

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2309035

论著 · 实验研究

人苯丙氨酸羟化酶突变体 p.R243Q、p.R241C 和 p.Y356X 的体外表达及功能研究

庞永红¹ 高翔羽² 袁振亚¹ 黄辉¹ 王增芹¹
彭磊¹ 李逸群¹ 刘杰¹ 刘冬¹ 陈桂荣¹

(1. 徐州医科大学附属徐州妇幼保健院, 江苏徐州 221009;
2. 东南大学附属徐州医院新生儿科, 江苏徐州 221009)

[摘要] **目的** 分析 3 种苯丙氨酸羟化酶 (phenylalanine hydroxylase, PAH) 突变体 (p.R243Q、p.R241C 和 p.Y356X) 的体外表达, 确定 3 种突变体的致病性。**方法** 利用生物信息技术预测 PAH 突变体对 PAH 蛋白结构和功能的影响。构建相应的 PAH 突变体质粒, 在人胚胎肾细胞 HEK293T 中进行表达, 采用定量逆转录聚合酶链反应检测 3 种 PAH 突变体的 mRNA 表达水平, 利用蛋白质印迹法与酶联免疫吸附试验检测突变体的 PAH 蛋白表达水平。**结果** 生物信息学分析预测结果显示, 3 种突变体均具备致病性。突变体 p.R243Q 和 p.R241C 质粒在 HEK293T 细胞中的 mRNA 表达水平与野生型类似 ($P>0.05$), 而 p.Y356X 突变体质粒的 mRNA 表达水平明显下降 ($P<0.05$)。3 种突变体 PAH 蛋白的表达水平与野生型相比均显著降低 ($P<0.05$)。p.R241C 和 p.Y356X 的细胞外 PAH 蛋白浓度较野生型降低 ($P<0.05$), p.R243Q 与野生型相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** p.R243Q、p.R241C 和 p.Y356X 降低真核细胞中 PAH 蛋白的表达量, 其中 p.R241C 和 p.Y356X 还影响 PAH 蛋白的功能, 这 3 种 PAH 突变体均为致病性突变。 [中国当代儿科杂志, 2024, 26 (2): 188-193]

[关键词] 苯丙氨酸羟化酶缺乏症; 突变体; 体外表达; 细胞

In vitro expression and functional analyses of the mutants p.R243Q, p.R241C and p.Y356X of the human phenylalanine hydroxylase

PANG Yong-Hong, GAO Xiang-Yu, YUAN Zhen-Ya, HUANG Hui, WANG Zeng-Qin, PENG Lei, LI Yi-Qun, LIU Jie, LIU Dong, CHEN Gui-Rong. Xuzhou Maternity and Child Health Care Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221009, China (Email: yhpang007@163.com)

Abstract: Objective To study the *in vitro* expression of three phenylalanine hydroxylase (PAH) mutants (p.R243Q, p.R241C, and p.Y356X) and determine their pathogenicity. **Methods** Bioinformatics techniques were used to predict the impact of PAH mutants on the structure and function of PAH protein. Corresponding mutant plasmids of PAH were constructed and expressed in HEK293T cells. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction was used to measure the mRNA expression levels of the three PAH mutants, and their protein levels were assessed using Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Bioinformatics analysis predicted that all three mutants were pathogenic. The mRNA expression levels of the p.R243Q and p.R241C mutants in HEK293T cells were similar to the mRNA expression level of the wild-type control ($P>0.05$), while the mRNA expression level of the p.Y356X mutant significantly decreased ($P<0.05$). The PAH protein expression levels of all three mutants were significantly reduced compared to the wild-type control ($P<0.05$). The extracellular concentration of PAH protein was reduced in the p.R241C and p.Y356X mutants compared to the wild-type control ($P<0.05$), while there was no significant difference between the p.R243Q mutant and the wild type control ($P>0.05$). **Conclusions** p.R243Q, p.R241C and p.Y356X mutants lead to reduced expression levels of PAH protein in eukaryotic cells, with p.R241C and p.Y356X mutants also affecting the

[收稿日期] 2023-09-11; [接受日期] 2024-01-08

[基金项目] 徐州市科学技术局社会发展项目 (KC20081); 江苏省卫生健康委员会妇幼健康科研项目 (F202058); 江苏省妇幼保健协会科研课题 (FYX201906); 徐州医科大学科研课题 (2018KJ19)。

[作者简介] 庞永红, 女, 博士, 主任医师。Email: yhpang007@163.com。

function of PAH protein. These three PAH mutants are to be pathogenic.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2024, 26(2): 188-193]

Key words: Phenylalanine hydroxylase deficiency; Mutant; *In vitro* expression; Cell

苯丙氨酸羟化酶 (phenylalanine hydroxylase, PAH) 缺乏症是一种由于 PAH 基因突变导致酶活性降低, 苯丙氨酸及其代谢产物在体内蓄积导致患儿发生智力损伤、生长发育迟缓等症状的常染色体隐性遗传病。全球发病率为 0.64/10 000 [1], 我国发病率高于全球平均水平, 约为 0.86/10 000 [2]。根据新生儿期血液苯丙氨酸浓度, PAH 缺乏症分为无需治疗的 PAH 缺乏症、轻度高苯丙氨酸血症 (hyperphenylalanemia, HPA)、轻度苯丙酮尿症 (phenylketonuria, PKU)、中度 PKU 和典型 PKU [1]。PAH 是苯丙氨酸转化为酪氨酸的限速酶, PAH 基因突变引起 PAH 活性降低, 苯丙氨酸转化酪氨酸受阻, 高浓度的苯丙氨酸及其代谢产物造成各系统损伤, 严重时导致脑损伤, 出现智力发育落后等症状 [3]。此外, 1%~2% PAH 缺乏症病例继发于四氢生物蝶呤 (tetrahydropterine, BH4) 缺乏, BH4 是 PAH 和其他氨基酸代谢酶的必要辅助因子 [4-5]。

1953 年发现 PKU 主要由 PAH 缺乏导致 [6]。20 世纪 60 年代世界各国陆续开始了新生儿 PKU 筛查工作, 早期诊断和干预确实使患者预后得到了有效改善 [7], 然而, 传统的限制苯丙氨酸的饮食疗法会严重恶化患者的生活质量 [8-9]。此外, 长期严格的 PKU 饮食可造成维生素、矿物质缺乏和骨质疏松等躯体疾病 [3, 10-11], 社会功能缺陷等心理疾病 [12-13], 以及家庭、社会的经济负担过重等问题 [14], 寻找 PKU 新的治疗方法逐渐成为研究新热点。截至 2023 年 8 月 22 日, PAH 基因突变种类已达 2 209 种 (<http://www.biopku.org/pah>)。既往对淮海经济区汉族 PKU 人群 PAH 基因的研究发现了 24 种突变, 其中 p.R243Q、p.R241C 和 p.Y356X 是常见的 3 种突变体, 相对突变频率分别为 18.317%、8.416% 和 3.960% [15]。然而, 关于以上 3 种突变体的蛋白质稳定性、酶活性和其他关键生物参数的研究较少, 开展以上研究有助于解锁 PKU 的病理机制, 为 PKU 的治疗方法, 包括可能的药物干预或基因疗法提供新思路和新线索。

1 材料与方法

1.1 命名法和生物信息学软件分析

突变命名遵循国际指南 (<http://www.hgvs.org/>

content/guidelines)。突变位点基于 PAH 转录本参考序列 (NM_000277.1) 进行编号。同时, 在生物信息学网站 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 分析突变位点空间变化和氨基酸相互作用, 并预测突变对蛋白质的影响。

1.2 PAH 野生型及突变型质粒的构建

野生型 (wild type, WT) 质粒 (pUC57-PAH-WT) 和 3 个诱变后的突变体质粒 (pUC57-p.R243Q、pUC57-p.R241C 和 pUC57-p.Y356X) 均由江苏赛索飞生物科技有限公司提供, 并对整个编码区进行测序验证。

1.3 突变 PAH 蛋白在 HEK293T 细胞中的表达

使用 H-DMEM 培养基 (含 10% FBS 和 1% P/S), 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 HEK293T 细胞。当细胞增殖达到 80% 时, 使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 将与载体相连的质粒 pUC57-PAH-WT、pUC57-p.R243Q、pUC57-p.R241C 和 pUC57-p.Y356X 分别转染到细胞中。培养 48 h 后收集细胞用于后续实验。

1.4 PAH 基因转录的定量逆转录聚合酶链反应分析

收集细胞后提取总 RNA 并反转录为 cDNA, 用于扩增。设计引物如下, PAH_F: AGTCGCGGAA-TCAGAGCGAT; PAH_R: AGGTCTCTGGCTTTTT-AGGGC; GAPDH_F: GCCGCATCTTCTTTTTCG-TC; GAPDH_R: GAGAACAGTGAGCGCCTAGT; 采用相对定量进行统计学分析, 样品目的基因的相对表达量用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算。分别使用 Excel 分析数据, GraphPad Prism 5 软件作图。

1.5 蛋白质印迹法检测 PAH 胞内水平

细胞裂解缓冲液提取蛋白质, 使用 Flag 标签抗体, 以 β -actin 为内参, 通过蛋白质印迹法检测 Flag-PAH 蛋白在 HEK293T 细胞中的表达。

1.6 酶联免疫吸附试验检测 PAH 分泌水平

采用人 PAH 的酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (上海诺渊生物技术有限公司) 检测细胞外 PAH 蛋白浓度。实验独立重复 3 次, 创建标准曲线后, 计算每个样品的 PAH 浓度。

1.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。正

态分布计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用两样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析结果

经生物学信息网站预测 3 种突变体 p.R243Q、p.R241C 和 p.Y356X 位于酶活性位点附近, 均会影

响 PAH 催化域中的氨基酸残基, 残基的突变可能都改变了氨基酸的亲水性和/或氢键。通过搜索公共人群数据库 (ClinVar 数据库, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>; HGMD 数据库, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>), 参照既往文献报道的与本研究中相同种族的基因数据, 并分析基因突变的频率, 发现 p.R243Q、p.R241C 和 p.Y356X 3 种突变体均具备致病性, 见表 1。

表 1 3 种 PAH 突变体 (p.R243Q、p.R241C 和 p.Y356X) 的致病性分析

cDNA 突变	氨基酸突变	致病证据*	结论
c.728G>A	p.R243Q	PS4+PM2_supporting+PM3_very strong+PP3+PP4	致病
c.721C>T	p.R241C	PS3+PM2_supporting+PM3_strong+PP3+PP4_Moderate	致病
c.1068C>A	p.Y356TX	PVS1+PM2+PM3_Strong+PP4_Moderate	致病

注: *示致病性分析参考文献 [16]。

2.2 pUC57-PAH-WT 质粒的构建和定点诱变

为了研究 PAH 突变体 p.R243Q、p.R241C 和 p.Y356X 在真核细胞中的表达, 首先构建 pUC57-PAH-WT 质粒, DNA 测序显示该质粒中 PAH 序列与参考序列 (NM_000277.1) 完全匹配, 然后在 pUC57-PAH-WT 质粒中分别进行定点诱变, 引物序列见表 2。突变质粒 pUC57-p.R243Q、pUC57-p.R241C 和 pUC57-p.Y356X 的测序结果显示定点基因位点被目标碱基成功取代, 测序结果见图 1。

2.3 PAH 突变蛋白在 HEK293T 细胞中的表达

为了研究 PAH 突变体在真核细胞中的表达, 将质粒转染至 HEK293T 细胞中, 采用定量逆转录聚合酶链反应检测突变体的 mRNA 转录差异。空对照 mRNA 的表达量为 1.01 ± 0.18 。突变体 p.R243Q 和 p.R241C 的 mRNA 相对表达量与 WT 相

似 ($P > 0.05$), p.Y356X 的 mRNA 相对表达量明显下降 ($P < 0.05$), 见表 3。

使用蛋白质印迹法检测突变体蛋白质表达量。空对照蛋白质印迹灰度值为 0.013 ± 0.003 , 说明 HEK293T 细胞本身几乎没有 PAH 蛋白表达。3 种突变体的 Flag-PAH 蛋白相对表达量与 WT 相比均有不同程度的降低 ($P < 0.05$), 其中突变体 p.Y356X 表达量最低, 见表 4。

使用 ELISA 测试突变体细胞外 PAH 蛋白浓度。空对照细胞外 PAH 蛋白浓度为 (95 ± 30) pg/mL, 说明 HEK293T 细胞本身有少量 PAH 表达。与 WT 比较, p.R241C 和 p.Y356X 突变体的细胞外 PAH 蛋白浓度均有明显降低 ($P < 0.05$), p.R243Q 虽然降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 5。

表 2 3 种 PAH 突变体定点诱变引物表

突变位点	正向引物	反向引物
p.R243Q (c.728G>A)	CAGACTTGCCTGTTTCCGCCTCCAACCTGTG GCTGGCCTGCTTTCCTCT	AGAGGAAAGCAGGCCAGCCACAGGTTGGAGCGGAAACCA GTGCAAGTCTG
p.R241C (c.721C>T)	TCTCAATTCTGCAGACTTGCCTGCTTCTGCTCC TCCGACCTGTGGCTGGCTGCTTTC	GGAAAGCAGGCCAGCCACAGGTCGGAGCCAGAAACCACTG CAAGTCTGCAGGAATTGAGA
p.Y356X (c.1068C>A)	TGTCATCCTTTGCTGAATTACAGTAATGCTTATC AGAGAAGCCAAAGCTTCT	AGAAGCTTTGGCTTCTCTGATAAGCATTACTGTAATTCACCA AAGGATGACA

注: PAH 转录序列号为 NM_000277.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)。

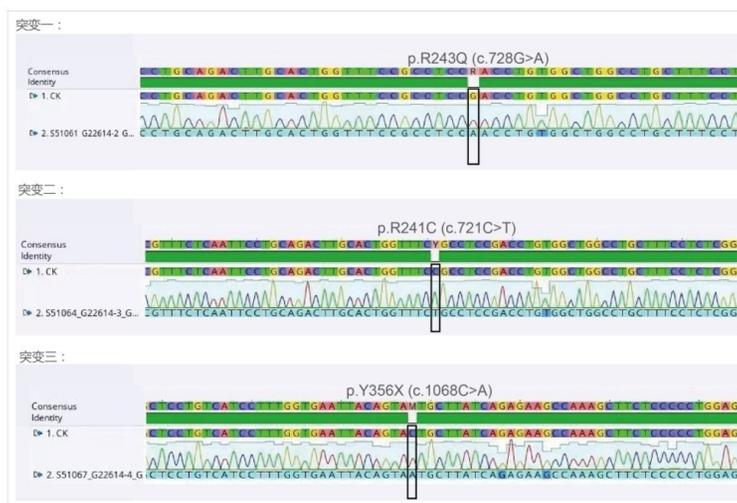


图 1 体外定点诱变质粒测序图 框内部分为突变位置，PAH 基因参考序列为 NM_000277.1。

表 3 3 种 PAH 突变体与 WT 的 mRNA 相对表达量比较

PAH 突变体	mRNA 相对表达量	<i>t</i> 值 ^a	<i>P</i> 值 ^a
WT	24.5 ± 7.4		
p.R243Q	15.8 ± 1.8	-1.991	0.117
p.R241C	17.3 ± 5.9	-1.316	0.258
p.Y356X	2.1 ± 0.4	-5.244	0.034

注：[PAH] 苯丙氨酸羟化酶；[WT] 野生型。a 示与 WT mRNA 的相对表达量比较的统计学分析结果。

表 4 3 种 PAH 突变体与 WT 的 Flag-PAH 蛋白相对表达量比较

PAH 突变体	Flag-PAH 蛋白相对表达量	<i>t</i> 值 ^a	<i>P</i> 值 ^a
WT	0.886 ± 0.036		
p.R243Q	0.113 ± 0.013	-34.842	<0.001
p.R241C	0.240 ± 0.035	-22.393	<0.001
p.Y356X	0.043 ± 0.006	-39.776	<0.001

注：[PAH] 苯丙氨酸羟化酶；[WT] 野生型。a 示与 WT 的 Flag-PAH 蛋白相对表达量比较的统计学分析结果。

表 5 3 种 PAH 突变体与 WT 的细胞外 PAH 蛋白浓度比较

PAH 突变体	细胞外 PAH 蛋白浓度	<i>t</i> 值 ^a	<i>P</i> 值 ^a
WT	576 ± 10		
p.R243Q	549 ± 31	-1.426	0.227
p.R241C	384 ± 12	-21.510	<0.001
p.Y356X	373 ± 59	-5.855	0.024

注：[PAH] 为苯丙氨酸羟化酶；[WT] 野生型。a 示与 WT 的细胞外 PAH 蛋白浓度比较的统计学分析结果。

3 讨论

人类 PAH 基因的突变谱丰富，大多数突变体（约占 58.3%）为错义突变^[17-18]。该酶包含 3 个域：调节域、催化域和四聚化域，多数突变位于催化域^[19]。本研究通过检索公共人群数据库并参照既往研究数据，分析基因突变频率，预测 p.R243Q、p.R241C 和 p.Y356X 均具有致病性^[16]，为后续体外表达研究奠定了理论基础。

既往研究认为所有 PAH 突变体都不影响 mRNA 转录，突变基因通过干扰蛋白质的翻译发挥作用^[20]。本研究发现 p.R243Q 和 p.R241C 的 mRNA 相对表达量和 WT 相比没有差别，但 p.Y356X 引起 mRNA 转录下调。另有研究表明 PAH 基因突变可以破坏正常的剪接机制，而剪接机制保真度的变化可以产生多种 mRNA^[21]。本研究中 p.Y356X 的 mRNA 转录水平降低的原因，可能是基因突变造成剪接机制保真度的改变，转录出异常的 mRNA。根据本研究结果，推测 PAH 突变体的致病途径除了从 RNA 到蛋白质的异常翻译，可能还包括从干扰 RNA 转录开始进而导致上述异常蛋白质翻译，确切的致病途径还需要扩大样本量，在不同表达系统中进行验证。

R243Q 作为淮海经济区汉族 PKU 人群中最常见的一种突变，在既往的报道中，既与轻度 PKU 相关，也与经典型 PKU 相关，其残留酶活性分别为 46%^[22]、12.8%^[23]、6%^[24] 和 14%^[25]。本研究

发现 p.R243Q 的蛋白表达量明显降低, 但该突变有比较高的细胞外蛋白浓度, 这与该突变的临床表型不一致。可能的原因有以下几点: 第一, 在体外酶活性测定的体系中, 底物和辅助因子浓度均高于体内, 因此所获得的酶活性水平一般略高^[24]。第二, 在体内存在强大的异常蛋白降解调控系统, 错误折叠的蛋白质, 随后可被清除, 蛋白质处于合成降解的动态平衡中^[26], 在体外瞬时表达系统中, 质粒 DNA 并没有稳定整合到基因组中, 因此对突变蛋白的折叠、聚合和降解缺少必要的调控, 部分突变体会出现一过性的高表达^[27]。第三, 由于大多数 PKU 患者基因型是复合杂合子^[4, 28], 不同变异等位基因的共表达 (阳性或阴性) 可能影响肝 PAH 活性^[29]。体外纯合子 PAH 活性在与体内半合子相同的患者进行比较时, 代谢表型并不总是完全一致。第四, 各种策略中包含不同的细胞系统、PAH 测定法、温度、反应时间和底物 (BH4 或 6-甲基四氢蝶呤), 这些差异将使得测量结果不完全相同^[24]。PAH 缺乏症是由于 PAH 酶的活力降低及消失所致, 蛋白表达水平只是一个初始指标, 不能直接反映酶的活性。下一步研究中我们将使用不同的细胞系, 规范实验条件, 综合分析结果。

既往研究表明大部分 PAH 突变体蛋白表达水平下降和酶活性降低的原因是突变蛋白错误折叠导致蛋白聚集和降解的趋势增加^[26]。本研究发现 p.R243Q、p.R241C 和 p.Y356X 可导致蛋白表达量的减少, 但具体的分子机制尚不明了。DNAJC12 是一种多功能分子伴侣, 与热休克蛋白 70 和核苷酸交换因子一起调节 PAH 的适当折叠、降解, 维持细胞内蛋白质稳定性, 在体外转染的细胞中, 这些分子伴侣也可以纠正一些突变蛋白的折叠缺陷, 稳定蛋白质^[30]。下一步将研究分子伴侣是否可以在体外纠正 PAH 突变体的蛋白表达量, 探索 PAH 突变体致病的分子机制。

人类 PAH 主要在肝脏表达, 少部分在肾脏表达。HEK293T 来源于人体胚胎肾细胞, 理论上只有少量 PAH 蛋白表达。为了区分来自背景 HEK293T 细胞和突变体的 PAH 蛋白表达, 蛋白质印迹法检测使用了抗 Flag 抗体作为一抗, 结果显示空对照组几乎没有 Flag-PAH 蛋白表达, 而 ELISA 使用的是抗 PAH, 空对照组检测到较低的 PAH。这一结果表明需要考虑背景 HEK293T 细胞本身 PAH 的表达。

本研究的局限性主要包括以下 2 个方面:

(1) HEK293T 可以少量表达 PAH 蛋白。尽管使用针对 Flag 标签的抗体可以指定质粒中的 PAH 表达, 但背景中的 PAH 单体可能会以某种方式影响 PAH 四聚体的形成。下一步研究中将结合使用其他细胞系, 如 COS-7 细胞或 NIH3T3 细胞来表达 PAH 突变并综合分析, 弥补这一不足。(2) 突变样本量较小, 下一步研究将扩大突变样本量, 提高研究精度。

综上所述, 在体外表达中 PAH 的 3 种突变体 p.R243Q、p.R241C 和 p.Y356X 导致细胞内 PAH 蛋白表达量减少, 其中 p.R241C 和 p.Y356X 还引起细胞外酶浓度降低, 这些结果为 p.R243Q、p.R241C 和 p.Y356X 的致病性研究提供了证据, 但还需要进一步在不同表达系统中进行验证。

作者贡献声明: 庞永红负责研究设计和实施、初稿写作、获取研究经费; 高翔羽负责研究指导、论文构思、审核与写作; 袁振亚、黄辉、王增芹、彭磊、李逸群、刘杰、刘冬、陈桂荣负责采集数据、实施研究、软件提供、统计分析、解释数据、技术支持。

利益冲突声明: 所有作者声明无利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Foreman PK, Margulis AV, Alexander K, et al. Birth prevalence of phenylalanine hydroxylase deficiency: a systematic literature review and meta-analysis[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2021, 16(1): 253. PMID: 34082800. PMCID: PMC8173927. DOI: 10.1186/s13023-021-01874-6.
- [2] Zhan JY, Qin YF, Zhao ZY. Neonatal screening for congenital hypothyroidism and phenylketonuria in China[J]. *World J Pediatr*, 2009, 5(2): 136-139. PMID: 19718537. DOI: 10.1007/s12519-009-0027-0.
- [3] van Wegberg AMJ, MacDonald A, Ahring K, et al. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2017, 12(1): 162. PMID: 29025426. PMCID: PMC5639803. DOI: 10.1186/s13023-017-0685-2.
- [4] Blau N. Genetics of phenylketonuria: then and now[J]. *Hum Mutat*, 2016, 37(6): 508-515. PMID: 26919687. DOI: 10.1002/humu.22980.
- [5] Opladen T, López-Laso E, Cortès-Saladelfont E, et al. Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2020, 15(1): 126. PMID: 32456656. PMCID: PMC7251883. DOI: 10.1186/s13023-020-01379-8.
- [6] Jervis GA. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of

- phenylalanine-oxidizing system[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1953, 82(3): 514-515. PMID: 13047448.
- [7] van Spronsen FJ, van Wegberg AM, Ahring K, et al. Key European guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5(9): 743-756. PMID: 28082082. DOI: [10.1016/S2213-8587\(16\)30320-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30320-5).
- [8] Huijbregts SCJ, Bosch AM, Simons QA, et al. The impact of metabolic control and tetrahydrobiopterin treatment on health related quality of life of patients with early-treated phenylketonuria: a PKU-COBESO study[J]. *Mol Genet Metab*, 2018, 125(1/2): 96-103. PMID: 30007854. DOI: [10.1016/j.ymgme.2018.07.002](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.07.002).
- [9] Vieira E Neto, Maia HS Filho, Monteiro CB, et al. Quality of life and adherence to treatment in early-treated Brazilian phenylketonuria pediatric patients[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 51(2): e6709. PMID: 29267500. PMCID: PMC5731329. DOI: [10.1590/1414-431X20176709](https://doi.org/10.1590/1414-431X20176709).
- [10] Crujeiras V, Aldámiz-Echevarría L, Dalmau J, et al. Vitamin and mineral status in patients with hyperphenylalaninemia[J]. *Mol Genet Metab*, 2015, 115(4): 145-150. PMID: 26123187. DOI: [10.1016/j.ymgme.2015.06.010](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.06.010).
- [11] Kose E, Arslan N. Vitamin/mineral and micronutrient status in patients with classical phenylketonuria[J]. *Clin Nutr*, 2019, 38(1): 197-203. PMID: 29433755. DOI: [10.1016/j.clnu.2018.01.034](https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.01.034).
- [12] Burlina AP, Lachmann RH, Manara R, et al. The neurological and psychological phenotype of adult patients with early-treated phenylketonuria: a systematic review[J]. *J Inher Metab Dis*, 2019, 42(2): 209-219. PMID: 30690773. DOI: [10.1002/jimd.12065](https://doi.org/10.1002/jimd.12065).
- [13] Klimek A, Baerwald C, Schwarz M, et al. Everyday life, dietary practices, and health conditions of adult PKU patients: a multicenter, cross-sectional study[J]. *Ann Nutr Metab*, 2020, 76(4): 251-258. PMID: 32998147. DOI: [10.1159/000510260](https://doi.org/10.1159/000510260).
- [14] Trefz F, Muntau AC, Schneider KM, et al. Health economic burden of patients with phenylketonuria (PKU): a retrospective study of German health insurance claims data[J]. *Mol Genet Metab Rep*, 2021, 27: 100764. PMID: 34036045. PMCID: PMC8138676. DOI: [10.1016/j.ymgmr.2021.100764](https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2021.100764).
- [15] 庞永红, 褚英, 刘雪楠, 等. 淮海地区汉族苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变分析[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2018, 33(20): 1545-1549. DOI: [10.3760/cma.j.issn.2095-428X.2018.20.006](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.2095-428X.2018.20.006).
- [16] 王秋菊, 沈亦平, 邬玲仟, 等. 遗传变异分类标准与指南[J]. *中国科学(生命科学)*, 2017, 47(6): 668-688. DOI: [10.1360/N052017-00099](https://doi.org/10.1360/N052017-00099).
- [17] Liu N, Huang Q, Li Q, et al. Spectrum of *PAH* gene variants among a population of Han Chinese patients with phenylketonuria from northern China[J]. *BMC Med Genet*, 2017, 18(1): 108. PMID: 28982351. PMCID: PMC5629770. DOI: [10.1186/s12881-017-0467-7](https://doi.org/10.1186/s12881-017-0467-7).
- [18] Hillert A, Anikster Y, Belanger-Quintana A, et al. The genetic landscape and epidemiology of phenylketonuria[J]. *Am J Hum Genet*, 2020, 107(2): 234-250. PMID: 32668217. PMCID: PMC7413859. DOI: [10.1016/j.ajhg.2020.06.006](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.06.006).
- [19] Mitchell JJ, Trakadis YJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency[J]. *Genet Med*, 2011, 13(8): 697-707. PMID: 21555948. DOI: [10.1097/GIM.0b013e3182141b48](https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3182141b48).
- [20] Zong Y, Liu N, Ma S, et al. Three novel variants (p.Glu178Lys, p.Val245Met, p.Ser250Phe) of the phenylalanine hydroxylase (*PAH*) gene impair protein expression and function *in vitro*[J]. *Gene*, 2018, 668: 135-139. PMID: 29653233. DOI: [10.1016/j.gene.2018.03.078](https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.078).
- [21] Garbade SF, Shen N, Himmelreich N, et al. Allelic phenotype values: a model for genotype-based phenotype prediction in phenylketonuria[J]. *Genet Med*, 2019, 21(3): 580-590. PMID: 29997390. DOI: [10.1038/s41436-018-0081-x](https://doi.org/10.1038/s41436-018-0081-x).
- [22] Pey AL, Desviat LR, Gámez A, et al. Phenylketonuria: genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in *PAH*[J]. *Hum Mutat*, 2003, 21(4): 370-378. PMID: 12655546. DOI: [10.1002/humu.10198](https://doi.org/10.1002/humu.10198).
- [23] Lee DH, Koo SK, Lee KS, et al. The molecular basis of phenylketonuria in Koreans[J]. *J Hum Genet*, 2004, 49(11): 617-621. PMID: 15503242. DOI: [10.1007/s10038-004-0197-5](https://doi.org/10.1007/s10038-004-0197-5).
- [24] Himmelreich N, Shen N, Okun JG, et al. Relationship between genotype, phenylalanine hydroxylase expression and *in vitro* activity and metabolic phenotype in phenylketonuria[J]. *Mol Genet Metab*, 2018, 125(1/2): 86-95. PMID: 30037505. DOI: [10.1016/j.ymgme.2018.06.011](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.06.011).
- [25] Sarodaya N, Tyagi A, Kim HJ, et al. Deubiquitinase USP19 extends the residual enzymatic activity of phenylalanine hydroxylase variants[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 14243. PMID: 35987969. PMCID: PMC9392723. DOI: [10.1038/s41598-022-18656-0](https://doi.org/10.1038/s41598-022-18656-0).
- [26] Waters PJ. How *PAH* gene mutations cause hyperphenylalaninemia and why mechanism matters: insights from *in vitro* expression[J]. *Hum Mutat*, 2003, 21(4): 357-369. PMID: 12655545. DOI: [10.1002/humu.10197](https://doi.org/10.1002/humu.10197).
- [27] Kaufman RJ. Vectors used for expression in mammalian cells[J]. *Methods Enzymol*, 1990, 185: 487-511. PMID: 2381327. DOI: [10.1016/0076-6879\(90\)85041-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85041-1).
- [28] van Spronsen FJ, Blau N, Harding C, et al. Phenylketonuria[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 36. PMID: 34017006. PMCID: PMC8591558. DOI: [10.1038/s41572-021-00267-0](https://doi.org/10.1038/s41572-021-00267-0).
- [29] Shen N, Heintz C, Thiel C, et al. Co-expression of phenylalanine hydroxylase variants and effects of interallelic complementation on *in vitro* enzyme activity and genotype-phenotype correlation[J]. *Mol Genet Metab*, 2016, 117(3): 328-335. PMID: 26803807. DOI: [10.1016/j.ymgme.2016.01.004](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.01.004).
- [30] Blau N, Martinez A, Hoffmann GF, et al. DNAJC12 deficiency: a new strategy in the diagnosis of hyperphenylalaninemia[J]. *Mol Genet Metab*, 2018, 123(1): 1-5. PMID: 29174366. DOI: [10.1016/j.ymgme.2017.11.005](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.11.005).

(本文编辑: 王颖)

(版权所有©2024 中国当代儿科杂志)