



УДК 575.17.174.2

## СПЕКТР И МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗЫ БОЛЬНЫХ ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

© 2000 г. Ф. О. Смагулова<sup>#</sup>, И. В. МорозовНовосибирский институт биоорганической химии СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 17.04.2000 г. Принята к печати 14.06.2000 г.

Фенилкетонурия – распространенное аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, обусловленное дефицитом активности фермента печени фенилаланингидроксилазы (Phe-гидроксилазы), приводящим к нарушению обмена фенилаланина и накоплению токсических метаболитов. Знание молекулярных основ фенилкетонурии имеет важное социальное значение вследствие возможности фенотипической коррекции заболевания в случае его ранней диагностики. Известно, что заболевание связано с мутациями гена Phe-гидроксилазы, причем распространенность и спектр мутаций имеют выраженные этнические и региональные особенности. Нами проведено исследование спектра мутаций в гене Phe-гидроксилазы в группе больных фенилкетонурией Новосибирской области, в результате которого выявлено 10 точковых мутаций, ведущих к замене аминокислоты, одна мутация донорного сайта сплайсинга и одна микроделеция. Для этих наиболее распространенных в регионе мутаций разработаны простые методы детекции на основе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), ПЦР с введением сайтов рестрикции (ACRS PCR) и электрофореза в градиенте денатурирующего агента (DGGE).

*Ключевые слова:* фенилаланингидроксилаза; фенилкетонурия; мутации; ACRS PCR; DGGE.

### ВВЕДЕНИЕ

Фенилаланингидроксилаза (Phe-гидроксилаза) (РАН, КФ 1.14.16.1) – ключевой фермент гидроксилирования фенилаланина, нарушение активности которого приводит к накоплению L-фенилаланина в крови и фенотипическим проявлениям фенилкетонурии (ФКУ). Исследование молекулярных механизмов ФКУ показало, что нарушение активности фермента в 95–98% случаев связано с мутациями в структуре гена фенилаланин-гидроксилазы [1]. На основании имеющейся информации консорциум исследователей гена *hPAH* человека, кодирующего Phe-гидроксилазу (РАН Gene Mutation Analysis Consortium), создал базу данных мутаций (<http://www.mcgill.ca/pahdb>) [2], которая постоянно пополняется. Большинство из известных мутаций являются точковыми заменами. Среди известных делеций – делеция участка гена длиной 7000 п. о., захватывающая экзон 3 (EX3DEL) [3], а также делеция, захватывающая

3'-концевой район гена, обнаруженная у пациентов с ФКУ из Японии [4].

К делеции экзона приводят мутации в сайтах сплайсинга мРНК, как в случае распространенной в Европе мутации IVS12nt1 [5, 6], а также замены в участках, расположенных рядом с границами экзона и интронов. Например, несмотря на то что мутации G272X и P281L находятся вне сайта сплайсинга, они приводят к вырезанию одного или нескольких экзона [7].

В промоторной области гена *hPAH* или сайте полиаденилирования не было обнаружено мутаций, вызывающих ФКУ, хотя полиморфные сайты в этих районах имеются [8].

С момента клонирования кДНК гена *hPAH* в 1985 г. [9] в его структуре обнаружено уже более 400 мутаций у представителей разных этнических групп. Скорость обнаружения мутаций возросла с введением в широкую практику таких методов детекции мутаций, как селективное химическое расщепление неспаренных оснований в дуплексах [10], анализ различий в электрофоретической подвижности цепей ДНК [11], электрофорез в градиенте денатурирующего агента [12, 13]. Каждый из этих методов имеет свои ограничения и преимущества. Самое существенное ограничение, присущее перечисленным методам, – сложность точной локализации мутации. Все перечислен-

Сокращения: ФКУ – фенилкетонурия; ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов; ACRS PCR – artificial constructed restriction site PCR (ПЦР с введением сайтов рестрикции); DGGE – denaturing gradient gel electrophoresis (электрофорез в градиенте денатурирующего агента).

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: fatimas@niboch.nsc.ru; тел.: (3832) 33-35-71; факс: (3832) 33-36-77).

ные методы применимы только для относительно коротких (до нескольких сотен пар оснований) фрагментов ДНК. Они дают значительное число ложных положительных и, что наиболее важно, ложных отрицательных результатов.

Для подтверждения наличия известных мутаций используется гибридизация с молекулярными зондами на определенные (ранее выявленные) мутантные аллели [15], а также методы, основанные на рестрикционном анализе продукта ПЦР (ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) [16]. Метод гибридизации достаточно надежен, но трудоемок и требует наличия отдельного зонда для каждого мутантного аллеля. Метод ПДРФ очень удобен, прост и надежен, однако не во всех случаях в результате мутации образуется или исчезает сайт эндонуклеазы рестрикции. Секвенирование соответствующих фрагментов геномной ДНК – самый надежный метод детекции мутаций. Однако для рутинного анализа, особенно в медицинской практике, секвенирование пока является сложным и дорогостоящим.

Как спектр, так и распространенность мутаций в гене *hPAH* имеют выраженные этнические и региональные особенности. Вследствие высокой гетерогенности мутаций в данном локусе, а также необходимости тестирования большого (13) числа экзонов, поиск мутаций в структуре гена *hPAH* представляет собой технически сложную задачу. Выявление региональных особенностей спектра мутаций и частот аллелей позволяет подобрать простые методы детекции частых нарушений и значительно ускорить определение молекулярной природы дефектов гена. Знание спектра мутаций региона дает, с одной стороны, возможность ограничить первичный поиск мутаций несколькими самыми распространенными мутациями, а с другой – получить панель образцов мутаций, которые можно использовать в качестве контрольных образцов для скрининга.

Целью данного исследования было определение спектра мутаций гена *hPAH* среди больных ФКУ Новосибирской области и разработка простых методов детекции выявленных мутаций.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе были исследованы экзоны, играющие важную роль в формировании активного центра, а именно кодирующие районы каталитического и тетрамеризирующего доменов Phe-гидроксилазы. Сравнительный анализ первичной структуры этого фермента из организмов разных видов [14], а также родственных гидролаз млекопитающих [17] выявил высокую степень гомологии районов, кодируемых экзонами гена *hPAH* с 4 по 11 включительно, с самой высокой степенью гомологии в области, кодируемой экзо-

нами с 7 по 9. Предполагают, что эти участки имеют особо важное и общее значение для функционирования ферментов этого семейства, поскольку они ответственны за связывание кислорода, кофакторов и каталитическое превращение субстрата, в то время как другие свойства, характерные для отдельных белков семейства (например, субстратная специфичность), могут кодироваться другими экзонами. Важность центрального района кодирующей части гена *hPAH* для функции фермента проявляется не только в высокой степени межвидовой гомологии этих районов, но и в локализации там наибольшего числа мутаций, приводящих к ФКУ. Около 20% всех известных мутаций, вызывающих заболевание, локализовано в экзоне 7 и около 80% – в районах с 5 по 12 экзона гена [2]. Мутации в этих экзонах приводят к значительному снижению активности Phe-гидроксилазы [18] и тяжелым случаям болезни.

Ранее было проведено молекулярно-генетическое обследование пациентов с ФКУ в областной научно-практической лаборатории ДНК-диагностики Государственного областного диагностического центра (ГНОДЦ) г. Новосибирска с целью типирования самой распространенной в европейской популяции мутации R408W (экзон 12) методом рестрикционного анализа [19]. В исследуемой группе из 34 человек было выявлено 9 пациентов с мутацией R408W в гомозиготном состоянии, 20 пациентов имели эту мутацию в гетерозиготном состоянии и 5 человек ее не имели. ДНК 25 пациентов была использована в настоящей работе для типирования отличных от R408W мутаций секвенированием.

Ранее в структуре экзона 7 гена *hPAH* нами были обнаружены следующие мутации: R243Q, R252W, R261Q, E280K, P281L [20]. В результате секвенирования экзонов 5, 6, 10, 11, 12 нами было обнаружено еще 4 варианта точковых замен, 1 делеция и 1 мутация сайта сплайсинга, что составляет вместе с ранее выявленными 91.1% всех мутантных аллелей в исследованной группе. В таблице представлены выявленные мутации гена *hPAH* и их частоты. Пять наиболее распространенных мутаций: R158Q (рис. 1), R261Q, P281L, R408W и IVS12nt + 1g → а составили около 78% всех мутантных аллелей. Большинство выявленных мутаций – однонуклеотидные замены, приводящие к замене аминокислоты. Семь из двенадцати выявленных мутаций приходятся на CpG-динуклеотиды (в таблице помечены звездочкой), предположительно являющиеся районами повышенной скорости мутагенеза [21, 22]. Как известно, в геноме млекопитающих около половины остатков цитозина метилируется преимущественно в CpG-участках. Случайное дезаминирование метилцитозина приводит к замене его на тимин.

Мутации гена Phe-гидроксилазы среди больных фенилкетонурией в Новосибирской области

Локализация	Мутация	Замена		Частота	Предложенные методы детекции
		ДНК	Белок		
Экзон 5	R158Q*	CGG → CAG	Arg → Gln	4.41	ACRS PCR
Экзон 6	E221D222fsdelAG	delAG(663, 664)	Сдвиг рамки	2.94	DGGE
Экзон 6	Q232Q**	CAA/CAG	Gln/Gln	–	ПДРФ(+DdeI)
Экзон 7	R243Q*	CGA → CAA	Arg → Gln	1.47	ПДРФ(+AccB7I)
Экзон 7	V245V**	GTG/GTA	Val/Val	–	ПДРФ(+AluI)
Экзон 7	R252W*	CGG → TGG	Arg → Trp	1.47	ПДРФ(–AvaI)
Экзон 7	R261Q*	CGA → CAA	Arg → Gln	5.88	ПДРФ(–HinfI)
Экзон 7	E280K*	GAA → AAA	Glu → Lys	1.47	–
Экзон 7	P281L*	CCg → CTg	Делеция экзона 8	7.35	ACRS PCR
Экзон 10	S349P	TCA → CCA	Ser → Pro	1.47	ПДРФ(+AccB7I)
Экзон 11	Y386C	TAT → TGT	Tyr → Cys	1.47	
Экзон 12	R408W	CGG → TGG	Arg → Trp	55.88	ПДРФ(+Eco130I)
Экзон 12	Y414C	TAC → TGC	Tyr → Cys	1.47	ПДРФ(+Fnu4HI)
Интрон 12	IVS12nt + 1g → a	1315 + 1g → a	Делеция экзона 12	5.88	–

\* Мутации в составе CpG-динуклеотидных пар; \*\* (/) – молчащие замены, не приводящие к замене аминокислотного остатка (при расчете частот мутаций не учитываются); → – мутации, вызывающие ФКУ (норма – слева); "+" перед названием эндонуклеазы рестрикции означает появление соответствующего сайта узнавания, "–" – исчезновение сайта.

В интроне 12 мы обнаружили мутацию IVS12nt + 1g → a, нарушающую сайт сплайсинга (5.88%). Мутация приводит к полной делеции экзона 12 во время сплайсинга мРНК [6], в результате чего в составе мутантной Phe-гидроксилазы утрачивается 52 а.о., входящих в тетрамеризую-

щий домен. Это приводит к значительному снижению активности фермента из-за конформационной нестабильности белка [6].

В структуре экзона 6 в двух случаях была выявлена микроделеция двух оснований (AG), затрагивающая кодоны 221 и 222 и приводящая к сдвигу

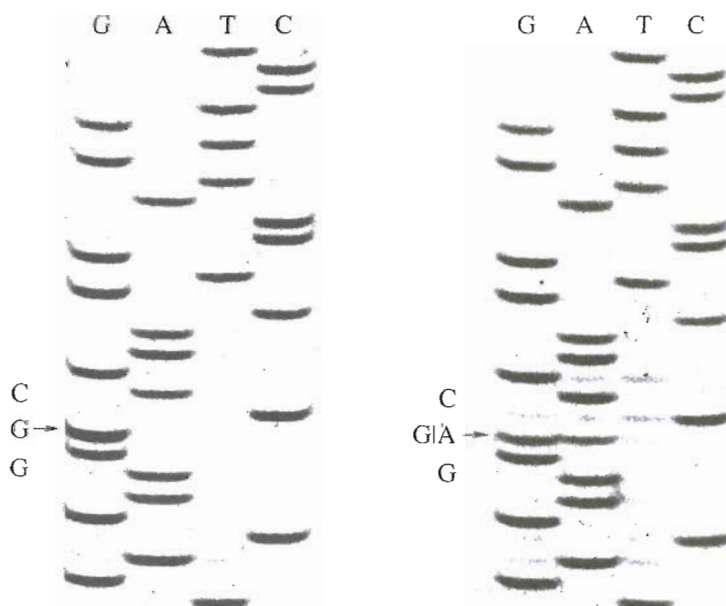


Рис. 1. Идентификация мутации R158Q в экзоне 5 в гетерозиготном состоянии. Слева – результат секвенирования фрагмента геномной ДНК здорового человека, справа – пациента с мутацией R158Q в гетерозиготном состоянии. Стрелкой указана локализация замены G на A.

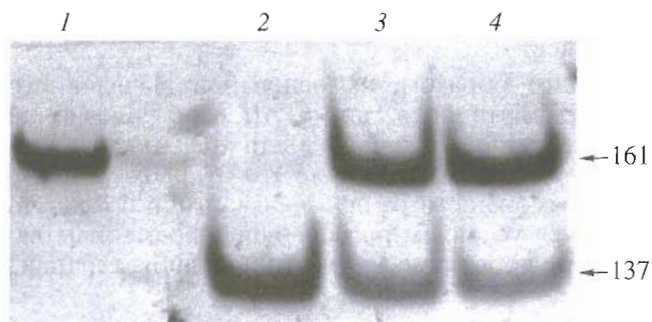


гу рамки считывания, в результате чего сразу после 221-го кодона образуется терминирующий кодон ТАА.

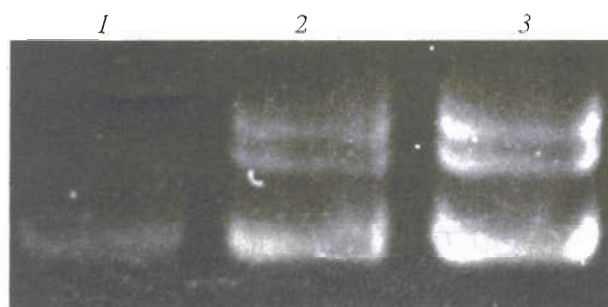
В кодирующей части гена *hPAH* были выявлены также нуклеотидные замены (V245V и Q232Q), не приводящие к замене аминокислоты. Они не учитывались при расчете частот мутаций, приводящих к ФКУ, поскольку встречаются с определенной частотой и у здоровых людей и не вызывают ФКУ.

В качестве простого метода детекции и подтверждения молекулярной природы найденных мутаций использовали картирование возникающих или исчезающих сайтов эндонуклеаз рестрикции в участках гена *hPAH*, затронутых мутациями. Для этого были использованы соответствующие эндонуклеазы рестрикции (перечислены в таблице). Например, последовательность GAGTC в экзоне 7 аллеля здоровых людей распознается эндонуклеазой рестрикции *HinfI*, при обработке которой продукт ПЦР участка экзона 7 расщепляется на два фрагмента. В случае мутации R261Q замена CGA → САА в кодоне 261 гена *hPAH* приводит к исчезновению этого сайта (последовательность GAGTC заменяется на САGTC), в результате чего продукт ПЦР, полученный из гомозигот по этой мутации, устойчив к расщеплению *HinfI*, а в случае гетерозигот расщепляется половина соответствующего продукта ПЦР. В случае мутации S349P (экзон 10) замена TCA → ССА в кодоне 349 приводит к образованию сайта CСATCCTTTGG, узнаваемого эндонуклеазой рестрикции *AccB7I*, которая расщепляет только продукт ПЦР с мутацией.

В случае отсутствия в районе детектируемой мутации подходящих сайтов для эндонуклеаз рестрикции в качестве метода, альтернативного секвенированию, использовали ПЦР с введением сайта эндонуклеазы рестрикции при помощи олигонуклеотидных праймеров (метод ACRS PCR – artificial constructed restriction site PCR). При этом один из праймеров выбирают так, чтобы его структура соответствовала участку, непосредственно примыкающему к детектируемой мутации, и вносят изменения (как правило, одну замену) в его нуклеотидную последовательность относительно структуры геномной ДНК так, чтобы продукт ПЦР содержал сайт эндонуклеазы рестрикции, исчезающий или возникающий в результате этой мутации. В данной работе для детекции частых мутаций P281L (7.35%) и R158Q (4.41%) использовали сайт одной и той же эндонуклеазы рестрикции *MspI* (CCGG), который был введен в случае нормального аллеля (структура праймеров приведена в “Эксперимент. части”) и исчезал в случае мутации (рис. 2). При детекции мутации P281L продукт ПЦР нормального аллеля (161 п. о.) гидролизуют *MspI* на фрагменты 24 п. о. и



**Рис. 2.** Использование ПЦР с введением сайта эндонуклеазы рестрикции при помощи олигонуклеотидных праймеров для идентификации мутации P281L в экзоне 7. Электрофорез в 6% ПААГ исходного продукта ПЦР нормального аллеля (фрагмент 161 п.о.) до гидролиза (1), этого же продукта после расщепления *MspI* (фрагмент 137 п.о., фрагмент 24 п.о. не виден) (2) и продуктов ПЦР образцов ДНК разных пациентов с мутацией P281L в гетерозиготном состоянии после расщепления *MspI* (фрагменты 137 п.о. и 161 п.о.) (3, 4).



**Рис. 3.** Идентификация микроделеции электрофорезом в 6% ПААГ в градиенте мочевины (0 → 8 М): 1 – продукт ПЦР области экзона 6 (383 п.о.) гена *hPAH* здорового человека, 2 и 3 – продукты ПЦР геномной ДНК разных пациентов с мутацией E221D222fsdelAG в гетерозиготном состоянии.

137 п. о., а в случае R158Q (146 п. о.) – на фрагменты 22 п. о. и 124 п.о. Преимущество метода ACRS PCR – в простоте исполнения и воспроизводимости, не уступающих ПДРФ.

Для идентификации микроделеции был применен анализ продуктов ПЦР с использованием электрофореза в градиенте денатурирующего агента. Так микроделеция в два нуклеотида в случае мутации E221D222fsdelAG приводит к значительному уменьшению стабильности гетеродуплекса, образующегося при ПЦР на матрице геномной ДНК, содержащей этот вид мутации в гетерозиготе, что легко выявляется электрофорезом в градиенте мочевины (рис. 3). Для детекции гомозиготного варианта мутации необходимо проводить отжиг продукта ПЦР с соответствующим фрагментом ДНК дикого типа. Этот метод не требует дорогостоящих реагентов, таких, как, например ферменты. Необходимо лишь

наличие контрольных образцов ДНК с делецией и без нее.

Таким образом, на основании выявленного спектра мутаций в гене *hPAH* в обследованной группе пациентов с ФКУ были предложены простые методы их детекции. Это открывает широкие возможности ранней диагностики ФКУ, что является условием применения современных вариантов коррекции заболевания и диетотерапии.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Пациенты.** Исследование проведено среди 34 неродственных больных с классической формой ФКУ, родившихся в Новосибирской области и состоящих на учете в областном медико-генетическом отделе Государственного областного диагностического центра (ГНОДЦ).

**Геномная ДНК** была выделена из ядерных клеток крови пациентов с использованием обработки додецилсульфатом натрия и протеиназой K по методу, описанному ранее [23].

**ПЦР.** Фрагменты ДНК экзонов получены методом ПЦР. Реакцию проводили в 20 мкл смеси, содержащей 65 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Твин-20, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 75 мкМ каждый из четырех dNTP, 0.1 мкМ олигонуклеотидные праймеры, 50–100 нг геномной ДНК, 0.5 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы (Промикс, Россия; Fermentas, Литва). Использовали следующие условия амплификации: 33 цикла, плавление: 94°C, 0.8 мин (4 мин в первом цикле); гибридизация: 61–63°C (в зависимости от температуры плавления олигонуклеотидных праймеров), 0.8 мин; полимеризация: 72°C, 1 мин.

Структура олигонуклеотидных праймеров, используемых для ПЦР и секвенирования экзонов 5, 7, 12, взята из работ [22–24]. Для ПЦР и секвенирования экзонов 6, 10, 11 праймеры были сконструированы на основе известных последовательностей интронов гена *hPAH* ([www.mcgill.ca/pahdb](http://www.mcgill.ca/pahdb)):

экзон 6: TTCACGTAGCAAGTGATGGCAGC,  
TCCCTCTCCTCTTCCCTCAATCCTC;

экзон 10:  
GACACATAAAATTAACCATCATAGAGTGTGC,  
CTGGAGAATGAGTTCACAGGTTGC;

экзон 11:  
CTCCCTTGGCTGTAGTTTTAGATAGGC,  
GAGGTGAGAACATGGAGACAAACTGTC.

**ПЦР с введением сайта эндонуклеазы рестрикции при помощи олигонуклеотидных праймеров** проводили в основном как описано в разделе “ПЦР”. Температуру отжига выбирали, исходя из температуры отжига полностью комплементарного праймера. Использовали следующие олиго-

нуклеотидные праймеры (5' → 3', подчеркнуты введенные отличия от последовательности геномной ДНК):

для мутации P281L:

PAH 7F CTTGCACTGGTTTCCGCCTC,

PAH 7C CTGGTAGCTGGAGGACAGTACTCC;

для мутации R158Q:

PAH 5F GATCCTGTGTACCGTGCAAGCC,

PAH 5C TTCATCCTCAACTGGATGAGGGC.

Продукты ПЦР гидролизовали эндонуклеазой *MspI* (Fermentas, Литва) и анализировали электрофорезом в 6% ПААГ.

**Очистка продуктов ПЦР.** Продукты ПЦР очищали от компонентов реакционной смеси с использованием набора Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, США) по прилагаемому протоколу. После электрофореза в агарозном геле вырезанные фрагменты выделяли из геля с использованием набора QIAQUICK (QIAGEN, Швеция) по прилагаемому фирмой протоколу.

**Секвенирование продуктов ПЦР.** Для секвенирования по Сэнгеру использовали те же олигонуклеотидные праймеры, которые были использованы для ПЦР. Праймеры, используемые в реакциях секвенирования, метили [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] rATP, используя полинуклеотидкиназу фага T4 (Fermentas, Литва), в условиях, рекомендованных изготовителем. Нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР определяли методом Сэнгера с использованием набора Thermo Sequenase cycle sequencing kit (Amersham, Англия) согласно протоколу изготовителя. Секвенированию подвергали обе цепи ДНК. Продукты секвенирования разделяли в 6% денатурирующем ПААГ (30 × 60 см, с градиентом толщины от 0.2 до 0.8 мм), после чего проводили радиоавтографию (рис. 1).

**Электрофорез в градиенте денатурирующего агента (DGGE).** Электрофорез проводили в 6% ПААГ с градиентом мочевины от 0 до 8 М при температуре 65°C как описано в работе [13]. Перед нанесением образцы ДНК денатурировали при 100°C 3 мин, затем ренатурировали при комнатной температуре для формирования гетеродуплекса в буфере следующего состава: 70% глицерин, 10 мМ Трис-НСl (рН 7.8), 1 мМ EDTA. После проведения электрофореза гель в течение 40 мин окрашивали в растворе бромистого этидия с последующей визуализацией в УФ-свете (рис. 3).

Данная работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки РФ по Проекту 05 “Генодиагностика и генотерапия социально значимых болезней человека”.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Eisensmith R.C., Woo S.L.C. // Advances in Genetics. 1995. V. 32. P. 199–271.*



2. Nowacki P., Byck S., Prevost L., Sriver C.R. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 139–142.
3. Avigad S., Cohen B.E., Bauer S., Schwartz G., Frydman M., Woo S.L.C., Niny Y., Shiloh Y. // Nature. 1990. V. 344. P. 168–170.
4. Trefz F.K., Yoshino M., Nishiyori A., Aengeneyndt F., Schmidt-Mader B., Lichter-Konecki U., Konecki D.S. // Hum. Genet. 1990. V. 85. P. 121–122.
5. DiLella A.G., Marvit J., Lidsky A.S., Guttler F., Woo S.L.C. // Nature. 1986. V. 322. P. 799–803.
6. Marvit J., DiLella A.G., Brayton K., Ledley F.D., Robson K.J.H., Woo S.L.C. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 5613–5628.
7. Ellingsen S., Knappskog P.M., Jaran A., Eiken H.G. // FEBS Lett. 1999. V. 457. P. 505–508.
8. Svensson E., Wang Y., Eisensmith R.C., Hagenfeldt L., Woo S.L.C. // Eur. J. Hum. Gen. 1993. V. 1. P. 306–313.
9. Kwock S.C.M., Ledley F.D., DiLella A.G., Robson K.J.H., Woo S.L.C. // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 556–561.
10. Cotton R.G.H., Rodrigues N.R., Campbell R.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 4397–4401.
11. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 2766–2770.
12. Myers R.M., Maniatis T., Lerman L.S. // Methods in Enzymology. 1987. V. 155. P. 501–520.
13. Guldberg P., Henriksen K.F., Guttler F. // Genomics. 1993. V. 17. P. 141–146.
14. Morales G., Requena G.M., Jimenez-Ruiz A., Lopez M.C., Ugarte M., Alonso C. // Gene. 1990. V. 93. P. 213–219.
15. Скрябин Б.В., Ковальчук Л.А., Хальчицкий С.Е., Гольцов А.А., Кабоев О.К., Плуталов О.В., Берлин Ю.А., Шварц Е.И. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. С. 1690–1692.
16. Иващенко Т.Э., Белова Е.Г., Баранов В.С. // Генетика. 1993. Т. 29. С. 862–865.
17. Grennett H.E., Ledley F.D., Reed L.L., Woo S.L.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 4. P. 5530–5534.
18. Guldberg P., Rey F., Zschocke J., Romano V., Francois B., Michiels L., Ullrich K., Hoffmann G.F., Burgard P., Schmidt H., Meli C., Riva E., Dianzani I., Ponzzone A., Rey J., Guttler F. // Am. J. Hum. Genet. 1998. V. 63. P. 71–79.
19. Smagulova F.O., Maslennikov A.B., Orobei A.M., Morozov I.V. // Eur. J. Hum. Genet. 1999. V. 7. P. 126.
20. Смагулова Ф.О., Масленников А.Б., Морозов И.В., Китайник Г.П. // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1–4.
21. Miller S.A., Dyckes D.D., Polesky H.F. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 1215.
22. Okano Y., Wang T., Eisensmith R.C., Steinmann B., Gitzelmann R., Woo S.L.C. // Am. J. Hum. Genet. 1990. V. 46. P. 18–25.
23. Meijer H., Jongbloed R.J., Hekking M., Spaapen J.M., Geraedts P.M. // Hum. Genet. 1993. V. 92. P. 588–592.
24. DiLella A.G., Huang W.M., Woo S.L.C. // Lancet. 1988. V. 1. P. 497–499.

## The Spectrum of Mutations and Methods for Their Detection in the Phenylalanine Hydroxylase Gene in Phenylketonuria Patients from the Novosibirsk Region

F. O. Smagulova<sup>#</sup> and I. V. Morozov

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,  
prospect Akad. Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

Phenylketonuria (PKU) is a widespread autosome recessive hereditary disease caused by a deficiency of the liver enzyme phenylalanine hydroxylase, which results in the distortion of phenylalanine metabolism and accumulation of toxic metabolites. The knowledge of molecular bases of PKU is of a high social importance as it enables phenotypic correction of the disease in the case of its early diagnostics. This disease is known to be associated with mutations in the phenylalanine hydroxylase gene, the distribution and mutation spectrum having pronounced ethnic and regional features. We studied the spectrum of mutations in the phenylalanine hydroxylase gene in a group of patients with PKU from the Novosibirsk region to reveal 10 missense point mutations, 1 mutation in the splice donor site, and 1 microdeletion. For these mutations, most widely distributed in the region, we used straightforward detection methods based on the restriction fragment length polymorphism (RFLP), artificial constructed restriction sites (ACRS) PCR, and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

*Key words: phenylalanine hydroxylase, phenylketonuria, mutations, ACRS PCR, DGGE*

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (3832) 333571; fax: +7 (3832) 333677; e-mail: fatimas@niboch.nsc.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 11. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.