

Diplomarbeit

**Die Bedeutung der Genotypisierung von Patienten  
mit typischer Phenylketonurie unter besonderer  
Berücksichtigung der BH4 Responsivität**

**Eine retrospektive Studie an einer österreichischen  
Kohorte von 102 Patienten**

eingereicht von

**Eva Maria Windisch**

Mat.Nr.: 0311743

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Institut / Klinik für Neuropädiatrie und angeborene  
Stoffwechselerkrankungen, Univ. Klinik für Kinder-und  
Jugendheilkunde**

unter der Anleitung von

**Prof. Dr. Barbara Plecko**

### *Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am .....*

*Unterschrift*

## Danksagungen

Ich bedanke mich ganz besonders bei meiner Betreuerin, Frau Prof. Plecko, die mir dieses interessante Thema gegeben hat und mich bei dieser Arbeit immer unterstützt hat. Sie stand mir sowohl bei der Studie als auch beim Verfassen der Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite. Ich durfte Sie im Mai zu einem Kongress zum Thema PKU nach Salzburg begleiten. Das war eine wertvolle Erfahrung, die mir auch zum Verständnis der Thematik sehr weiter geholfen hat.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Dr. Sterl bedanken, die mir viel von ihrem Wissen und ihren Erfahrungen zum Thema Wissenschaftliches Arbeiten weitergegeben hat.

An dieser Arbeit mitgewirkt hat auch Herr Paul, der die molekulargenetische Testung an der Klinik für Kinder und Jugendheilkunde Graz durchführt.

An dieser Stelle sage ich ein großes Dankeschön an meine Familie, die mich die sechs Jahre meines Studiums immer moralisch und auch finanziell unterstützt hat. Bedanken möchte ich mich auch bei all den Menschen in meinem Umfeld, die mir in meiner Studienzeit zur Seite gestanden sind.

Last but not least, DANKE an meine Freunde, dafür, dass sie immer für mich da sind.

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Einer angeborenen Hyperphenylalaninämie kann einerseits ein Mangel an Phenylalaninhydroxylase (typische PKU) oder aber ein Mangel des Ko-Faktors BH4 (atypische PKU) zugrunde liegen. Bislang bestand die Therapie der typischen PKU in einer streng eiweißreduzierten Diät und Supplementierung einer phenylalaninfreien Aminosäuremischung. Die Therapie der atypischen PKU setzt sich zusammen aus einer milden eiweißreduzierten Diät und Substitution von BH4. Die 1999 veröffentlichte Studie von Kure et al. zeigte, dass oral verabreichtes BH4 jedoch auch bei einem Teil der Patienten mit typischer PKU zu einem Absinken der Phenylalaninspiegel führt und eröffnete somit einen neuen Therapieansatz mit dem Ziel der Lockerung der Diät. Für die Auswahl möglicher BH4 Responder erlangte die molekulargenetische Diagnostik des PAH Gens neue klinische Bedeutung, da ein BH4 Response lediglich bei Mutationen mit funktioneller Restaktivität zu erwarten ist. Vor allem Patienten mit hoher Restaktivität der Phenylalaninhydroxylase und einem milden Phänotyp haben eine höhere Wahrscheinlichkeit BH4 Responder zu sein.

**Methode:** Im Rahmen meiner Diplomarbeit entstand diese retrospektive multizentrische Studie. Von einer Kohorte von 102 Patienten aus Wien (37 Patienten), Innsbruck (10 Patienten), Bregenz (1 Patient) und Graz (54 Patienten) wurden die Daten der molekulargenetischen Analyse des PAH Gens ausgewertet. Ziel dieser Diplomarbeit ist es, in der Kohorte von 102 Patienten, mögliche BH4 Responder anhand der vorliegenden Mutationen zu selektieren. Für Informationen über die Mutationen wurden die Datenbanken [www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca) und [www.biopku.org](http://www.biopku.org) als Grundlage genommen. Von insgesamt 60 der 102 Patienten wurden zusätzlich die Phenylalaninwerte nach der Geburt, prä- und postprandiale Werte vor Diätbeginn sowie die Phenylalaninwerte des BH4 loading Tests mittels Fragebogen aus den Einsendezentren Wien und Innsbruck erhoben. Diese Daten wurden zusätzlich herangezogen um die BH4 Responsivität vorherzusagen und um eine Genotyp-Phänotyp Korrelation herzustellen.

**Ergebnisse:** Bei der Kohorte der 102 Patienten wurde diese Selektion nur anhand des Genotyps durch Zusammenschau der vorliegenden Mutationen durchgeführt. In dieser Kohorte wurden 32 Patienten (31%) als Non-Responder selektiert. 69% der 102 Patienten müssen durch einen BH4 Therapieversuch auf ihre BH4

Responsivität hin getestet, wovon 5 Patienten (5%) als sicher BH4 responsiv gelten.

In der Teilkohorte von 60 Patienten sind 4 Patienten (6,5%) BH4 Responder, sie alle haben den mildesten Phänotyp. 20 Patienten (33,5%) sind Non-Responder der BH4 Therapie und 36 Patienten (60%) sind potentielle BH4 Responder, sie müssen einem BH4 Testversuch unterzogen werden.

**Schlussfolgerung:** Basierend auf dem Genotyp des Patienten konnten 31% der Kohorte als Non-Responder selektiert werden. 69% der 102 Patienten müssen einem BH4 Testversuch unterzogen werden, davon sind 5% sichere BH4 Responder. Die Ergebnisse der Teilkohorte von 60 Patienten zeigten eine Übereinstimmung der Genotyp-Phänotyp Korrelation. Alle BH4 Responder haben den mildesten Phänotyp und die Non-Responder einen schweren Phänotyp. Außerdem wurde gezeigt, dass der im Nachhinein ausgewertete BH4 loading Test keine sichere Aussage über die BH4 Responsivität zulässt.

## **Abstract**

**Introduction:** Hyperphenylalaninemia can be caused by a deficit of phenylalaninhydroxylase (PAH) caused by mutations in the PAH gene (typical phenylketonuria) or by a deficit of the PAH co-factor tetrahydrobiopterin (BH4). So far, the only therapy for typical PKU patients is a lifelong low protein diet with additional supplementation of a phenylalanine (Phe) free protein mixture. Patients suffering from atypical BH4 are treated with BH4 and a mild diet. In 1999 the study of Kure et al was published, suggesting that some patients suffering from typical PKU show Phe reduction to oral loading with BH4. Based on that fact a lot of research work has been done. It is suggested that specific mutations with high residual PAH activity lead to BH4 responsive PKU. These mutations go along with a mild phenotype of PKU. Now the genotype has reached new significance in identifying BH4 responsive PKU patients.

**Methods:** In this multicentre retrospective study 102 patients from Vienna (37 patients), Innsbruck (10 patients), Bregenz (1 patient) and Graz (54 patients) were included. We tried to estimate BH4 response by genotype analyses. We used [www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca) and [www.biopku.org](http://www.biopku.org) databases for specific mutation information. From 60 out of 102 patients we additionally evaluated their postpartal Phe data, pre- and postprandial Phe data and BH4 loading test by a questionnaire provided by the local centre. We used this additional information to “predict” BH4 responsiveness and establish genotype-phenotype correlation.

**Results:** In the cohort of 102 patients 5 patients (5%) are detected as responders to oral BH4 therapy based on pure genotype information. The genotype of 32 patients showed two mutations that are not associated with BH4 responsiveness. Those 32 patients (31%) are non-responders. 65 patients (64%) are potential BH4 responders and have to undergo further testing in order to find out whether they are BH4 responders or not. In the sub-cohort of 60 patients 4 patients (6,5%) are responders, they all show the mildest phenotype. 20 patients (33,5%) are non responders and 36 patients (60%) are potential BH4 responders and have to undergo further testing.

**Conclusion:** Based on the genotype it was possible to select 31% of our patients as non-responders. 69% out of 102 patients have to undergo further testing, therefrom 5% are obligatory responders. In the sub-cohort of 60 patients the results on the correlation between genotype and phenotype confirmed that all BH4

responders have the mildest phenotype and all non responders have a severe phenotype. We could show that the postpartal carried out BH4 loading test is not a significant factor to find BH4 responders.

|  |           |
|--|-----------|
| Danksagungen .....   | ii        |
| Zusammenfassung.....   | iii       |
| Abstract .....   | v         |
| Glossar und Abkürzungen.....   | ix        |
| Abbildungsverzeichnis .....  | x         |
| Tabellenverzeichnis .....  | xiii      |
| <b>1 Einleitung .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Ein kurzer Blick in die Geschichte der PKU.....                                  | 1         |
| 1.2 Grundlagen.....  | 2         |
| 1.2.1 ÄTIOLOGIE.....   | 3         |
| 1.2.2 PATHOGENESE .....  | 4         |
| 1.2.3 KLINIK .....   | 5         |
| 1.2.4 DIAGNOSE.....  | 6         |
| 1.2.5 DIFFERENTIALDIAGNOSEN.....   | 8         |
| 1.2.6 KLASSIFIKATION .....   | 9         |
| 1.2.7 EINTEILUNG DER PKU .....   | 10        |
| 1.2.8 THERAPIE.....  | 10        |
| 1.2.8.1 Probleme mit der Diät .....  | 12        |
| 1.3 Neue Aspekte einer bekannten Erkrankung.....                                     | 14        |
| 1.3.1 BEDEUTUNG DER GENETIK .....  | 14        |
| 1.3.2 NEUE THERAPIE MIT BH4 .....  | 18        |
| 1.3.3 BH4 RESPONSIVE MUTATIONEN.....   | 19        |
| 1.3.4 DAS PHENYLALANINHYDROXYLASE SYSTEM UND<br>REGULATION DER BH4 BIOSYNTHESE ..... | 22        |
| 1.3.4.1 Wirkmechanismus von BH4 in der Therapie der BH4 sensitiven PKU .             | 25        |
| 1.3.5 SUCHE NACH BH4 RESPONDERN .....  | 27        |
| 1.3.5.1 Stellenwert der Genetik .....  | 27        |
| 1.3.5.2 BH4 -Testversuch.....  | 29        |
| 1.3.6 LANGZEITERFAHRUNG MIT BH4 .....  | 31        |
| <b>2 Material und Methoden .....</b>   | <b>33</b> |
| 2.1 Design .....   | 33        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.2      | Methodik.....   | 33        |
| 2.3      | Ziel.....   | 34        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse – Resultate.....</b>  | <b>35</b> |
| 3.1      | Auswertung der Patientendaten .....   | 35        |
| 3.1.1    | DATEN DER GESAMTKOHORTE .....   | 35        |
| 3.1.1.1  | Genetik .....   | 35        |
| 3.1.2    | DATEN DER TEILKOHORTE.....  | 38        |
| 3.1.2.1  | Genetik .....   | 38        |
| 3.1.2.2  | Phänotyp.....   | 39        |
| 3.1.2.3  | BH4 loading Test.....   | 40        |
| 3.2      | Einteilung zur Vorhersage der BH4 Response.....                             | 41        |
| 3.2.1    | VORHERSAGE DER BH4 RESPONSE IN DER GESAMTKOHORTE. ....                      | 42        |
| 3.2.2    | VORHERSAGE DER BH4 RESPONSE IN DER TEILKOHORTE.....                         | 44        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>  | <b>51</b> |
| 4.1      | Prävalenz der Mutationen im europäischen und internationalen Vergleich..... | 51        |
| 4.2      | Phänotyp-Genotyp Korrelation in der Teilkohorte .....                       | 53        |
| 4.3      | Phänotyp und BH4 Response .....   | 55        |
| 4.4      | Aussagekraft des BH4 loading Tests .....                                    | 56        |
| 4.5      | Praktische Durchführung des neuen BH4 Test .....                            | 58        |
|          | Literaturverzeichnis .....  | 59        |

## Glossar und Abkürzungen

PKU : Phenylketonurie

PAH : Phenylalanin hydroxylase

Phe : Phenylalanin

BH4 : Tetrahydrobiopterin

HPA : Hyperphenylalaninämie

mPKU : milde Phenylketonurie

cPKU : klassische Phenylketonurie

TMS : Tandem-Massenspektrometrie

NGS: Neugeborenen -Screening

FIA : Fluoreszenzimmunoassay

US FDA: US Food and Drug Administration

GTP: Guanosin triphosphat

GTPCH: Guanosin triphosphat cyclohydrolase I

GFRP : GTP cyclohydrolase I feedback Regulations Protein

PTPS: 6-Pyruvoyl-tetrahydropterin Synthase

SR : Sepiapterin reductase

PCD : Pterin-4a-dehydrates

DHPR : Dihydropterine reductase

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Phenylalanin wird durch das Enzym Phenylalaninhydroxylase (PAH) zu Tyrosin verstoffwechselt. Tetrahydrobiopterin (BH4) dient als Ko-Faktor dieses Prozesses. Quelle : Ertan Mayatepek;, Pädiatrie, Urban und Fischer 1. Auflage, Seite 209. (1).....2
- Abbildung 2: Tyrosin als Ausgangspunkt für weitere Synthese von Neurotransmittern und Melanin. Quelle: Ertan Mayatepek;, Pädiatrie, Urban und Fischer 1. Auflage, Seite 209. (1).....2
- Abbildung 3: Autosomal rezessiver Erbgang. Quelle:de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/108038 . (30).....3
- Abbildung 4: Strukturmodell von Monomer (links) und Tetramer PAH (rechts). Quelle: N.Blau. “ PKU und BH4. Advances in Phenylketonurie and Tetrahydrobiopterin”, 1. Auflage 2006 , Seite 70. (15).....4
- Abbildung 5: Abweichungen der Phe Zielblutwerte, nach Alter sortiert. Quelle: Kuvan® Heft 2008, “Help your patients take a bite out of life”, product monograph first edition, November 2008.(19) (20).....13
- Abbildung 6: Häufige PAH Mutationen in Europa. Gezeigt wird die regionale Verteilung mit möglicher Herkunft und Migration dieser Mutationen. R408W-H1 und H2 bezieht sich auf den Haplotypen 1 und 2. Diese beiden Haplotypen sind in 2 ganz unterschiedlichen Gebieten häufig. Auf diese genaue Differenzierung wird im Rest der Arbeit nicht eingegangen. Quelle: J. Zschocke (2003) „Phenylketonuria Mutations in Europe“. J Human Mutation (2003) 21:345-356. (27).....17
- Abbildung 7: Mutationen die bei BH4 sensitiver HPA/ PKU gefunden wurden. Quelle : <http://www.biopku.org>. (13).....19
- Abbildung 8: Lage der Mutationen im PAH Enzym. Quelle: [www.biopku.org](http://www.biopku.org). (13).....20
- Abbildung 9: Restaktivität der Mutationen. Quelle: [www.biopku.org](http://www.biopku.org).(13).....21
- Abbildung 10 : Hydroxylierung von L-Phe zu L-Tyr mit BH4 als Ko-Faktor. Quelle: N.Blau. “ PKU und BH4. Advances in Phenylketonurie and Tetrahydrobiopterin”, 1. Auflage 2006 , Seite 68. (15).....22

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 11: Regeneration von BH4 durch PCD und DHPR. Quelle: B. Thöny, G.Auerbach, N.Blau (2000). "Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and function". Biochem. J (2000) 347, 1-16. (18).....  | 23 |
| Abbildung 12 : Regulation der BH4 Biosynthese und PAH Stoffwechsels. Quelle: Blau, N. and H. Erlandsen (2004). "The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency." Mol Genet Metab: 82:101-111. (17).....  | 24 |
| Abbildung 13: Empfehlungen für die Durchführung eines BH4 Testversuchs bzw für die Einführung einer BH4 Therapie. Quelle: Blau N, Bélanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, Trefz FK, van Spronsen FJ (2009). Optimizing the use of sapropterin (BH(4)) in the management of phenylketonuria. J Mol Genet Metab. 2009 Apr;96(4):158-63. Epub 2009 Feb 8. Review . (25)..... | 30 |
| Abbildung 14: Genotyp, BH4 Response und Phe Toleranz bei Patienten mit BH4 Langzeittherapie (10mg/kgKG). Quelle: Burlina, N. Blau (2009). "Effect of BH4 supplementation on phenylalanine tolerance". J Inher. Metab. Dis. (2009) 32:40-45. (24).....  | 32 |
| Abbildung 15: Mutationsverteilung in der Kohorte von 102 Patienten in absoluten Zahlen.....  | 36 |
| Abbildung 16: Mutationsverteilung in der Kohorte von 60 Patienten.....   | 38 |
| Abbildung 17 : Phänotypverteilung in der Teilkohorte von 60 Patienten.....   | 39 |
| Abbildung 18: BH4 Testergebnisse in der Kohorte von 60 Patienten graphisch dargestellt. ....   | 40 |
| Abbildung 19: Einteilung in Gruppen zur Vorhersage der BH4 Response in der Kohorte von 102 Patienten.....  | 42 |
| Abbildung 20: Einteilung in Gruppen zur Vorhersage der BH4 Response in der Kohorte von 60 Patienten.....   | 44 |
| Abbildung 21: Klassifizierung in Gruppen in der Kohorte von 60 Patienten mit Darstellung der Phänotyp-Verteilung.....  | 47 |
| Abbildung 22: Klassifizierung in Gruppen in der Kohorte von 60 Patienten mit Darstellung der BH4 loading Test Ergebnisse.....  | 47 |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 23 : Gruppe 1, Anzahl und Phänotyp der Patienten die einen Phe Abfall über 30% im BH4 loading Test gezeigt haben ..... | 48 |
| Abbildung 24: Gruppe 2a, Anzahl und Phänotyp der Patienten die einen Phe Abfall über 30% im BH4 loading Test gezeigt haben.....  | 48 |
| Abbildung 25: Gruppe 3, Anzahl und Phänotyp der Patienten die einen Phe Abfall über 30% im BH4 loading Test gezeigt haben.....   | 48 |
| Abbildung 26: Gruppe 4, Anzahl und Phänotyp der Patienten die einen Phe Abfall über 30% im BH4 loading Test gezeigt haben.....   | 48 |

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Österreichisches Neugeborenen Screening, Untersuchungsprogramm seit 2002. Quelle: <a href="http://www.dgkj.de/132.html">http://www.dgkj.de/132.html</a> . (9).....                           | 7  |
| Tabelle 2: Österreichisches Neugeborenen-Screening: Erfasste Erkrankungen & Ergebnisse 1966-2000. Quelle: <a href="http://www.dgkj.de/132.html">http://www.dgkj.de/132.html</a> . (9).....              | 8  |
| Tabelle 3: PKU Phänotyp Einteilung nach Phe Blutspiegeln . ....   | 10 |
| Tabelle 4: Therapiezielwerte bei PKU Patienten, abhängig vom Alter. (3) (4).....  | 12 |
| Tabelle 5: Mutations-Typ nach Häufigkeit sortiert in absoluten Zahlen, graphisch dargestellt und in Prozent angegeben. Quelle: <a href="http://www.pahdb.mcgill.ca">www.pahdb.mcgill.ca</a> . (12)..... | 15 |
| Tabelle 6: Häufigkeit der Mutationen auf 3200 untersuchten Allelen in absoluten Zahlen und in Prozent angegeben. Quelle: <a href="http://www.pahdb.mcgill.ca">www.pahdb.mcgill.ca</a> . (12).....       | 15 |
| Tabelle 7: Genotyp-Phänotyp-Korrelationen. Häufige PAH Mutationen und der dazugehörige Phänotyp. (15) .....   | 27 |
| Tabelle 8: Mutationen mit bekannter Restaktivität und Häufigkeit in unserer Kohorte in Prozent.....   | 37 |
| Tabelle 9: Einteilung in Gruppen zur Vorhersage der BH4 Response.....   | 41 |
| Tabelle 10: Aufschlüsselung der Einteilung der Patienten in der Gruppe 2. ....  | 45 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Ein kurzer Blick in die Geschichte der PKU

1934 beschreibt Dr. A. Fölling erstmals die PKU als selbstständiges Krankheitsbild. Er erkannte den Kausalzusammenhang zwischen Hirnschädigungen und erhöhten Konzentrationen der Phenylbrenztraubensäure im Harn. Nach Zugabe von Eisen III Chlorid zum Harn von seinen Patienten, färbte sich der Harn für kurze Zeit grün. Fölling identifizierte sie als Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure (Fölling Probe). Er weist auch bereits auf die genetische Ursache der Erkrankung hin. Fölling ging davon aus, dass die Aminosäure Phenylalanin zu Phenylbrenztraubensäure abgebaut wird. (8)

Erst 1944 gelang es Bernheim nachzuweisen, dass Phenylalanin hauptsächlich zu Tyrosin abgebaut wird. Udenfried und Cooper wiesen 1952 das Enzymsystem in der Leber nach, welches die Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin ermöglicht. 1953 beschrieb G.A. Jervis das Fehlen der Phenylalaninhydroxylase als biochemische Ursache der PKU. (8)

1953 erkannte Horst Bickel, dass das Fortschreiten bzw die Entstehung der Krankheitssymptome mit Hilfe einer eiweißarmen Diät verhindert werden kann. (8)

Dr. Robert Guthrie entwickelte 1963 einen nach ihm benannten Test (Guthrie Test), in dem Bakterien, die auf Phenylalanin angewiesen sind, durch ihr Wachstum die erhöhte Anwesenheit dieser Aminosäure in einer Blutprobe anzeigen. Guthrie schuf so die Grundlagen für ein Massenscreening auf PKU auf der Basis der Phenylalanin Bestimmung im, auf Filterpapier getrockneten, Vollblut. (8)

## 1.2 Grundlagen

Phenylalanin ist eine aromatische Aminosäure und zählt zu den essentiellen Aminosäuren. Essentielle Aminosäuren können, im Gegensatz zu nichtessentiellen Aminosäuren, nicht ausreichend vom Körper synthetisiert werden. Sie müssen dem Körper über die Nahrung zugeführt werden. Phenylalanin wird in Leber mit Hilfe des Enzyms Phenylalaninhydroxylase zu Tyrosin hydroxyliert. (Abb 1) Im Zentralnervensystem ist Tyrosin Ausgangspunkt für die Biosynthese von Katecholaminen, Dopamin, Thyroxin, sowie Melanin. (Abb 2). (1) (7)

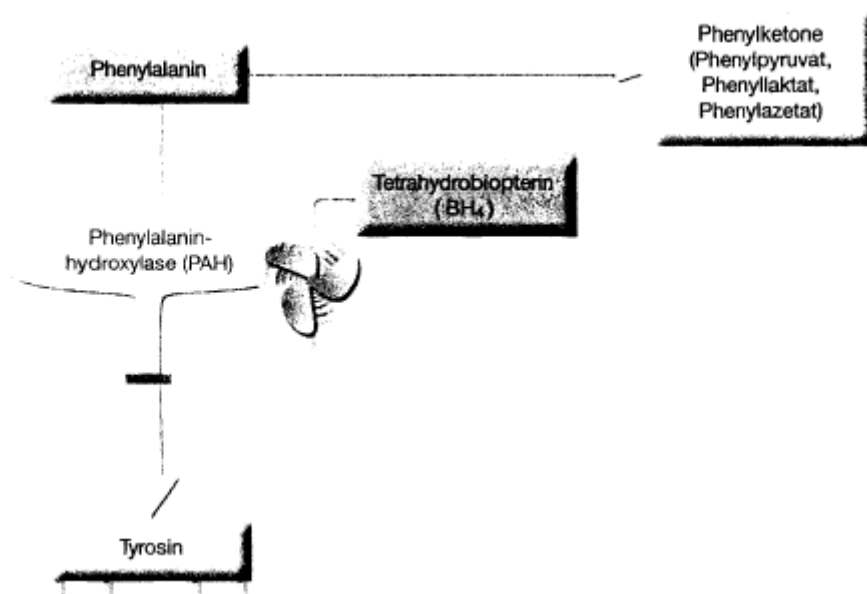


Abbildung 1: Phenylalanin wird durch das Enzym Phenylalaninhydroxylase (PAH) zu Tyrosin verstoffwechselt. Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) dient als Ko-Faktor dieses Prozesses. (1)

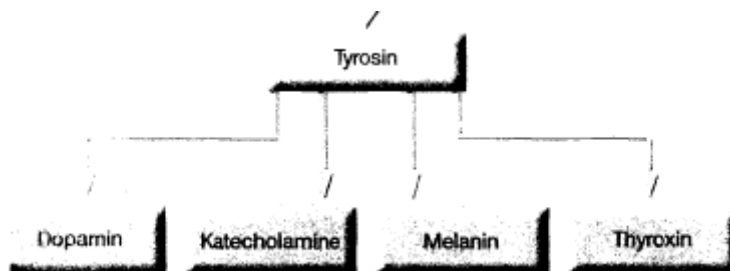


Abbildung 2: Tyrosin als Ausgangspunkt für weitere Synthese von Neurotransmittern und Melanin (1)

## 1.2.1 ÄTIOLOGIE

Ursache von angeborenen Störungen des Aminosäurestoffwechsels können Aminosäureabbaustörungen als Folge von Enzymdefekten oder Aminosäuretransportstörungen durch Defekte der Transportsysteme in Dünndarm oder Niere sein. (2)

Die Phenylketonurie ist die häufigste Aminosäurestoffwechselstörung mit einer Inzidenz von 1: 6000 bis 1:25000 (2). Es handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Funktionsstörung des Enzyms PAH, das in der Leber exprimiert wird. (2). Die meisten Patienten sind compound heterozygot. Das bedeutet, dass beide Allele des PAH Gens unterschiedliche Mutationen zeigen, die gemeinsam zum Krankheitsbild PKU führen. Die mildere Mutation ist ausschlaggebend für die Klinik (Phänotyp) des Patienten. Trägt ein Patient eine schwere Mutation, die keine Restaktivität des Enzyms zeigt und auf dem zweiten Allel eine mildere Mutation mit Restaktivität, so ist die Restaktivität der milderen Mutation für die Klinik bestimmend.

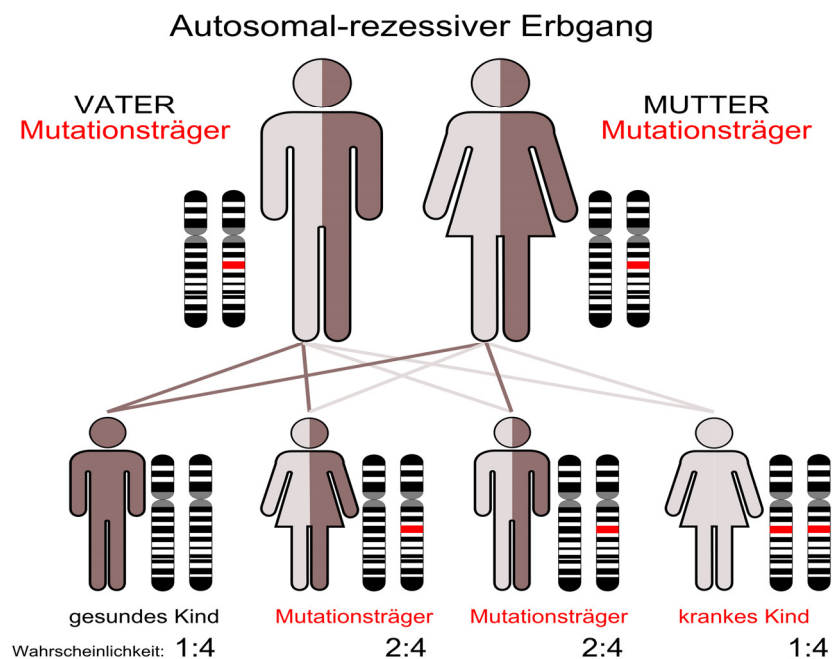


Abbildung 3: Autosomal rezessiver Erbgang. Quelle: [de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/108038](http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/108038) (30)

## 1.2.2 PATHOGENESE

Die Mutation bewirkt eine defekte oder mangelhafte Bildung der PAH in der Leber. Die Phenylalaninhydroxylase ist ein zytosolisches Enzym das sowohl als funktionelles Homotetramer existiert, aber auch als Dimer in Gleichgewicht mit der tetramerschen Form. (15)

Im homotetramerschen PAH Enzym setzt sich jedes Monomer aus drei Bereichen zusammen, der regulatorischen Domäne ( lokalisiert am N-Terminalen Ende), der katalytischen Domäne (beinhaltet die BH4 Bindungsstelle) und der Oligomerisations Domäne auch als Tetramerisationsregion bezeichnet. (15) (17)

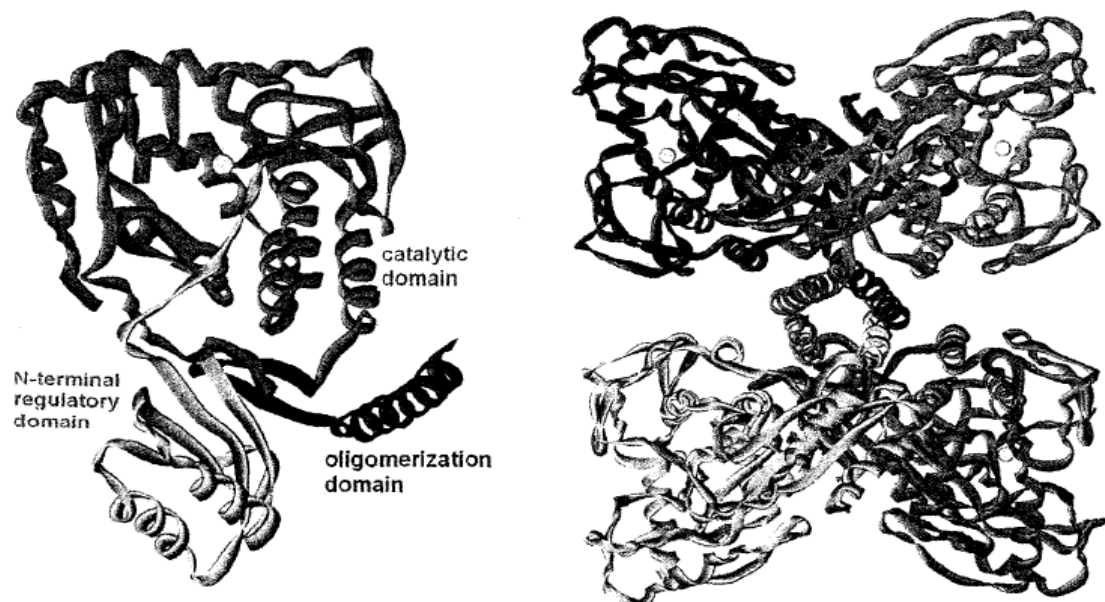


Abbildung 4: Strukturmodell von Monomer (links) und Tetramer PAH (rechts). (15)

Die betroffenen Patienten können die Aminosäure Phenylalanin nicht abbauen und es kommt zu einem Anstieg der Konzentration von Phenylalanin im Plasma. Die alternativen Abbauprodukte Phenylacetat, Phenylpyruvat und Phenyllaktat werden vermehrt ausgeschieden. Hohe Phenylalaninspiegel im Blut verursachen eine Entwicklungsstörung des Gehirns. Alle anderen inneren Organe sind nicht beeinträchtigt. Allerdings ist die Haut der unbehandelten Patienten betroffen. Durch die fehlende Umwandlung von Phe zu Tyr und im Weiteren zu Melanin

haben die Patienten eine gestörte Pigmentbildung und sehr helle, trockene Haut und blaue Augen. (6)

### **1.2.3 KLINIK**

Neugeborene mit PKU sind bei der Geburt klinisch unauffällig. Wird die Krankheit rechtzeitig diagnostiziert und entsprechend behandelt, ist mit einer normalen geistigen Entwicklung zu rechnen (6).

Unbehandelte Patienten zeigen frühestens ab dem 3. Lebensmonat Beeinträchtigungen der Hirnfunktion (6). Ohne Therapie erreichen nur ca. 5% einen IQ von über 70, der Rest entwickelt einen IQ von 35 (Idiotie) bis 50 (Imbezilität). (6)

Neben geistiger Retardierung und Mikrozephalie entwickelt ca. ein Viertel der unbehandelten Patienten eine Epilepsie. Häufig manifestierten sich extrapyramidale Symptome mit gesteigerten Muskeleigenreflexen. Bei hohen Phe Spiegeln kommt es auch zu typischen Verhaltensauffälligkeiten, wie autistisches Verhalten, Hyperaktivität und Aggressivität. Wegen der Hemmung der Bildung von Melanin haben unbehandelte PKU Patienten eine helle, trockene Haut, blaue Augen und blonde Haare. Der mäuseurinartige Geruch des Urins, der insbesondere durch die Phenyllessigsäure verursacht wird, führte vor Einführung des Neugeborenen-Screenings häufig zur Diagnosestellung. (1) (6)

Die Vulnerabilität des Gehirns ist bei Neugeborenen und jungen Säuglingen am größten, daher ist ein möglichst früher Behandlungsbeginn wichtig. In den ersten Jahren, circa bis zum 10. Lebensjahr ist eine strenge Diät notwendig, ganz besonders bis zum 4. Lebensjahr. (3)

Bleibt eine entsprechende Diagnose und Therapie nach der Geburt aus, so kann man bei späterem Therapiebeginn noch eine gewisse Verbesserung der psychischen Entwicklung erreichen. (1)(6)(3)

## 1.2.4 DIAGNOSE

Die Erkrankung wird in der Regel bereits im Rahmen des Neugeborenen-Screenings erkannt. Durch Bestimmung der Aminosäuren Phenylalanin (erhöht) wird die Krankheit diagnostiziert.

Das Neugeborenen-Screening ist ein bundesweites Programm zur Früherkennung von angeborenen, behandelbaren Stoffwechselerkrankungen und endokrinologischen Erkrankungen. (11)

Ein wichtiger Meilenstein für die Entwicklung des Neugeborenen-Screenings war die Entdeckung eines Früherkennungstests für PKU durch Guthrie 1963.

Österreich gehörte zu den ersten Ländern Europas die ein flächendeckendes Untersuchungsprogramm einführen. Bereits 1966 wurde das NGS in Wien eingeführt und nur wenige Jahre später auf ganz Österreich ausgeweitet. Die Universitätsklinik für Kinder und Jugendheilkunde Wien ist die zentrale Untersuchungsstelle, wo auch heute noch alle Proben untersucht werden.

Bis 2002 umfasste das NGS neun Erkrankungen, und zwar Phenylketonurie, Galaktosämie, Hypothyreose, Biotinidase Mangel, adrenogenitales Syndrom und zystische Fibrose. (9)(10)(11)

Im April 2002 konnte das Untersuchungsprogramm dank der Einführung der Tandem-Massenspektrometrie auf 23 Erkrankungen ausgeweitet werden (siehe Tabelle 1). Das NGS wird innerhalb des dritten Lebensstages durchgeführt. Durch eine kapillare Blutabnahme aus der Ferse werden wenige Blutstropfen auf spezielle Testkarten aufgetragen. (9)(10)(11)

Untersuchungsprogramm ab 4 / 2002

| Erkrankung      | Methode |
|-----------------|---------|
| Phenylketonurie | TMS     |

|   |     |
|---|-----|
| Galaktosämie  | ENZ |
| Hypothyreose  | FIA |
| Biotinidasemangel   | COL |
| Cystische Fibrose   | FIA |
| Adrenogenitales Syndrom (=21 Hydroxylase Mangel)                    | FIA |
| Fettsäureoxidationsdefekte: MCAD, LCHAD, VLCAD, CT, CPT-I/II, GA-II | TMS |
| Organoazidopathien: MMA, PA, IVA, GA-I, MCC, HMGL, bKT              | TMS |
| MSUD / Leuzinose  | TMS |
| Tyrosinämie-I   | TMS |
| GAMT  | TMS |

Tabelle 1: Österreichisches Neugeborenen Screening, Untersuchungsprogramm seit 2002.  
Quelle: <http://www.dgkj.de/132.html> (9)

### Österreichisches Neugeborenen-Screening: Erfasste Erkrankungen & Ergebnisse 1966-2000,

| Erkrankung              | getestete Kinder | Diagnosen | Inzidenz  |
|-------------------------|------------------|-----------|-----------|
| Phenylketonurie gesamt: | 2.950.350        | 349       | 1: 8.500  |
| Klassisch               |                  | 261       | 1: 11.000 |
| Mild                    |                  | 85        | 1: 33.000 |
| Atypisch                |                  | 3         |           |

|  |           |     |            |
|--|-----------|-----|------------|
| Galaktosämie gesamt:                               | 2.950.350 | 196 | 1: 15.000  |
| Gal-1-P Uridyltransferasemangel                    |           | 71  | 1: 41.500  |
| Galaktokinase-mangel                               |           | 24  | 1: 123.000 |
| Epimerasemangel                                    |           | 4   | 1: 738.000 |
| Duarte 2-Variante                                  |           | 96  | 1: 31.000  |
| Biotinidase-Mangel                                 | 1.322.636 | 29  | 1: 46.000  |
| Hypothyreose                                       | 2.013.835 | 480 | 1: 4.200   |
| Zystische Fibrose (CF)<br>(11/97-12/00)            | 255.966   | 73  | 1: 3.500   |
| Adrenogenitales Syndrom<br>(AGS) (4/2001-11/2001)* | 70.735    | 4   | 1: 17.600  |
| Argininosuccinatlyase-Mangel<br>(ASL) (bis 6/2000) | 2.211.451 | 26  | 1: 85.100  |
| Leuzinose (bis 6/00)                               | 1.592.463 | 2   | 1: 796.000 |
| Homozystinurie (bis 1992)                          | 945.816   | 2   | 1: 473.000 |
| Histidinämie (bis 1987)                            | 1.500.000 | 137 | 1: 11.000  |

Tabelle 2: Österreichisches Neugeborenen-Screening: Erfasste Erkrankungen & Ergebnisse 1966-2000. Quelle: <http://www.dgkj.de/132.html>. (9)

Das Adrenogenitale Syndrom wird erst seit 4/2001 im österr. Neugeborenen-Screening erfasst.

### 1.2.5 DIFFERENTIALDIAGNOSEN

Erhöhte Phenylalaninwerte im Blut können verschiedene Ursachen haben.

Zu den primären Phenylalaninerhöhungen gehören Defekte der Phenylalaninhydroxylase oder Defekte der Biosynthese oder Regeneration von BH<sub>4</sub>.

Treten im Rahmen von Leber- oder Nierenversagen, Tyrosinämie, Frühgeburtlichkeit oder Zytostatikatherapie erhöhte Phe Werte auf, so spricht man von sekundärer Phenylalaninerhöhung. Auf diese werde ich aber im Weiteren nicht eingehen.

### 1.2.6 KLASSIFIKATION

- Defekte der Phenylalaninhydroxylase = (typische) PKU
  - Ohne BH4 Responsivität
  - Mit BH4 Responsivität
- Defekte der Biosynthese oder Regeneration von BH4 = atypische PKU
- Sekundäre Phenylalaninerhöhung

(1)

Meine Diplomarbeit beschäftigt sich mit der typischen PKU. Davon zu unterscheiden ist die atypische PKU. Bei der atypischen PKU handelt es sich nicht um einen Defekt der Phenylalaninhydroxylase, sondern um einen Defekt des Ko-Faktors, des Tetrahydrobiopterins (BH4). Kinder mit atypischer PKU haben, wie die Kinder mit typischer PKU, hohe Phenylalaninwerte im Blut und fallen daher beim Neugeborenen-Screening auf. Zu diesem Zeitpunkt kann man noch nicht sagen, ob es sich um eine typische oder um eine atypische PKU handelt. Daher wird jeder Säugling an einem Stoffwechsellabor einem so genannten BH4 loading Test unterzogen. Dabei wird am ersten Tag ein Phe Tagesprofil unter Normalkost erstellt und das Pterinmuster im Harn untersucht. Am zweiten Tag wird dem Säugling in der Früh Blut abgenommen, um den Phe Wert zu bestimmen. Danach werden dem Säugling 20mg/kg/KG BH4 oral gegeben. Nach der Gabe von BH4 wird nach 4h, 8h und 24 Stunden jeweils Blut abgenommen und die Phe Werte werden bestimmt.

Bei der atypischen PKU, wo der Ko-Faktor BH4 nicht synthetisiert werden kann, fallen die Phe Werte innerhalb dieser Testzeit schnell auf Normalwerte ab, da der fehlende Ko-Faktor oral substituiert wurde. Außerdem findet sich bei der atypischen PKU ein abnormes Pterinmuster im Urin. Für diese Patienten ist das oral verabreichte BH4 nicht nur die Diagnosesicherung, sondern auch Bestandteil der Dauertherapie. Patienten mit atypischer PKU brauchen nur eine sehr milde lebenslange Diät, ihnen wird jedoch lebenslang BH4 substituiert.

### 1.2.7 EINTEILUNG DER PKU

Entsprechend der Plasmaphenylalaninspiegel, die das Ausmaß der Störung und den Grad der Enzymrestaktivität der PAH widerspiegeln, werden drei klinische Manifestationen, man spricht vom Phänotyp des Patienten, unterschieden. Die Einteilung wird postpartal aufgrund der Plasmaphenylalaninspiegel vor Diätbeginn getroffen. Es wird unterteilt in Hyperphenylalaninämie (HPA), dabei liegen die Phe Werte unter 10 mg/dl, milde Phenylketonurie (mPKU), dabei liegen die Phe Werte zwischen 10 bis 20 mg/dl und klassische Phenylketonurie (cPKU) mit Phe Werte über 20 mg/dl.

| Phänotyp | Phe Spiegel   |
|----------|---------------|
| HPA      | Bis 10 mg/dl  |
| mPKU     | 10 -20 mg/dl  |
| cPKU     | Über 20 mg/dl |

Tabelle 3: PKU Phänotyp Einteilung nach Phe Blutspiegeln.

### 1.2.8 THERAPIE

PKU ist eine aus dem heutigen Standpunkt der Medizin nicht heilbare Krankheit. Die einzige Therapie ist eine lebenslange phenylalaninarme Diät, die so früh als möglich begonnen werden muss. Wie bereits im Kapitel Klinik erwähnt, muss die Diät bis zum 10. Lebensjahr besonders genau eingehalten werden.

Neugeborene mit Phenylalaninblutwerten von über 10 mg/dl gelten als sicher behandlungsbedürftig und es muss sofort mit der Einleitung der Diät begonnen werden. Eine milde Hyperphenylalaninämie mit Spiegeln unter 10mg/dl bei normaler Ernährung ist nicht therapiebedürftig. (3)(6)

Das Therapieprinzip lautet „*So wenig Phenylalanin wie möglich, soviel Phe wie notwendig!*“. Therapieziel ist es, die Phenylalaninkonzentration im Blut in einem angestrebten therapeutischen Bereich zu halten, der eine normale Hirnentwicklung erlaubt. Da Phenylalanin eine essentielle Aminosäure ist, muss eine gewisse Menge Phe immer über die Nahrung zugeführt werden, die der Körper zur Proteinsynthese braucht. Die meisten Lebensmittel enthalten jedoch weitaus mehr Phe als PKU Patienten zu sich nehmen dürfen. Dadurch müssen PKU Patienten auf proteinreiche Nahrungsmittel, wie Fleisch, Fisch, Milchprodukte, Hülsenfrüchte verzichten. Zur Berechnung der täglichen Phe Zufuhr stehen spezielle Tabellen mit Phe Angaben vieler Nahrungsmittel zur Verfügung (6). Um einen Mangel an anderen (essentiellen) Aminosäuren zu vermeiden, wird die vegane Diät durch künstliche Eiweißersatzpräparate ergänzt. Diese Präparate enthalten kein Phenylalanin und sind mit Spurenelementen und Vitaminen angereichert. Grundnahrungsmittel wie Brot und Teigwaren werden aus speziellen eiweißarmen Mehlen hergestellt. (1)(6)(14)

Der individuelle Bedarf an Phe muss für jeden Patienten individuell ermittelt werden und hängt unter anderem vom Alter ab. Unter Phe Toleranz versteht man die Menge Phe, die die Patienten täglich zu sich nehmen können, sich aber trotzdem noch innerhalb der angestrebten Zielwerte befinden. Die Phe Toleranz hängt vom Alter, dem Genotyp bzw der Restaktivität der PAH und vom gesamten Ernährungsverhalten des Patienten ab. *Kinder haben ca 10-20 mg/kgKG/d, Säuglinge können sogar bis zu 50 mg/kgKG/d Phe Toleranz haben.* Dies sind nur Richtwerte, die individuelle Toleranz kann bei einem Patienten deutlich unter oder über diesen Werten liegen. (1)(6)(14)

Das Etablieren und Führen dieser Diät ist sehr komplex, da die Diät ständig den sich ändernden Bedürfnissen der wachsenden Kinder angepasst werden muss. Die Schulung und Betreuung der Eltern ist ein sehr wichtiger Teil der Therapie. Diese Betreuung findet einerseits durch den Arzt statt, aber besonders für die diätetische Therapie sind umfangreiche Gespräche mit DiätassistentInnen notwendig. Da die Diät nach den Phenylalaninblutwerten gesteuert wird, sind regelmäßige Kontrollen des Phe Blutspiegels für eine optimale Therapie unumgänglich. Während der Einstellungsphase der Diät finden diese Kontrollen mehrmals monatlich statt. Nach Etablierung der Therapie müssen die Werte im Säuglingsalter einmal wöchentlich kontrolliert werden, danach werden die

Kontrollintervalle je nach Compliance und Erfolg der Diät gestreckt. Die Kapillarblutabnahme kann selbstständig durch die Eltern erfolgen und dann an das behandelnde Zentrum geschickt werden. (1)(6)(14)

Therapiezielwerte bei PKU Patienten (3)(4)

|                        |              |
|------------------------|--------------|
| Bis zum 10. Lebensjahr | 2 - 4 mg/dl  |
| Ab 11. -Lebensjahr     | 2 - 15 mg/dl |
| > 16 Jahre             | 2 - 20 mg/dl |

Tabelle 4. Therapiezielwerte bei PKU Patienten, abhängig vom Alter. (3) (4)

### 1.2.8.1 Probleme mit der Diät

Die Einhaltung dieser Phe-bilanzierten Diät ist eine große Herausforderung und auch Belastung für den Patienten und seine Familie. Die PKU Diät ist eine der strengsten Diäten mit sehr eingeschränkten Möglichkeiten. Nur wenige natürliche Lebensmittel dürfen von Patienten gegessen werden, Phe freie Aminosäuremischungen haben einen Eigengeschmack und werden von den Kindern oft abgelehnt, speziell zubereitete Niedrig-Protein-Produkte sind meist trocken und fest. (15)

Im Kleinkind bzw Kindesalter müssen die Eltern in der Lage sein, die Diät ihres Kindes zu steuern. Spezielle Lebensmittel und Zubereitung der Mahlzeiten, Nährwerttabellen, genaues Abwiegen der Mahlzeiten und Berechnen der Phe Zufuhr sind eine Herausforderung, der sich die Eltern jeden Tag stellen müssen (18).

Besonders schwierig wird es, wenn die Kinder älter werden und den Kindergarten oder die Schule besuchen. Die Kinder fühlen sich stigmatisiert und wollen ihre Aminosäuremischungen nicht vor anderen zu sich nehmen. Außerdem sind Lebensmittel, die andere Kinder zur Jause bekommen für diese Kinder tabu, was dazu führt, dass sie sich ausgeschlossen fühlen oder sogar gehänselt werden. (15)

Im Adoleszentenalter sinkt die Compliance meist sehr stark ab. Die Diät wird oft als störend und lebens einschränkend empfunden. Die „Außerhausverpflegung“ nimmt stark zu, Jugendliche wollen wie Gleichaltrige essen gehen können, sie wollen Unabhängigkeit von den Eltern. Es gibt viele Faktoren die dazu führen, dass die Jugendlichen die regelmäßige und disziplinierte Einhaltung der Diät als psychosoziale Belastung sehen (21). Phe Spiegel sind oft außerhalb der angestrebten Zielwerte. Weichen die Zielwerte bei Kindern unter 10 Jahren noch bei 30% der Kinder ab, so befinden sich in der Gruppe der Kinder über 15 Jahren bereits 80% außerhalb der angestrebten Zielwerte. (20)

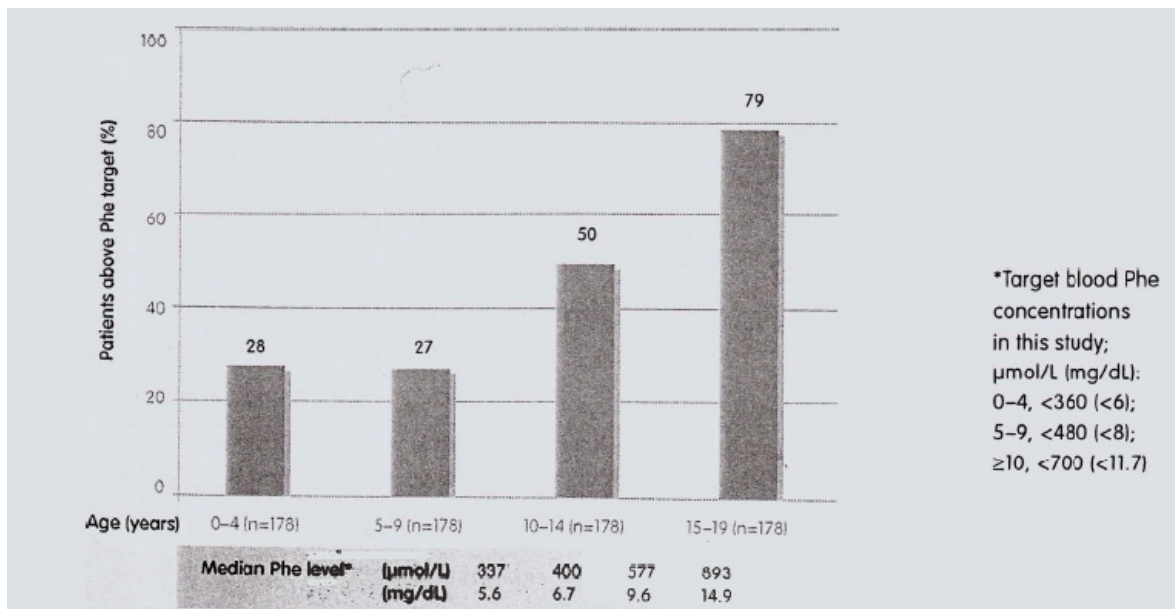


Abbildung 5: Abweichungen der Phe Zielblutwerte, nach Alter sortiert (19) (20)

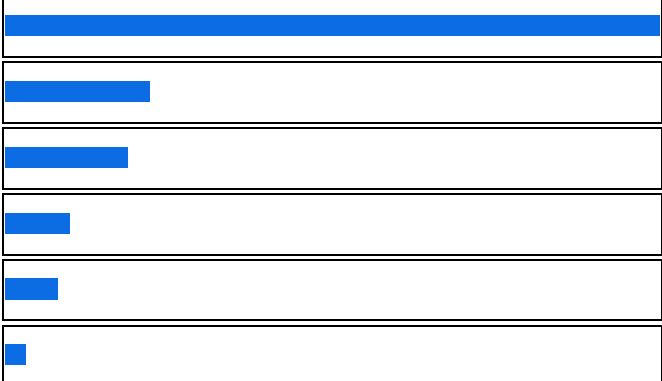
## 1.3 Neue Aspekte einer bekannten Erkrankung

### 1.3.1 BEDEUTUNG DER GENETIK

Die molekulargenetische Auswertung der Mutationen des PAH Gens galt zuerst nur dem akademischen Interesse. Klinische Bedeutung hatte der Genotyp des Patienten zuerst nicht.

In den 1980ern wurde das PAH Gen entschlüsselt und die ersten Mutationen wurden identifiziert. (14) Heute sind über 500 verschiedene Mutationen bekannt. Das Gen ist auf dem Chromosomenabschnitt 12q23 lokalisiert. Das PAH Gen enthält 13 Exons mit einer durchschnittlichen Größe von 170 bp. Die Häufigkeit der einzelnen Mutationen ist sehr unterschiedlich, jedoch regional bzw in ethnischen Gruppen kommen einzelne Mutationen gehäuft vor. Ungefähr 10 Mutationen werden auf 75% der Allele erkrankter Personen gefunden und werden daher als häufige Mutationen bezeichnet. (2) Ca 75% (2) bis zu über 89% (27) der erkrankten Patienten sind compound heterozygot.

Mutationen können alle drei Bereiche, das heißt die regulatorische, die katalytische sowie die Oligomerisations- Dömane, des Enzyms betreffen. Sie führen zu HPA, mPKU oder cPKU. Informationen über Mutationen sind auf der Internetseite <http://www.pahdb.mcgill.ca> (12) erhältlich. Diese internationale Internetplattform bietet immer aktuelle Daten. Wie dort publiziert, handelt es sich bei den meisten Mutationen um missense Mutationen (Tabelle 5).

| Mutation Type | No. | Graph  |        |
|---------------|-----|--|--------|
| Missense      | 327 |  | 61.47% |
| Deletion      | 72  |  | 13.53% |
| Splice        | 61  |  | 11.47% |
| Silent        | 32  |  | 6.02%  |
| Nonsense      | 26  |  | 4.89%  |
| Insertion     | 10  |  | 1.88%  |

|             |                   |  |       |
|-------------|-------------------|--|-------|
| Sil./Splice | 3                 |  | 0.56% |
| Unknown     | 1                 |  | 0.19% |
|             | <b>Total: 532</b> |  |       |

Tabelle 5 :Mutations Typ nach Häufigkeit sortiert in absoluten Zahlen, graphisch dargestellt und in Prozent angegeben. Quelle: www.pahdb.mcgill.ca. (12)

Tabelle 6 zeigt die Häufigkeit einzelner Mutationen. Es sind alle Mutationen aufgelistet, die sich auf mindestens 50 Allelen fanden. Von insgesamt 3200 Allelen, ist die Mutation R408W mit 214 gefundenen Allelen die häufigste. (12)

| Mutation    | Anzahl der gefundenen Allele, graphisch dargestellt | Prozent |
|-------------|---|---------|
| p.R408W     | 214   | 6.69%   |
| IVS10-11G>A | 168   | 5.25%   |
| p.I65T      | 130   | 4.06%   |
| p.R261Q     | 114   | 3.56%   |
| p.P281L     | 93  | 2.91%   |
| IVS12+1G>A  | 91  | 2.84%   |
| p.R158Q     | 87  | 2.72%   |
| p.Q232Q     | 69  | 2.16%   |
| p.E280K     | 69  | 2.16%   |
| p.Y414C     | 68  | 2.12%   |
| p.R252W     | 67  | 2.09%   |
| p.V245V     | 64  | 2.00%   |
| p.L48S      | 63  | 1.97%   |
| p.G272X     | 50  | 1.56%   |
|             | <b>Total: 3200</b>                                  |         |

Tabelle 6: Häufigkeit der Mutationen auf 3200 untersuchten Allelen in absoluten Zahlen und in Prozent angegeben. (12)

In der 2003 veröffentlichten Arbeit von J. Zschocke (27) wird auf die in Europa häufigen PKU Mutationen, deren Verteilung, Herkunft sowie Migration eingegangen (Abbildung 6). In dieser Arbeit, in der 9000 Chromosomen untersucht wurden, spricht er von 29 häufigen Mutationen in Europa. (27) (29) Häufige Mutation bedeutet, dass diese Mutation zumindest auf 3% der untersuchten Allele in zwei Staaten gefunden wurde. Diese Mutationen sind F39L, G46S, L48S, I65T, A104D, R111X, R158Q, W187X, R243X, R252W, R261Q, R261X, G272X, E280K, P281L, IVS7+1G>A, F299C, A300S, L348V, S349P, IVS10+11G>A, c.1089delG, V388M, E390G, A403V, R408W, R408Q, Y414C, IVS12+1G>A. (27)

Es gibt keine einzelne Mutation die in jedem Land in Europa vorkommt. Es kann festgestellt werden, dass bestimmte Mutationen gewissen Regionen zugeordnet werden können, da sie dort eine hohe Prävalenz aufweisen. (27)

Die Häufigkeit der einzelnen Mutationen ist nur für jedes Land bzw Region einzeln angegeben, Zahlen zur Häufigkeit in Europa gesamt sind nicht vorhanden.

Dennoch wird R408 W als die häufigste Mutation in Europa angegeben, mit vermehrter Prävalenz in den Baltischen Staaten und Ost Europa. Weitere sehr häufige Mutationen sind IVS10-11G>A, besonders prävalent in mediterranen Gebieten, dabei im Speziellen in der Türkei. IVS12+1G>A ist in Dänemark und England, Y414 in Skandinavien und I65T in West-Europa häufig. (27)

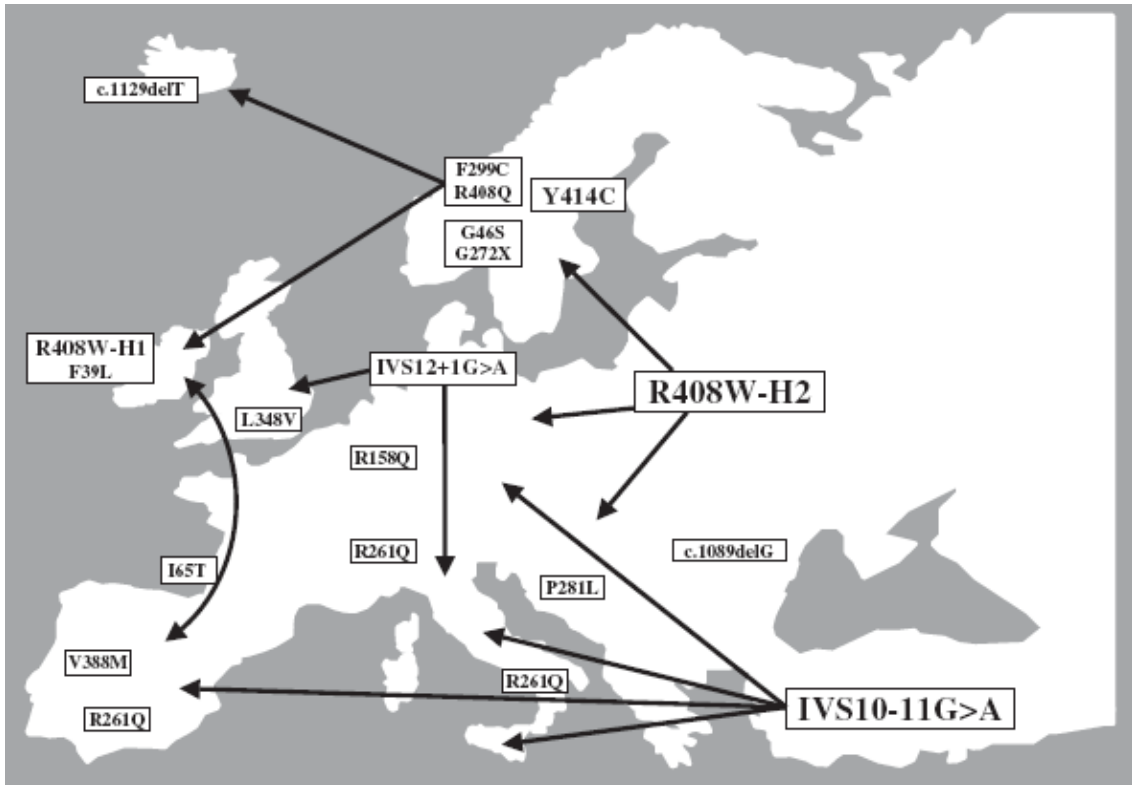


Abbildung 6: Häufige PAH Mutationen in Europa. Gezeigt wird die regionale Verteilung mit möglicher Herkunft und Migration dieser Mutationen. R408W-H1 und H2 bezieht sich auf den Haplotypen 1 und 2. Diese beiden Haplotypen sind in zwei ganz unterschiedlichen Gebieten häufig. Auf diese genaue Differenzierung wird im Rest der Arbeit nicht eingegangen. (27)

### 1.3.2 NEUE THERAPIE MIT BH4

Im Jahre 1999 beobachtete eine japanische Forschergruppe Kure et al. (23) Patienten mit typischer PKU, die bei unveränderter Phe Zufuhr auf Gabe von BH4 mit einem Absinken der Blut Phe Spiegel reagierten. Dies könnte bei einzelnen Patienten zu einer Erhöhung der Phe Toleranz führen und damit zu einer Diätlockerung. Für manche Patienten mit HPA, die ohnehin nur eine lockere Diät halten, könnte BH4 sogar zu einer Aufgabe der Diät führen. Ein BH4 Response von Patienten ist nur bei Mutationen mit funktioneller Restaktivität zu erwarten. Durch diese Beobachtung gewann die molekulargenetische Auswertung neue klinische Bedeutung.

Die Klassifikation der PKU wurde um den Begriff der BH4 responsiven PKU erweitert. Diese Patienten profitieren von einer oralen Therapie mit BH4. Das dazugehörige Medikament heißt Kuvan®. Der aktive pharmazeutische Bestandteil in Kuvan® ist Sapropterin dihydrochloride, eine synthetische Form von BH4. Der systematische chemische Name von Sapropterin dihydrochloride ist (6R)-2-amino-6-[(1R, 2S)-1, 2-dihydroxypropyl]- 5,6,7,8,- tetrahydro-4 (1H)-pteridionone dihydrochloride. (19)

Kuvan® ist in Europa zugelassen für die Behandlung von *HPA* bei Erwachsenen und Kindern ab 4 Jahren mit PKU, die gezeigt haben, dass sie auf BH4 responsiv sind. Außerdem ist das Medikament für die Behandlung der atypischen PKU zugelassen. (19)

Kuvan® kann durch eine Steigerung der PAH Aktivität den Phe Spiegel senken. Somit ist der Benefit dieses Medikaments für die Patienten, dass sie mehr Phe zu sich nehmen können, das heißt ihre Diät wird lockerer. Im besten Fall kann der Patient durch Kuvan® diätfrei leben. (19) Das ist aber nur für Patienten mit HPA, die nur eine leichte Diät halten müssen, zu erwarten.

Ein klinisch relevanter Phe Abfall im Blut unter oraler BH4 Therapie ist bei ca 80% der HPA Patienten, 50% der mPKU Patienten und unter 10% der cPKU Patienten beobachtet worden. Ein Phe Abfall im Blut von mindestens 30% in 24h wird meist als cut-off Wert für ein Ansprechen auf eine orale BH4 Therapie angesehen. (25)

### 1.3.3 BH4 RESPONSIVE MUTATIONEN

Die Abbildung 7 stammt von der Internetseite <http://www.biopku.org> (13). Diese Internetseite ist eine internationale Seite, die Daten von Patienten und Mutationen, die mit BH4 Responsivität verbunden sind, anbietet. Insgesamt wurden Daten von 534 Patienten beschrieben. Die meisten Patienten waren compound heterozygot. In Abbildung 7 sind all die Mutationen markiert, die bei BH4 responsiven Patienten gefunden wurden. Die Tabelle enthält sowohl BH4 responsive, wie auch nicht responsive Mutationen.

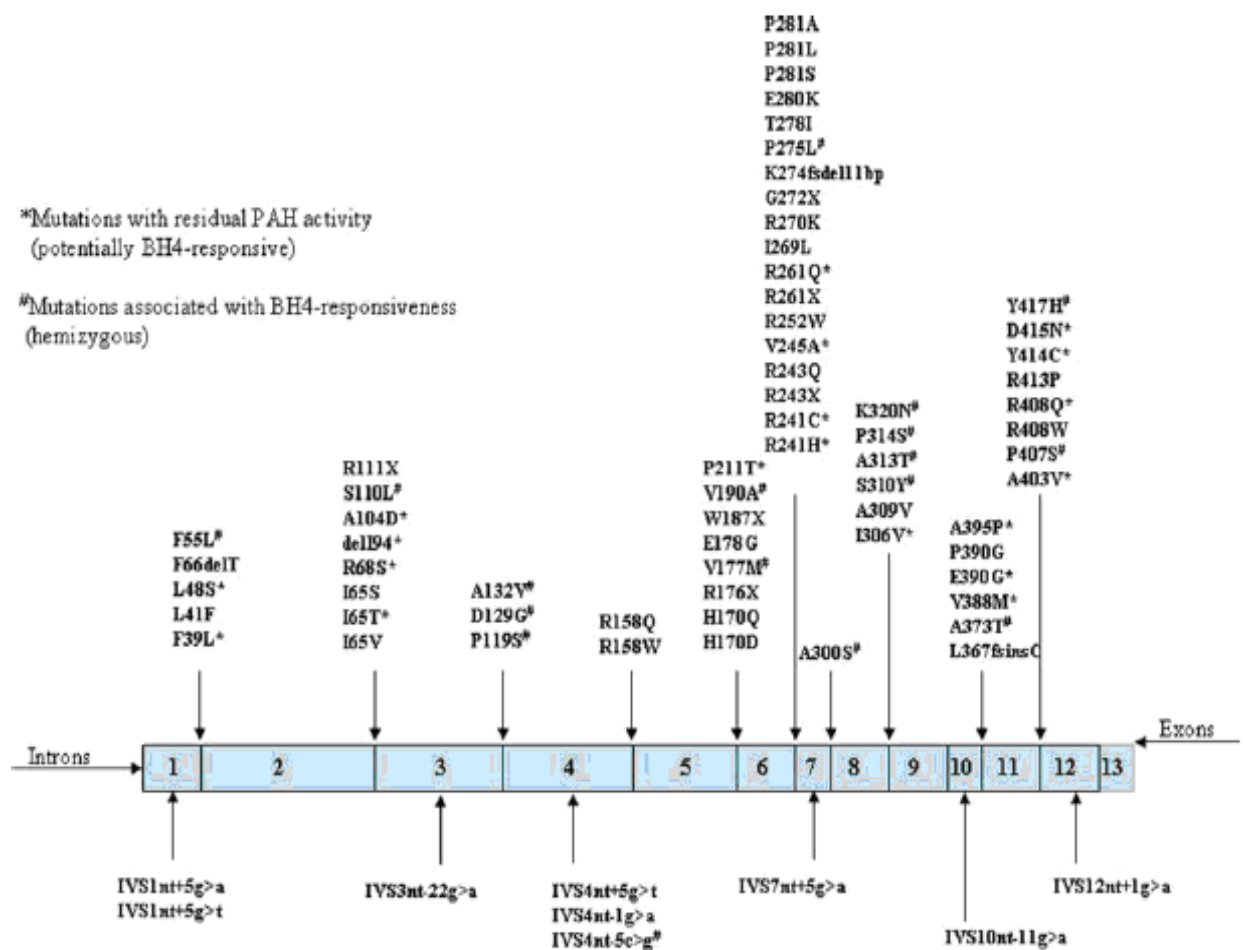


Abbildung 7: Mutationen die bei BH4 sensitiver HPA/ PKU gefunden wurden (<http://www.biopku.org>)

Als sicher BH4 responsiv, hemizygot, gelten die Mutationen F55L, S110L, A132V, D129G, P119S, V190A, V177M, P275L, K320N, P314S, A313T, S310V, A373T, Y417H, P470S und IVS4nt-5c>g.

Als potentiell BH4 responsiv gelten L48S, F39L, A104D, dell94, R68S, I65T, P211T, R261Q, V245A, R241C, R241H, I306V, A396P, E390G, V388M, D415N, Y414C, R408Q und A403V. Diese Mutationen verfügen über PAH Restaktivität. (siehe Abb. 9).

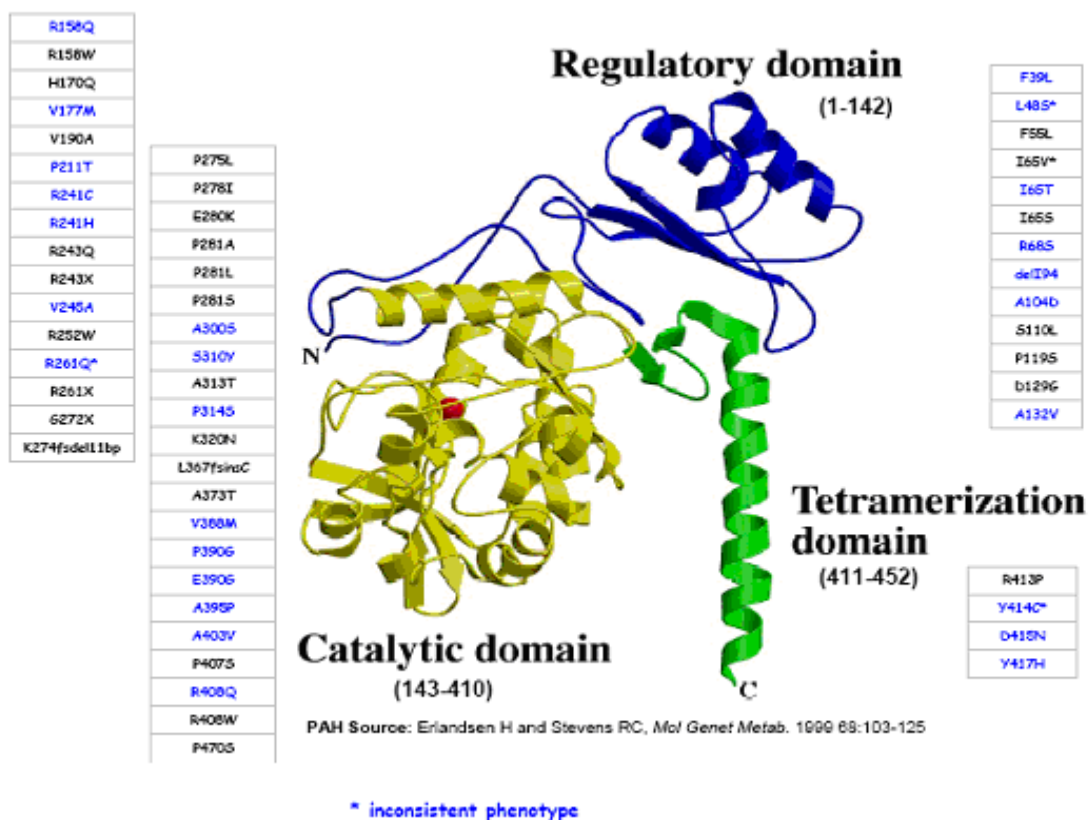


Abbildung 8 : Lage der Mutationen im PAH Enzym (Quelle: www.biopku.org) (13)

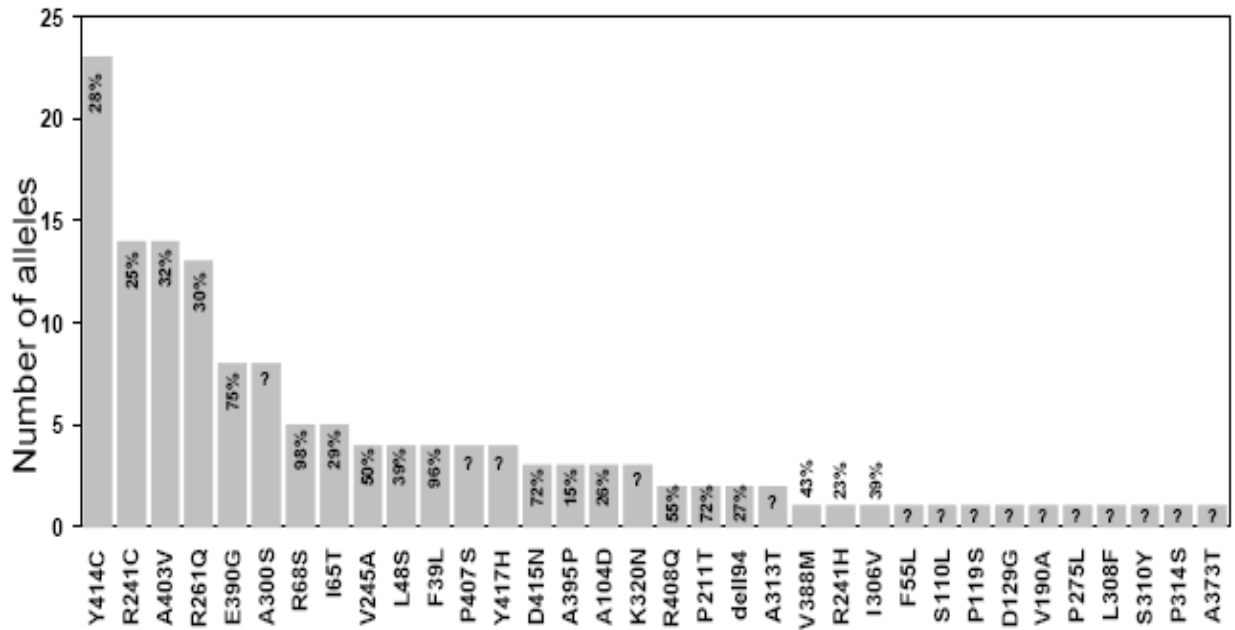


Abbildung 9: Restaktivität der Mutationen. (Quelle: www.biopku.org)

Abbildung 7 wurde als Grundlage für die Einteilung unserer Patienten genommen. Außerdem wurde die Studie von Karacic et al 2009 (16) zugezogen. In dieser Studie wurde die Mutation E390G als sicher responsiv beschrieben. (16)

### 1.3.4 DAS PHENYLALANINHYDROXYLASE SYSTEM UND REGULATION DER BH4 BIOSYNTHESE

Das PAH Enzym ist wie die Tyrosin hydroxylase (TH) und die Tryptophan hydroxylase (TPH) eine aromatische Aminosäurehydroxylase. Diese Enzyme teilen eine hohe Ähnlichkeit in Struktur und Funktion. Sie benötigen für den Prozess der Hydroxylierung ihres entsprechenden Substrates ein Eisenatom sowie ein Tetrahydrobiopterinmolekül als Ko-Faktor. (15) BH4 fungiert sowohl für die PAH, TH, wie auch TPH als natürlicher Ko-Faktor. (18)

PAH mit seinem Ko-Faktor BH4 katalysiert die Umwandlung von L-Phe zu L-Tyrosin. Die PAH Aktivität ist ein vom Substratangebot her regulierter Prozess, der ca 75% der Zufuhr an L-Phe katabolisiert. (15)

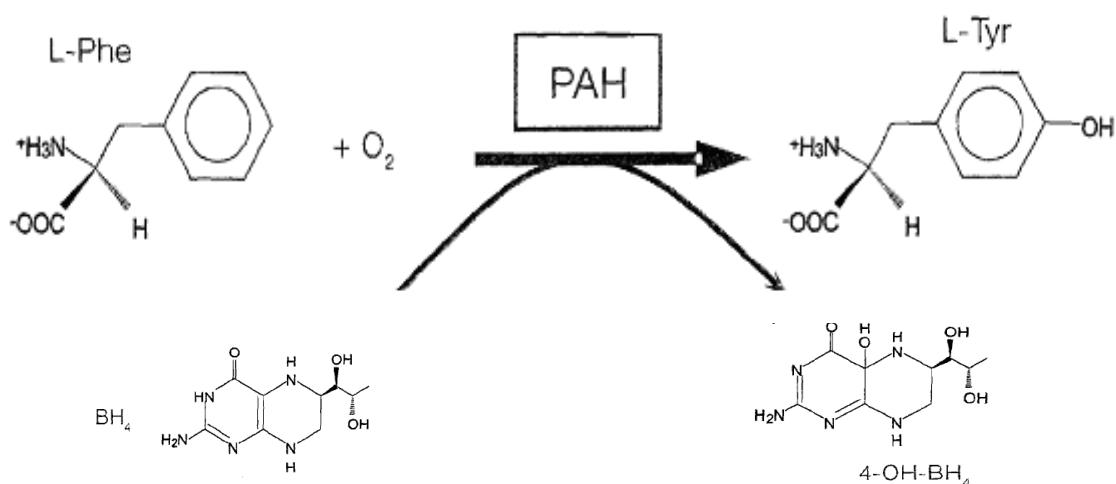


Abbildung 10 : Hydroxylierung von L-Phe zu L-Tyr mit BH4 als Ko-Faktor. (15)

Nach der Hydroxylierung von L-Phe zu L-Tyr wird BH4 wieder reduziert in seine funktionelle Tetrahydro-Form. Diese Regeneration geschieht durch eine gekoppelte Reaktion durch die beiden Enzyme PCD und DHPR. (Abbildung 11) (15) (18)

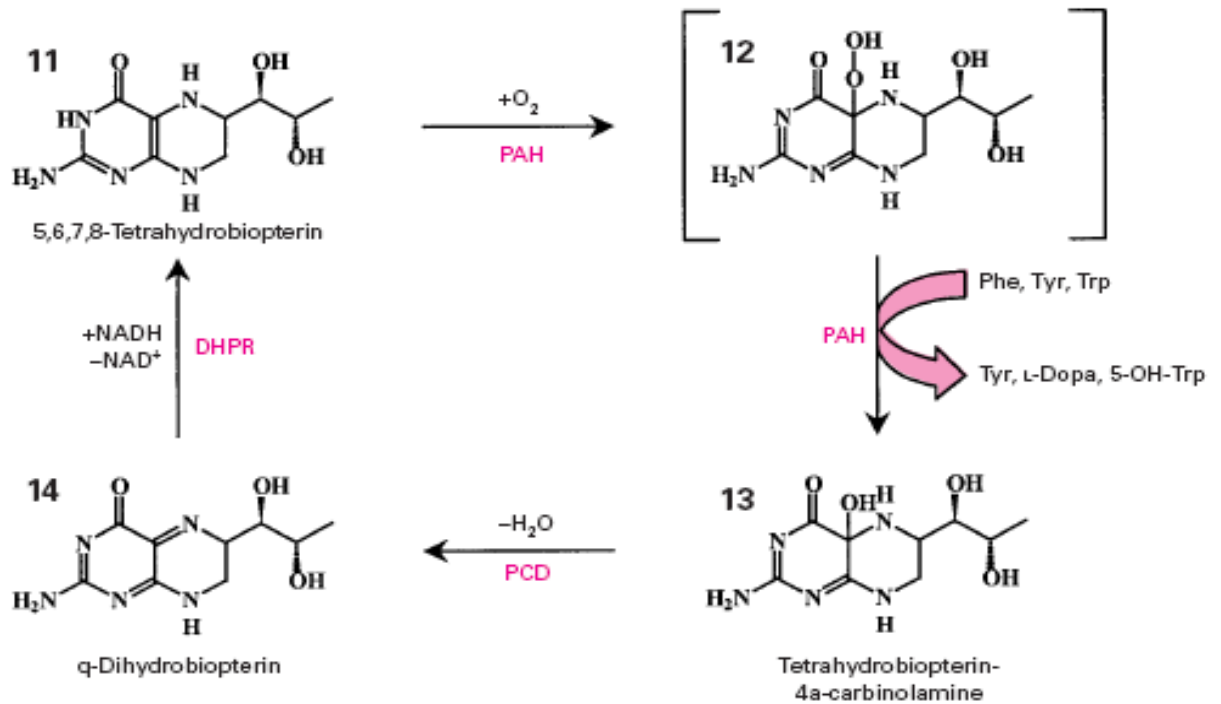


Abbildung 11: Regeneration von BH4 durch PCD und DHPR. (18)

Die intrazelluläre Konzentration von BH4 wird durch Neusynthese von BH4 aufrechterhalten. Dieser Prozess wird durch mehrere Faktoren gesteuert. Die Biosynthese von BH4 wird einerseits durch einen positiven Feedback Mechanismus vom intrazellulären L-Phe Spiegel in der Leber beeinflusst. Andererseits trägt ein negativer Feedback Mechanismus durch BH4 selbst zur Hemmung der Synthese bei. Die GTP Cyclooxygenase 1 ist der Katalysator zur Biosynthese von BH4, über das Protein GFRP. (15) (17)

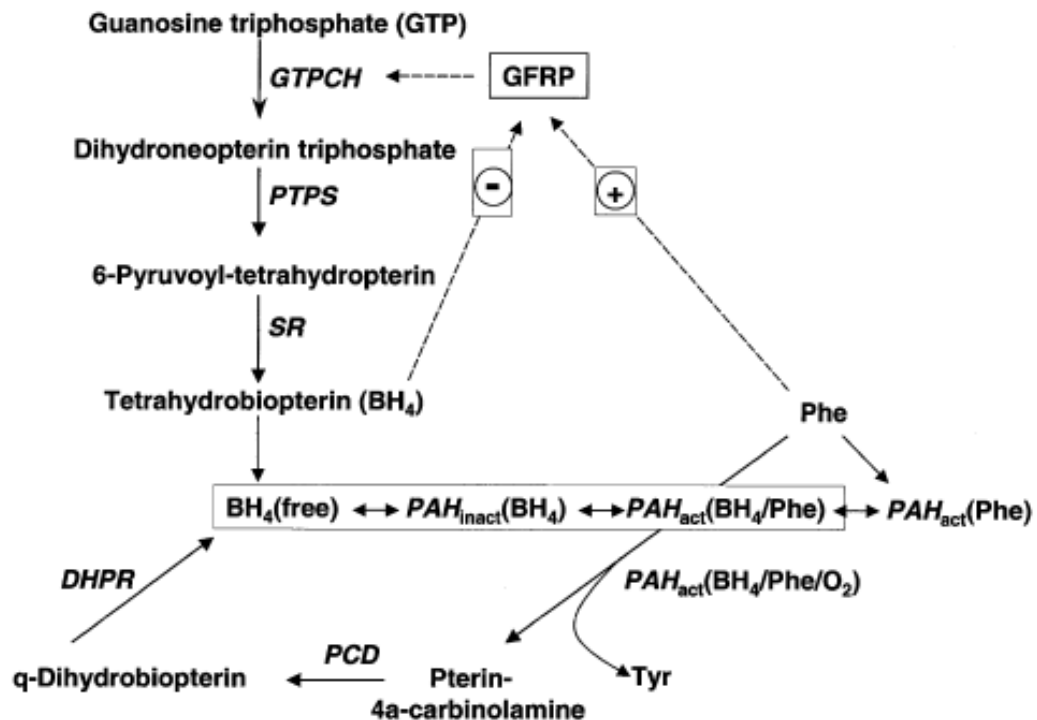


Abbildung 12 : Regulation der BH4 Biosynthese und PAH Stoffwechsels (17)

Es gibt zwei Formen von BH4 in der Leber, das gebundene und das freie BH4. Die metabolische Verfügbarkeit von BH4 hängt davon ab, inwieweit BH4 in einem PAH-BH4 Komplex gebunden ist oder nicht. Die Aktivität von BH4 im Komplex ist viel geringer und auch die Bereitschaft der PAH durch Phe aktiviert zu werden ist viel geringer im PAH-BH4 Komplex. Die Bildung des PAH-BH4-Komplexes führt zu einer Senkung von freiem Enzym und freiem BH4. Die physiologische Rolle dieses Komplexes wird als latente Form der PAH Enzyms gesehen. Das Enzym kann so schnell vom kaum aktivierten Zustand in den aktivierten übergehen, als Antwort auf einen extra und intrazellulären Anstieg von L-Phe. (15) (17)

### **1.3.4.1 Wirkmechanismus von BH4 in der Therapie der BH4 sensitiven PKU**

Basierend auf den neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen werden fünf verschiedene Ursachen der Wirkung von BH4 diskutiert. (17)

#### 1. Km Variante des PAH Enzyms mit verminderter Bindungsaffinität zu BH4

Eine höhere Michaelis Konstante bzw eine geringere Bindungsaffinität des mutanten Enzyms senkt die Rate der enzymatisch katalysierten Reaktion. Erhöhte Konzentrationen des Ko-Faktors aktivieren das mutierte Enzym. (17)

#### 2. Stabilisierung der PAH durch Chaperon Wirkung von BH4

Der mutierte Tetramer/Dimer Komplex unterliegt aufgrund der verminderten Faltung und Oligomerisation einer raschen Elimination durch den Ubiquitin-Pathway . Durch Bildung eines PAH-BH4 Komplexes kann das mutierte Enzym stabilisiert werden und möglicherweise das Fe<sup>\*</sup> Molekül besser in der katalytischen Domäne fixieren. Dadurch fällt der PAH-BH4 Komplex weniger rasch dem Abbau durch das Ubiquitin System anheim. Durch hohe Phenylalaninspiegel wird der PAH-BH4 Komplex aktiviert und steht für den Abbau von Phenylalanin zur Verfügung. (17)

#### 3. Veränderung der Biosynthese von BH4

Üblicherweise führt ein hoher Phenylalaninspiegel zu einer Aktivierung des PAH-BH4 Komplexes und reguliert damit die Konzentration von freiem BH4. Bei mutantem Enzym kann dieser Sensoreffekt verloren gehen, durch exogen zugeführtes BH4 jedoch durch einen „Bypass Effekt“ ausgeglichen werden. (17)

#### 4. Induktion bzw höhere Expression des PAH Enzyms durch BH4

Bei nicht PKU Patienten hat die Gabe von BH4 keine Auswirkung auf die PAH Aktivität bzw den Phe Spiegel im Blut.

Versuche an GTPCH/BH4 defizienten Mäusen (hph-1) mit einem Defekt der TH zeigten einen Anstieg des mRNA Levels der TH nach BH4 Gabe. Ein ähnlicher Effekt fand sich für die PAH. Dies lässt vermuten, dass wild Typ Enzym und mutantes Enzym auf dem mRNA Level einem unterschiedlichen Regulationsmechanismus unterliegen. (17)

#### 5. PAH mRNA Stabilisierung durch BH4

Die Biosynthese von BH4 wird aber nicht nur durch Phenylalanin gesteuert, sondern auch auf transkriptioneller Ebene durch den mRNA Level der involvierten Proteine. L-Phe stimuliert die Biosynthese nicht nur durch die Hemmung des negativen Feedback Mechanismus auf GTPCH, sondern auch durch eine Erhöhung der mRNA Level von GTPCH. Dies führt zu einer direkten Produktionssteigerung des Ko-Faktors. (17)

## 1.3.5 SUCHE NACH BH4 RESPONDERN

### 1.3.5.1 Stellenwert der Genetik

Nach den ersten Berichten von Kure et al 1999 über den Erfolg von BH4 Therapie bei PKU Patienten, folgten viele Berichte über PAH Mutationen, die mit BH4 Response einhergehen. Es handelt sich um Mutationen, die hauptsächlich zu milden Formen der PKU führen, wo das Enzym PAH über Restaktivität verfügt. (15).

| Klass. PKU  | Moderate PKU | Milde PKU | HPA   |
|-------------|--------------|-----------|-------|
| R158Q       | F39L         | G46S      | V230I |
| E280K       | I65T         | R68S      | V245A |
| P281L       | R261Q        | A104D     | A300S |
| IVS10-11G>A | L348V        | E390G     | T380M |
| R408W       | V388M        | R408Q     | A403V |
| IVS12+1G>A  |              | Y414c     | D415N |

Tabelle 7: Genotyp-Phänotyp-Korrelationen. Häufige PAH Mutationen und der assoziierte Phänotyp. (15)

Ob der Phänotyp wirklich immer mit dem Genotyp korreliert ist noch nicht vollständig geklärt. Es existieren einige Berichte, die das Gegenteil zeigen. Eine Erklärung für die fehlende Übereinstimmung von Genotyp und Phänotyp könnte sein, dass unterschiedliche Phänotyp Klassifikationen verwendet wurden. Es gibt keine internationalen Richtlinien zur Phänotyp Bestimmung und Klassifikation. (15) Auch wenn es noch keinen definitiven Beweis gibt, zeigt der Großteil der Literatur jedoch, dass der Genotyp ausschlaggebend für den Phänotyp ist. Dies könnte im klinischen Alltag nicht nur für die Bestimmung der BH4 Sensitivität ausschlaggebend werden, sondern auch bei der Klassifikation bzw Einstellung der Therapie aller PKU Patienten angewendet werden. (15)

BH4 Responsivität für alle PKU Patienten ausschließlich anhand des Genotyps vorherzusagen, ist schwierig, da die meisten Patienten compound heterozygot sind. Es gibt Berichte, dass Patienten mit gleichen Mutationen unterschiedliche Antwort auf BH4 loading Test zeigen (25) und sogar die gleichen Patienten, die den BH4 loading Test wiederholten, andere Ergebnisse haben (26). Diese inter- und intra-individuellen Unterschiede können wir heute noch nicht genau erklären.

Karacic et al (16) publizierte im März 2009 die erste Studie über BH4 Responsivität in einer Kohorte von 39 Patienten mit HPA, in der das einzige Selektionskriterium für den BH4 Test die Genetik des Patienten darstellt. BH4 Responsivität wurde bei Patienten mit mindestens einer potentiell responsiven Mutation mit Restaktivität über 10% vorausgesagt. Nur bei 30% konnte die vorhergesagte BH4 Responsivität dann aber tatsächlich nachgewiesen werden. *Die Anzahl der vorhergesagten BH4 Responsivität stellte sich im Nachhinein als 3mal höher als das tatsächliche Ansprechen heraus.* Das Fazit dieser Studie ist, dass die BH4 Responsivität nicht nur anhand einer Mutation auf einem Allel vorausgesagt werden kann. Es ist wichtig den gesamten Genotyp, also die Mutationen auf beiden Allelen des Patienten zu berücksichtigen. Allerdings wird in dieser Studie auch von einer 100%igen Responsivität von E390G und I306V gesprochen, unabhängig von der Mutation am zweiten Allel. (16)

In der Datenbank [www.biopku.org](http://www.biopku.org) (13) werden auch einige Mutationen als sicher responsiv angegeben, unabhängig von der Mutation am zweiten Allel. Für die meisten Patienten jedoch gilt, dass immer beide Mutationen auf den Allelen gemeinsam betrachtet werden müssen. Es gibt den Begriff des „inconsistent Response“, das bedeutet, dass der tatsächliche Phänotyp einer potentiell BH4 responsiven Mutation, immer von der Mutation am zweiten Allel abhängt. Das wurde bereits des Öfteren für die Mutationen p.L48S, p.I65 T, p.R158Q, p.R261Q, and p.Y414C. beobachtet. (1) (4) (8)

Auf Grund der Genetik ist es zurzeit nicht möglich für alle Patienten eine sichere Vorhersage über den BH4 Response zu treffen. Im Moment können aufgrund des Genotyps Non-Responder bei Vorliegen von zwei null Mutationen bzw Responder bei Vorliegen von sicher responsiven Mutationen identifiziert werden.

Die endgültige Antwort, ob ein Patient auf BH4 anspricht oder nicht, zeigt sich erst im BH4 Testversuch. Aufgrund von weiteren Faktoren, welche die BH4 Responsivität beeinflussen, kann das Ansprechen eines Patienten auf einen oralen BH4 Testversuch nicht vorhergesagt werden. Zu diesen Faktoren gehören zum Beispiel initialer Phe Spiegel, Alter des Patienten, BH4 Pharmakokinetik, die Länge des BH4 Tests, mögliche Stabilisatoren des BH4, sowie Polymorphismen. (8)

Aufgrund der Genetik kann man Non- Responder im Vorfeld ausschließen.

### **1.3.5.2 BH4 -Testversuch**

Um BH4 Responder zu identifizieren und Ergebnisse verschiedener Studien vergleichen zu können ist es wichtig, ein einheitliches Protokoll für einen BH4 Testversuch zu finden. Dieser Test sollte einfach durchzuführen sein, eine hohe Aussagekraft haben und mit wenigen Messungen auskommen. (25)

Abbildung 13 zeigt zwei Algorithmen für einen BH4 Testversuch bzw Einführung zur Therapie mit BH4.

Abbildung 13 A gibt die Empfehlungen der US FDA wieder. Abbildung 13 B wurde von der European working group for phenylketonuria ausgearbeitet. (25)

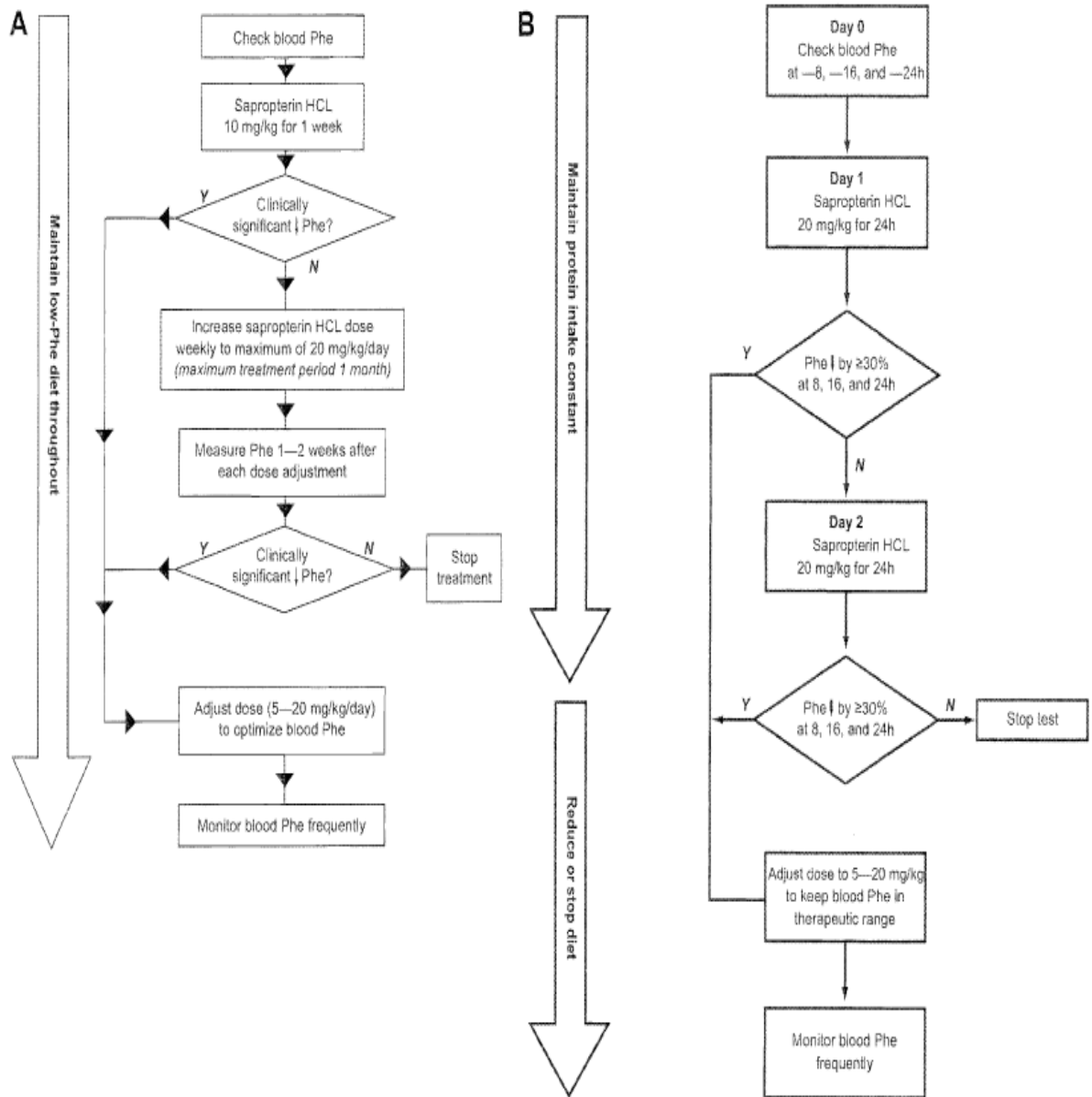


Abbildung 13: Empfehlungen für die Durchführung eines BH4 Testversuchs bzw für die Einführung einer BH4 Therapie.

(A) Empfehlung von der US FDA

(B) Empfehlung der European working group for phenylketonuria

### 1.3.6 LANGZEITERFAHRUNG MIT BH4

Es gibt erst wenig Erfahrung mit der Langzeittherapie von BH4 bei HPA/PKU Patienten. Es wird angenommen, dass bis zu zwei Drittel der Patienten mit leichten Formen der PKU mit BH4 behandelt werden können. Auch schwangere PKU Patientinnen könnten von der neuen Therapie profitieren. Langzeitstudien fehlen aber bis zu diesem Zeitpunkt noch. (15)(17)

Abb.14 fasst Ergebnisse von 12 Patienten zusammen, die seit mindestens 6 Monaten mit BH4 behandelt werden (24). In dieser retrospektiven Studie wurden 30 PKU Patienten aus Italien inkludiert.

11 von diesen 30 Patienten hatten Phe Blutspiegel unter 7 mg/dl und einen positiven BH4 loading Test. Bei diesen Patienten wurde keine Behandlung mit BH4 begonnen. 19 Patienten hatten Phe Blutwerte zwischen 7 mg/dl und 15 mg/dl. 12 dieser 19 Patienten zeigten einen positiven BH4 loading Test. Die Behandlung mit BH4 wurde begonnen. Die Patienten erhielten zweimal täglich 10mg/kgKG BH4. Vor der Therapie lag die Phe Toleranz unter 700 mg/Tag (außer bei Patient Nummer 9). Bei allen Patienten stieg die *Phe Toleranz um das 2 bis 3 fache an*. Die Dauer der Behandlung variiert von 6 Monaten bis 4 Jahren. Die Diät wurde je nach dem aktuellen Plasma Phe Spiegel gelockert. Bei keinem Patienten sind Nebenwirkungen aufgetreten.

| Patient | Age at the start of treatment (years) | Genotype               | Phe before BH <sub>4</sub> test (μmol/L) | Phe reduction after 24 h (%) | Phe tolerance before BH <sub>4</sub> (mg/day) | Phe tolerance on BH <sub>4</sub> (mg/day) | Duration of treatment | Low-Phe diet |
|---------|---------------------------------------|------------------------|--|------------------------------|---|---|-----------------------|--------------|
| 1       | 3                                     | p.P281L<br>IVS3-13T>G  | 561                                      | 37                           | 400   | 1000                                      | 3 years               | Combined*    |
| 2       | 3                                     | p.V245A<br>IVS10-11G>A | 502                                      | 66                           | 650   | 2700                                      | 6 years               | No           |
| 3       | 2                                     | p.A403V<br>IVS12+13T>G | 564                                      | 39                           | 350   | 1400                                      | 3 years               | Combined*    |
| 4       | 10                                    | p.P281L<br>p.A403V     | 490                                      | 73                           | 600   | 2000                                      | 2 years               | No           |
| 5       | 11                                    | p.E390G<br>IVS10-11G>A | 564                                      | 69                           | 350   | 1400                                      | 3 years               | No           |
| 6       | 2                                     | p.V230I<br>p.G272X     | 433                                      | 73                           | 370   | 1600                                      | 6 mo                  | No           |
| 7       | 3                                     | p.P281L<br>p.R408W     | 605                                      | 39                           | 400   | 1000                                      | 3 years               | Combined*    |
| 8       | 2                                     | p.Y414C<br>IVS3-22C>T  | 1215                                     | 37                           | 550   | 800                                       | 2 years               | Combined*    |
| 9       | 9                                     | p.P281L<br>p.R408W     | 684                                      | 74                           | 700   | 2000                                      | 7 years               | No           |
| 10      | 2                                     | p.A403V<br>IVS12+1gG>A | 649                                      | 54                           | 500   | 1200                                      | 5 years               | No           |
| 11      | 16                                    | p.E390G<br>p.R408W     | 961                                      | 45                           | 500   | 1400                                      | 4 years               | No           |
| 12      | 4                                     | p.R408W<br>p.L48S      | 716                                      | 44                           | 350   | 1200                                      | 4 years               | Combined*    |

\*Low-Phe (without amino acid mixture) and BH<sub>4</sub> (10 mg/kg) treatment.

Abbildung 14: Genotyp, BH<sub>4</sub> Response und Phe Toleranz bei Patienten mit BH<sub>4</sub> Langzeittherapie (10mg/kgKG). (24)

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Design:**

Es handelt sich um eine retrospektive multizentrische Studie mit insgesamt 102 Patienten mit typischer PKU, davon 37 Patienten aus Wien, 10 Patienten aus Innsbruck, 1 Patient aus Bregenz und 54 Patienten aus Graz. Von allen Patienten wurden die Daten der molekulargenetischen Auswertung der Mutationen auf dem ersten und zweiten Allel, sowie der vorliegenden Polymorphismen gesammelt. Die molekulargenetische Testung von allen Patienten wurde vom Stoffwechsellabor der Universitätsklinik für Kinder und Jugendheilkunde Graz im Zeitraum von 2004 bis 2008 durchgeführt. Von 60 Patienten konnten zusätzlich die Phe Werte nach der Geburt, die Phe Werte präprandial und postprandial, sowie der Phe loading Test durch einen Fragebogen an das Einsendezentrum Wien und Innsbruck ausgewertet werden.

### **2.2 Methodik:**

Im Zuge eines Forschungsprojekts wurde 2004 im Stoffwechsellabor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz eine Methodik zur molekulargenetischen Charakterisierung von Phenylketonurie Patienten etabliert. Alle Proben der 102 Patienten dieser Studie wurden in Graz untersucht. Primär wurden die Proben mittels Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein von acht prävalenten Mutationen getestet. Dabei handelt es sich um die Mutationen F55fs, IVS2+5G>C, R261Q, IVS10-3C>T, IVS10-11G>A, Y414C, R408W und IVS12+1G>A. In einem nächsten Schritt erfolgt ein Mutations-Screening mittels Schmelzkurvenanalyse in der Real-Time-PCR. Dabei waren pro analysierter DNA-Probe durchschnittlich 2 Exone auffällig, die im Anschluss sequenziert wurden. Die anderen Proben wurden mittels DGGE (denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese) untersucht.

Für die Beschreibung der Mutationen, Responsivität, und Restaktivitätsangaben wurden die Datenbanken <http://www.pahdb.mcgill.ca> und <http://www.biopku.org> zur Hilfe genommen.

### **2.3 Ziel:**

Die bisherige Therapie der PKU bis zu diesem Zeitpunkt besteht aus einer streng eiweißreduzierten Diät und Supplementierung einer phenylalaninfreien Aminosäuremischung. Durch die Gabe von synthetischem BH4 gibt es nun einen neuen Ansatz in der Therapie der typischen PKU für Patienten mit BH4 responsiver PKU. In diesem Zusammenhang hat die molekulargenetische Testung neuen klinischen Stellenwert gewonnen, da ein BH4 Response nur bei Mutationen mit funktioneller Restaktivität zu erwarten ist. Das Ziel der Studie war es, in einer Kohorte von 102 Patienten eine Vorhersage der BH4 Response an Hand des Genotyps zu treffen - einerseits, um eine Priorität für die Testung zu finden und andererseits um Non-Responder im Vorfeld auszuschließen.

## **3 Ergebnisse – Resultate**

### ***3.1 Auswertung der Patientendaten***

#### **3.1.1 DATEN DER GESAMTKOHORTE**

Von einer Kohorte von 102 Patienten aus Wien (37 Patienten), Innsbruck (10 Patienten), Bregenz (1 Patient) und Graz (54 Patienten) wurde die molekulargenetische Testung ausgewertet.

##### **3.1.1.1 Genetik**

Von einer Kohorte von 102 Patienten konnten 202 der 204 Mutationen identifiziert werden. In diesem Kontingent fanden sich 42 verschiedene Mutationen. 25 Patienten sind homozygot. Vier Mutationen finden sich auf knapp der Hälfte der Allele. Es handelt sich um die Mutationen R408W, IVS12+1 G-A., Y414C und R261Q. Die häufigste ist die Mutation R408W auf 20% aller Allele. Die zweithäufigste Mutation ist die Intronmutation IVS12+1 G-A mit 14%. 18 Mutationen wurden jeweils nur auf einem Allel gefunden, das entspricht 9%. Ca 30% aller Mutationen sind Intronmutationen. Bei 27 der 42 gefundenen Mutationen handelt es sich um missense Mutationen, 8 sind splice Mutationen, 3 nonsense Mutationen, 3 frameshift Mutationen, eine Deletion. 2 Mutationen konnten nicht entschlüsselt werden.

Als sicher BH4 responsiv gelten die Mutationen E390G, D129G und A300S. Die Mutation E390G fand sich bei drei Patienten, D129G und A300S jeweils bei einem Patienten compound heterozygot.



|       |     |      |
|-------|-----|------|
| R241C | 25% | 0,5% |
| R158Q | 10% | 3%   |
| R408W | 3%  | 19%  |
| R243X | <1% | 2%   |
| P281L | <1% | 3%   |
| R261X | <1% | 0,5% |

Tabelle 8: Mutationen mit bekannter Restaktivität und Häufigkeit in unserer Kohorte in Prozent.



### 3.1.2.2 Phänotyp

Der Phänotyp wurde anhand der postpartalen Phe Werte eingeteilt. Es wird unterteilt in HPA ( Phe Werte bis 10 mg/dl), milde PKU ( Phe Werte von 10-20 mg/dl) und klassische PKU ( Phe Werte über 20 mg/dl). 12 Patienten haben eine Hyperphenylalaninämie, das entspricht 20% unseres Patientengutes. Der niedrigste Phe Ausgangswert lag bei 3,4 mg/dl .8 Patienten fallen in die Gruppe mPKU, das sind 12%. Beim Hauptanteil der Patienten, 40 Patienten, wurden Phe Werte über 20mg/dl gemessen. Damit zeigen fast 70% der Kohorte die schwerste Ausprägung des Phänotyps, nämlich die klassische PKU.

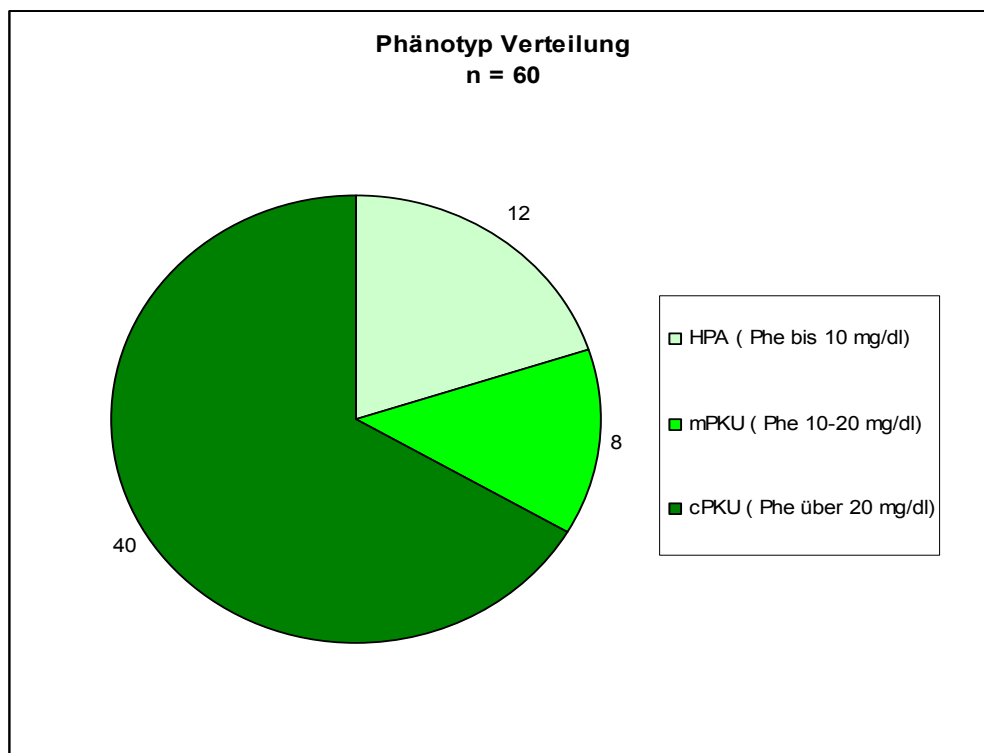


Abbildung 17 : Phänotypverteilung in der Teilkohorte von 60 Patienten.

### 3.1.2.3 BH4 loading Test

Die Ergebnisse des BH4 loading Tests wurden auf den Abfall bzw Anstieg der Phe Werte hin ausgewertet. Dieser Wert wurde für die bessere Vergleichbarkeit in Prozent umgerechnet. Als BH4 responsiv gilt ein Abfall von mindestens 30 %.

32 Patienten zeigten einen Abfall ihrer Phe Werte, davon sank bei 12 von 60 Patienten der Phe Wert über 30 % des Ausgangswertes ab. Der höchste Abfall lag bei 92% bei einem Phe Ausgangswert von 9,9 mg/dl und einem absoluten Abfall von 9,1 mg/dl auf einen Phe Wert von 0,8 mg/dl nach 24 Stunden.

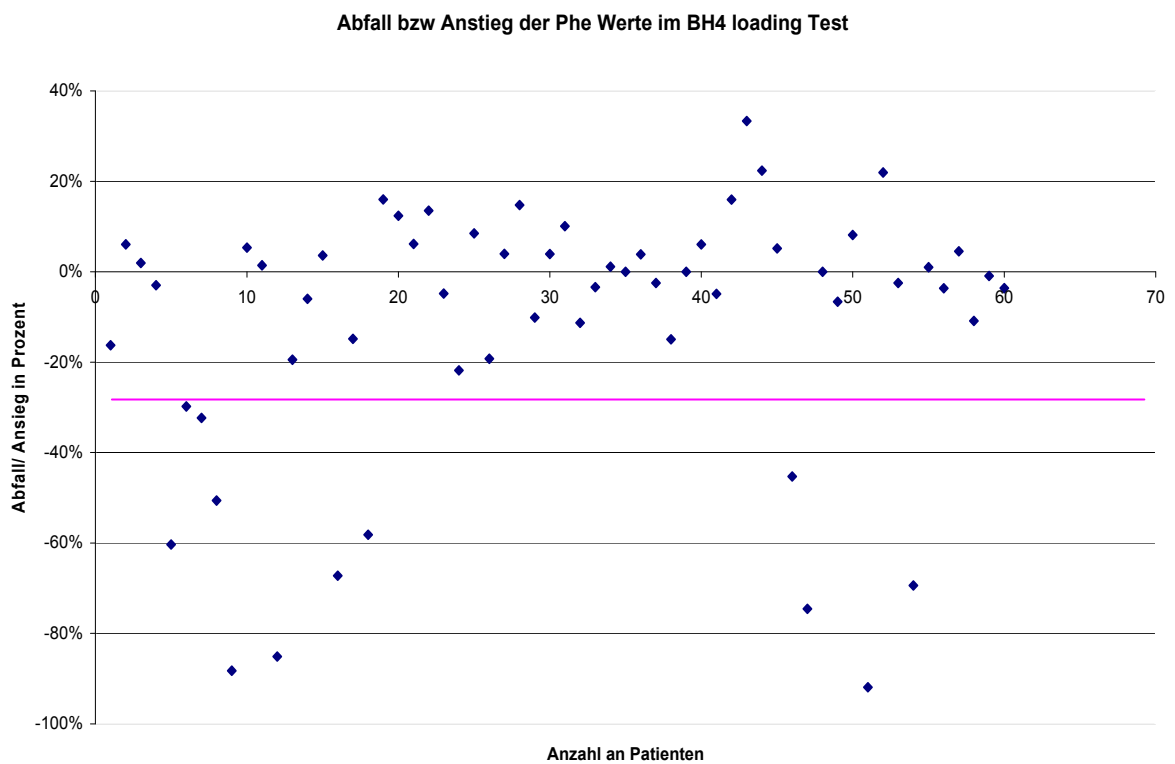


Abbildung 18: BH4 Testergebnisse in der Teilkohorte von 60 Patienten graphisch dargestellt.

### 3.2 Einteilung zur Vorhersage der BH4 Response

Um eine Selektion bzw eine Reihenfolge der Testung zu finden, wurden die Patienten in vier Gruppen eingeteilt. Ausschlaggebend für die Klassifizierung ist der Genotyp des jeweiligen Patienten.

In die erste Gruppe wurden Patienten mit einer sicher BH4 responsiven Mutation eingeteilt, unabhängig von der Mutation am zweiten Allel. Als sicher responsive Mutation, die bei uns gefunden wurden, gelten E390G, D129G und A300S.

Zur zweiten Gruppe gehören Patienten, die entweder 2 potentiell responsive Mutationen haben oder eine potentiell responsive Mutation und eine nicht responsive oder unbekannte Mutation auf dem 2. Allel tragen.

In die dritte Gruppe wurden jene Patienten zugeteilt, von denen keine Informationen über die Responsivität der Mutationen auf beiden Allelen vorhanden sind. Weiters enthält diese Gruppe jene Patienten, die auf einem Allel eine nicht responsive Mutation haben und die Responsivität der Mutation auf dem 2. Allel unklar ist.

Die vierte Gruppe umfasst jene Patienten, welche auf beiden Allelen nicht BH4 responsive Mutationen tragen. Diese Patienten sind Non-Responder der BH4 Therapie und werden auch nicht weiter getestet.

|          |  |
|----------|--|
| Gruppe 1 | zumindest eine sicher BH4 responsive Mutation  |
| Gruppe 2 | zwei potentiell responsive Mutationen bzw eine potentiell BH4 responsive Mutation plus eine nicht responsive Mutation oder plus eine unbekannte Mutation |
| Gruppe 3 | beide Mutationen mit unbekannter Responsivität oder eine Mutation nicht BH4 responsiv plus eine unbekannt  |
| Gruppe 4 | zwei nicht BH4 responsive Mutationen   |

Tabelle 9 : Einteilung in Gruppen zur Vorhersage der BH4 Response

### 3.2.1 VORHERSAGE DER BH4 RESPONSE IN DER GESAMTKOHORTE

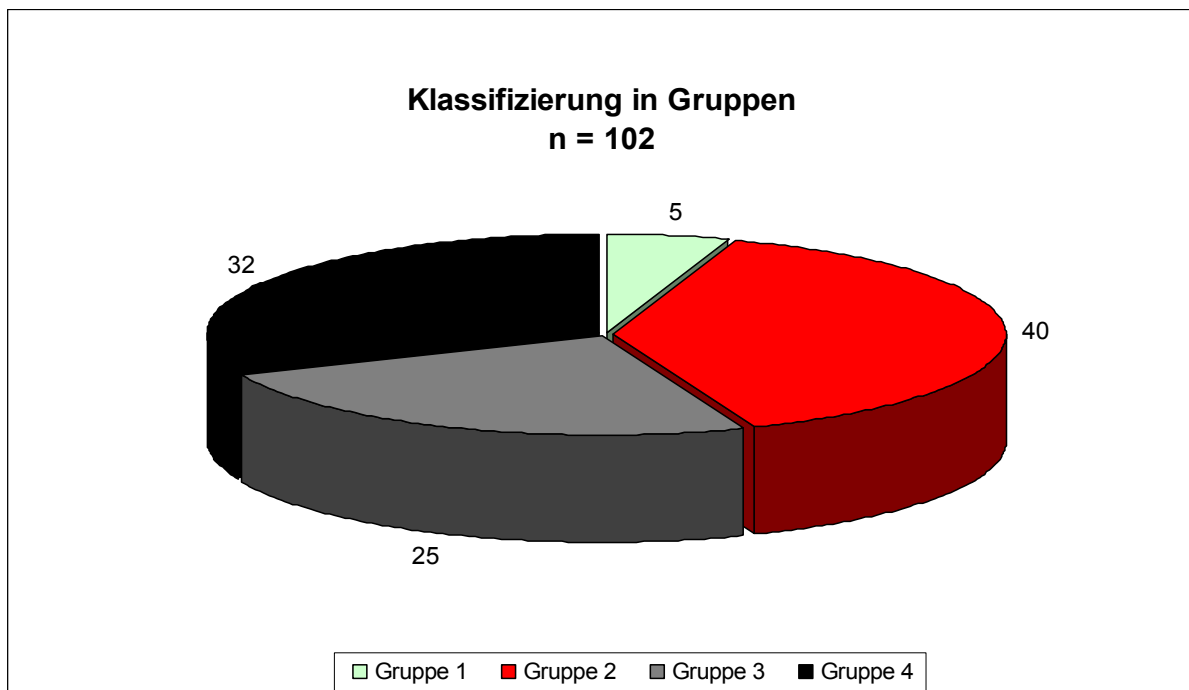


Abbildung 19: Einteilung in Gruppen zur Vorhersage der BH4 Response in der Kohorte von 102 Patienten.

Die Klassifizierung in Gruppen, basierend auf dem Genotyp der Patienten, ergab fünf Patienten in der Gruppe 1., das entspricht 5% der Kohorte. Diese Patienten sind sichere BH4 Responder.

*Alle Patienten der Gruppe 2 müssen auf ihre BH4 Responsivität hin getestet werden.* Die Gruppe 2 umfasst 40 Patienten, die einen Therapieversuch mit BH4 unterzogen werden müssen. 12 Patienten der Gruppe 2 tragen auf beiden Allelen Mutationen, die potentiell BH4 responsiv sind. Von diesen 12 Patienten sind fünf Patienten homozygot. Vier Patienten tragen die Mutation Y414C und ein Patient R261Q homozygot. Von weiteren zehn Patienten ist die eine Mutation potentiell BH4 responsiv, die Responsivität der zweiten Mutation ist unbekannt. Die restlichen 18 Patienten tragen eine nicht responsive und eine potentiell responsive Mutation im Genotyp. Patienten mit Mutationen mit höherer Restaktivität haben eine höhere Wahrscheinlichkeit BH4 Responder zu sein.

Die Gruppe 3 umfasst 25 Patienten. Auch diese Patienten müssen alle einem BH4 Therapie Versuch unterzogen werden. In dieser Gruppe gibt es acht Patienten die auf beiden Allelen Mutationen tragen, von denen keine Daten zur Responsivität bekannt sind. Die restlichen 17 Patienten tragen auf einem Allel eine nicht responsive Mutation. R408W findet sich bei neun dieser 17 Patienten und IVS12+1 G-A bei 4 Patienten. Jeweils ein Patient trägt R243X, P281L, I 65V und IVS10-11 G-A auf einem Allel.

In die Gruppe 4 fallen 32 der 102 Patienten. *Diese Patienten sind Non-Responder.* Dies entspricht 31% des gesamten Patientengutes. 17 der 32 Patienten sind homozygot, neun davon tragen die Mutation IVS12+1 G-A. Die Mutation R408 W findet sich bei sechs Patienten homozygot und IVS10-11 G-A bei zwei Patienten.

### 3.2.2 VORHERSAGE DER BH4 RESPONSE IN DER TEILKOHORTE.

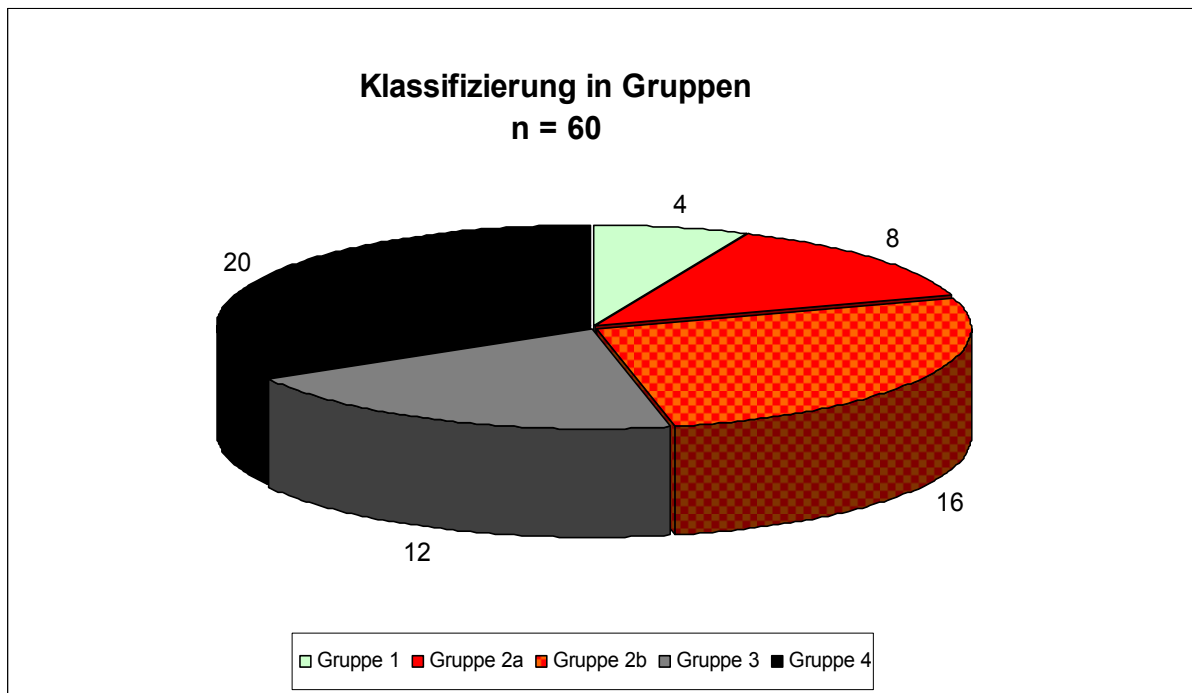


Abbildung 20: Einteilung in Gruppen zur Vorhersage der BH4 Response in der Teilkohorte von 60 Patienten.

Nach Einteilung in diese Gruppen, die nur auf der Genetik basiert, wurde die Gruppe 2 noch zusätzlich in Gruppe 2a und 2b aufgeteilt. Patienten der Gruppe 2a zeigten im BH4 loading Test einen Phe Abfall von über 30%. Die Patienten der Gruppe 2b hatten entweder einen Abfall unter 30% oder einen Phe Anstieg während des BH4 loading Tests.

In die Gruppe 1 fallen vier Patienten. Drei Patienten tragen die Mutation E390G und ein Patient D129G, diese Mutationen gelten als sicher BH4 responsiv. Mit nur 6,5% ist dies die kleinste Gruppe. Von diesen vier Patienten muss ein Patient keine Diät halten. Die restlichen drei Patienten werden von der oralen BH4 Therapie durch eine Lockerung bzw im besten Fall durch eine Aufgabe Ihrer Diät profitieren.

Mit insgesamt 24 Patienten ist die Gruppe 2 die größte Gruppe. *Alle Patienten dieser Gruppe müssen auf ihre BH4 Responsivität hin getestet werden.*

|           | 2 responsive Mutationen | 1 responsive Mutation plus 1 Mutation<br>Responsivität unbekannt | 1 responsive Mutation plus 1 nicht responsive Mutation |
|-----------|-------------------------|--|--|
| Gruppe 2a | 1 Patienten             | 3 Patienten  | 4 Patienten  |
| Gruppe 2b | 5 Patienten             | 2 Patienten  | 9 Patienten  |

Tabelle 10 : Aufschlüsselung der Einteilung der Patienten in der Gruppe 2.

In der Gruppe 2a hat ein Patient zwei potentiell BH4 responsive Mutationen. Drei Patienten tragen auf einem Allel eine potentiell BH4 responsive Mutation, die Responsivität der Mutation des 2. Allels ist nicht bekannt. Der Genotyp der restlichen vier Patienten der Gruppe 2a zeigt eine potentiell responsive Mutation auf dem einen Allel und eine nicht responsive Mutation auf dem anderen Allel.

In der Gruppe 2b haben fünf Patienten zwei potentiell responsive Mutationen, zwei Patienten tragen die Mutation Y414C homozygot. Von zwei Patienten ist von der zweiten Mutation nichts über die Responsivität bekannt, das andere Allel trägt eine potentiell responsive Mutation. Neun Patienten haben eine potentiell responsive und eine nicht responsive Mutation.

Ebenfalls keine genaue Aussage über die BH4 Responsivität kann man bei der Gruppe 3 treffen. Auch in dieser Gruppe müssen alle Patienten einen BH4 Therapie Versuch unterzogen werden.

Von den 12 Patienten der Gruppe Rest sind von fünf Patienten keine Informationen über die Responsivität beider Mutationen bekannt. Zwei Patienten tragen die Mutation IVS 2+5 G-C homozygot. Die restlichen sieben Patienten tragen auf dem einen Allel eine nicht responsive Mutation und auf dem zweiten Allel eine von der Responsivität her unbekannte Mutation.

20 Patienten aus einer Teilkohorte von 60 Patienten gehören der Gruppe 4 an. Sie tragen auf beiden Allelen nicht responsive Mutationen und sind somit Non-Responder der BH4 Therapie. Das entspricht 33% der Kohorte. Von den 20 Patienten sind elf Patienten homozygot. fünf Patienten tragen die Mutation R408W, vier die Mutation IVS12+1G-G und jeweils ein Patient die Mutation IVS10-11G-A bzw R111X homozygot.

Ausgehend von der Klassifizierung der Patienten in Gruppen würde man erwarten, dass sich in der Gruppe 1 und Gruppe 2 die meisten HPA und mPKU Patienten finden. Außerdem kann man vom Genotyp her erwarten, dass die Patienten in diesen beiden Gruppen beim BH4 loading Test einen Abfall ihrer Phe Spiegel gezeigt haben. Für die Patienten der Gruppe 2b mit cPKU, die keinen Abfall zeigten, ist die Wahrscheinlichkeit BH4 Responder zu sein geringer als bei Patienten mit HPA bzw mPKU und Abfall der Phe Spiegel im BH4 loading Test.

In der Gruppe 4 sollte kein Patient einen Abfall gezeigt haben. Außerdem sollten sich keine Patienten mit HPA bzw mPKU in der Gruppe 4 befinden, da diese Gruppe auf beiden Allelen nicht responsive Mutationen mit geringer oder keiner Restaktivität tragen. Bei HPA und mPKU Patienten in der Gruppe 3 ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass sie Mutationen mit Restaktivität im Genotyp tragen.

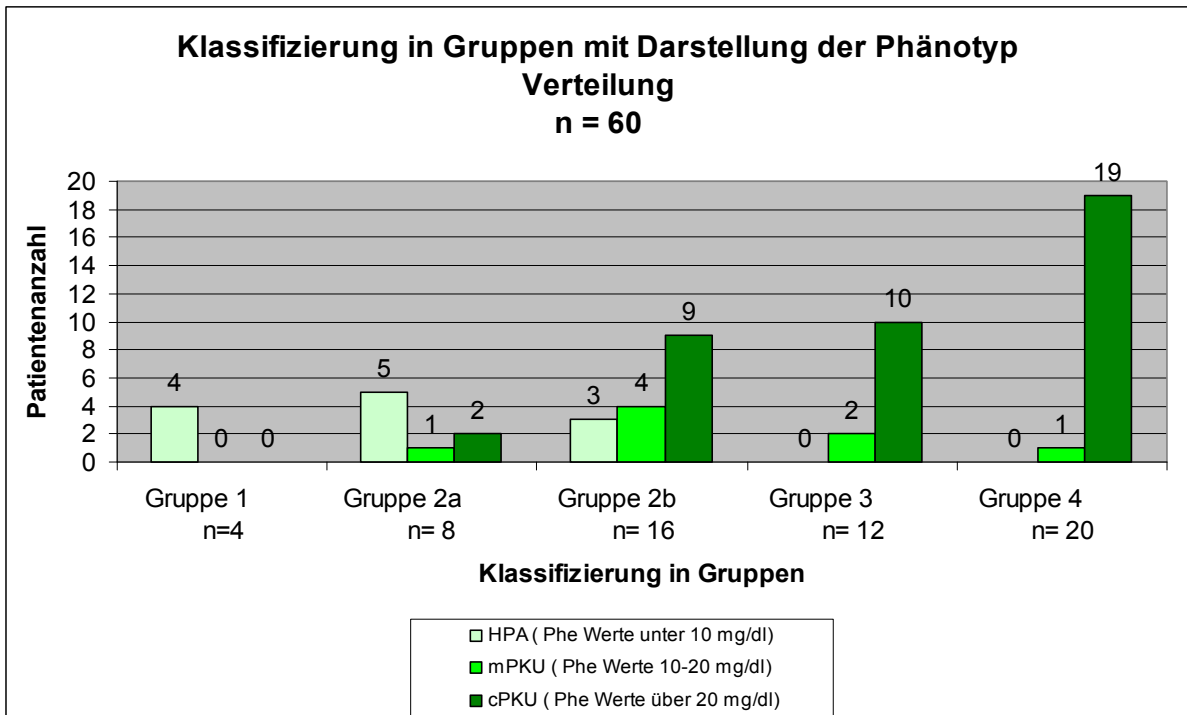


Abbildung 21: Klassifizierung in Gruppen in der Teilkohorte von 60 Patienten mit Darstellung der Phänotyp-Verteilung.

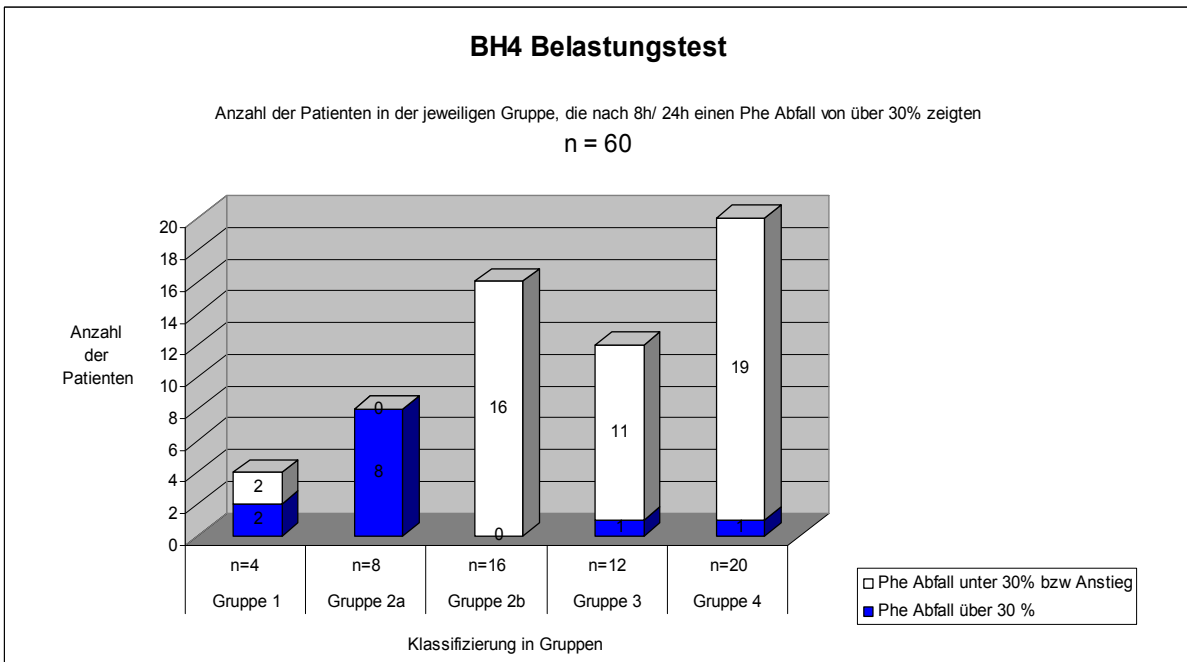


Abbildung 22: Klassifizierung in Gruppen in der Teilkohorte von 60 Patienten mit Darstellung der BH4 loading Test Ergebnisse.

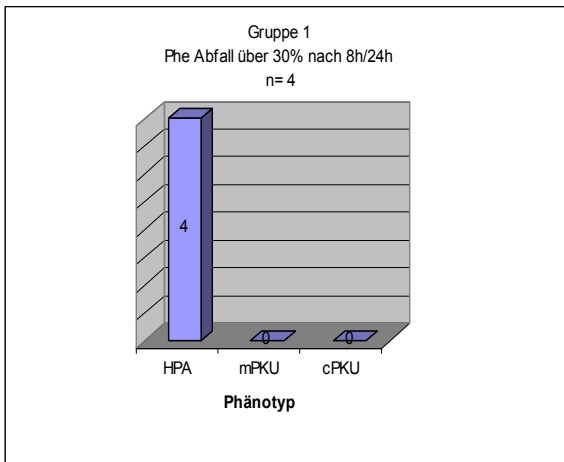


Abbildung 23: Gruppe 1, Anzahl und Phänotyp der Patienten die einen Phe Abfall über 30% im BH4 loading Test gezeigt haben

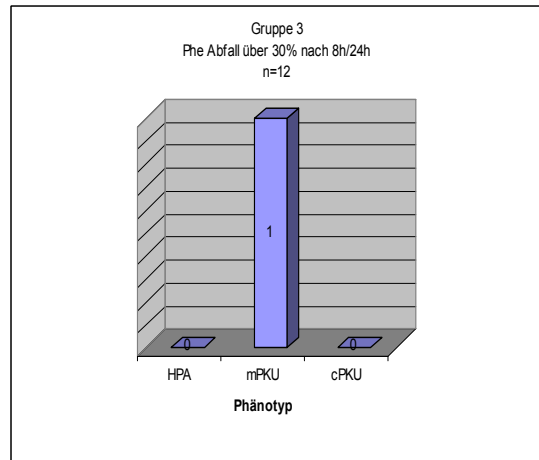


Abbildung 25: Gruppe 3, Anzahl und Phänotyp der Patienten die einen Phe Abfall über 30% im BH4 loading Test gezeigt haben

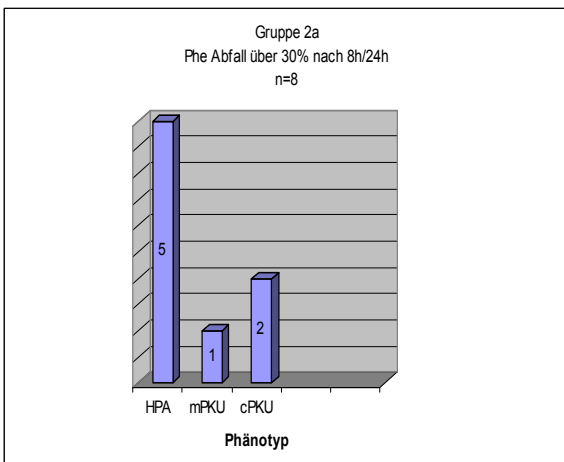


Abbildung 24: Gruppe 2a, Anzahl und Phänotyp der Patienten die einen Phe Abfall über 30% im BH4 loading Test gezeigt haben

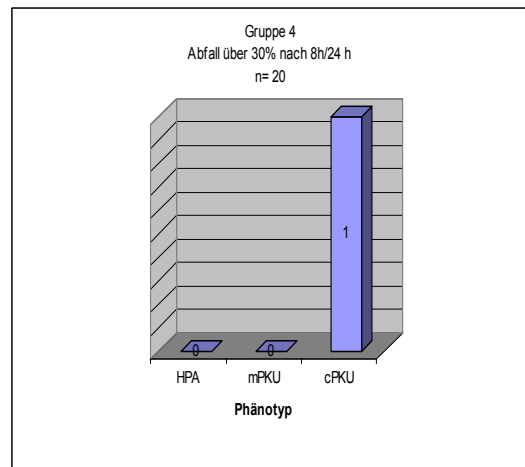


Abbildung 26: Gruppe 4, Anzahl und Phänotyp der Patienten die einen Phe Abfall über 30% im BH4 loading Test gezeigt haben

Wie vom Genotyp her zu erwarten war, leiden alle Patienten der Gruppe 1 an HPA. Zwei Patienten zeigten einen Phe Abfall von über 30% im BH4 loading Test. Ein Patient der Gruppe 1, der die Mutationen R408W und E390G trägt, zeigte einen Phe Abfall von minus 85%. Ein zweiter Patient dieser Gruppe mit dem gleichen Genotyp zeigte einen wesentlich geringeren Abfall von nur 16%.

In der Gruppe 2a befinden sich fünf Patienten mit dem Phänotyp HPA. Sie haben die höchste Wahrscheinlichkeit BH4 Responder zu sein. Auch der Patient mit mPKU und die beiden cPKU Patienten zeigten einen Phe Abfall von über 30 %. Genotyp und BH4 Response sprechen dafür, dass diese acht Patienten eine hohe Wahrscheinlichkeit haben, von der BH4 Therapie zu profitieren. Vom Phänotyp her gesehen sind die beiden Patienten mit cPKU allerdings eher untypische Responder.

In der Gruppe 2b befinden sich 16 Patienten. Die Phänotyp Verteilung ist eher ungünstig, da nur drei Patienten an HPA leiden, vier an mPKU und neun Patienten an cPKU. Vom Genotyp ausgehend, haben diese Patienten die gleichen Voraussetzungen wie die Patienten in der Gruppe 2a. Der einzige Unterschied ist, dass niemand in dieser Gruppe einen Phe Abfall über 30% zeigte. Es ist sehr interessant, dass obwohl der BH4 loading Test sehr variabel zu sein scheint, diese Trennung dennoch die meisten cPKU Patienten herausfilterte. Wenn man den BH4 loading Test außer Acht lässt, haben die sieben Patienten mit HPA und mPKU die gleich hohe Wahrscheinlichkeit BH4 Responder zu sein, wie die HPA und mPKU Patienten der Gruppe 2a.

In der Gruppe 3 gibt es einen Patienten mit mPKU, der einen Abfall im BH4 loading Test gezeigt hat. Er trägt die Mutationen R408W und A395G. Über die Mutation am zweiten Allel sind keine Daten über die Responsivität bekannt. Dieser Patient hat die größte Wahrscheinlichkeit dieser Gruppe von der BH4 Therapie zu profitieren. Der zweite mPKU Patient dieser Gruppe zeigte einen Abfall von 3% im BH4 loading Test. Im Genotyp trägt er die Mutationen R243X, welche unter 1% Restaktivität besitzt, und Y377C, von dieser Mutation sind keine Daten vorhanden. Da man in dieser Gruppe von mindestens einer Mutation keine Information über ihre Responsivität hat, kann man aufgrund der Genetik keine Aussage über den

BH4 Response der Patienten treffen. Allerdings leiden zehn der zwölf Patienten an klassischer PKU und sind damit sehr wahrscheinlich Non-Responder der BH4 Therapie.

Wie zu erwarten, hat die Selektion anhand des Genotyps fast ausschließlich Patienten mit cPKU in der Gruppe 4 ergeben. Bis auf einen Patienten mit cPKU zeigte kein Patient einen Abfall im BH4 loading Test. Dieser Patient hatte als Ausgangswert 56 mg/dl Phe und sank um 18,1 mg/dl ab. Dieser Wert war der höchste Ausgangswert im BH4 loading Test von allen.

## 4 Diskussion

### ***4.1 Prävalenz der Mutationen im europäischen und internationalen Vergleich***

In unserer Kohorte von 102 Patienten, 204 Allele, fanden sich 43 verschiedene Mutationen. Die Heterogenität der Mutationen in einzelnen Ländern lässt sich nur schwer vergleichen. Karacic et al (16) berichten von 35 verschiedenen Mutationen auf 226 Allelen in einer kroatischen Studienkohorte.

Die häufigste Mutation in unserer Kohorte von ist R408W, auf knapp 20% aller Allele. Wie in Tabelle 6 gezeigt, ist R408W laut [www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca) (12) die häufigste Mutation weltweit mit 6,69% von 3200 Allelen. Auch in der Arbeit von J. Zschocke (27) wird R408W als häufigste Mutation in Europa beschrieben. R408W hat eine besonders hohe Frequenz in den Baltischen Staaten, aber auch Ost- bis Süd-Ost- Europa und Zentraleuropa. Einen zweiten Häufigkeitsgipfel hat die Mutation in Großbritannien und Irland. (Abbildung 6) (27). Bei uns ist diese Mutation vermutlich durch die Einwanderung aus den Baltischen Staaten sehr hoch.

Die zweithäufigste Mutation in unserer Kohorte ist die Mutation IVS12+1G>A mit 14%. Diese Intronmutation hat eine hohe Prävalenz in Nordeuropa, besonders Dänemark, Skandinavien, England, Holland und Norddeutschland. Ebenfalls häufig ist diese Mutation in Nord-Italien, wahrscheinlich durch Migration von Trägern dieser Mutation von Nord-Deutschland nach Nord-Italien. (27)

Von den in der Arbeit von J. Zschocke (27) beschriebenen, 29 häufigsten Mutationen in Europa, fanden sich 18 in unserer Kohorte. Nicht vertreten waren die Mutationen F39L, G46S, W18f7X, R252W, G272X, E280K, F299C, L348V, S349P, c1089delG und V388M.

Von den 14 international häufigsten Mutationen, die in der Datenbank [www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca) (12) beschrieben wurden, fanden sich neun Mutationen in unserem Patientenkontingent. In unserer Kohorte machen vier Mutationen knapp 50% der Mutationen aller Allele aus. Diese Mutationen sind auch international gesehen unter den Häufigsten. Besonders die 7 Mutationen mit der höchsten

Prävalenz laut [www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca) sind auch in unserer Kohorte die Mutationen, die unter den zehn häufigsten Mutationen zu finden sind.

In der Arbeit von Zurflüh et al. (22) wurden Mutationen von 3173 Allelen der Datenbank [www.pahdb.mcgill.ca](http://www.pahdb.mcgill.ca) (12) in responsive und nicht responsive Mutationen unterteilt, basierend auf Informationen der Datenbank [www.biopku.org](http://www.biopku.org). Dabei wurden 32 % der Mutationen responsiv klassifiziert und 68% nicht responsiv (diese Gruppe enthält auch die unklaren Mutationen). In unserer Kohorte 102 Patienten konnten 202 Mutationen entschlüsselt werden. Davon fanden sich auf fünf Allelen sicher responsive Mutationen (2,5 %), und auf 51 Allelen potentiell BH4 responsive Mutationen, das entspricht 25,5%. Die Mutationen von 103 Allelen sind nicht BH4 responsiv, (51%) und 43 sind unklar (21%). Zusammengefasst können die Mutationen von 28% der Allele als responsiv klassifiziert werden und 72% als nicht responsiv.

## **4.2 Phänotyp-Genotyp Korrelation in der Teilkohorte**

Die Frage ob man vom Genotyp auf den Phänotyp schließen kann, wird auf zwei unterschiedlichen Ebenen abgehandelt.

Einerseits diskutiert man die Korrelation zwischen Genotyp und metabolischen Phänotyp. Ob ein Patient an HPA, mPKU oder cPKU leidet ist nicht mit Sicherheit durch den Genotyp vorauszusagen. Zwei gleiche Mutationen können bei unterschiedlichen Patienten einen anderen Phänotyp ergeben. Beispiele für diese Aussage sind im übernächsten Absatz anhand unserer Teilkohorte für die Mutationen Y414C und R261Q angeführt. Trotz molekulargenetischer Testung muss sich der Arzt an die tatsächliche Phe Toleranz des Patienten herantasten. Es ist nicht möglich anhand des Genotyp die Phe Toleranz des Patienten vorherzusagen.

Andererseits wird versucht eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp auf der Ebene der BH4 Responder herzustellen. Damit könnten BH4 Responder anhand ihres Genotyps bestimmt werden. Das würde besonders den Patienten, die bereits einem BH4 loading Test unterzogen wurden und jetzt auf eiweißarmer Diät sind, einen weiteren Test ersparen.

Für eine Aussage über den Phänotyp bzw eine mögliche BH4 Response vom Genotyp ausgehend, muss man immer den gesamten Genotyp anschauen. Es ist nicht möglich von einer der beiden Mutation auf den Phänotyp/ BH4 Response zu schließen. Obwohl die mildere Mutation ausschlaggebend ist, so fällt auf, dass gerade bei den „inconsistent mutations“ eine Vorhersage sehr schwierig ist.

Ich habe in unserer Kohorte die Mutationen Y414C und R261Q genauer angeschaut.

In unserer Teilkohorte von 60 Patienten fanden sich zwei Patienten, die die Mutation Y414C homozygot tragen. Trotz des gleichen Genotyps mit Homozygotie einer milden Mutation, ist der Phänotyp der beiden Patienten unterschiedlich. Ein Patient leidet an HPA, der andere an mPKU. Auch der BH4 loading Test zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Bei dieser Mutation in homozygoter Form würde man

erwarten, dass beide Patienten BH4 Responder sind und eine deutliche Reaktion, in diesem Fall einen signifikanten Abfall, im BH4 loading Test gezeigt haben. Während der Phe Spiegel des HPA Patienten um immerhin 15% absank, sank der Phe Spiegel des mPKU Patienten praktisch gar nicht ab (minus 2%). Ein anderer Patient trägt die Mutation Y414C auf dem einen Allel und R408W auf dem anderen Allel. Da die Mutation Y414C zu immerhin 28% Restaktivität der PAH führt, würde man einen milden Phänotyp erwarten. Dieser Patient leidet an cPKU mit 38 mg/dl Phe Blutspiegel postpartal ohne Diät. Das gleiche war bei einem anderen Patienten zu beobachten. Er trug die Mutation Y414c und R243X compound heterozygot und im Phänotyp ebenfalls cPKU.

Ein Patient unserer Teilkohorte trägt die Mutation R261Q mit 30% Restaktivität der PAH homozygot. Sein Phänotyp ist mPKU und im BH4 loading Test zeigte er einen minimalen (+4%) Anstieg des Phe Spiegels. Es gibt fünf Patienten in unserer Teilkohorte, die die Mutationen R261Q und R408W compound heterozygot tragen. Zwei dieser Patienten sind miteinander verwandt, beide leiden an cPKU und zeigten keinen signifikanten Abfall im BH4 loading Test (minus 14 bzw minus 6% Phe Abfall). Ein anderer cPKU Patient mit diesen Mutationen zeigte ebenfalls nur 10% Abfall im BH4 loading Test. Der vierte Patient mit diesem Genotyp ist auch ein cPKU Patient, er zeigte aber einen Phe Abfall um 58%. Der fünfte Patient mit demselben Genotyp ist der Einzige, der im Phänotyp an mPKU leidet, mit einem postpartalen Phe Spiegel von 17mg/dl ohne Diät. Er fiel aber im BH4 loading Test um 15% ab.

Es scheint daher noch andere Faktoren zu geben, die für den Phänotyp ausschlaggebend sind. Es ist denkbar, dass hier Polymorphismen des PAH Gens eine Rolle spielen. Auf diesem Gebiet ist noch viel Forschung notwendig, um vielleicht eines Tages sowohl den metabolischen Phänotyp sowie den BH4 Response anhand des Genotyps einteilen zu können.

Ich habe keine Daten gefunden, die einen Umkehrschluss diskutieren. In unserer Kohorte von 60 Patienten sind zwei Patienten mit Homozygotie für die Mutation IVS2+5C-G. Über diese Mutation gibt es keine Information über die Restaktivität bzw BH4 Responsivität. Beide Patienten sind im Phänotyp cPKU, mit postpartalen

Phe Werten von 20mg/dl bzw 31,5 mg/dl. Im BH4 loading Test sind die Phe Werte dieser Patienten um 0% bzw -1% abgefallen.

Inwieweit man nun von dieser Tatsache auf die BH4 Responsivität der Mutation schließen kann, ist unklar.

### **4.3 Phänotyp und BH4 Response**

Zulassungsstudien von Sapropterin (Kuvan®) haben gezeigt, dass ca 20-50 % der PKU Patienten eine Reduktion der Phe Werte im Blut von über 30% erreicht haben. (25) In der Arbeit von Blau et al. (25) wird von BH4 Response bzw einem klinisch signifikanten Abfall der Phe Werte nach BH4 Gabe, bei circa 80% der HPA Patienten, bis zu 50% der mPKU Patienten und unter 10% der cPKU Patienten gesprochen.

Nimmt man nun in unserer Teilkohorte von 60 Patienten den BH4 loading Test als Grundlage zur Hand, so zeigten 32 Patienten einen Abfall der Phe Werte aber nur 12 Patienten einen Abfall über 30% des Ausgangswertes. Das entspricht 20% der Teilkohorte.

Von diesen 12 Patienten leiden sieben Patienten an HPA, zwei an mPKU und drei an cPKU. Insgesamt sind 12 HPA Patienten in der Teilkohorte. Das heißt, die Phe Spiegel sind von ca 80% der HPA Patienten im BH4 Test um über 30% abgesunken. Von insgesamt acht mPKU Patienten, sind die Phe Spiegel von zwei Patienten signifikant gesunken, das entspricht ca 25%. Drei der 40 cPKU in der Teilkohorte zeigten eine Phe Abfall von über 30%, das entspricht ca 9% .

Allerdings handelt es sich bei unserem Test nur um den nachträglich ausgewerteten BH4 loading Test, der postpartal vor Diätbeginn der Patienten durchgeführt worden ist. Der tatsächliche BH4 Response hängt unter anderem auch vom Alter, Ausgangs-Phe Wert, Dauer des Tests und BH4 Pharmakokinetik ab (22). Wie in der Arbeit von Zurflüh et al. (22) berichtet, sind die tatsächlichen Zahlen an BH4 Respondern wahrscheinlich höher als BH4 loading Tests dies vermuten lassen.

Wie bereits im Kapitel „Der Stellenwert der Genetik“ kurz angesprochen, gibt es keine internationalen Richtlinien über die Phänotyp Einteilung und Klassifikation. Phe Werte können zum Beispiel auf Grund vom Zeitpunkt der Blutabnahme, letzter Mahlzeit oder durch Fieber beeinflusst sein. Auch unterschiedliche Messmethoden und Parameter für die Phänotyp Einteilung können zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

In dieser Studie sind Patienten in HPA, mPKU und cPKU eingeteilt worden. In englischen Arbeiten findet man auch immer wieder den Ausdruck milde Hyperphenylalaninämie (MHP) statt HPA. Auch findet dort oft eine Unterteilung in milde, moderate und klassische PKU statt.

Dadurch ist es wichtig, die Ergebnisse von Studien genau zu betrachten und zu hinterfragen.

Gerade bei der Frage nach BH4 Respondern bzw Profit der BH4 Therapie für die Patienten, geht es um die Phe Toleranz. Besonders in den Langzeitstudien wird es wichtig werden, nicht nur von Abfall der Phe Spiegel zu sprechen, sondern die Steigerung der Phe Toleranz und deren Ausmaß ist als ausschlaggebend anzusehen.

#### **4.4 Aussagekraft des BH4 loading Tests**

In Abbildung 21 bis 26 sind die Ergebnisse des BH4 loading Tests in den Gruppen dargestellt.

Alle vier Patienten der Gruppe eins sind im Phänotyp HPA Patienten und tragen eine sicher responsive Mutation im Genotyp. Sie sind sicher BH4 Responder. Alle vier Patienten sollten im BH4 loading Test einen signifikanten Abfall gezeigt haben. Tatsächlich ist es aber so, dass zwei der vier Patienten in der Gruppe 1 keinen signifikanten Abfall im BH4 Test zeigten. Einer dieser Patienten zeigte einen Abfall um 16 %. Dieser Patient trägt im Genotyp die Mutationen E390G und R408W. Ein anderer Patient dieser Gruppe mit demselben Genotyp fiel im BH4 loading Test um 85% ab. Ich glaube, dass dieser Patient mit nur 16% Abfall in einem neuen BH4 Test ebenfalls stärker abfallen würde. Der zweite Patient stieg im BH4 loading Test sogar um 22% an. Sein Phe Ausgangswert lag bei 8,5 mg/dl.

In diesem Fall ist anzunehmen, dass die Ergebnisse des BH4 loading Tests nicht mit dem tatsächlichen BH4 Response übereinstimmen.

Durch die Instabilität von BH4, die eine korrekte Lagerung erfordert, sowie auf Grund von Unterschieden in Resorption und Pharmakokinetik von BH4, sind die Ergebnisse des im Nachhinein ausgewerteten BH4 loading Tests nicht aussagekräftig.

Außerdem fällt auf, dass ein Patient aus der Gruppe 4 im BH4 loading Test um 32% abgefallen ist. Dieser Patient ist vom Genotyp her ein Non-Responder und wird auch keinem weiteren BH4 Testversuch unterzogen. Allerdings ist es bei diesem Patienten wahrscheinlich, dass hier ein Fehler in der Messung bzw Dokumentation vorliegt. Der Ausgangswert beim BH4 loading Test lag bei 56 mg/dl, der erste gemessene Phe Wert bei 62 mg/dl. Diese Werte des Patienten sind mit Abstand die höchsten Ausgangswerte von allen.

Obwohl der nachträglich ausgewertete BH4 loading Test keinen Rückschluss auf die tatsächliche BH4 Response zulässt, so kann man in unserem Patientenkontingent dennoch sagen, dass er beim Großteil der Patienten mit dem Genotyp übereinstimmt. Die Ergebnisse des BH4 loading Tests zeigen, dass bis auf zwei Ausnahmen, alle signifikanten Phe Abfälle in den Gruppen 1 und 2 stattgefunden haben. Der Patient in Gruppe 3, der einen Abfall um 30% hatte, trägt im Genotyp die Mutationen R408W und A395G. Über die Mutation am zweiten Allel sind keine Daten über die BH4 Responsivität oder Restaktivität bekannt. Möglicherweise ist der BH4 Test ein Anzeichen dafür, dass es sich um eine BH4 responsive Mutation handelt und der Patient BH4 Responder ist. Er wird wie alle Patienten der Gruppe 3 einem BH4 Testversuch unterzogen. Seine Reaktion im BH4 loading Test könnte aber vermuten lassen, dass er höhere Chancen hat von dieser Therapie zu profitieren. bzw auf diese Therapie anzusprechen.

Meiner Meinung nach hat der postpartale BH4 Test keine relevanten Aussagekraft und ist in der Studie als Zusatzinformation zu sehen. Es ist nicht notwendig den BH4 Test der Patienten im Nachhinein auszuwerten. Non-Responder können auf Grund der molekulargenetischen Testung ausgeschlossen, alle anderen Patienten müssen einem neuerlichen BH4 Testversuch unterzogen werden. Dieser BH4 Test sollte standardisiert, nach einem festgelegten Protokoll, mit einem zugelassenen Präparat und einer längeren Testdauer durchgeführt werden.

#### **4.5 Praktische Durchführung des neuen BH4 Test**

Bisher war der BH4 loading Test lediglich ein Mittel um typische und atypische PKU zu differenzieren. Zu diesem Zeitpunkt haben die Kinder noch keine eiweißreduzierte Diät und ihre Phe Werte sind dem Phänotyp entsprechend hoch. Nun stellt sich die Frage nach dem optimalen Zeitpunkt für den BH4 Test für die Suche nach BH4 Respondern bei typischer PKU. Es wäre sinnvoll ein Testprotokoll zu entwickeln, das beide Tests miteinander kombiniert. Wenn möglich sollte man sich international auf ein Protokoll, wie getestet werden soll, einigen. Damit würden die Ergebnisse international vergleichbar und Daten aus Studien könnten leichter miteinander verglichen werden. Ein mögliches Protokoll, von der europäischen Arbeitsgruppe für Phenylketonurie ausgearbeitet, zeigt Abbildung 13. Auf Patienten mit atypischer PKU wird in dieser Arbeit (25) nicht eingegangen. Ob dieser Test mit 48 Stunden Testdauer alle BH4 responsiven Patienten identifizieren kann ist derzeit noch offen. Zudem ist Kuvan® nicht für die Anwendung vor dem 4. Lebensjahr zugelassen.

Es steht nun die Frage im Raum, was man mit den Patienten machen soll, die einem BH4 loading Test bereits unterzogen wurden und nun bereits mittels eiweißreduzierter Diät therapiert werden.

Der BH4 loading Test im Nachhinein ausgewertet hat nicht genügend Aussagekraft, ebenso wenig kann man BH4 Responsivität über den Genotyp bestimmen. Bei diesen Patienten kann man die Non Responder anhand des Genotyps ausschließen, aber alle anderen Patienten müssen einem neuerlichen BH4 Testversuch unterzogen werden. Allerdings sind diese Patienten auf Diät und haben üblicherweise niedrige Phe Werte. So gab es die Empfehlung eines kombinierten Phe und BH4 Tests. Dabei wurde zuerst ein standardisierter Phe-load verabreicht und dann BH4. Dieser Test ist jedoch bereits wieder obsolet. Derzeit sind Protokolle mit einer stufenweisen Steigerung der Phe Zufuhr in Abhängigkeit vom Abfall des Phe Spiegels im Blut in Ausarbeitung.

## Literaturverzeichnis

1. Ertan Mayatepek; Pädiatrie, Urban und Fischer 1. Auflage
2. Neumeister, Besenthal, Böhm; Klinikleitfaden der Labordiagnostik, Urban und Fischer, 4. Auflage
3. Reinhardt; Therapie der Krankheiten im Kinder und Jugendalter, Springer, 8. Auflage
4. Speer, Gahr; Pädiatrie, Springer, 2. Auflage
5. Kerbl, Kurz, Roos, Wessel; Checkliste Pädiatrie, Thieme, 3. Auflage
6. Springer, Pädiatrie Grundlagen und Praxis
7. Löffler; Basiswissen Biochemie, Springer, 4. Auflage
8. Ursula Wachtel, Phenylketonurie. Ein Modellfall für die Entwicklung der Kinderheilkunde, Schattauer; 1. Auflage:(2004)
9. <http://www.dgkj.de/132.html>
10. <http://www.oegast.at/index.php?id=25>
11. <http://www.neoscreening.de/Screening/Austria-Wien-Bericht-2000.pdf>
12. <http://www.pahdb.mcgill.ca>
13. <http://www.biopku.org>
14. <http://www.univie.ac.at/Ernaehrungswissenschaften/lva/diaetetik/Ase05.pdf>
15. N.Blau. "PKU und BH4. Advances in Phenylketonurie and Tetrahydrobiopterin", 1. Auflage 2006
16. Karacić I, Meili D, Sarnavka V, Heintz C, Thöny B, Ramadza DP, Fumić K, Mardesić D, Barić I, Blau N.(2009). "Genotype-predicted tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness and molecular genetics in Croatian patients with phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency". Molekular Genetics and
17. Blau, N. and H. Erlandsen (2004). "The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency." Mol Genet Metab: 82:101-111.
18. B. Thöny, G.Auerbach, N.Blau (2000). "Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and function". Biochem. J (2000) 347, 1-16
19. Kuvan® Heft 2008, "Help your patients take a bite out of life", product monograph first edition, November 2008

20. JH Walter, FJ White, SK Hall, A MacDonald, G Rylance, A Boneh, DE Francis, GJ Shortland, M Schmidt, A Vail (2002). "How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria?", *J Lancet* (2002); 360: 55-57
21. <http://www.dgem.de/termine/muench2004/dokoupil.pdf>
22. Zurfluh, M. R., J. Zschocke, M. Lindner, F. Feillet, C. Chery, A. Burlina, R. C. Stevens, B. Thony and N. Blau (2008). "Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency." *Hum Mutat* 29(1): 167-75.
23. Kure s, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii K, Matasubara Y, Narisawa K. 1999. "Tetrahydrobiopterin-Response phenylalanine hydroxylase deficiency." *J Pediatr* 135:375-378
24. Burlina, N. Blau (2009). "Effect of BH4 supplementation on phenylalanine tolerance". *J Inher. Metab. Dis.* (2009) 32:40-45
25. Blau N, Bélanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, Trefz FK, van Spronsen FJ (2009). "Optimizing the use of sapropterin (BH4) in the management of phenylketonuria. *J Mol Genet Metab.* 2009 Apr;96(4):158-63. Epub 2009 Feb 8. Review.
26. G. Gramer, S.F.Garbade, N.Blau and M.Lindner (2009). „Pharmacokinetics of tetrahydrobiopterin following oral loadings with three single dosages in patients with phenylketonuria”, *J Inher. Metab. Dis.* (2009) 32:52-57
27. J. Zschocke (2003). „ Phenylketonuria Mutations in Europe“. *J Human Mutation* (2003) 21:345-356.
28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=pku>
29. C. R. Scriver (2007). „ The PAH Gene, Phenylketonuria, and a Paradigm Shift“. *J Human Mutation* (2007) 28(9), 831-845
30. [.http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/108038](http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/108038)