystems) that used the measurement of increasing reporter fluorescence following PCR. Reporter signals were normalized to the emission of a passive

reference. Results were then placed in a graph as shown in figure 2.

Intrasample variability and reproducibility were assessed by repeated measurements of all genotyped samples in replicas. Method was validated by comparing controls' results of previously applied methods (RFLP and direct sequencing analysis) with results obtained by this methodology.

Following validation, we have detected in the group that were previously tested by other methods 12 mutant alleles carrying IVS2+5G>C, 23 alleles carrying p.I65T, 8 alleles carrying p.R261Q, 11 alleles carrying p.R261X, 12 alleles carrying p.R408W, and 4 alleles carrying IVS12+1G>A. And, in the group of new PKU patients (26 mutant alleles) we have found 1 allele carrying IVS2+5G>C, 1 allele carrying p.I65T, 2 alleles carrying p.R261Q and 2 alleles carrying p.R408W.

Discussion

We described here a sensitive protocol for identification of six common mutations in PKU patients from Southern part of Brazil. Frequency of these six mutations were demonstrated to be higher when compared to disease allelic heterogeneity [3,6]. Therefore, as a well-defined mutation panel shows a high detection rate, allele-specific mutation analysis can be used to begin a wider gene mutation search.

Our results demonstrated that 2 ng is sufficient and a good amount of DNA to be employed in a total of 8 μ L PCR reaction. Higher quantities, such as 50 ng or 100 ng, possibly promote hampered amplification due to saturation of reagents among other features.

Following the establishment of protocol, analyses were carried out in a total of 113 mutant alleles and same results were detected in 113 mutant alleles. This real time PCR based protocol was applied to samples from new PKU patients and 6 mutant alleles were identified within a short period of time.

Specific screening of these mutations in our laboratory was previously based on restriction fragment length polymorphism (RFLP). This technique requires higher amounts of DNA, an extra step to generate results, and is labour-intensive. These aspects make difficult the application of RFLP in large-scale mutation programs. As mention before, sequencing analysis remains as the gold standard in mutation detection. Advances in rapid sequencing of amplicons have made the protocol more rapid than the past, while it remains not suitable for large-scale population studies or rapid clinical testing.

The strategy presented here can identify, in a quite efficient protocol, every mutation in just one step, which can be completed within two hours. The system also allows simultaneous analysis of several samples, due to the possibility of using 96- or 486-well plate. In addition, high sensitivity is an important feature, especially when thinking of neonatal screening using blood spots.

Dried blood specimens have been used to evaluate the frequency of specific alleles for several different disorders by PCR analysis [11]. Several works have been published in which molecular analysis is performed directly in dried blood card [12,13,14]. Then, methodology described here is validated to be applied in DNA samples from different sources, even to those with low DNA concentration.

In this study we optimized, validated, and then applied TaqMan[®] system to detect IVS2+5G>C, p.I65T, p.R261Q, p.R261X, p.R408W and IVS12+1G>A in the PAH gene in a clinical setting. The use of this system allowed accurate and rapid identification of mutant as well as normal alleles in patients and obligated heterozygous individuals, and can be extended to asymptomatic individuals at risk. Consequently, a primary screening of PKU patients can be quickly and effectively performed and potentially identify half of mutant alleles. Finally, similar approach can be optimized for other mutant genes caused by single nucleotide changes that are clinically relevant for the diagnostic of inherited diseases.

Acknowledgements

This research was supported by Brazilian Funding Agencies (CNPq, FAPERGS, and FINE-BCPA). M.L. Saraiva-Pereira was supported by CNPq.

References

1. Scriver CR, Kaufman S (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (ed) The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th edn. New York. McGraw-Hill: 1667-1724
2. Kaufman S (1999) A model of human phenylalanine metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients. Proc Natl Acad Sci USA 96: 3160–3164
3. Scriver CR (2007) The *PAH* Gene, Phenylketonuria, and a Paradigm Shift. Hum Mutat 28: 831-845
4. Güttler F, Guldberg P (1994) Mutations in phenylalanine hydroxylase gene: genetic determinants for the phenotypic variability of hyperphenylalaninemia. Acta Paediatr Suppl 407: 49-56
5. Güttler F, Guldberg P (1996) The influence of mutations of enzyme activity and phenylalanine tolerance in phenylalanine hydroxylase deficiency. Eur J Pediatr 1: 6-10
6. Zschocke J (2003) Phenylketonuria Mutations in Europe. Hum Mutat 21: 345-356
7. Silva LCS, Carvalho TS, Silva FB et al (2003). Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. Mol Genet and Metab 79: 17-24

8. Santos LL, Magalhães M de C, Reis A de O et al (2006) Frequencies of phenylalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M, R408W, Y414C AND IVS12nt1 in Minas Gerais, Brazil. *Genet Mol Res* 5: 16-23
9. Acosta A, Silva W Jr, Carvalho T et al (2001) Mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Brazilian patients with phenylketonuria. *Hum Mutat* 17: 122-130
10. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 16: 1215
11. McCabe ER (1991) Utility of PCR for DNA analysis from dried blood on filter paper blotters. *PCR Methods Appl* 1: 99-106
12. Hannelius U, Lindgren CM, Mélen E et al (2005) Phenylketonuria screening registry as a resource for population genetic studies. *J Med Genet* 42: e60. DOI 10.1136/jmg.2005.032987
13. Yang Y, Drummond-Borg M, Garcia-Heras J (2001) Molecular analysis of Phenylketonuria (PKU) in newborns from Texas. *Hum Mutat* 17(6): 523-528
14. Zaffanello M, Zamboni G, Maselli M et al (2005) Genetic Analysis Carried Out on Blood-Spots of Phenylalanine Hydroxylase-Deficient Newborns Detected by Northeastern Italian Neonatal Screening. *Genetic Testing* 9: 133-137

Table 1 - Sequences of primers and probes used in this study.

Mutation	Primer sequence (5' → 3')	Probe sequence (5' → 3')
IVS2+5G>C	Forward	Normal
	CATTGGCCAAAGTATTGCGCTTA	ATTGTAGCACTGACCTC-VIC
	Reverse	Mutant
	AGAACATGGAAGTTTGCTACGACAT	TTGTAGCAGTGACCTC-FAM
p.I65T	Forward	Normal
	CCTCCCCATTCTCTCTTAGGA	ACCCACATTGAATCT-VIC
	Reverse	Mutant
	CCAAATGGGTGAAAAATTCATACTCATCTT	CCCACACTGAATCT-FAM
p.R261Q	Forward	Normal
	TGCTTTCCTCTCGGGATTTCTTG	CCTCCGAGTCTTC-VIC
	Reverse	Mutant
	GGATCCATGTCTGATGTACTGTGT	CCTCCAAGTCTTC-FAM
p.R261X	Forward	Normal
	TGCTTTCCTCTCGGGATTTCTTG	TGGCCTCCGAGTCT-VIC
	Reverse	Mutant
	GGATCCATGTCTGATGTACTGTGT	CTGGCCTTCTGAGTCT-FAM
p.R408W	Forward	Normal
	TGGTTTTGGTCTTAGGAACTTTGCT	ACAATACCTCGGCCCTT-VIC
	Reverse	Mutant
	GTATGGGTCGTAGCGAACTGA	ACAATACCTTGGGCCCTT-FAM
IVS12+1G>A	Forward	Normal
	GGACAATACCCAGCAGCTTAAGATT	CTGATTCCATTAACAGTAAGTA-VIC
	Reverse	Mutant
	GAGTGGCCTCGTAAGGTGTAAAT	TGATTCCATTAACAATAAGTA-FAM

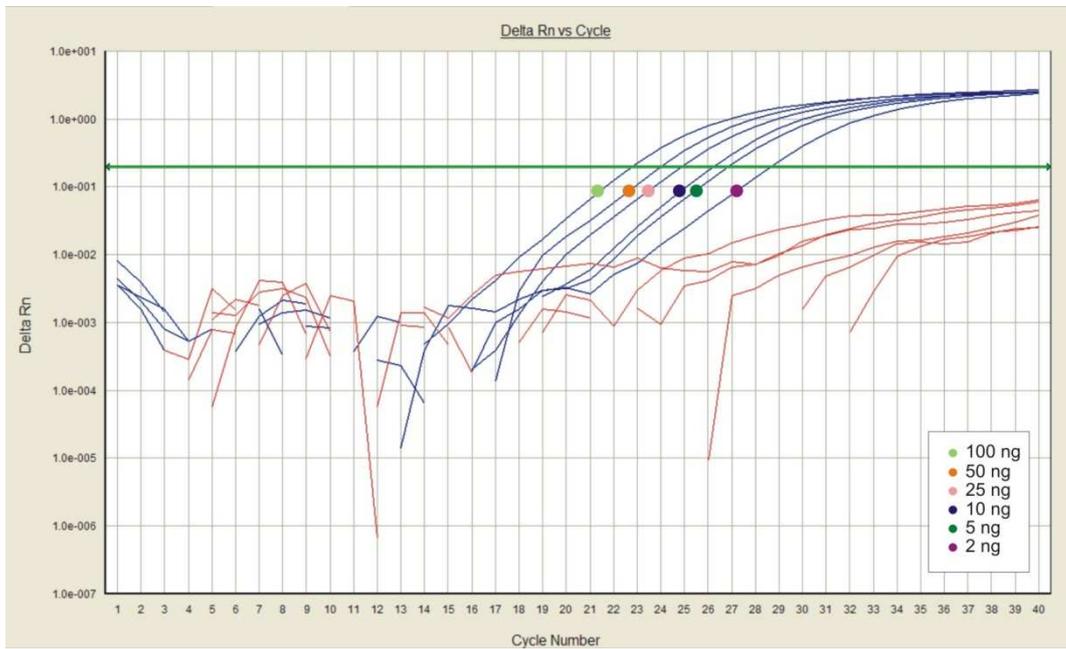
Figure legends

Figure 1 – Amplification curves of p.I65T mutation of different amounts of DNA. (a) homozygous DNA sample for normal allele; (b) heterozygous DNA sample; (c) homozygous DNA sample for mutant allele.

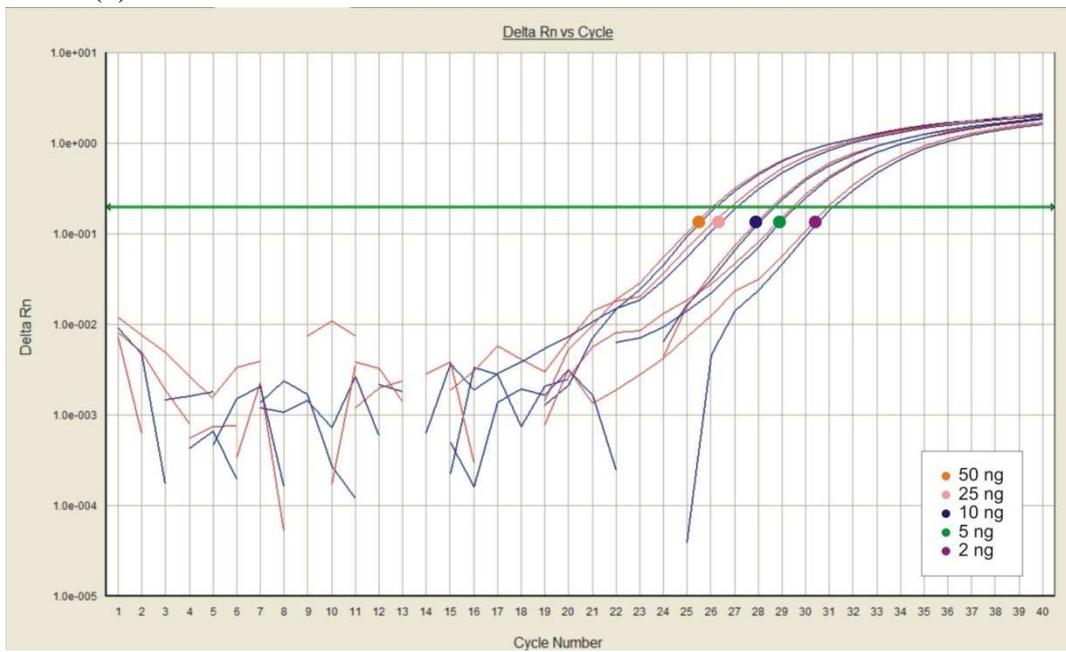
Figure 2 – Allelic discrimination of p.I65T mutation in four DNA samples. Square denotes a blank reaction; circle denotes samples that are homozygous for normal allele; triangle denotes heterozygous DNA samples; lozenge denotes samples that are homozygous for mutant allele.

Figure 1

(a)



(b)



(c)

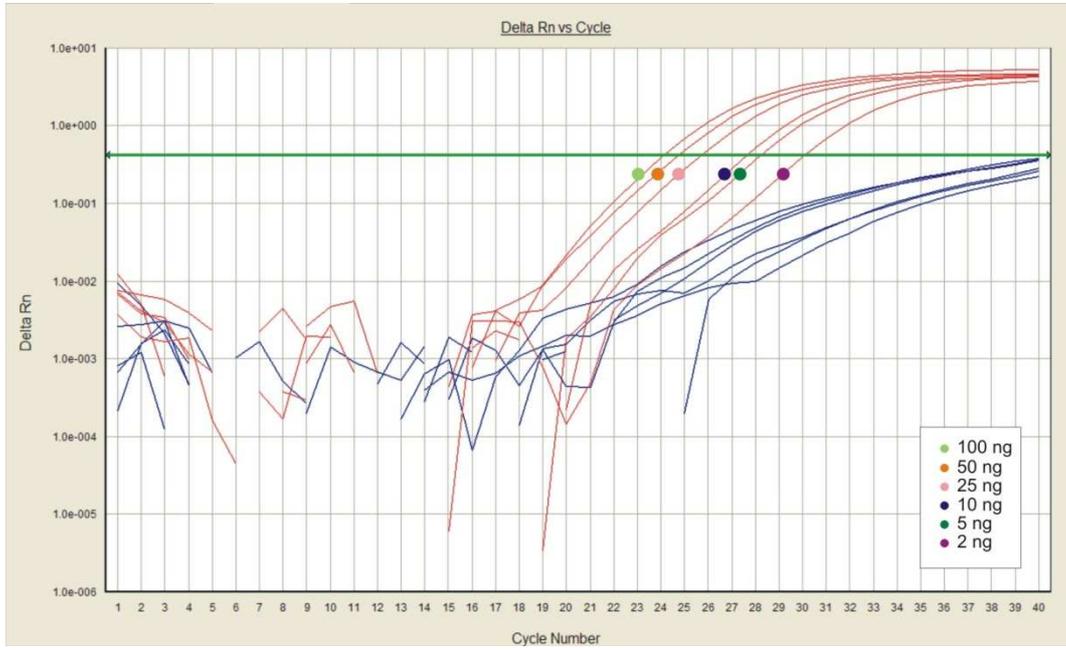
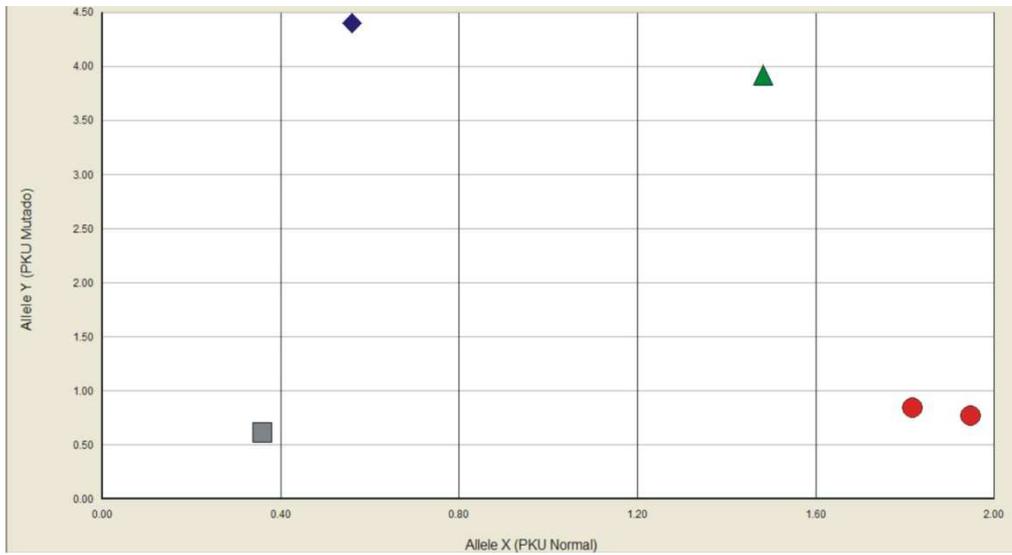


Figure 2



5. DISCUSSÃO

Na análise molecular, a técnica do seqüenciamento do DNA é reconhecida como padrão-ouro para a identificação de mutações e polimorfismos. Porém, outras técnicas podem ser utilizadas para uma análise mais rápida e específica de uma alteração conhecida.

Para o desenvolvimento e validação de uma nova técnica, é necessário avaliar as vantagens e o emprego da mesma na rotina laboratorial. Além disso, a escolha de uma metodologia é baseada na comparação entre as técnicas disponíveis para a análise em particular.

Neste estudo, diferentes quantidades de DNA foram utilizadas para determinar a eficiência da reação e demonstrar a melhor quantidade inicial de DNA para a análise. Nesta etapa, foram testadas diferentes concentrações de DNA para cada mutação com amostras controle: (a) homozigoto para a seqüência normal, (b) heterozigoto e (c) homozigoto para a seqüência mutante. Nesses testes, foi observado que uma quantidade inicial de 100 ou 50 ng prejudica a amplificação, possivelmente pela saturação dos reagentes e pela maior quantidade de produto formado na reação.

As amostras controle utilizadas já tinham sido testadas e as mutações devidamente identificadas por duas metodologias distintas: polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e seqüenciamento direto. Na metodologia de RFLP, o resultado é obtido após diversas etapas. Além da PCR inicial, é necessária a verificação da eficiência da amplificação e, após isso, a digestão com enzimas de restrição específicas para cada mutação, a qual deve ser verificada novamente por eletroforese em gel de agarose para a obtenção do

resultado final. Todo este procedimento pode ser interrompido em qualquer parte se em algum momento a análise não for eficiente. Além disso, nessa metodologia, o resultado só é obtido após várias horas de trabalho.

Com a padronização realizada neste trabalho, as reações para as seis mutações comuns no gene *PAH* foram otimizadas para as mesmas concentrações dos reagentes e o mesmo volume final de reação. A partir disso, poder-se-á realizar a análise do painel de mutações para uma mesma amostra simultaneamente.

A técnica desenvolvida tem alta sensibilidade, por isso pode ser utilizada para a análise de amostras com pequenas concentrações de DNA como, por exemplo, em amostras de sangue impregnadas em papel filtro. Diversos autores descreveram protocolos sugerindo a detecção de mutações diretamente do papel filtro utilizado no “Teste do Pezinho”. Esses procedimentos têm como característica a utilização de métodos qualificados para a análise de pequenas concentrações de amostra (DNA), sendo essencial o uso de métodos com alta sensibilidade (Yang *et al.*, 2001; Hannelius *et al.*, 2005; Zaffanello *et al.*, 2005).

Para cada mutação, foram testadas concentrações diferentes de DNA e a otimização dos reagentes demonstrou que a melhor reação ocorre com uma quantidade de 2 ng de DNA em 8µL de reação.

A hibridização específica entre a sonda e a sequência alvo é uma característica do sistema *TaqMan*[®]. A especificidade é alta quando não há variação da sequência alvo com relação à composição da sonda. No painel de mutações estudadas neste trabalho duas diferentes alterações ocorrem no mesmo aminoácido (p.R261Q, p.R261X). Essas mutações

estão inseridas no mesmo códon para a tradução do aminoácido arginina em alelos normais. A mutação p.R261Q é causada por uma transição de G para A no nucleotídeo 782 do cDNA da PAH, enquanto que a mutação p.R261X é causada pela transição de C para T no nucleotídeo 781. No nosso estudo, como esperado, amostras de pacientes homocigotos para a p.R261Q não amplificaram no sistema *TaqMan*[®], pois não houve homologia com nenhuma das sondas (normal ou mutante) devido a presença de outro SNP na seqüência alvo. Isso comprova a alta especificidade das sondas. Amostras de indivíduos heterocigotos para a mutação p.R261Q não interferem no resultado da análise da mutação p.R261X, pois o outro alelo consegue ser amplificado e identificado pelas sondas de hibridização.

Nesse estudo, o sistema *TaqMan*[®] foi aplicado, otimizado e validado para detectar as mutações IVS2+5G>C, p.I65T, p.R261Q, p.R261X, p.R408W e IVS12+1G>A no gene *PAH*. O uso desse sistema permitiu a identificação rápida e precisa de alelos mutantes e normais em paciente e em heterocigotos obrigatórios e pode ser aplicado para indivíduos assintomáticos em risco. Conseqüentemente, uma triagem primária de pacientes com PKU pode ser realizada, podendo identificar rápida e efetivamente a metade dos alelos mutantes. Finalmente, um enfoque semelhante pode ser otimizado para outras alterações nucleotídicas em genes mutantes que são clinicamente relevantes para o diagnóstico de doenças hereditárias.

6. CONCLUSÕES

- Um protocolo baseado em discriminação alélica por PCR em tempo real foi desenvolvido e padronizado para a identificação das mutações IVS2+5G>C, p.I65T, p.R261X, p.R261Q, p.R408W e IVS12+1G>A no gene da PAH;
- Essa análise foi validada através do uso de amostras controle previamente genotipadas por sequenciamento direto (padrão-ouro);
- A precisão do método foi avaliada pela análise de uma série de amostras testadas previamente por outras metodologias;
- A metodologia permite a análise das mutações citadas acima em um curto período de tempo, uma vez que o sistema pode analisar 96 amostras simultaneamente, sendo que o mesmo já foi incorporado como triagem de análise molecular inicial em pacientes com PKU no Laboratório de Identificação Genética do SGM/HCPA.

7. REFERÊNCIAS

- Acosta A, Silva W Jr, Carvalho T, Gomes M, Zago M (2001). Mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Brazilian patients with phenylketonuria. *Hum. Mutat.* 17: 1221-1230.
- Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM (1953). Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 265: 812-813.
- Brouwer M, de Bree PK, van Sprang FJ, Wadman SK (1977). Low serum-tyrosine in patients with phenylketonuria on dietary treatment. *Lancet.* 1: 1162.
- Campbell RS, Brearly GM, Varsani H, Morris HC, Milligan TP, Hall SK, Hammond PM, Price CP (1992). Development and validation of a robust specific enzyme mediated assay for phenylalanine in serum. *Clin. Chim. Acta* 210: 197-210.
- Centerwall SA, Centerwall WR (2000). The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. *Pediatrics* 105: 89-103.
- Chace DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Row CR, Hofman LF (1993). Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 39: 66-71.
- Committee on Genetics (1996). Newborn Screening Facts Sheets. *Pediatrics* 98: 473-501.
- Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD (1993). Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 67: 1772-1777.

Cotton RGH (1993). Current methods of mutation detection. *Mutat. Res.* 285: 125-144.

den Dunnen JT, Antonarakis SE (2000). Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion. *Hum. Mutat.* 15: 7-12.

Desviat LR, Perez B, Gamez A, Sanchez A, Garcia MJ, Martinez-Pardo M, Marchante C, Boveda D, Baldellou A, Arena J, Sanjurjo P, Fernandez A, Cabello ML, Ugarte M (1999). Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur. J. Hum. Genet.* 7: 386-392.

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

DiLella AG, Marvit J, Brayton K, Woo SL (1987). An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. *Nature* 327: 333-336.

DiLella AG, Kwok SC, Ledley FD, Marvit J, Woo SL (1986). Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 25: 743-749.

Doskeland AP, Doskeland SO, Ogreid D, Flatmark T (1984). The effect of ligands of phenylalanine 4-monooxygenase on the cAMP-dependent phosphorylation of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 259: 11242-11248.

Dworniczak B, Kalaydjieva L, Aulehla-Scholz C, Ullrich K, Kremensky I, Radeva B, Horst J (1991). Recurrent nonsense mutation in exon 7 of the phenylalanine hydroxylase gene. *Hum. Genet.* 87: 731-733.

Eisensmith RC, Okano Y, Dasovich M, Wang T, Güttler F, Lou H, Guldberg P, Lichter-

Konecki U, Konecki 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, Özalp I, Fekete G, Schuler D, Berencsi GY, Nász I, Brdicka R, Kamaryt J, Pijackova A, Cabalska B, Boszkowa K, Schwartz E, Kalinin VN, Jin L, Chakraborty R, Woo SLC (1992). Multiple origins for phenylketonuria in Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 1355-1365.

Erlandsen H, Stevens RC (2001). A structural hypothesis for BH₄ responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninemia and phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 24: 213-230.

Erlandsen H, Patch MG, Gamez A, Straub M, Stevens RC (2003). Structural studies on phenylalanine hydroxylase and implications toward understanding and treating phenylketonuria. *Pediatrics* 112: 1557-1565.

Erlandsen H, Pey AL, Gamez A, Perez B, Desviat LR, Aguado C, Koch R, Sunrendran S, Tyring S, Matalon R, Scriver CR, Ugarte M, Martinez A, Stevens RC (2004). Correction of kinetic and stability defects by the tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 16903-16908.

Flatmark T, Knappskog PM, Bjørge E, Martinez A (1997). Molecular characterization of disease related mutant forms of human phenylalanine hydroxylase and tyrosine hydroxylase. In: Pfeleiderer W, Rokos H, eds. *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates*. London. Blackwell Science: 503-508.

Fusetti F, Erlandsen H, Flatmark T, Stevens RC (1998). Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J. Biol. Chem.* 273:

16962-16967.

Gamez A, Perez B, Ugarte M, Desviat LR (2000). Expression analysis of phenylketonuria mutations: effect of folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein. *J. Biol. Chem.* 275: 29737-29742.

Giglio S, Monis PT, Saint CP (2003). Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res.* 22: e136.

Gregersen N, Bross P, Andresen BS, Pedersen PL, Corydon MJ, Bolund L (2001). The role of chaperone-assisted folding and quality control in inborn errors of metabolism: protein folding disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* 24: 189-212.

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

Guthrie R, Susi A (1963). A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32: 338-343.

Güttler F (1980). Hyperphenylalaninemia: Diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. *Acta Paediatr Scand Suppl* 280: 1-80.

Hannelius U, Lindgren CM, Mélen E, Malmberg A, Von Dobeln U, Kere J (2005). Phenylketonuria screening registry as a resource for population genetic studies. *J. Med. Genet.* 42: e60.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic (1993). PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-1030.

Hoang L, Byck S, Prevost L, Scriver CR (1996). PAH Mutation Analysis Consortium Database: a database for disease-producing and other allelic variation at the human PAH locus. *Nucleic Acids Res.* 24: 127-131.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 7276-7280.

Jennings IG, Cotton RGH, Kobe B (2000). Structural interpretation of mutations in phenylalanine hydroxylase protein aids in identifying genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Eur. J. Hum. Genet.* 8: 683-696.

Jervis GA (1947). Studies on phenylpyruvic oligophrenia: the position of the metabolic error. *J. Biol. Chem.* 169: 651-656.

Jervis GA (1953). Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82: 514-515.

John SW, Scriver CR, Laframboise R, Rozen R (1992). In vitro and in vivo correlations for I65T and M1V mutations at the phenylalanine hydroxylase locus. *Hum. Mutat.* 1: 147-153.

Kaufman S, Holtzman NA, Milstien S, Butler LJ, Krumholz A (1975). Phenylketonuria due to a deficiency of dihydropteridine reductase. *N. Engl. J. Med.* 293: 785-790.

Kaufman S (1993). The phenylalanine hydroxylating system. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 67 :77-264.

Kaufman S (1999). A model of human phenylalanine metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 3160-3164.

Kaye CI, Committee on Genetics (2006). Newborn Screening Fact Sheets. *Pediatrics* 118: 934-963.

Konecki DS, Wang Y, Trefz FK, Lichter-Konecki U, Woo SLC (1992). Structural characterization of the 5' region of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 31: 8363-8368.

Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* 28: 655-661.

Kwok S, Higuchi R (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237-238.

Kwok SCM, Ledley FD, Dilella AG, Robson KJH, Woo SLC (1985). Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 24: 556-561.

Leandro J, Nascimento C, de Almeida IT, Leandro P (2006). Co-expression of different subunits of human phenylalanine hydroxylase: evidence of negative interallelic complementation. *Biochim. Biophys. Acta* 1762: 544-550.

Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Rabin M, Ruddle FH, Woo SL (1985). Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 6221-6225.

Marini de Carvalho T, Pimentel dos Santos H, dos Santos ICGP, Vargas PR, Pedrosa J (2007). Newborn screening: a national public health programme in Brazil. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30: 615.

Marvit J, DiLella AG, Brayton K, Ledley FD, Robson KJ, Woo SL (1987). GT to AT transition at a splice donor site causes skipping of the preceding exon in phenylketonuria. *Nucleic Acids Res.* 15: 5613-5628.

McCaman M W, Robins E (1992). Fluorometric method for the determination of phenylalanine in serum. *J. Lab. Clin. Med.* 59: 885.

Morrison C, Gannon F (1994). The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochim. Biophys. Acta* 1219: 493-498.

Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-350.

Murphy BC, Scriver CR, Singh SM (2006). CpG methylation accounts for a recurrent mutation (c.1222C>T) in the human PAH gene. *Hum. Mutat.* 9: 975.

Niederwieser A, Curtius HC, Bettoni O, Bieri J, Schircks B, Viscontini M, Schaub J (1979). Atypical phenylketonuria caused by 7, 8-dihydrobiopterin synthetase deficiency. *Lancet* 1: 131-133.

Okano Y, Takatori K, Kudo S, Sakaguchi T, Asada M, Kajiwara M, Yamano T (2007). Effects of tetrahydrobiopterin and phenylalanine on in vivo human phenylalanine hydroxylase by phenylalanine breath test. *Mol. Genet. Metab.* 92: 308-314.

OMIM 261600 <http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=261600> último acesso em

16/06/08

PAHdb <http://www.pahdb.mcgill.ca> último acesso em 16/06/08

Paine RS (1957). The variability in manifestations of untreated patients with phenylketonuria (phenylpyruvic aciduria). *Pediatrics* 20: 290-302.

Penrose L, Quastel JH (1937). Metabolic Studies in Phenylketonuria. *Biochem. J.* 31: 266-274.

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

Scriver CR (2007). The *PAH* gene, Phenylketonuria, and a Paradigm Shift. *Hum. Mutat.* 28: 831-845.

Scriver CR, Kaufman S (2001). Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York. McGraw-Hill: 1667-1724.

Silva LCS, Carvalho TS, Silva FB, Morari L, Fachel A, Pires R, Refosco LF, Desnick RJ, Giugliani R, Saraiva-Pereira ML (2003). Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. *Mol. Genet. Metab.* 79: 17-24.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-182.

Smith I, Beasley MG, Ades AE (1990). Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Arch. Dis. Child.* 65: 472-478.

Tan X, Sun X, Gonzalez CF, Hsueh W (1994). PAF and TNF increase the precursor of NF-kappa B p50 mRNA in mouse intestine: Quantitative analysis by competitive PCR. *Biochim. Biophys. Acta* 1215: 157-162.

Tse C, Capeau J (2003). Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann. Biol. Clin.* 61: 279-293.

Tyfield LA, Osborn MJ, Holton JB (1991). Molecular heterogeneity at the phenylalanine hydroxylase locus in the population of the south-west of England. *J. Med. Genet.* 28: 244-247.

Vitzthum F, Bernhagen J (2002). SYBR Green I: an ultrasensitive fluorescent dye for double-stranded DNA quantification in solution and other applications. *Recent Res. Devel. Anal. Biochem.* 2: 65-93.

Waters PJ, Parniak MA, Akerman BR, Scriver CR (2000). Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype. *Mol. Genet. Metab.* 69: 101-110.

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22: 134-138.

Wretborn M, Humble E, Ragnarsson U, Engstrom L (1980). Amino acid sequence at the phosphorylated site of rat liver phenylalanine hydroxylase and phosphorylation of a corresponding synthetic peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93: 403-408.

Yang Y, Drummond-Borg M, Garcia-Heras J (2001). Molecular analysis of phenylketonuria (PKU) in newborns from Texas. *Hum. Mutat.* 17(6): 523.

Zaffanello M, Zamboni G, Maselli M, Gandini A, Camilot M, Maffeis C, Burlina AB, Tato L (2005). Genetic analysis carried out on Blood-spots of phenylalanine hydroxylase-deficient newborns detected by northeastern Italian neonatal screening. *Genet. Test.* 9: 133-137.

Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 32: e103.

Zschocke J, Mallory JP, Eiken HG, Nevin NC (1997). Phenylketonuria and the peoples of Northern Ireland. *Hum. Genet.* 100: 189-194.

Zschocke J (2003) Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum. Mutat.* 21: 345-356.

8. ANEXOS

Instrução para submissão de manuscrito para a revista *Molecular and Cellular Biochemistry*.

Manuscript Submission

EDITOR-IN-CHIEF

Naranjan S. Dhalla, Institute of Cardiovascular Sciences, St. Boniface General Hospital Research Centre, Faculty of Medicine, University of Manitoba, 351 Tache Avenue, Winnipeg, Manitoba, Canada R2H 2A6 (Telephone: 204-235-3417; Fax: 204-233-6723; E-mail: cvso@sbrc.ca)

ONLINE MANUSCRIPT SUBMISSION

Springer now offers authors, editors, and reviewers of *Molecular and Cellular Biochemistry* the use of our fully web-enabled online manuscript submission and review system. To keep review time as short as possible, we request authors to submit manuscripts online to the journal's editorial office. Our online manuscript submission and review systems offer authors the option to track the progress of the review process of manuscripts in real time. Manuscripts should be submitted to: <http://mcbi.edmgr.com>. The online manuscript submission and review system for *Molecular and Cellular Biochemistry* offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts- Word, WordPerfect, RTF, TXT, and LaTeX; for figures — TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript. **PDF is not an acceptable format.**

NOTE: In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript online, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

MANUSCRIPT PRESENTATION

The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. The manuscript should be organized in the following order: Title page, Abstract (100 to 250 words), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Figure Legends, and Figures. Quotations of more than 40 words should be set off clearly. Number the pages consecutively with the first page containing running heads (shortened title), title, author(s), affiliation(s), full address for the correspondence, including telephone and fax numbers and e-mail address.

References

1. Journal article:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

2. Inclusion of issue number (optional):

Saunders DS (1976) The biological clock of insects. *Sci Am* 234(2):114–121

3. Journal issue with issue editor:

Smith J (ed) (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

4. Journal issue with no issue editor:

Mod Genomics J (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

5. Book chapter:

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York

6. Book, authored:

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

7. Book, edited:

Smith J, Brown B (eds) (2001) *The demise of modern genomics*. Blackwell, London

8. Chapter in a book in a series without volume titles:

Schmidt H (1989) Testing results. In: Hutzinger O (ed) *Handbook of environmental chemistry*, vol 2E. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 111

9. Chapter in a book in a series with volume title:

Smith SE (1976) Neuromuscular blocking drugs in man. In: Zaimis E (ed) *Neuromuscular junction*. *Handbook of experimental pharmacology*, vol 42. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp593–660

10. Proceedings as a book (in a series and subseries):

Zowghi D et al (1996) A framework for reasoning about requirements in evolution. In: Foo N, Goebel R (eds) PRICAI'96: topics in artificial intelligence. 4th Pacific Rim conference on artificial intelligence, Cairns, August 1996. Lecture notes in computer science (Lecture notes in artificial intelligence), vol 1114. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 157

11. Proceedings with an editor (without a publisher):

Aaron M (1999) The future of genomics. In: Williams H (ed) Proceedings of the genomic researchers, Boston, 1999

12. Proceedings without an editor (without a publisher):

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. In: Abstracts of the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

13. Paper presented at a conference:

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. Paper presented at the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

14. Patent:

Name and date of patent are optional

Norman LO (1998) Lightning rods. US Patent 4,379,752, 9 Sept 1998

15. Dissertation:

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

16. Institutional author (book):

International Anatomical Nomenclature Committee (1966) *Nomina anatomica*. Excerpta Medica, Amsterdam

17. Non-English publication cited in an English publication:

Wolf GH, Lehman P-F (1976) *Atlas der Anatomie*, vol 4/3, 4th edn. Fischer, Berlin. [NB: Use the language of the primary document, not that of the reference for "vol" etc.!]

18. Non-Latin alphabet publication:

The English translation is optional.

Marikhin VY, Myasnikova LP (1977) *Nadmolekulyarnaya struktura polimerov* (The supramolecular structure of polymers). Khimiya, Leningrad

19. Published and In press articles with or without DOI:

19.1 In press

Wilson M et al (2006) References. In: Wilson M (ed) *Style manual*. Springer, Berlin Heidelberg New York (in press)

19.2. Article by DOI (with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* 78:74–80. DOI 10.1007/s001090000086

19.3. Article by DOI (before issue publication with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* (in press). DOI 10.1007/s001090000086

19.4. Article in electronic journal by DOI (no paginated version)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. DOI 10.1007/s801090000086

20. Internet publication/Online document

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. <http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document>. Cited 15 Jan 1999

20.1. Online database

Healthwise Knowledgebase (1998) *US Pharmacopeia*, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 Sept 1998

Supplementary material/private homepage

Doe J (2000) Title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2000 University site

Doe J (1999) Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 1999 FTP site

Doe J (1999) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 1999 Organization site

ISSN International Centre (1999) *Global ISSN database*. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2000

Proofs will be sent to the corresponding author. One corrected proof, together with the original, edited manuscript, should be returned to the Publisher within three days of receipt by mail (airmail overseas).

Fifty **offprints** of each article will be provided free of charge. Additional offprints can be ordered by means of an offprint order form supplied with proofs. No page charges are levied on authors or their institutions. **Color figures** in the online journal are free; color figures in the paper journal are printed at the author's expense.

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springers online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit www.springer.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.