

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Pharmakologische Therapie der Phenylketonurie durch Defekt der
Phenylalaninhydroxylase mit Tetrahydrobiopterin:
Effekt auf Metabolite, *in vivo* Enzymaktivität und Proteintoleranz**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Matthias Stefan Habich
aus Baden-Baden

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Ania C. Muntau

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. K.-S. Boos

Prof. Dr. F. X. Reichl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan:

Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

12.10.2006

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	HYPERPHENYLALANINÄMIE	1
1.1.1	Historischer Überblick.....	1
1.1.2	Definitionen und Häufigkeit.....	1
1.1.3	Pathogenese	2
1.1.4	Klassifikation und klinische Verlaufsformen.....	6
1.1.5	Diagnostisches Vorgehen zur Klassifikation der Hyperphenylalaninämie bei positivem Neugeborenenenscreening	7
1.1.6	Vererbung.....	8
1.1.7	Die diätetische Therapie der Phenylketonurie	9
1.1.8	Alternative Therapieversuche	12
1.1.9	Tetrahydrobiopterin-sensitive Hyperphenylalaninämie	14
1.2	ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	15
2	PATIENTEN UND METHODEN.....	16
2.1	PATIENTEN.....	16
2.1.1	Kontrollkollektiv.....	17
2.2	STUDIENDESIGN	19
2.3	KOMBINIRTER BELASTUNGSTEST MIT PHENYLALANIN UND TETRAHYDROBIOPTERIN.....	21
2.4	¹³ C-PHENYLALANINOXIDATIONSTEST	24
2.5	MUTATIONSANALYSE DES <i>PHENYLALANINHYDROXYLASE</i> -GENS	26
2.6	STRUKTURELLE LOKALISATION DER MUTATIONEN AUF DEM PHENYLALANINHYDROXYLASE-PROTEIN.....	27
2.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	28
3	ERGEBNISSE.....	29
3.1	KOMBINIRTER PHENYLALANIN-TETRAHYDROBIOPTERIN-BELASTUNGSTEST	29
3.2	BESTIMMUNG DER <i>IN VIVO</i> ¹³ C-PHENYLALANIN-OXIDATIONSRATE.....	32
3.2.1	Fraktionelle ¹³ CO ₂ -Bildung der <i>in vivo</i> ¹³ C-Phenylalanin-Oxidationsrate	32
3.2.2	Kumulative ¹³ CO ₂ -Bildung der <i>in vivo</i> ¹³ C-Phenylalanin-Oxidationsrate	34

Inhaltsverzeichnis

3.3	ZUSAMMENHANG DER WIRKUNG VON TETRAHYDROBIOPTERIN AUF DIE PHENYLALANINKONZENTRATION IM VOLLBLUT UND AUF DIE ¹³ C-PHENYLALANIN-OXIDATIONSRATE.....	37
3.4	ÜBERSICHT EINZELWERTE	40
3.5	KONTROLLKOLLEKTIV	41
3.6	LANGZEITBEHANDLUNG MIT TETRAHYDROBIOPTERIN.....	42
3.7	WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN BEI EINEM PATIENTEN MIT KLASSISCHER PHENYLKETONURIE.....	43
3.8	GENOTYPISIERUNG UND STRUKTURELLE LOKALISATION DER MUTATIONEN IM PHENYLALANINHYDROXYLASE-GEN AUF DEM PHENYLALANINHYDROXYLASE-PROTEIN	45
4	DISKUSSION	48
5	AUSBLICK.....	58
6	ZUSAMMENFASSUNG	60
7	LITERATURVERZEICHNIS	62
8	DANKSAGUNG	70
9	VERÖFFENTLICHUNG FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
10	LEBENS LAUF..... FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	

Abkürzungsverzeichnis

A

ATP Adenosintriphosphat

B

BH₄ Tetrahydrobiopterin

BSA Körperoberfläche

C

cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure

¹³C₂ ¹³C -markiertes Kohlendioxid

CoA Coenzym A

D

DHPR Dihydropteridinreduktase

DOB Delta-over-baseline-Wert

E

EEG Elektroenzephalogramm

EDTA Ethylene Diamine Tetra-Acetate

G

GTP Guanosintriphosphat

GTPCH 1 Guanosintriphosphat-Cyclohydrolase 1

H

HCl Salzsäure

HPA Hyperphenylalaninämie

I

ID Identität

IQ Intelligenzquotient

K

K Kontrollgruppe

Kb Kilobasen

KG Körpergewicht

O

OMIM Online Mendelian Inheritance in Man

P

PAL Phenylalanin-Ammonium-Lyase

PAH Phenylalaninhydroxylase

PCR (Percentage of ¹³C recovered) Wiederfindungsrate

Phe Phenylalanin

PKU Phenylketonurie

PTPS 6-Pyruvoyltetrahydropterinsynthase

Abkürzungsverzeichnis

Q

QR Quartilenrange

M

MG Molekulargewicht
MHP milde Hyperphenylalaninämie
mRNA Messenger Ribonukleinsäure
MS Massenspektrometer

N

NO Stickoxid

R

R_P Isotopenverhältnis in der Atemprobe
R_{STD} Isotopenverhältnis in einem Standard-Gas
R_{PDB} Isotopenverhältnis in einem Standard-Gas (PeeDeeBelmnite)

T

TE Tris-Ethylene Diamine Tetra-Acetate
Tyr Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Hyperphenylalaninämie

1.1.1 Historischer Überblick

Der norwegische Arzt Asbjörn Fölling beschrieb 1934 das Krankheitsbild der Phenylketonurie (PKU). Er wies bei Patienten mit geistiger Behinderung die Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure im Urin nach und umschrieb das neue Krankheitsbild zunächst mit dem Begriff „Imbezillitas phenylpyruvica“ (*Fölling 1934*). 1947 wurde durch G.A. Jervis der Defekt der Verstoffwechslung von Phenylalanin zu Tryosin bei Patienten mit PKU nachgewiesen (*Jervis 1937*). 1953 gelang es dem deutschen Kinderarzt Horst Bickel, eine PKU-Patientin mittels einer phenylalaninarmen Diät erfolgreich zu behandeln (*Bickel 1953*). Damit wurde die Hyperphenylalaninämie (HPA) zum Prototyp der behandelbaren genetischen Erkrankung (*Scriver 1999*).

Den Früherkennungstest für PKU (Guthrie-Test), der in West- und Ostdeutschland seit 1966 bei jedem Neugeborenen durchgeführt wird, verdanken wir Robert Guthrie. Er entwickelte hierzu 1963 einen mikrobiologischen Hemmtest (*Guthrie 1963*). In Deutschland, in Österreich und in einigen anderen europäischen Ländern erfolgt die Untersuchung auf HPA im Rahmen erweiterter Neugeborenen-Screeningprogramme inzwischen mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie.

1.1.2 Definitionen und Häufigkeit

Die Diagnose einer Hyperphenylalaninämie (HPA) beruht in der Regel auf einem positiven Neugeborenen-Suchtest, der durch eine quantitative Kontrolluntersuchung der Aminosäuren im Plasma bestätigt wird.

Eine Plasma-Phenylalaninkonzentration über 2 mg/dl (120 µmol/l) bei einer Phenylalanin/Tryosin-Ratio über 3 wird als HPA bezeichnet. Sie entsteht entweder durch eine Funktionseinschränkung des Enzyms Phenylalaninhydroxylase (PAH) oder durch einen Mangel des Kofaktors der PAH, Tetrahydrobiopterin (BH₄). Darüber hinaus kommen transitorische bzw. exogen bedingte HPA vor.

Die HPA ist in der Bundesrepublik Deutschland mit einer Inzidenz von etwa 1:7000 Neugeborenen der häufigste genetische Defekt im Aminosäurenstoffwechsel. Etwa 98% dieser Patienten leiden an einem Defekt der PAH, bei etwa 2% besteht eine genetisch bedingte Störung der Synthese oder der Regeneration des Kofaktors BH₄. Die Heterozygotenfrequenz für alle Formen der HPA liegt bei ca. 1:40 (*Muntau 2000*).

1.1.3 Pathogenese

1.1.3.1 HPA durch Defekt der PAH

Die PAH spielt beim Abbau von Phenylalanin eine zentrale Rolle, sie verstoffwechselt den größten Teil der Aminosäure (*Scriver 1999*).

Das Enzym ist durch reversible Phosphorylierung interkonvertierbar und beim Menschen bisher nur im Cytosol der Leber nachweisbar. Es gehört zu den mischfunktionellen Oxygenasen, d.h. Enzymen, die mit molekularem Sauerstoff arbeiten, wobei ein Sauerstoffatom in das Substrat eingebaut wird, während das andere Sauerstoffatom mit Wasserstoff zu Wasser reagiert.

Bei der irreversiblen Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin wird ein Sauerstoffatom in Parastellung in den aromatischen Ring eingeführt (Hydroxylierung); als Wasserstoffdonator für die Wasserbildung dient BH₄. Die PAH entfaltet ihre volle Aktivität erst nach der Geburt, in der Leber des menschlichen Feten sind nur ganz geringe Aktivitäten nachweisbar.

Durch die verminderte Aktivität der PAH kommt es zu einer Akkumulation von Phenylalanin in Zellen und Körperflüssigkeiten. Gleichzeitig wird weniger Tyrosin gebildet, das dadurch zur essentiellen Aminosäure wird. Durch den Enzymblock weicht der Phenylalaninabbau auf alternative Stoffwechselwege aus:

- Durch Transaminierung entsteht aus Phenylalanin Phenylpyruvat, eine Ketocarbonsäure, deren vermehrtes Auftreten in Blut und Urin der Krankheit den Namen verliehen hat; durch Hydrierung kann Phenylpyruvat in Phenyllactat umgewandelt werden.
- Durch Decarboxylierung entsteht Phenylacetyl-CoA, das vorwiegend nach Konjugation mit Glutamin im Urin als Phenylacetylglutamin nachgewiesen werden kann, aber auch zu Phenylacetat und CoA-SH hydrolysiert wird; außerdem kann Phenylalanin zu Phenylethylamin decarboxyliert und anschließend zu Phenylacetat dehydriert und desaminiert werden.

Die Entstehungsmechanismen der schweren Hirnschädigung bei unbehandelter HPA sind bisher nicht vollständig geklärt. Einerseits handelt es sich um eine irreversible Schädigung von Hirnstrukturen, die zur mentalen Retardierung der Patienten führt. Das während der frühkindlichen Entwicklung rasch wachsende und sich differenzierende Zentralnervensystem ist in dieser Hinsicht besonders gefährdet. Andererseits spielen bei hoher Phenylalaninkonzentration reversible toxische Effekte eine Rolle, die neurophysiologische Störungen und Verhaltensauffälligkeiten verursachen.

Folgende Hypothesen zur Entstehung der zerebralen Schädigung werden diskutiert:

- Phenylalanin konkurriert mit anderen Aminosäuren um den Transport über die Blut-Hirn-Schranke. Die Erhöhung von Phenylalanin im Blut hemmt kompetitiv den Einstrom anderer Aminosäuren in das Gehirn, wodurch es zu einer Störung der intrazerebralen Proteinsynthese und möglicherweise der Myelinisierung von Nervenfasern kommt (*Surtees und Blau 2000*).
- Die Konkurrenz von Phenylalanin mit Tyrosin und Tryptophan an der Blut-Hirn-Schranke führt zu einer verminderten Synthese der Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin und Serotonin im Gehirn. Durch Hemmung der Tyrosinhydroxylase und der Tryptophanhydroxylase infolge der hohen intrazerebralen Phenylalaninkonzentration wird die Neurotransmittersynthese zusätzlich beeinträchtigt (*Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria 1993*).
- Bei einer Phenylalaninkonzentration von nur 600 $\mu\text{mol/l}$ erfolgt *in vitro* eine spezifische Hemmung der ATP-Sulfurylase, wodurch *in vivo* ein pathologisch vermehrter Myelinabbau induziert wird (*Matsuo 1987*).
- Der Plasmaphenylalanin Gehalt eines Feten mit Defekt der PAH ist etwa doppelt so hoch wie der seiner Mutter. Hierdurch könnte möglicherweise eine pränatale Schädigung von PKU-Kindern auftreten (*Hanley 1996*).

1.1.3.2 HPA durch genetisch bedingte Störungen der Synthese oder Regeneration von BH₄ („atypische PKU“)

5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄) ist ein Pteridin. Bei Pteridinen handelt es sich um eine große, strukturell heterogene Gruppe natürlich vorkommender heterozyklischer Substanzen, die bei der Biosynthese von Kofaktoren und Vitaminen eine wichtige Rolle spielen. Derivate mit einer 2-Amino-4-Oxo-Gruppe werden Pterine genannt. Sie

kommen in Körperflüssigkeiten und Geweben in reduzierter und oxidierten Form vor, aber nur die 5,6,7,8-Tetrahydro-Form ist biologisch aktiv. BH_4 entsteht entweder *de novo* aus Guanosintriphosphat oder es wird aus präexistierenden Dihydrobiopterinen regeneriert.

BH_4 ist Kofaktor für die enzymatisch gesteuerte Hydroxylierung von Phenylalanin zu Tyrosin, von Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan sowie von Tyrosin zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin. Darüber hinaus ist BH_4 im zentralen Nervensystem als Kofaktor der NO-Synthase ein wichtiger neuroprotektiver Faktor.

BH_4 übt seine Kofaktorfunktion durch die Übertragung molekularen Sauerstoffs auf das Substratmolekül aus.

Störungen im Syntheseweg von BH_4 können wie der Defekt der PAH Ursache für eine HPA sein. Ausgehend von Guanosintriphosphat (GTP) katalysieren die Enzyme GTP-Cyclohydrolase 1 (GTPCH 1) [EC 3.5.4.16], 6-Pyruvoyltetrahydropterinsynthase (PTPS) [EC 4.6.1.10] und Sepiapterinreduktase [EC 1.1.1.153] die körpereigene Synthese von BH_4 (Abbildung 1).

Bei mangelnder Aktivität des Enzyms Dihydropteridinreduktase (DHPR) [EC 1.6.99.7], das Dihydrobiopterin zu BH_4 reduziert, oder der Pterin-4a-Carbinol-Amindehydratase [EC 4.2.1.96], liegt BH_4 ebenfalls nicht in seiner aktiven Form vor und man spricht von einer Regenerationsstörung von BH_4 (Abbildung 1 und 2).

Als Kofaktor der Tryptophan- und Tyrosin-Hydroxylase ist BH_4 für die Neurotransmittersynthese essentiell. Bei BH_4 -Mangel sind daher erniedrigte Konzentrationen von Homovanillinsäure und 5-Hydroxyindolessigsäure im Liquor nachweisbar. Darüberhinaus kommt es bei verminderter BH_4 -Konzentration zu einer Akkumulation abnormer Pterine (Neopterin/Biopterin) (Thöny 2000) (Abbildung 1).

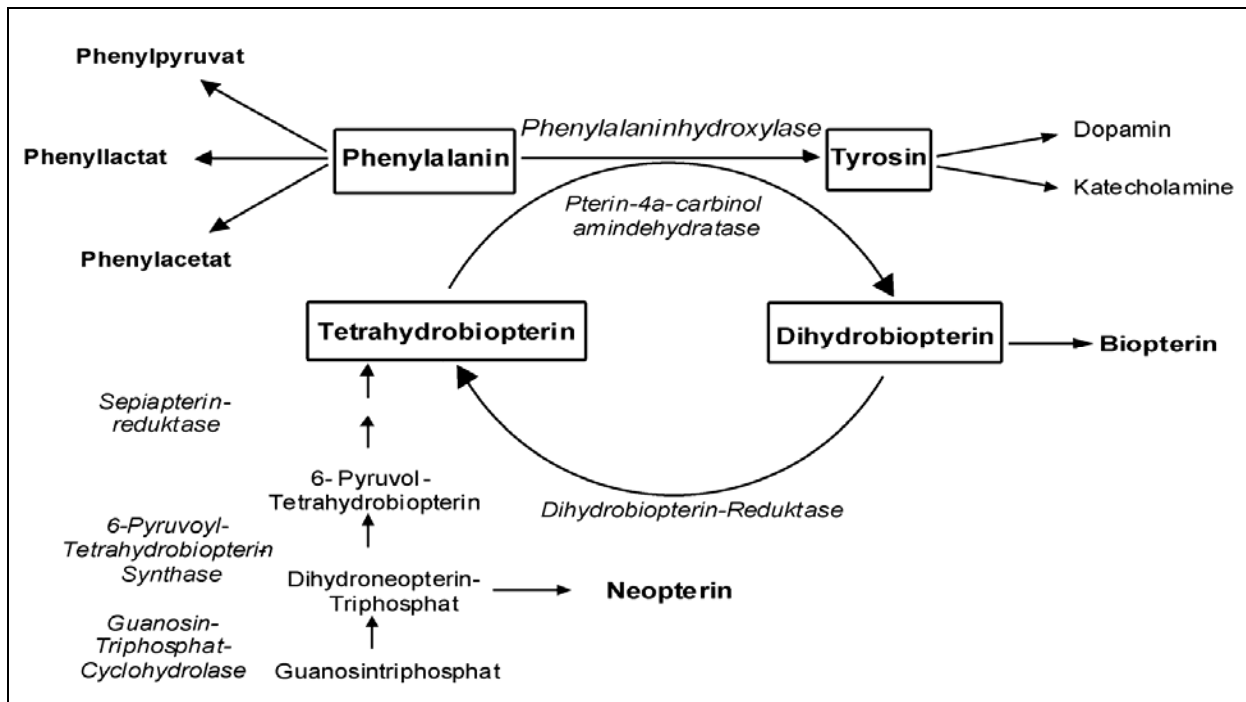


Abbildung 1: Der Stoffwechsel von Phenylalanin und BH₄. Die PAH katalysiert die Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin. BH₄ ist das Koenzym der PAH. BH₄ wird in mehreren enzymatischen Schritten aus GTP synthetisiert. Die DHPR regeneriert BH₄ aus Dihydrobiopterin.

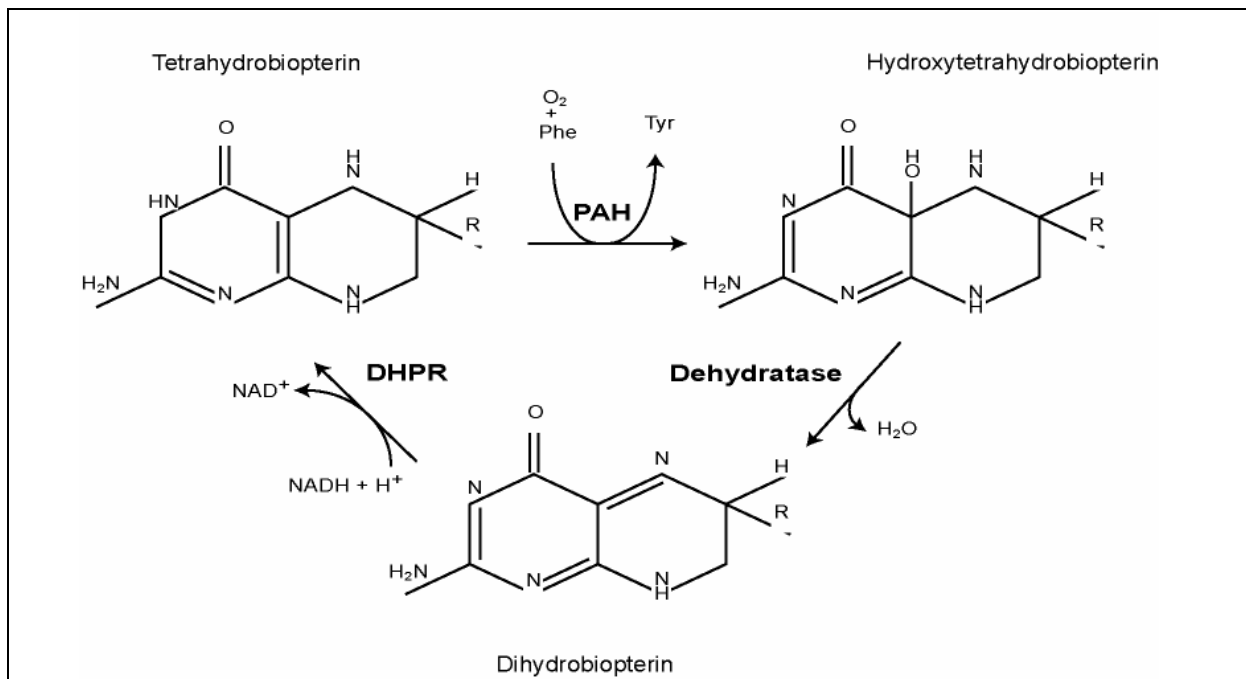


Abbildung 2: Das System der Hydroxylierung von Phenylalanin zu Tyrosin ist die Summe dreier Reaktionen und deren jeweiligen Enzyme. In Gegenwart des aktiven BH₄ wandelt die Phenylalaninhydroxylase Phenylalanin zu Tyrosin und BH₄ zu 4- α -Hydroxytetrahydrobiopterin um. Dieses Carbinolamin wird durch die 4- α -Carbinolamin-Dehydratase (Dehydratase) zu Dihydrobiopterin umgewandelt. Der Kreislauf schließt sich mit der Reduktion von Dihydrobiopterin zu BH₄ durch die DHPR (Scriver und Kaufman 2001).

1.1.4 Klassifikation und klinische Verlaufsformen

In Abhängigkeit der Restaktivität der PAH kommt es zu unterschiedlich hohen prätherapeutischen Phenylalaninkonzentrationen im Blut, aus denen sich unterschiedliche klinische Phänotypen mit abnehmendem Schweregrad ableiten.

Tabelle 1: Klassifikation der genetisch bedingten HPA bei Defekt der PAH (*Blaug 1994*)

Klinische Phänotypen	Prätherapeutische Phenylalaninkonzentrationen im Blut
Klassische PKU	> 1200 $\mu\text{mol/l}$
Milde PKU (non-PKU HPA)	< 1200 $\mu\text{mol/l}$ und > 600 $\mu\text{mol/l}$
Milde HPA	< 600 $\mu\text{mol/l}$ und > 120 $\mu\text{mol/l}$

Bei unbehandelten *Patienten mit Defekt der PAH* stehen klinisch neurologische Symptome im Vordergrund: Ab dem Ende des ersten Lebensjahres entwickelt sich ein hochgradiger, zumeist progredienter mentaler Entwicklungsrückstand. Bei etwa 25% der unbehandelten PKU-Patienten treten zerebrale Krampfanfälle auf, EEG-Veränderungen sind in 75-90% der Fälle zu beobachten. Sowohl Pyramidenbahnzeichen (gesteigerte Muskeleigenreflexe) als auch Zeichen einer extrapyramidalen Störung (erhöhter Muskeltonus) sind häufig. Das Bewegungsmuster ist hyperkinetisch. Das Kopfwachstum ist beeinträchtigt. Nicht selten werden Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität, aggressives Verhalten und Zerstörungswut, unkontrollierbare Erregungszustände mit Zornesausbrüchen und Selbstverstümmelungstendenzen beobachtet. Auch schizophrenieähnliche Manifestationen und depressive Krankheitsbilder sind bekannt (*Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria 1993*).

Das klinische Bild einer sogenannten *atypischen PKU bei BH₄-Mangel* wird hingegen hauptsächlich durch den Neurotransmittermangel geprägt und erinnert an die Symptome des Morbus Parkinson: Hypokinesie, Hypomimie, Hyperhidrosis, okulogyre Krisen, Myoklonien, choreoathetotische Bewegungsstörung sind die Symptome des für diese Erkrankungsgruppe charakteristischen infantilen Parkinsonismus. Außerdem entstehen eine hochgradige Entwicklungsverzögerung und ein schwerer Intelligenzdefekt. Bei besonders schweren Verlaufsformen kann die

Erkrankung bereits im Kindesalter tödlich sein. Weniger schwere Verlaufsformen mit geringradiger psychomotorischer Retardierung, Bewegungsstörung und Epilepsie kommen vor. Asymptomatische Verlaufsformen oder solche, die lediglich im Rahmen kataboler Stoffwechselsituationen oder nach diätetischen Phenylalaninexzessen symptomatisch werden, wurden ebenfalls beschrieben.

Bei frühzeitigem Therapiebeginn ist bei Patienten mit atypischer PKU eine nahezu normale Entwicklung möglich. Dramatische Verbesserungen durch Einführung der Therapie wurden auch bei schwer erkrankten Patienten beobachtet. Dennoch ist das Auftreten neurologischer Symptome trotz frühen Therapiebeginns möglich. Diese treten bei Patienten mit Synthesedefekten häufiger auf als bei Patienten mit DHPR-Defekt, insbesondere wenn hier eine intrazerebrale Normalisierung der BH₄-Konzentration gelingt (*Muntau 2000*).

1.1.5 Diagnostisches Vorgehen zur Klassifikation der HPA bei positivem Neugeborenencreening

Bei jedem Neugeborenen, das im Neugeborenencreening eine HPA aufweist, muss nach Diagnosebestätigung mittels quantitativer Aminosäureanalyse die Differenzierung der zugrundeliegenden biochemischen Störung (Apoenzymdefekt versus Kofaktormangel) erfolgen.

Zum Ausschluß einer „atypischen PKU“ auf dem Boden eines BH₄-Mangels wurde vor etwa zwanzig Jahren ein BH₄-Belastungstest entwickelt (*Blaskovics 1974*). Hierzu erhält das Neugeborene, bei dem im Neugeborenencreening eine HPA nachgewiesen wurde, bei altersentsprechender Eiweisszufuhr 20 mg pro kg Körpergewicht BH₄ per os. Ein drastischer Abfall der Plasma-Phenylalaninkonzentration nach Gabe von BH₄ innerhalb von vier bis acht Stunden spricht für das Vorliegen eines Kofaktormangels. Sinkt die Plasma-Phenylalaninkonzentration nach Gabe von BH₄ nicht ab, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine klassische PKU durch Defekt des Apoenzym PAH vor. Die Diagnosestellung eines BH₄-Mangels wird durch eine Bestimmung der Biopterin- und Neopterinkonzentration im Urin sowie durch eine Aktivitätsbestimmung der DHPR in Erythrozyten vervollständigt.

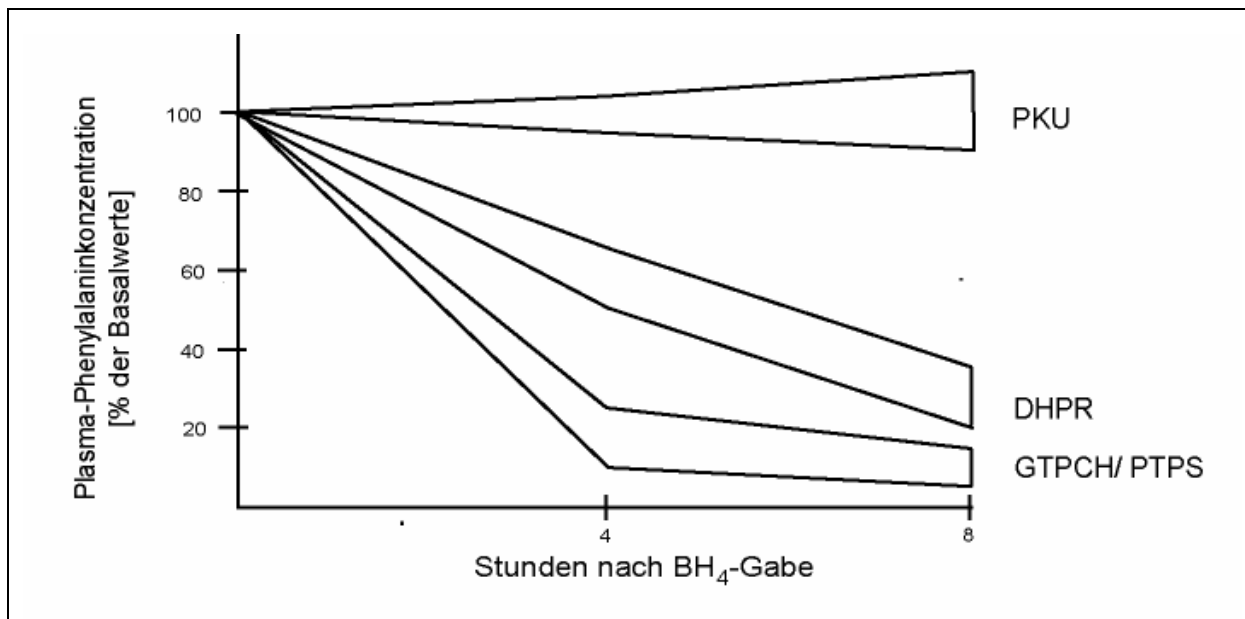


Abbildung 3: Typische Resultate eines BH_4 -Belastungstests. Es zeigt sich 8 Stunden nach BH_4 -Gabe ein deutlicher Abfall der Plasma-Phenylalaninkonzentration sowohl bei Regenerationsstörungen (DHPR) als auch bei Synthesestörungen (GTPCH/PTPS) von BH_4 , während bei Patienten mit klassischer PKU kaum Veränderungen erzielt werden (*Blau 1994*).

1.1.6 Vererbung

Die primär genetisch bedingte HPA wird autosomal rezessiv vererbt.

Das *PAH*-Gen liegt auf Chromosom 12 q22-24. Während die mRNA 2,4 kb lang ist, weist das *PAH*-Gen eine Länge von etwa 90 kb auf. Der für das Enzymprotein codierende Bereich verteilt sich dabei auf 13 Exons.

Die meisten Patienten sind compound-heterozygot, das heißt, sie sind Träger von jeweils zwei unterschiedlichen Mutationen des *PAH*-Gens. Da die Enzymaktivitätsminderung in Abhängigkeit der vorliegenden Mutation unterschiedlich stark ausfällt, führen verschiedene Mutationskombinationen zu unterschiedlich stark ausgeprägten Aktivitätsminderungen der PAH und damit zu unterschiedlich schweren Stoffwechseldefekten (*Scriver 2000*).

Bisher sind 527 verschiedene Mutationen im *PAH*-Gen beschrieben worden. Davon sind 62% Missense Mutationen, bei denen es als Folge einer Punkt- oder Codonmutation zum Austausch einer Aminosäure kommt, 13% sind kleine Deletionen mit Verlust eines distalen oder interkalaren Chromosomenstücks, 10% sind Splice-Mutationen, wobei es zu abnormer mRNA-Prozessierung kommt, 5% sind nonsense Mutationen, bei denen durch Basensubstitution ein Aminosäurekodon

in ein Stopkodon verwandelt wird und es so zu einem frühzeitigen Abbruch der Translation kommt und 2% sind kleine Insertionen, also Genmutationen, bei denen es zum Einbau eines oder mehrerer Nukleotide kommt.

Sämtliche bekannte Mutationen im *PAH*-Gen sind in einer umfassenden Datenbank zusammengefasst (www.pahdb.mcgill.ca).

1.1.7 Die diätetische Therapie der PKU

Die diätische Therapie der PKU ist erfolgreich und ermöglicht den Patienten bei frühzeitigem Beginn und bei konsequenter lebensbegleitender Einhaltung eine weitgehend normale neurologische und intellektuelle Entwicklung. Dennoch handelt es sich bei der streng eiweissarmen Diät nicht um eine „harmlose“, leicht einzuhaltende Therapiemassnahme, sondern um eine Lebensform, die von den Betroffenen strengste Disziplin erfordert. Die Patienten dürfen weder Fleisch, noch Fisch, Milchprodukte, Eier, Brot, oder Nudeln, kaum Süßigkeiten und Obst und Gemüse nur in geringen Mengen zu sich nehmen. Da Weizen und andere Getreidesorten sehr viel natürliches Protein enthalten, kommen Back- und Teigwaren aus speziellem eiweißarmem Mehl zum Einsatz. Die Eiweiß- bzw. Phenylalaninzufuhr aus allen Nahrungsmitteln muß genau berechnet werden. Gleichzeitig muß je nach Ausprägung der Enzymrestaktivität die individuelle Phenylalanintoleranz bestimmt werden (*Bremer 1997*). Hierbei handelt es sich um die Phenylalaninmenge, die der Patient zu sich nehmen kann, ohne, dass die Plasma-Phenylalaninkonzentrationen den therapeutischen Bereich überschreiten.

Tabelle 2: Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen zu Therapiezielen bei klassischer PKU (*Bremer 1997*).

Alter	Angestrebte Plasma-Phenylalaninkonzentration
1. bis 10. Lebensjahr	42 bis 240 µmol/l
11. bis 16. Lebensjahr	42 bis 900 µmol/l
16 Jahre und älter	< 1200 µmol/l

Die erlaubte tägliche Menge an natürlichem Eiweiß ist so gering, dass ein normales Wachstum sowie eine altersentsprechende körperliche Entwicklung nicht möglich wären. Deshalb muss eine Eiweißsubstitution mit einem phenylalaninfreien

Aminosäurengemisch erfolgen, das mit Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen angereichert ist. Die Kinder müssen bis zu 70 g Pulver, verteilt auf drei bis vier Einzelportionen zu den Mahlzeiten, einnehmen. Die Einnahme dieses Pulvers wird durch den extrem unangenehmen Geschmack der Präparate ganz erheblich erschwert.

Die diätetische Therapie ist belastend.

Die eiweissarme Diät bei PKU ist eine Form der Diät, die mit extremen Entbehrungen und Belastungen verbunden ist (Mac Donald 1997). Die Auswahl an natürlichen Lebensmitteln ist stark eingeschränkt. In vielen Fällen nimmt die Verabreichung der Aminosäurenmischung mehrere Stunden täglich in Anspruch, da die Kinder das Präparat auf Grund des schlechten Geschmacks nicht einnehmen wollen. Die eiweissarmen Spezialprodukte (Brot, Kuchen, Kekse, Teigwaren) sind hart, trocken und völlig farblos. Der Tagesablauf der Kinder ist in hohem Maße durch die Diäteinhaltung geprägt. Sämtliche Nahrungsmittel müssen sorgfältig gewogen und ihr Phenylalaningehalt berechnet werden. Sehr häufig treten Fütterungsschwierigkeiten auf, die zu Untergewicht führen (Mac Donald 1997). In der Schule kommt es regelmäßig zu einer Stigmatisierung der Patienten, da Kinder mit PKU niemals die Nahrungsmittel zu sich nehmen dürfen, die ihre Mitschüler essen. Kindergeburtstage und Klassenfahrten müssen minutiös geplant werden und führen unweigerlich zur sozialen Isolation der Patienten. Sie werden auf Grund ihrer ungewöhnlichen Essgewohnheiten gehänselt. Restaurantbesuche führen meistens zu unüberwindlichen Schwierigkeiten und werden daher in der Regel von den Familien gemieden (Mac Donald 1997). In einer Studie, in der die Probleme der Eltern, deren Kinder an PKU erkrankt sind, analysiert wurden, steht die Einhaltung der Diät führend vor weiteren 22 Problemen an oberster Stelle (Awiszus 1990). Die besondere Belastung der Patienten und ihrer Eltern besteht darin, dass jeder Diätfehler zu einer erhöhten Phenylalaninkonzentration im Blut führt und mit dem Risiko einer Intelligenzeinbuße bzw. mit dem Auftreten neurologischer Symptome verbunden ist.

Die diätbedingten Belastungen führen zu psychosozialen Problemen.

Es ist leicht vorstellbar, dass die Interaktionen zwischen Eltern und Kindern durch die chronische Erkrankung und die aufwendige Therapie in erheblichem Masse belastet

ist. In der Literatur finden sich zahlreiche Belege dafür, dass das Risiko für das Auftreten psychopathologischer Auffälligkeiten und familiärer Funktionsstörungen bei Patienten mit PKU unter diätetischer Therapie deutlich erhöht ist (*Moen 1977; Stevenson 1979; Holtzman 1986; Realmuto 1986; Reber 1987; Weglage 1992; Weglage 1996; Smith 2000*).

Die diätbedingten Belastungen führen zu einer schlechten Compliance.

Die Unannehmlichkeiten, die mit der Einhaltung einer streng phenylalaninarmen Diät verbunden sind, führen dazu, dass die Therapieempfehlungen in der Regel nicht eingehalten werden (*Walter 2002*). Nur einem geringen Prozentsatz der Kinder gelingt es, die Phenylalanin-Blutwerte dauerhaft unter dem empfohlenen Grenzwert zu halten (*Walter 2002; Holtzman 1986; Smith 1991; Beasley 1971; Griffiths 1997*). Die schlechte Compliance ist wiederum mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung irreversibler neurologischer Schäden mit Intelligenzverlust assoziiert.

Eine schlechte Compliance führt zu einer Verschlechterung der Langzeitprognose.

Es wurde mehrfach gezeigt, dass die Langzeitprognose der PKU hauptsächlich von der Qualität der diätetischen Führung abhängt. Die Deutsche PKU-Verbundstudie ergab, dass der durchschnittliche IQ Wert von Patienten mit einer Plasma-Phenylalaninkonzentration über 600 $\mu\text{mol/l}$ 10 Punkte unterhalb der Ergebnisse gesunder und derjenigen Patienten lag, die ihre Werte innerhalb des empfohlenen Bereiches hielten (*Burgard 1996*). Auch bei adoleszenten oder erwachsenen Patienten wirkt sich ein Diätabbruch ungünstig auf die Intelligenz aus. Durch Magnetresonanzuntersuchungen konnten darüber hinaus Veränderungen innerhalb der weißen Substanz und akute demyelinisierende Neuropathien nachgewiesen werden (*Villasana 1989; Pearsen 1990; Shaw 1990; Thompson 1990; Thompson 1991; Lou 1992; Mc Combe 1992; Walter 1993; Möller 1995*).

Diese Daten belegen, dass die lebensbegleitende Normalisierung der Plasma-Phenylalaninkonzentration bei Kindern mit PKU erzielt werden muß, um eine normale Intelligenz und eine gesunde neurologische Entwicklung zu erreichen. Unglücklicherweise zeigt sich in der Realität, dass dieses Ziel durch die starke Belastung der Diät meist nicht erreicht wird.

Die diätetische Therapie ist mit dem Risiko einer Fehlernährung assoziiert.

Die Nährstoffzufuhr ist durch die stark limitierte Auswahl an erlaubten Nahrungsmitteln erheblich eingeschränkt. Die verminderte Zufuhr kann über die Verabreichung der Aminosäuremischungen, die mit Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen angereichert sind, nur partiell ausgeglichen werden. Darüber hinaus wissen wir, dass auf Grund des schlechten Geschmacks der Präparate die Aminosäurepulver häufig nicht in der empfohlenen Dosierung eingenommen werden. Am häufigsten treten ein Vitamin B₁₂-Mangel (*Hanley 1996; Lee 1999*), ein Mangel an langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*Sanjurjo 1994; Giovannini 1996*) und ein Selen-Mangel (*Jochum 1997; Muntau 2002*) auf. Darüber hinaus ist die Osteoporose-Inzidenz bei Patienten, die jahrelang eine eiweissarme Diät einhalten, erhöht (*Schwahn 1998*).

Aus den Belastungen und Risiken, die mit der diätetischen Therapie der PKU assoziiert sind, ergab sich die Notwendigkeit der Entwicklung alternativer Therapieformen (*NIH 2001; Walter 2002*).

1.1.8 Alternative Therapieversuche

Seit 50 Jahren wird zur Behandlung der PKU eine lebensbegleitend einzuhaltende streng phenylalaninarme Diät empfohlen. Diese Behandlungsform ist zwar erfolgreich, kann aber wegen der erheblichen Belastungen für die Patienten und ihre Familien nicht als zufriedenstellend beurteilt werden. Die Entwicklung alternativer Therapieformen wird daher generell gefordert. Folgende Behandlungsmethoden wurden bisher in Betracht gezogen:

Somatische Gentherapie:

Erste Versuche, den Gentransfer in die Leber zu verbessern, wurden durch die Anwendung des rezeptor-vermittelten Gentransfers mit Hilfe nicht-viraler Systeme unternommen. DNA-Asialoglykoprotein-Komplexe wurden *in vitro* zwar erfolgreich in Hepatozyten transferiert (*Cristiano 1993*), *in vivo* konnte jedoch eine nur sehr geringe Transfektionseffizienz erreicht werden (*Wu 1995*). Aufgrund dieser Limitationen wurden nicht-virale Gentransfersysteme zur Therapie der PKU bisher nur vereinzelt eingesetzt. Die Vorteile adenoviraler Gentransfer-Vektoren wie die hohe Transfektionseffizienz und die Fähigkeit, auch nicht teilende Zellen zu transfizieren,

führte zu ihrem Einsatz beim *in vivo* Transfer von *PAH*-cDNA in die Leber der Maus. Die Injektion des *PAH*-cDNA-enthaltenden adenoviralen Vektors führte innerhalb einer Woche zu einem signifikanten Anstieg der *PAH*-Aktivität bei vollständiger Normalisierung der Phenylalaninkonzentration im Blut (*Fang 1994*). Durch das Auftreten neutralisierender Antikörper gegen den adenoviralen Vektor persistierte der therapeutische Effekt jedoch nur wenige Wochen und ließ sich auch durch wiederholte Injektionen nicht wiederherstellen (*Eisensmith 1996*). Ebenfalls konnte, unter Verwendung rekombinanter retroviraler Vektoren aus Onkoretroviren, die in isolierte Hepatozyten der PKU-Maus transferiert wurden, eine hohe Expression des *PAH*-Gens erzielt werden (*Liu 1992*). Bisher ist jedoch noch kein Bericht über einen erfolgreichen *in vivo* oder *ex vivo* *PAH*-Gentransfer bei PKU-Mäusen unter Verwendung rekombinanter retroviraler Vektoren erschienen. Die Anwendung onkoretroviraler Vektoren wird darüber hinaus durch die kürzliche Beobachtung des Auftretens von Leukämien bei Einsatz dieser Gentransfer-Systeme erschwert und macht weitere klinische Studien in nächster Zukunft eher unwahrscheinlich (*Hacein-Bey-Abina 2003*).

Je nach verwendetem Virus bestehen bei der Anwendung viraler Gentransfer-systeme, trotz ihrer hohen Effizienz, einige gewichtige Risiken. Virale Genvektorsysteme rufen in der Regel immunologische Reaktionen hervor und es besteht die Gefahr, dass Viren die Fähigkeit zur Replikation wiedererlangen und zu ungewollten Infektionen beim Patienten führen und die remutierten Viren Verbreitung finden. Der eigentliche Vorteil des retroviralen Gentransfers, dass die Erbinformation in das menschliche Genom stabil eingebaut werden kann, erweist sich hinsichtlich einer möglichen Mutagenese durch unkontrollierten Einbau als unkalkulierbares Risiko (*Kay 2003*).

Enzymersatztherapie:

Durch Substitution von Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) soll oral aufgenommenes Phenylalanin vor Aufnahme über die Dünndarmschleimhaut im Gastrointestinaltrakt abgebaut werden. Durch die verminderte Aufnahme von Phenylalanin normalisiert sich die Plasma-Phenylalaninkonzentration. Neben den hohen Kosten und der Suche nach einem spezifischen Proteasehemmer zur Verhinderung einer Degradierung der PAL durch intestinale Proteasen, konnten bisher keine Aussagen über immunologische Reaktionen bei Langzeittherapie gemacht werden (*Sarkissian 1999*).

Verabreichung großer neutraler Aminosäuren:

Durch eine Behandlung mit großen neutralen Aminosäuren wird versucht, das Gleichgewicht des Transportes von Phenylalanin und anderen großen neutralen Aminosäuren durch die Blut-Hirn-Schranke wiederherzustellen. Damit ließen sich die hohen intrazerebralen Phenylalaninkonzentration senken, deren toxische Effekte die neurophysiologischen Störungen und Verhaltensauffälligkeiten verursachen (*Van Spronsen 1998; Zielke 2002*).

1.1.9 BH₄-sensitive HPA

Seit 1999 sind in der Literatur einige Einzelfallberichte über Patienten mit PAH-Defekt erschienen, bei denen die orale Verabreichung pharmakologischer Dosen des natürlichen Kofaktors der PAH, BH₄, zu einem Absinken der Plasma-Phenylalaninkonzentration führte, obwohl kein Kofaktormangel vorlag (*Kure 1999; Spaapen 2001; Trefz 2001; Lindner 2001; Lässker 2002*).

Die therapeutische Gabe von BH₄ erfolgte bisher nur bei BH₄-Synthese-Defekten zur Substitution des fehlenden Kofaktors (*Danks 1975; Smith 1985*). Ein therapeutischer Einsatz von BH₄ bei Patienten mit einem PAH-Defekt war bisher nicht erwogen worden, da diese keinen BH₄-Mangel aufweisen.

Der zur Erfassung der Patienten mit Kofaktormangel entwickelte BH₄-Belastungstest mit einer Beobachtungsdauer von acht Stunden war bei oben genannten Patienten in der Regel negativ ausgefallen, da die Plasma-Phenylalaninkonzentration bei Patienten mit BH₄-sensitiver HPA durch Defekt des Apoenzyms ohne Kofaktormangel in den meisten Fällen erst später, also 12-24 Stunden nach Gabe von BH₄, abfällt.

Aus diesem Grund war bei diesen Patienten trotz durchgeführtem BH₄-Belastungstest in der Neugeborenenperiode viele Jahre lang das Phänomen der BH₄-Sensitivität übersehen worden.

1.2 Zielsetzung und Fragestellung

Der zufälligen klinischen Beobachtung der BH₄-Sensitivität bei Patienten mit Defekt der PAH durch Mutationen im *PAH*-Gen ohne Kofaktormangel sind wir im Rahmen einer systematischen klinisch-experimentellen Studie nachgegangen.

Ziel der Studie war es, einen Beitrag zur Aufklärung der biochemischen und molekularen Grundlagen der BH₄-sensitiven HPA bei PAH-Defekt zu leisten.

Im Detail sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Wie häufig ist das Phänomen des BH₄-sensitiven PAH-Defektes, also bei welchem Prozentsatz der Patienten mit Defekt der PAH durch Mutationen des *PAH*-Gens führt die Behandlung mit BH₄ zu einer signifikanten Reduktion der Plasma-Phenylalaninkonzentration?
- Führt BH₄ zu einer Verbesserung der Phenylalanin-Oxidationsrate *in vivo*, lässt sich also der Effekt von BH₄ auf die Plasma-Phenylalaninkonzentration auf eine Steigerung der PAH-Enzymaktivität zurückführen?
- Besteht für die BH₄-Sensitivität eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation, das heißt, wie verteilen sich die betroffenen Mutationen auf die Proteinstruktur der PAH und lässt sich das phänotypische Merkmal der BH₄-Sensitivität bei Kenntnis der zugrundeliegenden Mutation voraussagen?

2 Patienten und Methoden

2.1 Patienten

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden 38 Patienten mit HPA durch Defekt der PAH untersucht (Kenncode ID 1-38). Dabei handelte es sich um 24 weibliche und 14 männliche Patienten.

Abhängig von der Plasma-Phenylalaninkonzentration vor Beginn der diätetischen Behandlung wurden die Patienten folgendermaßen klassifiziert:

- 10 Patienten mit milder HPA
(Plasma-Phenylalaninkonzentrationen 120-600 $\mu\text{mol/l}$; Alter 15 Tage bis 10 Jahre/ Mittelwert: 4 Jahre und 1 Monat)
- 21 Patienten mit milder PKU
(Plasma-Phenylalaninkonzentrationen 600-1200 $\mu\text{mol/l}$; Alter 8 Tage bis 17 Jahre/ Mittelwert: 6 Jahre und 4 Monate)
- 7 Patienten mit klassischer PKU
(Plasma-Phenylalaninkonzentrationen $> 1200 \mu\text{mol/l}$; Alter 1 Tag bis 9 Jahre/ Mittelwert: 3 Jahre und 7 Monate)

Insgesamt untersuchten wir sieben Neugeborene, 24 Kinder unter 10 Jahren, 7 Kinder zwischen 10 und 15 Jahren und eine Patientin älter als 15 Jahre. Wir schlossen Geschwister in die Untersuchung mit ein, da die Phenylalanin-Homöostase auch durch nicht-genetische Faktoren beeinflusst werden kann. Bei ID 6 und 13 handelte es sich um türkische Geschwister, bei ID 15, 17 und 23 um italienische Geschwister und bei ID 30 und 31 um deutsche Geschwister.

Die Neugeborenen ID 8, 12, 19, 23 waren innerhalb der ersten Lebenswoche untersucht worden, und somit unterlag deren Ernährung bis zum Zeitpunkt der Untersuchung keiner Eiweißrestriktion. Eine Ausnahme machte Patientin ID 36, bei der auf Grund einer fetalen DNA-Analyse eine klassische PKU vor Beginn des Testes nachgewiesen worden war.

Bei den Geschwistern ID 6 und 13 war eine Diäteeinstellung wegen der geringen Compliance der Eltern trotz intensivster Bemühungen nicht möglich.

ID 18 erhielt eine stark restriktive Diät, da wiederholt Werte über dem angestrebten therapeutischen Bereich von 600 $\mu\text{mol/l}$ aufgetreten waren. Bei ID 10 und ID 16

wurde die Phenylalanin-Restriktion aufgehoben, da die Patienten älter als zehn Jahren waren und dabei keine Werte über 900 µmol/l aufwiesen.

Patienten mit milder oder klassischer PKU, die retrospektiv untersucht wurden, wurden entsprechend ihrer individuellen Phenylalanintoleranz mittels einer phenylalaninarmen Diät behandelt (*Bremer 1997*).

Ein Defekt der BH₄-Synthese oder -Regeneration war bei allen Patienten durch die Analyse der Pterine Neopterin und Biopterin im Urin (*Fukushima 1980; Nixon 1980*) und der Aktivität der DHPR in Erythrozyten ausgeschlossen worden (*Blau 1999; Surplice 1990*).

Bei allen Patienten wurde sowohl für die molekulargenetischen Untersuchungen als auch für den Atemtest mit ¹³C-markiertem Phenylalanin ein schriftliches Einverständnis der Erziehungsberechtigten eingeholt, da es sich ausschließlich um minderjährige Patienten handelte. Dem Einverständnis war jeweils ein ausführliches Aufklärungsgespräch vorausgegangen.

2.1.1 Kontrollkollektiv

Als Kontrollkollektiv dienten 12 gesunde (fünf weibliche /sieben männliche) Kinder im Alter zwischen 4 Tagen und 15 Jahren (Kenncode ID K-39 bis K-50). Bei keinem dieser Kinder war im Neugeborenenenscreening eine erhöhte Plasma-Phenylalaninkonzentration festgestellt worden (siehe Kapitel 3.5).

Tabelle 4: Charakterisierung der Patienten

Patientencharakterisierung					Untersuchung zum Ausschluß einer atypischen PKU		
ID	Alter in Jahren	Geschlecht	Plasma-Phenylalaninkonzentration vor Therapie [$\mu\text{mol/l}$]	Phenylalanintoleranz vor Therapie [mg/kg KG pro Tag]	Neopterin im Urin* (Normwert: 1,1-4,0 mmol/mol Kreatinin)	Biopterin im Urin* (Normwert: 0,5-3,0 mmol/mol Kreatinin)	DHPR-Aktivität in Erythrozythen (Normwert: 2,0-5,0 $\mu\text{U/g Hb}$)
1	0,2	W	360	voll gestillt	0,55	1,7	2,5
2	0,1	W	342	voll gestillt	1,53	0,43	2,9
3	0,1	W	288	voll gestillt	2,32	0,34	2,2
4	6,7	M	240	keine Diät	1,30	2,40	4,3
5	10	W	300	keine Diät	1,60	2,80	3,4
6	4,5	W	702	25	2,50	0,80	4,3
7	5	W	330	keine Diät	2,30	1,80	4,2
8	0,1	W	684	voll gestillt	4,26	0,72	2,2
9	4,5	W	174	keine Diät	3,50	0,90	3,7
10	12,9	W	678	keine Diät	9,59	1,22	3,9
11	6,9	W	150	keine Diät	2,10	2,30	3,7
12	0,1	W	750	voll gestillt	1,73	0,44	3,6
13	3,8	M	606	25	0,60	0,70	2,8
14	6,1	W	150	keine Diät	1,00	1,80	2,3
15	5,6	M	924	15	1,80	1,40	3,5
16	11,2	W	612	keine Diät	0,80	2,90	3,3
17	3,2	M	882	24	2,30	1,00	2,9
18	9,9	M	720	8,9	7,60	4,20	3,0
19	0,2	M	606	voll gestillt	7,36	1,78	2,5
20	0,6	W	750	56	4,30	0,70	2,3
21	7,5	W	690	25	1,60	1,29	2,1
22	4,7	M	756	17	2,10	5,10	2,8
23	0,1	W	622	voll gestillt	3,19	0,77	1,7
24	17,1	W	708	keine Diät	2,78	1,20	3,1
25	12,5	M	702	44	2,90	1,70	2,8
26	4,2	W	312	keine Diät	2,61	1,39	3,0
27	13	M	780	12,5	2,90	1,10	3,0
28	5,5	M	1500	12	6,40	1,80	4,0
29	4,2	W	846	17	3,40	1,80	3,4
30	10,9	M	738	25	1,01	1,81	2,3
31	12,8	W	600	21	4,60	2,40	2,2
32	8,7	W	654	17	11,12	3,53	2,9
33	0,6	W	1341	25	1,22	0,55	2,1
34	4,3	W	1860	13	3,90	0,70	3,5
35	9,5	M	1440	12	10,2	2,00	3,3
36	0,1	W	1210	19	7,14	2,61	2,5
37	1,3	M	1270	14	3,60	1,50	2,7
38	7	M	1450	10	6,60	0,90	2,9

* Geringgradige Abweichungen vom Normbereich sind ohne pathologische Relevanz.

2.2 Studiendesign

Die Studie gliedert sich in vier Abschnitte. Der erste Abschnitt beinhaltet einen ^{13}C -Phenylalaninoxidationstest ohne Gabe von BH_4 zur Bestimmung der prätherapeutischen Phenylalanin-Oxidation *in vivo*. Anschließend wurde bei jedem Patienten ein kombinierter Phenylalanin- BH_4 -Belastungstest durchgeführt (zweiter Abschnitt). Der dritte Abschnitt beinhaltete einen zweiten ^{13}C -Phenylalaninoxidationstest unter Kurzzeittherapie mit BH_4 mit einem Abstand von mindestens 48 Stunden zum ersten Belastungstest, um den Effekt pharmakologischer Dosen des Kofaktors auf die Aktivität der PAH *in vivo* zu untersuchen. Darüber hinaus wurde bei allen Patienten eine Mutationsanalyse des *PAH*-Gens durchgeführt.

Erster ^{13}C -Phenylalanin (6 mg/kg)-Atemtest

ohne BH_4

Atemproben:

im 5 min Intervall für 80 min, im 10 min Intervall für 100 min

Kombinierter Phenylalanin- BH_4 -Belastungstest

Blutprobe (Phenylalanin im Vollblut)

Phenylalanin Belastung (100 mg/kg p.o.)

Blutprobe (Phenylalanin im Vollblut) nach 1 h

BH_4 -Belastung (20 mg/kg p.o.)

Blutproben (Phenylalanin im Vollblut): nach 4 h, 8 h, 15 h

Zweiter ^{13}C -Phenylalanin (6 mg/kg)-Atemtest

mit BH_4

Atemproben:

im 5 min Intervall für 80 min, im 10 min Intervall für 100 min

Mutationsanalyse *PAH*-Gen

Abbildung 4: Übersicht über die einzelnen Studienabschnitte

2.3 Kombiniertes Belastungstest mit Phenylalanin und BH₄

Die Phenylalaninbelastung erfolgte mittels einer Mahlzeit, die 100 mg L-Phenylalanin pro kg Körpergewicht enthielt und den individuellen Ernährungsgewohnheiten des Patienten entsprechend zusammengestellt wurde. Bei den Neugeborenen wurde die Phenylalaninmenge in Form eines Eiweißkonzentrates (Protein 88, Novartis, Osthofen) über eine Magensonde verabreicht.

Eine Stunde nach Ende dieser Phenylalaninbelastung nahmen die Patienten 20 mg BH₄ (Schricks Laboratories, Jona, Schweiz) pro kg Körpergewicht ein. Dabei wurden die Tabletten in Wasser aufgelöst und unmittelbar getrunken bzw. bei den Neugeborenen über eine Magensonde verabreicht.

Zur Bestimmung der Phenylalaninkonzentrationen im Vollblut wurde vor und eine Stunde nach der Phenylalaninbelastung sowie vier, acht und fünfzehn Stunden nach der Gabe von BH₄ kapillär Blut abgenommen und auf Filterpapierkarten aufgetragen. Während des Testes wurden die Neugeborenen mit Muttermilch oder volladaptierter Säuglingsnahrung gefüttert. Die älteren Kinder erhielten 6 bis 8 Stunden nach BH₄-Gabe jeweils eine standardisierte Mahlzeit mit 10 mg Phenylalanin pro kg Körpergewicht.

Analyse der Phenylalaninkonzentration im Vollblut

Die Phenylalaninkonzentrationen im Vollblut wurden mittels Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie bestimmt (*Chace 1993; Millington 1990*).

Der Tandemmassenspektrometer besteht dabei aus zwei hintereinandergeschalteten Massenspektrometern (MS), die mit einer Kollisionszelle verbunden sind. Dabei erlaubt die Elektrospray-Ionisation die kontinuierliche Injektion flüssiger Proben in das MS ohne, dass die zu analysierenden Moleküle schon in der Ionenquelle in Bruchstücke zerfallen (*Smith 1990; Griffiths 2001*).

Für die Analyse werden aus den blutgetränkten Filterpapierkarten kreisförmige Areale von 4,3 mm Durchmesser ausgestanzt. Diese Stanzlinge werden in Mikrotiterplatten zunächst mit Methanol versetzt. Dem Methanol sind die deuterierten Standards zugesetzt. Die Methanollösung dient neben der Extraktion der Aminosäuren auch der Proteinfällung sowie der Abtrennung des Extrakts von der verbleibenden Papiermatrix. Nach Eindampfen des Methanols erfolgt die Derivatisierung mit Butanol-HCl. Nach erneutem Eindampfen werden die Butylester

in einem Methanol- Wasser-Gemisch aufgenommen und mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ in die Ionenquelle injiziert. Hier wird das Untersuchungsmaterial unter Hitze im Hochvakuum in Ionen überführt. Die erzeugten positiv geladenen Ionen werden anschließend ladungsabhängig in einem elektrischen Feld beschleunigt und zu einem monoenergetischen Ionenstrahl gebündelt. Dieser wird in ein erstes Massenspektrometer geführt, in dem eine Vorselektion der Ionen entsprechend ihres Masse/Ladung-Verhältnisses erfolgt. Hierbei wird der Ionenstrahl durch ein Hochfrequenzfeld, das durch vier konzentrisch parallel zueinander angeordnete Stabelektroden erzeugt wird, massenabhängig in Schwingung versetzt. Die Schwingungsamplitude bleibt nur für Ionen einer bestimmten Masse so groß, dass sie passieren können. Die vorselektierten Ionen gelangen dann in eine mit Inertgas (Stickstoff) gefüllte Kollisionszelle, in der die Molekülionen durch die Stoßenergie bei der Kollision mit den Gasmolekülen in spezifische Bruchstücke zerfallen (Fragmentation der Moleküle). Die Aminosäuren spalten dabei immer ein Neutralteilchen der Masse 102 Dalton ab. Durch diese Charakteristik können Aminosäuren von anderen Metaboliten getrennt werden, z. B. spalten Acylcarnitine ein Neutralteilchen der Masse 85 Dalton ab. Die fragmentierten Ionen werden in einem zweiten MS aufgetrennt und anschließend einem Detektor zugeführt. Aus den Masse-Ladungs-Verhältnissen des Ausgangsmoleküls (1. MS) und den Spaltprodukten (2. MS) können beliebige Metabolite äußerst sensitiv und spezifisch bestimmt werden.

Die Untersuchungen wurden im Rahmen einer Kooperation im Labor Dr. Becker, Dr. Olgemöller und Partner in München durchgeführt.

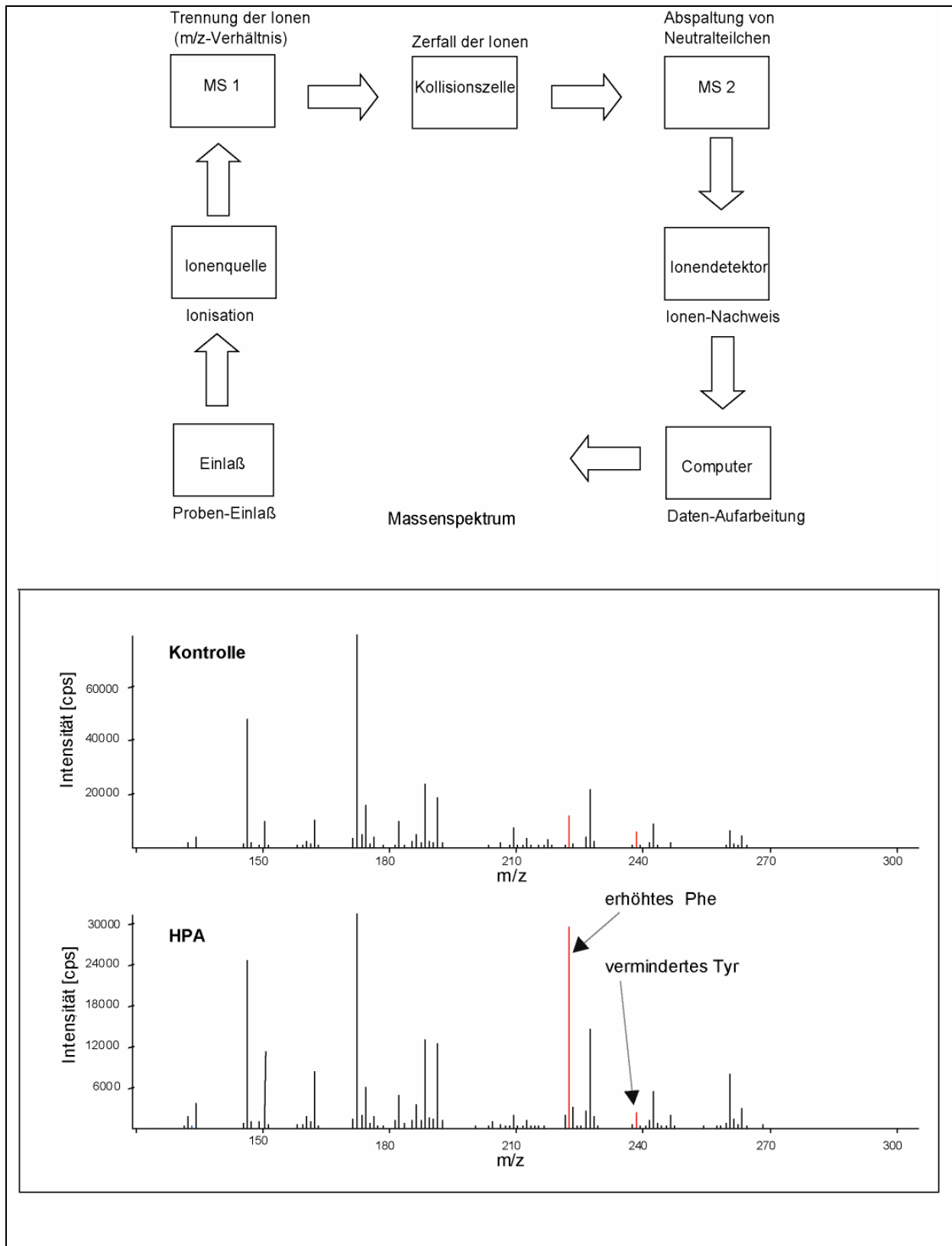


Abbildung 5: Ablauf der Tandem-Massenspektrometrie.

2.4 ^{13}C -Phenylalaninoxidationstest

Die älteren Patienten wurden nüchtern zwischen 7.00 und 9.00 Uhr einbestellt. Bei den Neugeborenen wurde der Untersuchungsbeginn den Stillzeiten angepasst. Vier Stunden nach einer Mahlzeit wurde mit dem Test begonnen.

Vor Beginn der Untersuchung wurden Körpergewicht und Körpergröße ermittelt. Zur Bestimmung der Oxidationsrate von Phenylalanin *in vivo* wurde jedem Probanden 6 mg/kg Körpergewicht L- [$1\text{-}^{13}\text{C}$] Phenylalanin (Euriostop, Paris, Frankreich) oral verabreicht. Dabei wurde der Tracer in 25% Glucose-Saccharid-Lösung (Dextroneonat, SHS, Heilbronn) und in Fencheltee in einer Konzentration von 2 mg/ml aufgelöst. Während bei den älteren Kindern in einen speziellen Atembeutel bzw. direkt in ein Proberöhrchen mit einem Strohhalm ausgeatmet wurde, wurde die Ausatemluft bei den Neugeborenen über eine Nasenbrille in eine 10 ml Spritze abgesogen. Die Ausatemluft wurde in Vakutainern (Labco, Buckinghamshire, UK) bis zur Analyse mittels Isotopen-Ratio-Massenspektrometrie (deltaS, Thermoquest, Bremen, Deutschland) aufbewahrt.

15, 10 und 5 Minuten vor der Tracer-Einnahme wurde jeweils ein basaler Ausgangswert gemessen. Nach der Tracer-Einnahme wurde zuerst über einen Zeitraum von 80 Minuten alle 5 Minuten, dann während der folgenden 100 Minuten alle 10 Minuten eine Ausatemluftprobe (10 ml) gewonnen.

Frühestens 3 Tage nach dem ersten ^{13}C -Phenylalaninoxidationstest führten wir den zweiten Atemtest durch. Jeder Proband erhielt zuvor über einen Zeitraum von 30 Stunden 10 mg $\text{BH}_4/\text{kg KG}$ pro Tag, wobei die letzte Dosis drei Stunden vor Beginn des Atemtestes eingenommen werden sollte. Der weitere Ablauf des zweiten Atemtestes erfolgte in Analogie zum ersten.

Bestimmung von $^{13}\text{CO}_2$ in der Ausatemluft

^{13}C -markiertes Phenylalanin wird rasch nach oraler Gabe im Duodenum resorbiert und über den Zitronensäurezyklus zu $^{13}\text{CO}_2$ metabolisiert. Während radioaktive Isotope anhand ihrer Strahlung detektiert werden können, reicht bei stabilen Isotopen der geringfügige Massenunterschied von nur einem Neutron zur Detektion aus. Die Bestimmung von $^{13}\text{CO}_2$ in der Ausatemluft erfolgte mittels Gas-Isotopen-Massenspektrometrie („gas isotope ratio mass spectrometry“) (Preston 1988). Das

Prinzip dieser Untersuchung besteht darin, dass zunächst gaschromatographisch aus den Atemgasen Kohlendioxid abgetrennt wird, das in das eigentliche MS gelangt. In einer Ionenquelle werden die Kohlenstoffmoleküle durch Elektronenbeschuss ionisiert und danach in einem konstanten Hochspannungsfeld beschleunigt. Dabei nehmen leichtere Ionen höhere Geschwindigkeiten auf als schwerere Ionen gleicher Ladung. Beim anschließenden Flug durch ein Magnetfeld werden schnelle Ionen durch die Lorenzkraft stärker abgelenkt. So beschreiben schwerere und leichtere Ionen unterschiedliche Flugbahnen, werden räumlich voneinander getrennt und können somit selektiv auf verschiedenen Kollektoren aufgefangen werden. Beim Aufprall der Ionen auf die Kollektoren werden Stromsignale gemessen, die als Verhältnis der schwereren zu den leichteren Ionen ausgewertet werden.

Die $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate in der Ausatemluft wurde ausgehend von einer Gesamt CO_2 -Produktion von 300 mmol/ Stunde \times m² Körperoberfläche berechnet (*Treacy 1997; Vantrappen 1989*).

Die Körperoberfläche (BSA) wurde durch Größe und Gewicht nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{BSA (m}^2\text{)} = \text{Gewicht (kg)}^{0,5378} \times \text{Größe (cm)}^{0,3964} \times 0,024265 \text{ (Haycock 1978)}$$

Das gemessene Isotopenverhältnis der Probe wird unter Bezug auf das bekannte Isotopenverhältnis eines Standardgases (International limestone standard, PeeDeeBelmnite (PDB)) als sogenannter Deltawert ausgedrückt. Bezogen auf diesen errechnen sich die prozentualen ^{13}C -Konzentrationen als Ergebnis des $^{13}\text{CO}_2$ -Atemtests, die auch als PCR Wert (Percentage of ^{13}C recovered) oder $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate bezeichnete werden und über die sich der dynamische Prozeß der Untersuchung darstellen lässt.

Die numerische Addition der PCR ermittelt die kumulative PCR oder kumulative $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate, mit Hilfe derer eine Aussage über den globalen Prozeß der Untersuchung gemacht werden kann (*Ghoos 1993*).

Die Atemgasanalysen wurden von Herrn Dr. H. Demmelmair im Stoffwechsellabor der Kinderklinik (Prof. Dr. B. Koletzko) durchgeführt.

Tabelle 6: Gemessene und berechnete Parameter der ^{13}C -Atemteste (Braden 2003)

Parameter	Symbol	Berechnung
Isotopenverhältnis in der Atemprobe	R_P	Anzahl der „schweren,, Moleküle $^{13}\text{CO}_2$ / Anzahl der „leichten,, Moleküle $^{12}\text{CO}_2$
Isotopenverhältnis in einem Standard-Gas (PeeDeeBelmnite mit $R_{\text{PDB}} = 0,01123$)	R_{STD}	Anzahl der „schweren,, Moleküle $^{13}\text{CO}_2$ / Anzahl der „leichten,, Moleküle $^{12}\text{CO}_2$
Delta-permille-Wert	δ	$((R_P / R_{\text{STD}}) - 1) \times 100$
Delta-over-baseline-Wert ¹	DOB	$\delta_{\text{Probe}} - \delta_{\text{Ausgangswert vor Tracerapplikation}}$
$^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate pro h ²	%Dosis/h	$\frac{(\text{Menge abgeatmetes } ^{13}\text{C pro h} \times 100)}{(\text{Menge eingesetztes } ^{13}\text{C})}$ = $\frac{\text{DOB} \times R_{\text{STD}} / 1000 \times \text{CO}_2 - \text{Produktion} \times 100}{\text{mg Substrat/MG} \times n \times \text{BSA}}$
Kumulierte $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate	%Dosis	Integration der $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate über die Zeit

¹ Aufgrund des schwankenden natürlichen ^{13}C -Isotopenvorkommens im menschlichen Körper werden alle gemessene $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherungen in den Atemproben auf einen basalen Ausgangswert vor Aufnahme der Tracersubstanz bezogen (Delta-over-baseline-Wert).

² Zur Quantifizierung des Atemtests lässt sich berechnen, wie viel Prozent der ursprünglich im Tracermolekül eingesetzten Menge ^{13}C wieder als $^{13}\text{CO}_2$ abgeatmet wird (Wiederfindungsrate). Dazu ist es erforderlich, die endogene Gesamtkohlendioxidproduktion zu kennen oder abzuschätzen. Diese wurde über die Körperoberfläche approximiert.
BSA, Körperoberfläche; n, Anzahl der ^{13}C -Atome im Substratmolekül; MG, Molekulargewicht des Substrats

2.5 Mutationsanalyse des PAH-Gens

Für die DNA-Präparation standen zwischen 1,5 und 5 ml Vollblut (EDTA-Blut) zur Verfügung. Nach Lyse der Erythrozyten wurden die Leukozyten abzentrifugiert. Anschließend wurde das Leukozyten-Pellet mit Proteinase K-Puffer inkubiert, um noch vorhandenes Protein abzuspalten. SDS als Detergenz lysiert die Zellmembranen der Leukozyten. Mit Hilfe von Ethanol wurde die genomische DNA gefällt, gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde sie in TE-Puffer gelöst und bei 4 °C gelagert.

Die 13 genomischen Fragmente mit den Exon flankierenden Sequenzen des *PAH*-Gens wurden mittels Polymerase Ketten Reaktion (PCR) amplifiziert und sequenziert.

Die nicht-radioaktive Sequenzierung von PCR-Produkten mittels *Cycle Sequencing* beruht wie die radioaktive Sequenzierung auf dem Kettenabbruch (*Sanger 1977*). Bei der nicht-radioaktiven Methode werden statt eines radioaktiv markierten Nukleotids vier mit Fluorescein-Farbstoffen markierte Didesoxynukleotide (Terminatoren) verwendet. Der Einbau der markierten Nukleotide erfolgt in einer PCR-Reaktion mit nur einem Primer. Da jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff markiert ist, wird nur ein Sequenzier-Ansatz benötigt (*Guldberg 1993*). Nach der Sequenzierung wurden die Proben gereinigt, um nicht eingebaute, fluoreszenzmarkierte Nukleotide zu entfernen. Die Mutationsanalyse erfolgte zum Teil im Labor Dr. Nevinny-Stickel, München, zum Teil im Labor von Prof. Dr. E. Albert in der Kinderpoliklinik und zum Teil im eigenen Labor (molekulargenetisches Labor der Kinderklinik) mit einem ABI 16-Kapillar-Sequenzierer (ABI 3100). Ausgewertet wurden die Sequenzen mit Hilfe des Computerprogrammes Sequence Navigator TTP1.0 der Firma Applied Biosystems.

2.6 Strukturelle Lokalisation der Mutationen auf dem PAH-Protein

Für das Verständnis der biochemischen Funktion eines Proteins sind Kenntnisse über den Aufbau dessen dreidimensionaler Struktur hilfreich.

So wurde zunächst ein N-terminal trunkiertes Homodimer (Aminosäurereste 103-424) der humanen Phenylalaninhydroxylase kristallisiert (*Erlandsen 1997*) und mittels Röntgenstrukturanalyse genauer untersucht (*Erlandsen 1997*). In der Folge gelang es, die humane Phenylalaninhydroxylase als N-terminal trunkiertes Homotetramer (Aminosäurereste 118-452) zu kristallisieren (*Fusetti 1998*). Schließlich konnte die Struktur der N-terminalen regulatorischen Domäne der humanen Phenylalaninhydroxylase aufgeklärt werden, in dem ein C-terminal trunkiertes Monomer (Aminosäure 1-429) kristallisiert wurde (*Kobe 1999*). Um ein vollständiges Modell der dreidimensionalen Struktur der humanen Phenylalaninhydroxylase zu erhalten, wurden die einzelnen Kristallstrukturen durch computer-

gestützte Modellrechnungen zusammengefügt und noch bestehende kleinere Lücken durch Vergleich mit der Kristallstruktur der Tyrosinhydroxylase aufgefüllt.

Mit Hilfe der Aminosäuresequenz eines Proteins besteht darüber hinaus die Möglichkeit, *in silico* eine Vorhersage über die dreidimensionale Tertiärstruktur eines Proteins zu treffen. Hierzu stehen unterschiedliche Tools zur Verfügung, wie z.B. das Swiss-Model. Swiss-Model ist ein Programm, welches eine Strukturvorhersage trifft, in dem es eine Homologie-Modellierung sequenzverwandter Proteine durchführt. Man gibt hierbei die Proteinsequenz des Proteins mit bereits bekannter Struktur als „Template“ ein und eine weitere Proteinsequenz, deren Struktur angepaßt werden soll, als „Target“. Die Daten werden verglichen und somit eine Struktur des Targets vorgeschlagen. Die berechneten Modelle können dann mittels SwissPDBViewer visualisiert und modifiziert werden (*Guex 1997*).

Uns gelang es mit Hilfe dieses Programmes, das BH₄-gebundene PAH-Monomer vollständig dreidimensional darzustellen.

2.7 Statistische Auswertung

Bei einem großen Teil der interessierenden Variablen handelt es sich um nicht normal verteilte Größen. Deshalb wurden die Daten mittels nichtparametrischer Testverfahren analysiert und die korrespondierende Darstellungsform mit Median und 25%-Perzentile (Q1) bzw. 75%-Perzentile (Q2) anstelle von Mittelwert und Standardabweichung verwendet (*Sachs 1984*). Der Abstand zwischen Q1 und Q2 ist dabei als Quartilenabstand (= Q-Range (QR)) wiedergegeben.

Die Ergebnisse wurden bei verbundenen Stichproben mit dem Wilcoxon Test und bei unverbundenen Stichproben mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz geprüft. Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha = 5\%$ festgesetzt. Die Korrelations- und Regressionsanalysen wurde mit dem Statistikprogramm SPSS 10,0 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Kombiniertes Phenylalanin-BH₄-Belastungstest

BH₄-Sensitivität wurde folgendermaßen definiert: Abfall der Phenylalaninkonzentration im Vollblut 15 Stunden nach BH₄ Gabe um mindestens 30% des Ausgangswertes vor Gabe von BH₄.

Alle 10 Patienten mit milder Hyperphenylalaninämie (MHP) und 17 von 21 Patienten mit milder PKU erfüllten dieses Kriterium und wurden daher als BH₄-sensitiv eingestuft. Nur 4 der Patienten aus der Gruppe der Patienten mit milder PKU und alle 7 Patienten mit klassischer PKU erfüllten nicht das in dieser Studie definierte Kriterium der BH₄-Sensitivität.

In der Gruppe der 10 Patienten mit MHP sank der Median für die Phenylalaninkonzentration im Vollblut von 363 µmol/l (QR: 280-489 µmol/l) vor Gabe von BH₄ auf 90 µmol/l (QR: 63-124 µmol/l) 15 Stunden nach BH₄ (p=0,005) (Abbildung 5).

In der Gruppe der als BH₄-sensitiv eingestuften Patienten mit milder PKU sank der Median für die Phenylalaninkonzentration im Vollblut von 583 µmol/l (QR: 467-733) vor Gabe von BH₄ auf 168 µmol/l (QR: 124-180 µmol/l) 15 Stunden nach BH₄ (p=0,0001) (Abbildung 6).

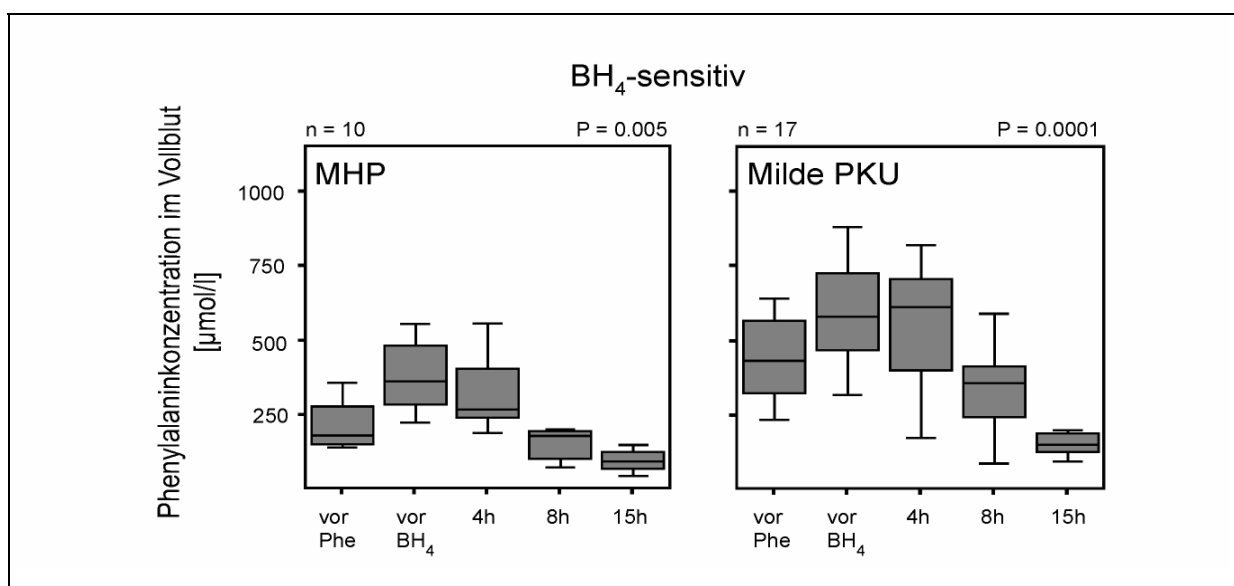


Abbildung 6: Phenylalaninkonzentrationen im Vollblut vor Gabe von Phenylalanin sowie vor und 4, 8 und 15 Stunden nach Belastung mit BH₄. Die Boxplots stellen das 50 Prozent-Konfidenz-Intervall (25.-75. Perzentile) dar; die schwarzen horizontalen Balken zeigen den Median; die Whiskers geben den Maximal- und den Minimalwert an.

In der Gruppe der als nicht BH₄-sensitiv eingestuften Patienten mit milder PKU stieg der Median für die Phenylalaninkonzentration im Vollblut bei vergleichbarer Ausgangskonzentration von 541 µmol/l (QR: 483-685 µmol/l) vor Gabe von BH₄ auf 589 µmol/l (QR: 548-624µmol/l) 15 Stunden nach BH₄ an (p=1,0) (Abbildung 7).

Bei den Patienten aus der Gruppe der klassischen PKU betrug der Median für die Phenylalaninkonzentration im Vollblut 732 µmol/l (QR: 435-953 µmol/l) vor Gabe von BH₄ und 683 µmol/l (QR: 654-977 µmol/l) 15 Stunden nach BH₄ (p=0,74) (Abbildung 7).

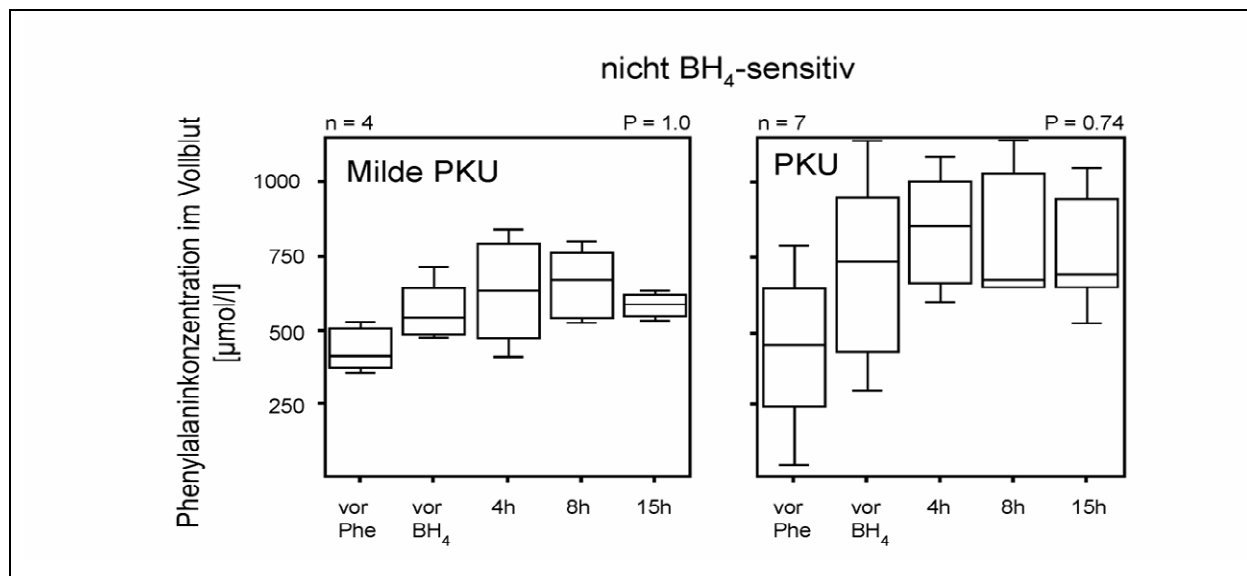


Abbildung 7: Phenylalaninkonzentrationen im Vollblut vor Gabe von Phenylalanin sowie vor und 4, 8 und 15 Stunden nach Belastung mit BH₄. Die Boxplots stellen das 50 Prozent-Konfidenz-Intervall (25.-75. Perzentile) dar; die schwarzen horizontalen Balken zeigen den Median; die Whiskers geben den Maximal- und den Minimalwert an.

Betrachtet man die zeitlichen Verläufe der Phenylalaninkonzentrationen im Vollblut, so zeigt sich eine erhebliche interindividuelle Variabilität bezüglich des Ansprechens auf die Gabe von BH₄. Bei einigen Patienten sank die Phenylalaninkonzentration im Vollblut bereits innerhalb der ersten vier bis sechs Stunden ab („rapid responder“), wie es für Patienten mit angeborenen Störungen der Synthese oder Regeneration von BH₄ beschrieben ist, während andere langsamer reagierten und sich die maximale Wirkung erst nach acht bis fünfzehn Stunden einstellte („slow responder“) (Abbildung 8).

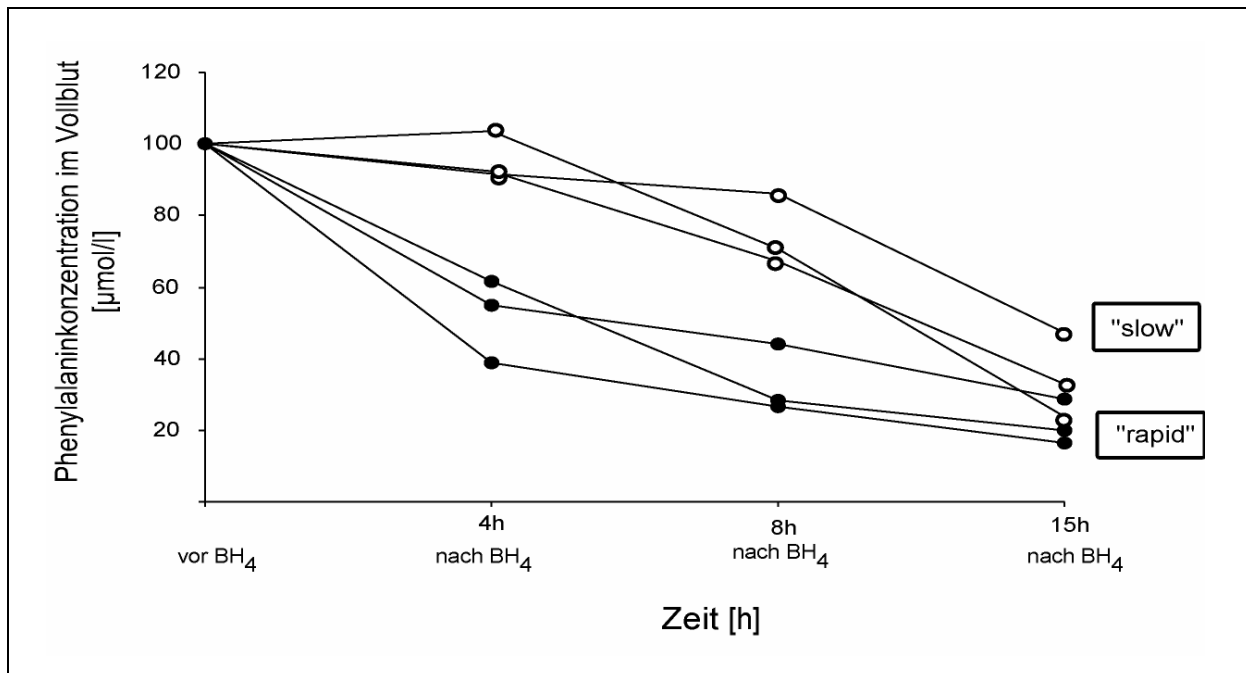


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der Phenylalaninkonzentration im Vollblut nach Gabe von BH_4 . Bei sechs repräsentativen Patienten zeigt sich ein unterschiedlich schnelles Ansprechen der Phenylalaninkonzentration nach Gabe von BH_4 .

3.2 Bestimmung der *in vivo* ^{13}C -Phenylalanin-Oxidationsrate

3.2.1 Fraktionelle $^{13}\text{CO}_2$ -Bildung der *in vivo* ^{13}C -Phenylalanin-Oxidationsrate

Die Analyse der fraktionellen $^{13}\text{CO}_2$ -Bildung bei gesunden Probanden zeigte eine initial geringe Produktion von $^{13}\text{CO}_2$ gefolgt von einem meist linear verlaufenden Anstieg der $^{13}\text{CO}_2$ -Bildung. Die maximale Oxidationsrate wurde nach 10-30 Minuten erreicht, danach nahm die $^{13}\text{CO}_2$ -Bildung kontinuierlich ab (Abbildung 9).

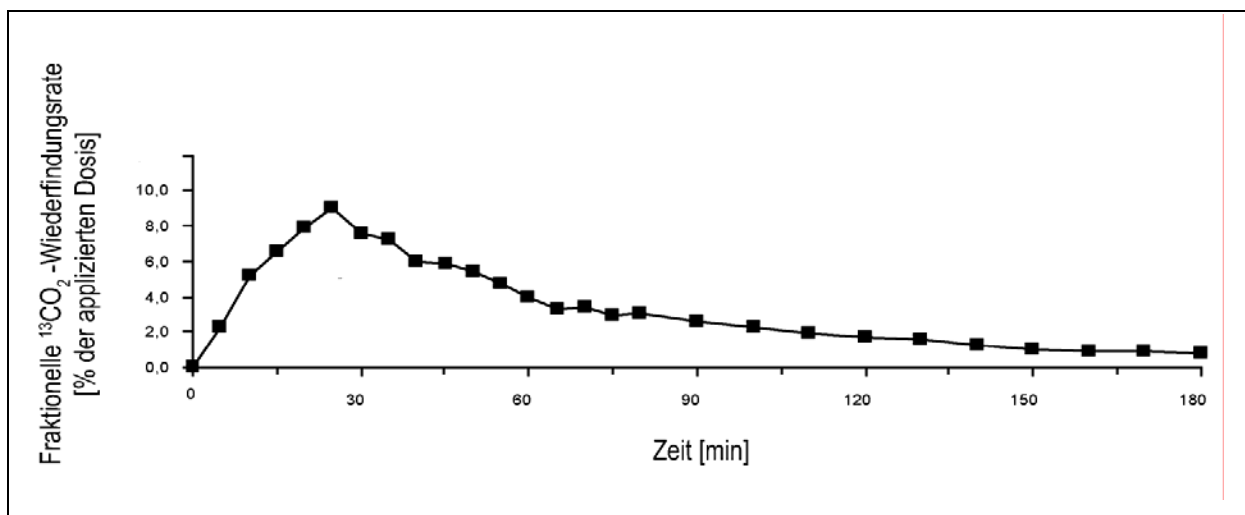


Abbildung 9: Fraktionelle Analyse der $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate bei einem repräsentativen Probanden aus der Kontrollgruppe gesunder Kinder.

Bei Patienten mit einem Defekt der PAH zeigte sich vor der BH_4 -Behandlung im zeitlichen Verlauf der fraktionellen $^{13}\text{CO}_2$ -Bildung eine deutliche Abweichung von den Ergebnissen gesunder Probanden.

Bei Patienten mit MHP und milder PKU waren sowohl der initiale Anstieg als auch die maximale Oxidationsrate vermindert. Die Kofaktor-Behandlung führte bei einigen BH_4 -sensitiven Patienten vornehmlich zu einer Zunahme des initialen Anstiegs der Kurve, während bei anderen Patienten hauptsächlich eine Zunahme der maximalen Oxidationsrate (Plateau) zu beobachten war (Abbildung 10).

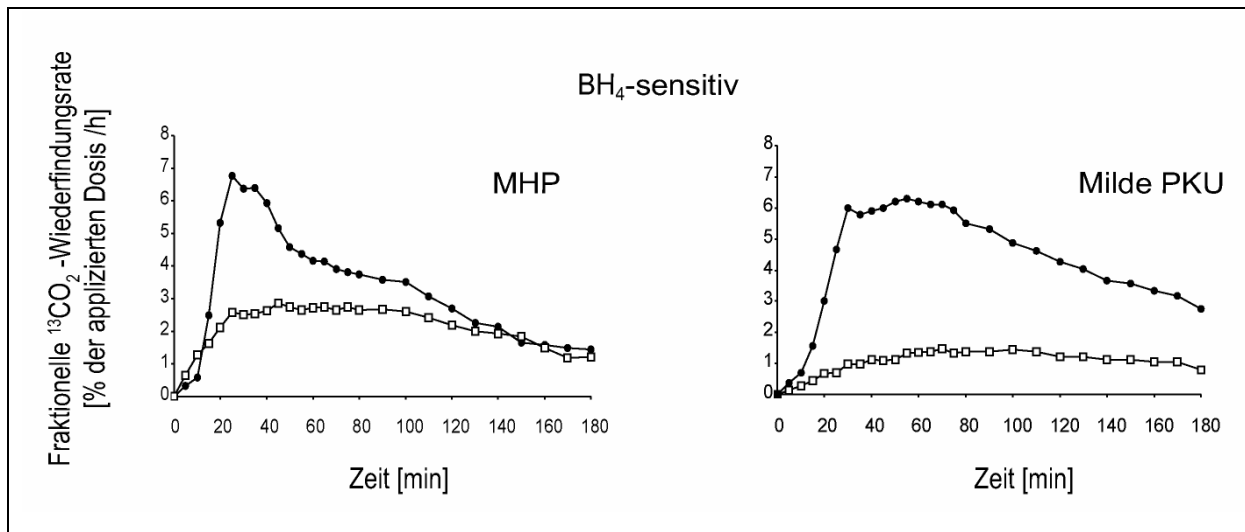


Abbildung 10: Fraktionelle Analyse der $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate bei repräsentativen Patienten mit klinischen Phänotypen unterschiedlicher Schwere vor (□) und nach (●) Kurzzeitbehandlung mit BH_4 . Normalisierung des Kurvenverlaufs unter Behandlung mit BH_4 bei BH_4 -sensitiven Patienten mit MHP und milder PKU.

Bei Patienten mit klassischer PKU waren der initiale Anstieg und die maximale Oxidationsrate der fraktionellen $^{13}\text{CO}_2$ -Bildung fast vollständig aufgehoben. Die Kofaktor-Behandlung führte bei nicht BH_4 -sensitiven Patienten nur zu minimalen Veränderungen der fraktionellen $^{13}\text{CO}_2$ -Bildung (Abbildung 11).

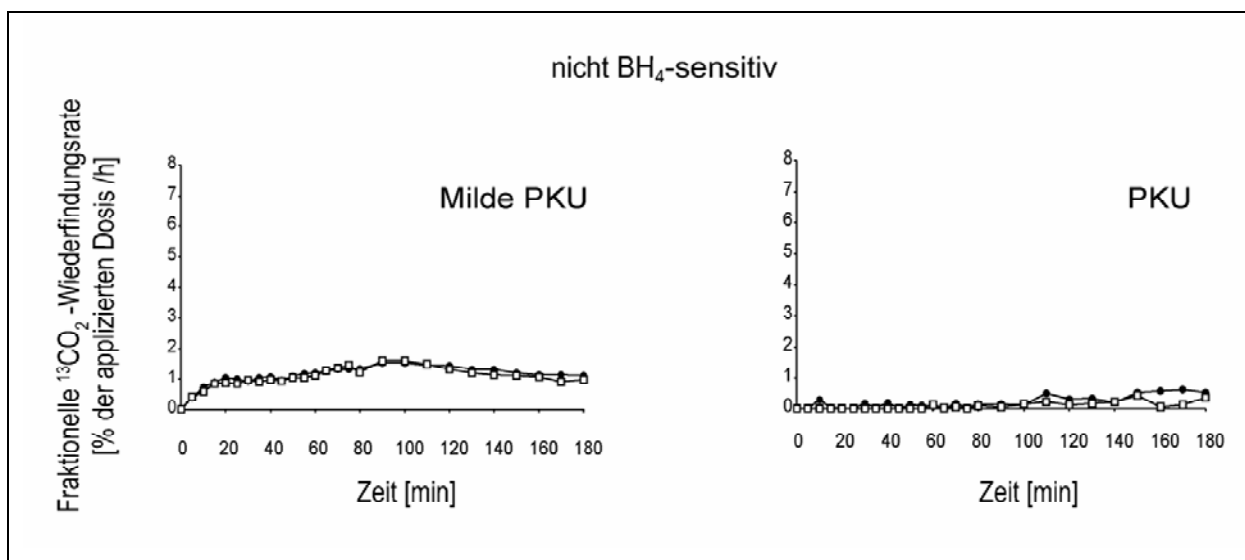


Abbildung 11: Fraktionelle Analyse der $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate bei repräsentativen Patienten mit klinischen Phänotypen unterschiedlicher Schwere vor (□) und nach (●) Kurzzeitbehandlung mit BH_4 . Fehlende therapeutische Wirkung bei nicht BH_4 -sensitiven Patienten mit milder PKU und klassischer PKU.

3.2.2 Kumulative $^{13}\text{CO}_2$ -Bildung der *in vivo* ^{13}C -Phenylalanin-Oxidationsrate

In der vorliegenden Studie wurde das Kriterium der BH_4 -Sensitivität folgendermaßen definiert: Zuwachs der basalen kumulativen $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate um mindestens 15% nach Therapie mit BH_4 (10 mg/kg KG über 30 Stunden). Dabei wurde für diesen Parameter der Mittelwert einer Kontrollgruppe aus 12 gesunden Probanden als 100 Prozent-Marke festgelegt. Die Einzelwerte der Probanden der Kontrollgruppe sind in Kapitel 3.5 aufgeführt.

Die *in vivo* Oxidation des markierten ^{13}C -Phenylalanins ist ein Maß für die endogene Aktivität der Phenylalaninhydroxylase und spiegelt die unterschiedlich hohe residuale Phenylalanin-Oxidationsrate bei unterschiedlichen klinischen Phänotypen wider. Diese lag bei den 7 Patienten mit PKU bei $1,4 \pm 0,7\%$ (Mittelwert \pm SD), bei den 21 Patienten mit milder PKU bei $3,0 \pm 1,4\%$, bei den 10 Patienten mit MHP bei $4,8 \pm 1,8\%$ und bei den 12 Patienten der Kontrollgruppe bei $8,3 \pm 2,8\%$ (Abbildung 12).

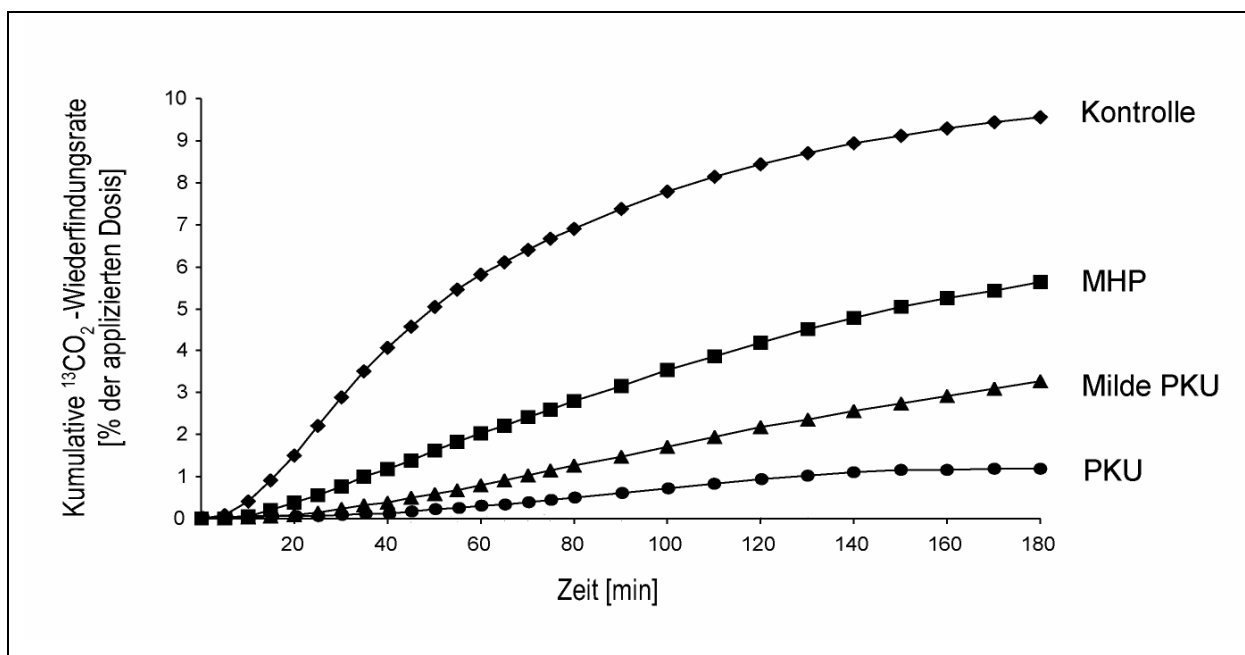


Abbildung 12: Kumulative Analyse der $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate pro Zeiteinheit eines Probanden aus der Kontrollgruppe sowie jeweils eines repräsentativen Patienten mit MHP, milder PKU und PKU.

In der Kontrollgruppe der 12 gesunden Probanden lag der Median der kumulativen $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate nach 180 Minuten ohne Behandlung mit BH_4 bei 8,7% (QR: 5,1-10,3) (Abbildung 13).

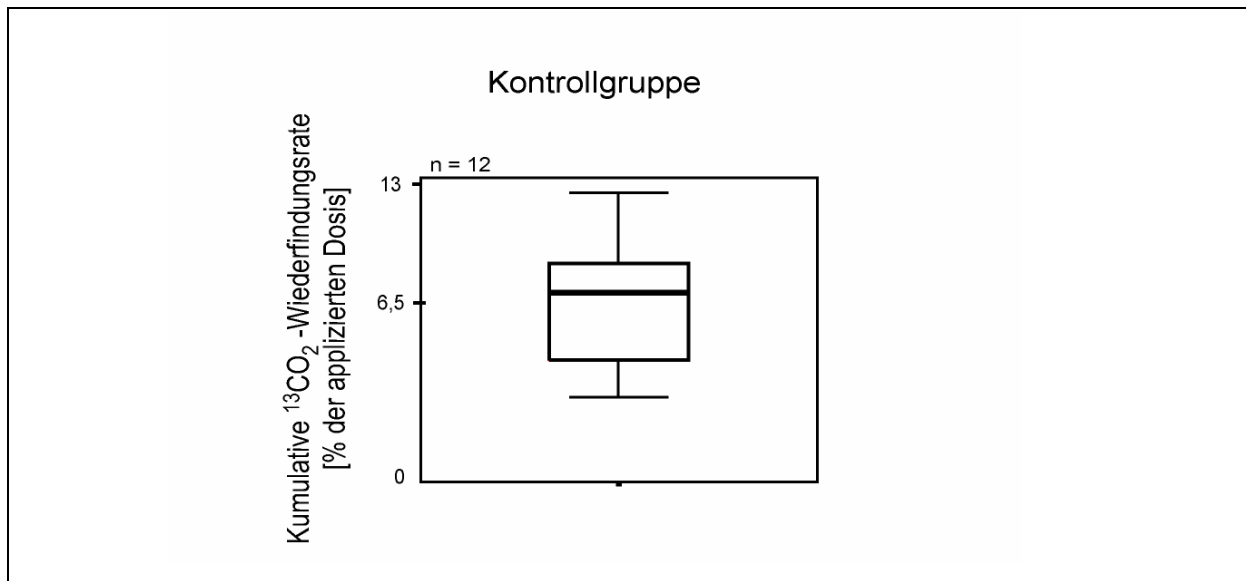


Abbildung 13: Kumulative $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate (180 Minuten) ohne BH_4 bei den Probanden aus der Kontrollgruppe. Der Boxplot zeigt das 50% Konfidenz Intervall (25.-75. Perzentile); die schwarzen horizontalen Balken zeigen den Median, die Whisker geben den Maximal- und den Minimalwert an.

In der Gruppe der 10 Patienten mit MHP stieg der Median der kumulativen $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate von 5,6% (QR: 3,03-6,18) vor Gabe von BH_4 auf 7,35% (QR: 6,43-9,15) unter Therapie mit BH_4 an ($p=0,005$). In der Gruppe der sensitiven milden PKU, deren Zuwachs der basalen kumulativen $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate um mindestens 15% nach Therapie mit BH_4 (10 mg/kg KG über 24 Stunden) betrug, stieg der Median der kumulativen $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate noch deutlicher von 3,5% (QR: 1,80-4,10) ohne Gabe von BH_4 auf 6,8% (QR: 5,80-9,40) unter Therapie mit BH_4 an ($p=0,0001$) (Abbildung 14).

Damit verbesserte sich die Phenylalanin-Oxidationsrate bei Patienten mit milder PKU deutlicher als bei Patienten mit MHP.

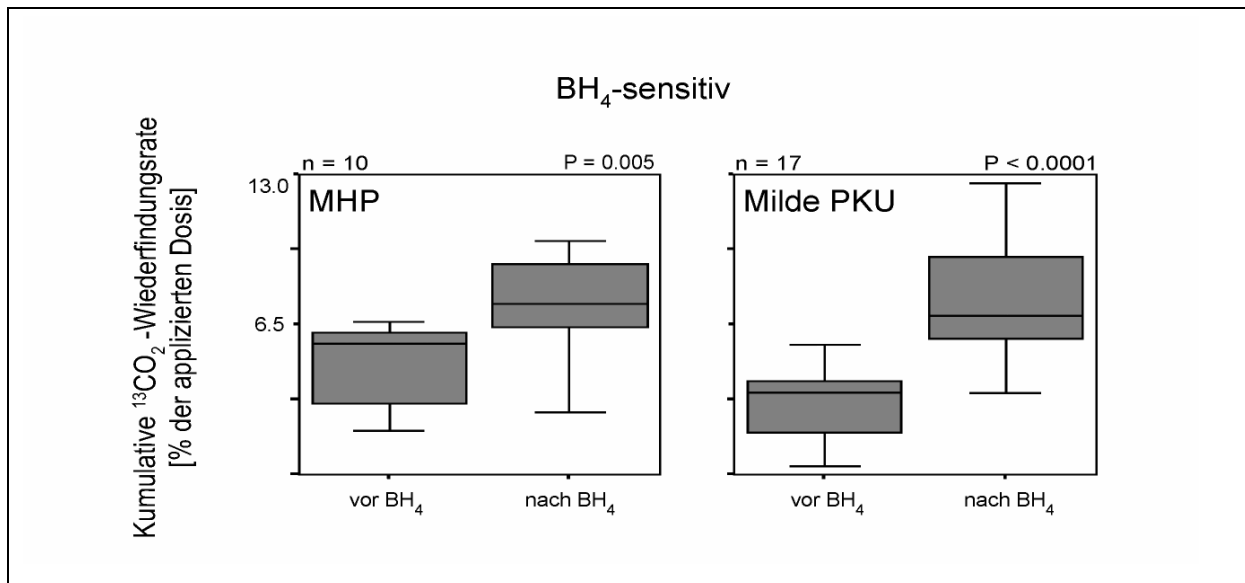


Abbildung 14: Wirkung der Kurzzeitbehandlung mit BH_4 auf die Phenylalanin-Oxidation *in vivo*. Kumulative $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate (180 Minuten) vor und nach BH_4 -Behandlung (10 mg/kg KG über 30 Stunden). Die Boxplots zeigen das 50% Konfidenz Intervall (25.-75. Perzentile); die schwarzen horizontalen Balken zeigen den Median, die Whisker geben den Maximal- und den Minimalwert an.

Bei den übrigen 4 Patienten mit milder PKU und bei allen 7 Patienten mit klassischer PKU wurde das oben definierte Kriterium der BH_4 -Sensitivität nicht erfüllt. So stieg in der Gruppe der 4 Patienten mit milder PKU der Median der kumulativen $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate von 2,8% (QR: 2,05-3,93) ohne Gabe von BH_4 auf 3,35% (QR: 2,58-3,98) unter Therapie mit BH_4 ($p=0,11$). In der Gruppe der 7 Patienten mit klassischer PKU stieg der Median der kumulativen $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate von 1,7% (QR: 0,70-1,90) ohne Gabe von BH_4 auf 1,9% (QR: 0,70-2,90) unter Therapie mit BH_4 ($p=0,17$) (Abbildung 15).

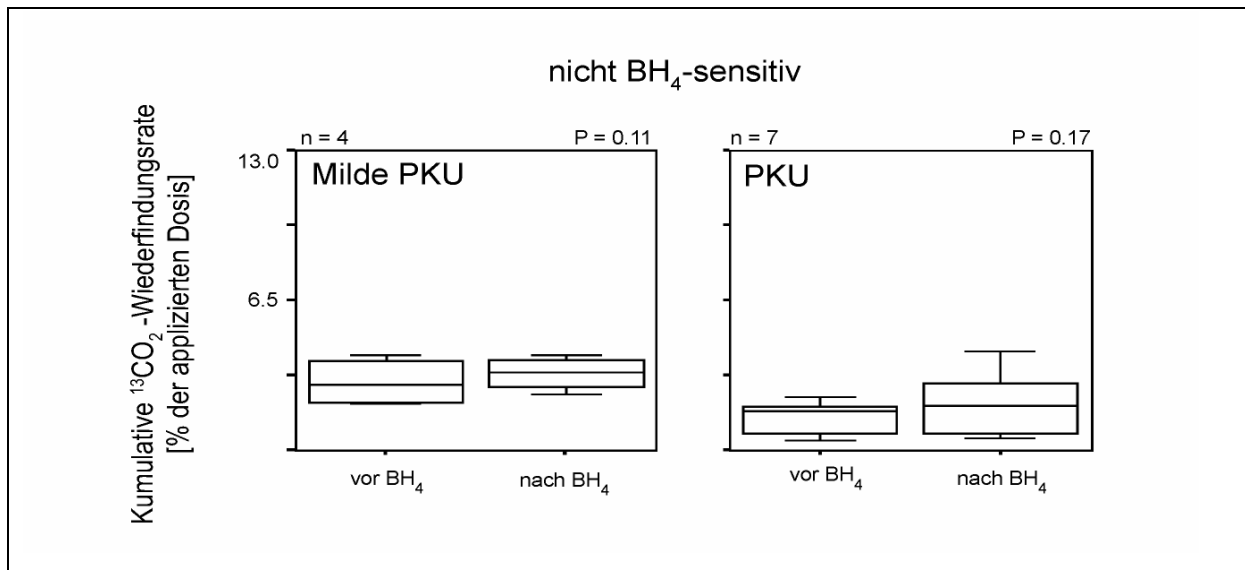


Abbildung 15: Wirkung der Kurzzeitbehandlung mit BH_4 auf die Phenylalanin-Oxidation *in vivo*. Kumulative $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate (180 Minuten) vor und nach BH_4 -Behandlung (10 mg/kg KG über 30 Stunden). Die Boxplots zeigen das 50% Konfidenz Intervall (25.-75. Perzentile); die schwarzen horizontalen Balken zeigen den Median, die Whisker geben den Maximal- und den Minimalwert an.

3.3 Zusammenhang der Wirkung von BH_4 auf die Phenylalaninkonzentration im Vollblut und auf die ^{13}C -Phenylalanin-Oxidationsrate

Vor der Behandlung mit BH_4 zeigten alle Patienten erhöhte Phenylalaninkonzentrationen im Vollblut von über 200 $\mu\text{mol/l}$ und eine kumulative $^{13}\text{CO}_2$ Wiederfindungsrate unter 7%. Trägt man diese Parameter gegeneinander auf, konnten BH_4 -sensitive und nicht BH_4 -sensitive Patienten nicht voneinander unterschieden werden (Abbildung 16 links).

Nach BH_4 -Therapie beobachteten wir zwei nicht überlappende, klar getrennte Cluster von sensitiven und nicht-sensitiven Patienten mit HPA (Abbildung 16 rechts). Bei 23 der 27 BH_4 -sensitiven Patienten (ID 1-23) sanken die Phenylalaninkonzentrationen unter Therapie auf Werte unter 200 $\mu\text{mol/l}$, während vier Patienten (ID 24-27) nur moderat auf BH_4 ansprachen und Werte zwischen 200 und 400 $\mu\text{mol/l}$ erreichten. Nicht BH_4 -sensitive Patienten (ID 28-38) wiesen ohne Ausnahme nach BH_4 -Gabe Phenylalaninkonzentrationen über 400 $\mu\text{mol/l}$ auf.

Die kumulative $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate stieg unter Therapie bei 13 der 27 BH_4 -sensitiven Patienten auf über 7%, während alle nicht BH_4 -sensitive Patienten (ID 28-38) Werte unter 5% erzielten.

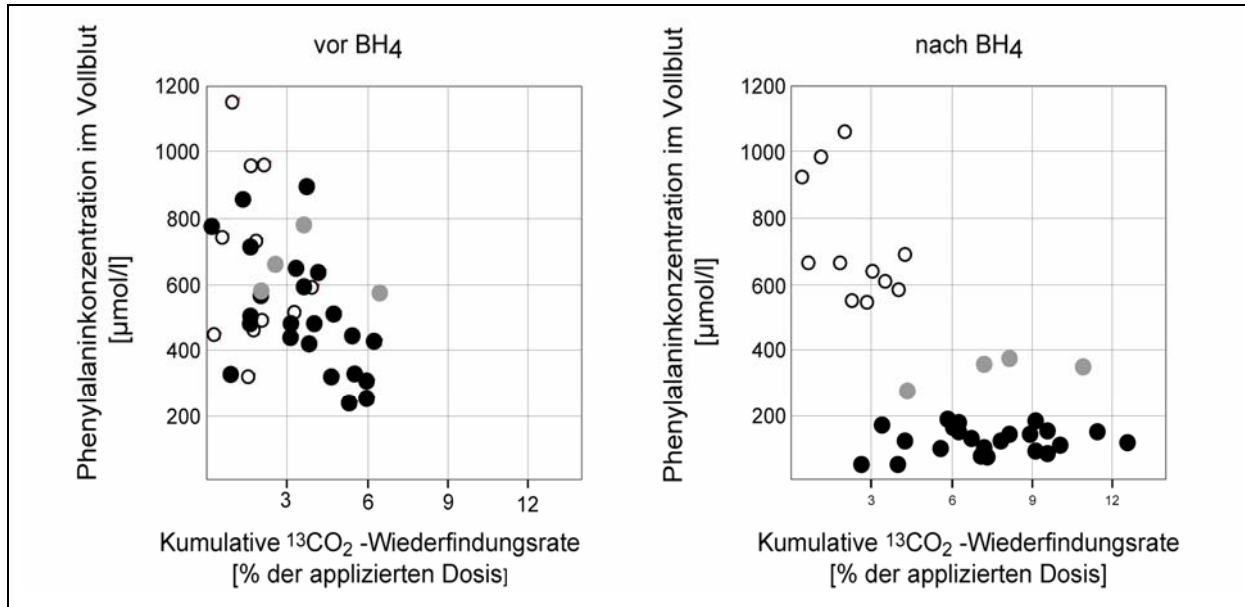


Abbildung 16: Die Abbildung zeigt die Beziehung zwischen kumulativer $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate und der Phenylalaninkonzentration im Vollblut. Die kumulative $^{13}\text{CO}_2$ -Wiederfindungsrate wurde ohne und mit BH_4 -Therapie (10 mg/kg KG über 30 Stunden) 180 Minuten nach der Einnahme von ^{13}C -markiertem Phenylalanin gemessen; die Phenylalaninkonzentration im Vollblut wurde vor und 15 Stunden nach einer einmaligen Gabe von BH_4 (20 mg/kg KG) bestimmt. Dabei wurden die Patienten in Abhängigkeit des Grades der BH_4 -Sensitivität eingeteilt (schwarze Symbole BH_4 -sensitive Patienten, graue Symbole moderat BH_4 -sensitive Patienten, weiße Symbole nicht BH_4 -sensitive Patienten).

BH_4 führte bei BH_4 -sensitiven Patienten zu einer Reduktion der Phenylalaninkonzentration im Vollblut von 37-92% und verbesserte die Phenylalanin-Oxidationsrate um 10-91% .

Bei 33 der 38 Patienten mit HPA durch Defekt der PAH wurden im kombinierten Phenylalanin- BH_4 -Belastungstest und im ^{13}C -Phenylalanin-Oxidationstest übereinstimmende Auswirkungen auf die Stoffwechsellage erzielt. Bei vier Patienten (ID 2/4/7/26), bei denen im Phenylalanin- BH_4 -Belastungstest das Kriterium der BH_4 -Sensitivität erfüllt war, stieg die Phenylalanin-Oxidationsrate lediglich um 8-14 %.

Ein Patient mit klassischer PKU (ID 25) zeigte nur einen leichten Abfall der Phenylalaninkonzentration im Vollblut, während die Oxidationsrate um 24% anstieg. Weitere 7 der 11 Patienten, die nicht auf eine Kurzzeitbehandlung mit BH_4 ansprachen, zeigten einen leichten Anstieg der ^{13}C -Phenylalanin-Oxidationsrate (2-

14%), der jedoch das in der vorliegenden Studie definierte Kriterium der BH₄-Sensitivität nicht erfüllte (Abbildung 17).

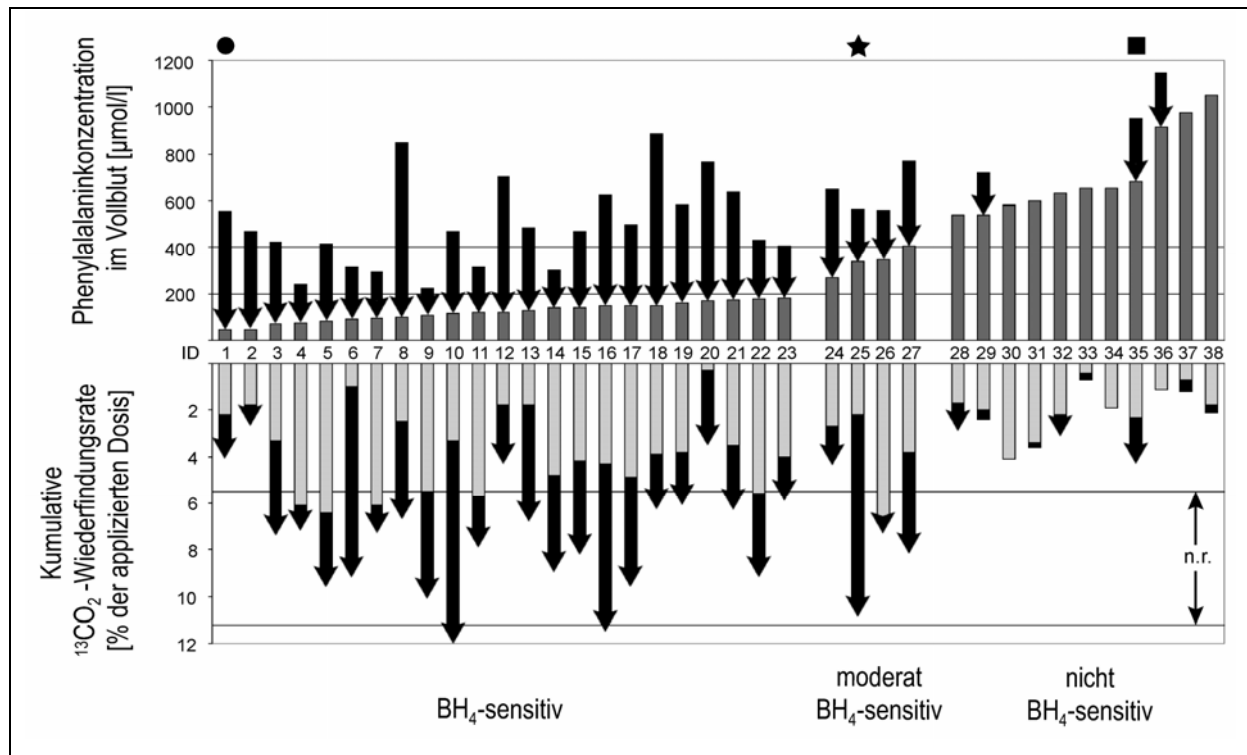


Abbildung 17: Wirkung von BH₄ auf die Phenylalaninkonzentration im Vollblut und auf die ¹³C-Oxidationsrate bei 38 Patienten mit HPA. Der obere Teil der Graphik zeigt die Phenylalaninkonzentration im Vollblut vor (Balken und Pfeile) und 15 Stunden nach der Gabe von BH₄ (nur Balken). Der untere Teil der Abbildung zeigt die kumulative ¹³CO₂-Wiederfindungsrate nach Einnahme von ¹³C-markiertem Phenylalanin vor (Balken) und unter (Balken und Pfeile) BH₄-Behandlung. Der Normbereich (n.r. = normal range) der ¹³C-Phenylalanin-Oxidationsrate bei 12 gesunden Kontrollindividuen (im Alter zwischen 2 Tagen und 13 Jahren) ist dargestellt und beträgt 8,3 ± 2,8% (Mittelwert ± Standardabweichung). Der erzielte therapeutische Effekt bezüglich der beiden analysierten Parameter bei den einzelnen Patienten ist durch schwarze Pfeile dargestellt. Die Patienten wurden nach aufsteigender Phenylalaninkonzentration im Vollblut nach BH₄-Behandlung sortiert und in Abhängigkeit des Grades der Sensitivität in drei Gruppen eingeteilt.

3.4 Übersicht Einzelwerte

ID	Phenylalaninkonzentration im Vollblut [$\mu\text{mol/l}$]						Kumulative $^{13}\text{CO}_2$ - Wiederfindungsrate [% der applizierten Dosis]		
	vor Belastung mit Phenylalanin	vor Belastung mit BH_4	4h nach Belastung mit BH_4	8h nach Belastung mit BH_4	15h nach Belastung mit BH_4	Prozentuale Veränderung nach 15 h	vor Therapie mit BH_4	unter Therapie mit BH_4	Prozentuale Veränderung unter Therapie mit BH_4
1	144	555	391	75	47	-91,5	2,2	4,1	+86,3
2	276	468	378	85	47	-90,0	1,8	2,7	+49,9
3	225	424	458	177	69	-83,7	3,3	7,4	+124,2
4	150	240	189	103	74	-69,2	6,1	7,2	+18,0
5	194	413	255	117	83	-79,9	6,4	9,6	+50,0
6	314	313	172	138	90	-71,2	1,0	9,2	+820,0
7	303	294	272	198	97	-67,0	6,1	7,3	+19,7
8	437	850	581	172	98	-88,5	1,5	5,7	+279,9
9	148	225	207	195	106	-52,9	5,5	10,1	+81,8
10	360	468	612	354	115	-75,4	3,3	12,6	+281,8
11	163	314	259	201	119	-62,1	5,7	7,9	+38,5
12	494	703	727	388	120	-82,9	1,8	4,3	+138,8
13	311	486	189	80	129	-73,5	1,8	6,8	+277,7
14	144	304	250	186	140	-53,9	4,8	9,0	+87,4
15	398	467	451	224	141	-69,8	4,2	8,2	+95,2
16	561	624	645	441	148	-76,3	4,3	11,5	+167,4
17	416	496	391	374	148	-70,2	4,9	9,6	+95,9
18	863	885	807	549	149	-83,2	3,9	6,3	+61,5
19	360	583	388	288	161	-72,4	3,8	6,1	+160,5
20	713	764	690	360	168	-78,0	0,3	3,5	+1066,6
21	483	637	622	346	172	-73,0	3,5	6,3	+79,9
22	238	430	586	344	176	-59,1	5,6	9,2	+64,2
23	296	404	406	265	184	-54,5	4,0	5,9	+47,5
24	565	651	717	387	270	-58,5	2,7	4,4	+62,9
25	528	564	679	500	341	-39,5	2,2	10,9	+395,4
26	353	557	563	595	349	-37,3	6,6	7,3	+10,6
27	631	768	823	659	418	-45,6	3,8	8,2	+115,7
28	133	310	702	658	536	-0,0	1,7	2,9	+70,5
29	532	719	848	801	539	-25,0	2,0	2,4	+20,0
30	402	583	631	595	578	-0,9	4,1	4,1	+0,0
31	357	499	417	525	600	+20,2	3,4	3,6	+5,8
32	424	478	644	644	632	+32,2	2,2	3,1	+40,9
33	331	435	635	657	654	+50,3	0,4	0,7	+75,0
34	190	448	610	673	655	+46,2	1,9	1,9	+0,0
35	568	953	852	657	683	-28,3	2,3	4,3	+86,9
36	729	1148	1037	1034	914	-20,4	1,1	0,5	-54,5
37	448	732	972	1031	977	+33,5	0,7	1,2	+71,4
38	792	951	1088	1171	1053	+10,7	1,8	2,1	+16,6

3.5 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv bestand aus 12 Probanden im Alter zwischen 20 Tagen und 13 Jahren. Wir führten bei allen Kindern einen Atemtest nach oraler Verabreichung von L- [1-¹³C] Phenylalanin durch. Der Mittelwert der kumulativen ¹³CO₂-Wiederfindungsrate betrug 8,3% (Standardabweichung ± 2,8%). Es zeigte sich eine Zunahme der Phenylalanin-Oxidationsrate mit zunehmendem Alter.

Bei Probandin ID K-7 wurde zusätzlich die kumulative ¹³CO₂-Wiederfindungsrate nach einer BH₄-Belastung (20 mg/kg Körpergewicht über 24 Stunden) bestimmt und ein Wert von 8,9% gemessen.

Tabelle 7: Kumulative Analyse der ¹³CO₂-Wiederfindungsrate bei 12 Kontrollindividuen

ID	Alter [Jahre]	Geschlecht	Kumulative ¹³ CO ₂ Wiederfindungsrate [% der applizierten Dosis]
K-1	0,4	w	4,6
K-2	0,6	w	4,6
K-3	0,3	w	9,5
K-4	0,2	m	7,8
K-5	0,1	m	3,9
K-6	0,1	m	6,6
K-7	6,9	w	9,2
K-8	13,4	w	10,5
K-9	9,3	m	8,2
K-10	5,5	w	12,1
K-11	3,8	m	9,6
K-12	7,5	m	13,3

3.6 Langzeitbehandlung mit BH₄

Die Eltern von fünf Kindern mit milder PKU im Alter von vier bis vierzehn Jahren willigten in einen Langzeittherapieversuch mit BH₄ ein. Hierbei wurde die phenylalaninarme Diät durch die orale Einnahme von BH₄ ersetzt. Das Medikament wurde täglich in einer Dosierung zwischen 7,1 und 10,7 mg pro kg Körpergewicht in drei Einzeldosen verabreicht. Die Behandlung dauerte 207 ± 51,3 Tage (Mittelwert ± Standardabweichung/ Range 166-263 Tage).

Die BH₄-Behandlung führte zu einem Anstieg der täglichen Phenylalanintoleranz von 18,7 ± 8,6 mg/kg Körpergewicht (KG) (Range 8,5-30 mg/kg KG) vor auf 61,4 ± 29,9 mg/kg KG (Range 17,9-90 mg/kg KG) unter Behandlung (p= 0,043). Während der medikamentösen Therapie blieb die durchschnittliche Phenylalaninkonzentration im Vollblut nahezu unverändert (unter diätetischer Behandlung 366 ± 120 µmol/l; unter medikamentöser Therapie 378 ± 173 µmol/l).

Tabelle 8: Einzelwerte der Patienten unter langfristiger Behandlung mit BH₄.

ID	Verabreichte BH ₄ -Dosis [mg/kg KG] pro Tag	Phenylalaninkonzentration im Vollblut [µmol/l]		Phenylalanintoleranz [mg/kg] pro Tag		Behandlungsdauer [Tage]
		vor Therapie	unter Therapie	vor Therapie	unter Therapie	
2	9,4	450	294	25	54	177
6	10,7	522	252	8,5	17,9	166
22	7,1	270	690	30	90	166
33	7,8	354	282	15	65	263
34	7,8	234	372	15	80	263

3.7 Weiterführende Untersuchungen bei einem Patienten mit klassischer PKU

Ein Patient mit klassischer PKU (ID 28) erfüllte zwar nicht die hier gewählten Definitionskriterien für BH₄-Sensitivität, zeigte jedoch unter Therapie mit BH₄ eine Verbesserung der *in vivo* Phenylalanin-Oxidationsrate von 14%. Es wurde daher beschlossen, eine weitere Untersuchungsreihe durchzuführen, um zu prüfen, ob eine langfristige Gabe von BH₄ bei diesem Patienten zu einer signifikanten Verbesserung der biochemischen Situation im Sinne einer Steigerung der diätetischen Phenylalanintoleranz führt. Dazu erhöhten wir für drei Tage die Phenylalanin-Zufuhr zunächst von 240 mg/d auf 900 mg/d und danach auf 1200 mg/d unter täglichen Kontrollen der Phenylalaninkonzentration im Vollblut. Die Phenylalaninkonzentration stieg dabei kontinuierlich, aber nicht über 600 µmol/l an. Nach weiteren drei Tagen erhielt der Patient zusätzlich 10 mg/kgKG BH₄ pro Tag und an den darauf folgenden drei Tagen 18 mg/kgKG BH₄ pro Tag. Unter Therapie mit BH₄ sank die Phenylalaninkonzentration im Vollblut auf die Hälfte des Ausgangswertes. Nach Absetzen von BH₄ kam es zu einem Wiederanstieg der Phenylalaninkonzentration im Vollblut (Abbildung 15 und Tabelle 8).

Dieser Befund spricht für das Vorliegen eines Defektes der PAH, der partiell auf BH₄ anspricht.

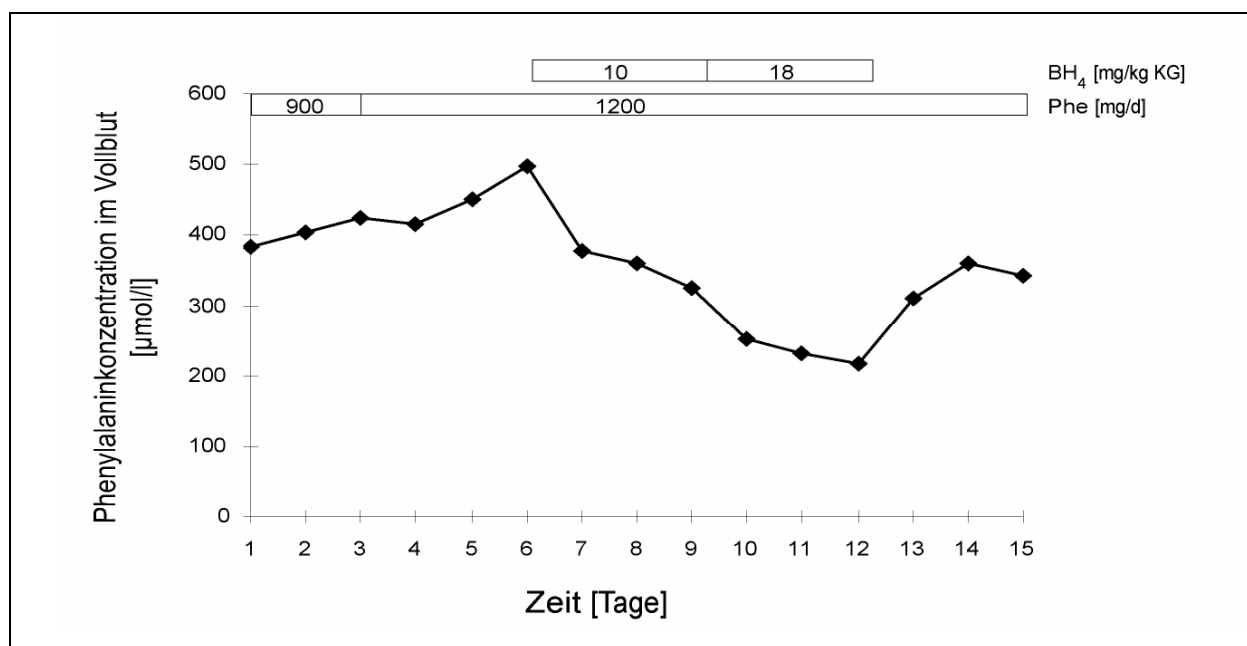


Abbildung 18: Wirkung einer langfristigen Gabe von BH₄ auf die Phenylalaninkonzentration im Vollblut bei einem Patienten mit klassischer PKU

Tabelle 9: Übersicht der Einzelwerte des Patienten (ID 28) unter Behandlung mit BH₄.

Zeit	Phenylalaninzufuhr [mg/die]	BH₄-Zufuhr [mg/kgKGxdie]	Phenylalaninkonzentration im Vollblut [μmol/l]
1. Tag	900	keine BH ₄ -Gabe	383
2. Tag	900	keine BH ₄ -Gabe	405
3. Tag	900	keine BH ₄ -Gabe	424
4. Tag	1200	keine BH ₄ -Gabe	417
5. Tag	1200	keine BH ₄ -Gabe	452
6. Tag	1200	keine BH ₄ -Gabe	499
7. Tag	1200	10	379
8. Tag	1200	10	361
9. Tag	1200	10	325
10. Tag	1200	18	252
11. Tag	1200	18	230
12. Tag	1200	18	218
13. Tag	1200	keine BH ₄ -Gabe	310
14. Tag	1200	keine BH ₄ -Gabe	359
15. Tag	1200	keine BH ₄ -Gabe	342

3.8 Genotypisierung und strukturelle Lokalisation der Mutationen im *PAH*-Gen auf dem PAH-Protein

Die DNA wurde aus Leukozyten extrahiert. 13 genomische Fragmente mit den Exon flankierenden Sequenzen des *PAH*-Gens wurden mittels Polymerase Ketten Reaktion amplifiziert und direkt sequenziert. Dabei wurden bei 37 der 38 Patienten jeweils zwei pathogene Mutationen identifiziert (Tabelle 9).

Sieben Mutationen (P314S, Y417H, V245A, A300S, E390G, IVS4-5C>G) traten entweder in homozygotem oder in funktionell hemizygotem Zustand auf, d. h., auf dem zweiten Allel fand sich eine Nullmutation. Für diese Mutationen ist ein kausaler Zusammenhang zur nachgewiesenen BH₄-Sensitivität sehr wahrscheinlich.

Für sechs weitere Mutationen (A403V, F39L, D415N, R158Q, I65T) war aus *in vitro* Expressions-Experimenten eine signifikante Enzymrestaktivität bekannt oder auf dem zweiten Allel fand sich eine Mutation, die mit einem schweren klinischen Phänotyp assoziiert ist. Für diese Mutationen wurde daher ein möglicher Zusammenhang zur BH₄-Sensitivität postuliert.

Vier Mutationen (Y414C, L48S, R261Q, I65V) traten sowohl bei BH₄-sensitiven als auch bei nicht BH₄-sensitiven Patienten auf.

Acht der zwölf Missense-Mutationen, die mit einer BH₄-Sensitivität assoziiert werden konnten, führen zu einem Aminosäureaustausch in der katalytischen Domäne des PAH-Proteins, während zwei Mutationen zu Proteinveränderungen in der regulatorischen und zwei zu Proteinveränderungen in der Tetramerisations-Domäne führen. Keine Mutation zeigte eine direkte Beziehung zum aktiven Zentrum oder zu Aminosäuren, die direkt mit dem Kofaktor, BH₄, interagieren.

Tabelle 10: Genotypen der Patienten mit BH₄-sensitiver und nicht-sensitiver HPA.

ID	ALLEL 1	ALLEL 2	PHÄNOTYP	BH ₄ -SENSITIVITÄT
1	A403V	IVS4+5G>T	Milde Hyperphenylalaninämie	Ja
2	A403V	nicht identifiziert	Milde Hyperphenylalaninämie	Ja
3	P314S*	R408W [†]	Milde Hyperphenylalaninämie	Ja
4	F39L	D415N	Milde Hyperphenylalaninämie	Ja
5	Y414C	D415N	Milde Hyperphenylalaninämie	Ja
6	Y417H*	Y417H*	Milde Phenylketonurie	Ja
7	F55L	S310Y*	Milde Hyperphenylalaninämie	Ja
8	R261Q	Y414C	Milde Phenylketonurie	Ja
9	V177M	R408W [†]	Milde Hyperphenylalaninämie	Ja
10	P275L*	Y414C	Milde Phenylketonurie	Ja
11	V245A	R408W [†]	Milde Hyperphenylalaninämie	Ja
12	L48S	R158Q	Milde Phenylketonurie	Ja
13	Y417H*	Y417H*	Mild phenylketonuria	Ja
14	V245A	R408W [†]	Milde Hyperphenylalaninämie	Ja
15	R261X [†]	A300S	Milde Phenylketonurie	Ja
16	R158Q	E390G	Milde Phenylketonurie	Ja
17	R261X [†]	A300S	Milde Phenylketonurie	Ja
18	Y414C	IVS12+1G>A [†]	Milde Phenylketonurie	Ja
19	I65S*, H170Q*	A300S	Milde Phenylketonurie	Ja
20	R261Q	Y414C	Milde Phenylketonurie	Ja
21	K274fsdel11bp [†]	E390G	Milde Phenylketonurie	Ja
22	IVS4-5C>G	R408W [†]	Milde Phenylketonurie	Ja
23	R261X [†]	A300S	Milde Phenylketonurie	Ja
24	I65T	Y414C	Milde Phenylketonurie	moderat
25	E390G	IVS12+1G>A [†]	Milde Phenylketonurie	moderat
26	I65V	R261Q	Milde Hyperphenylalaninämie	moderat
27	R158Q	Y414C	Milde Phenylketonurie	moderat
28	Y414C	IVS12+1G>A [†]	Klassische Phenylketonurie	Nein
29	P281L [†]	Y414C	Milde Phenylketonurie	Nein
30	I65V	IVS12+1G>A [†]	Milde Phenylketonurie	Nein
31	I65V	IVS12+1G>A [†]	Milde Phenylketonurie	Nein
32	N61D*	R261Q	Milde Phenylketonurie	Nein
33	R408W [†] ,	Y414C	Klassische Phenylketonurie	Nein
34	P281L [†]	P281L [†]	Klassische Phenylketonurie	Nein
35	R243X [†]	Y414C	Klassische Phenylketonurie	Nein
36	L48S	P281L [†]	Klassische Phenylketonurie	Nein
37	R261Q	R408W [†]	Klassische Phenylketonurie	Nein
38	R243X [†]	IVS7+1G>A	Klassische Phenylketonurie	Nein

Mutationen, die *sehr wahrscheinlich* mit BH₄ Sensitivität assoziiert sind, sind schattiert

Mutationen, die *möglicherweise* mit BH₄ Sensitivität assoziiert sind, sind fett gedruckt

Mutationen, die *inkonstant* mit BH₄ Sensitivität assoziiert sind, sind kursiv gedruckt

* Mutationen, die zuvor noch nicht beschrieben wurden

[†] Putative Null Mutation

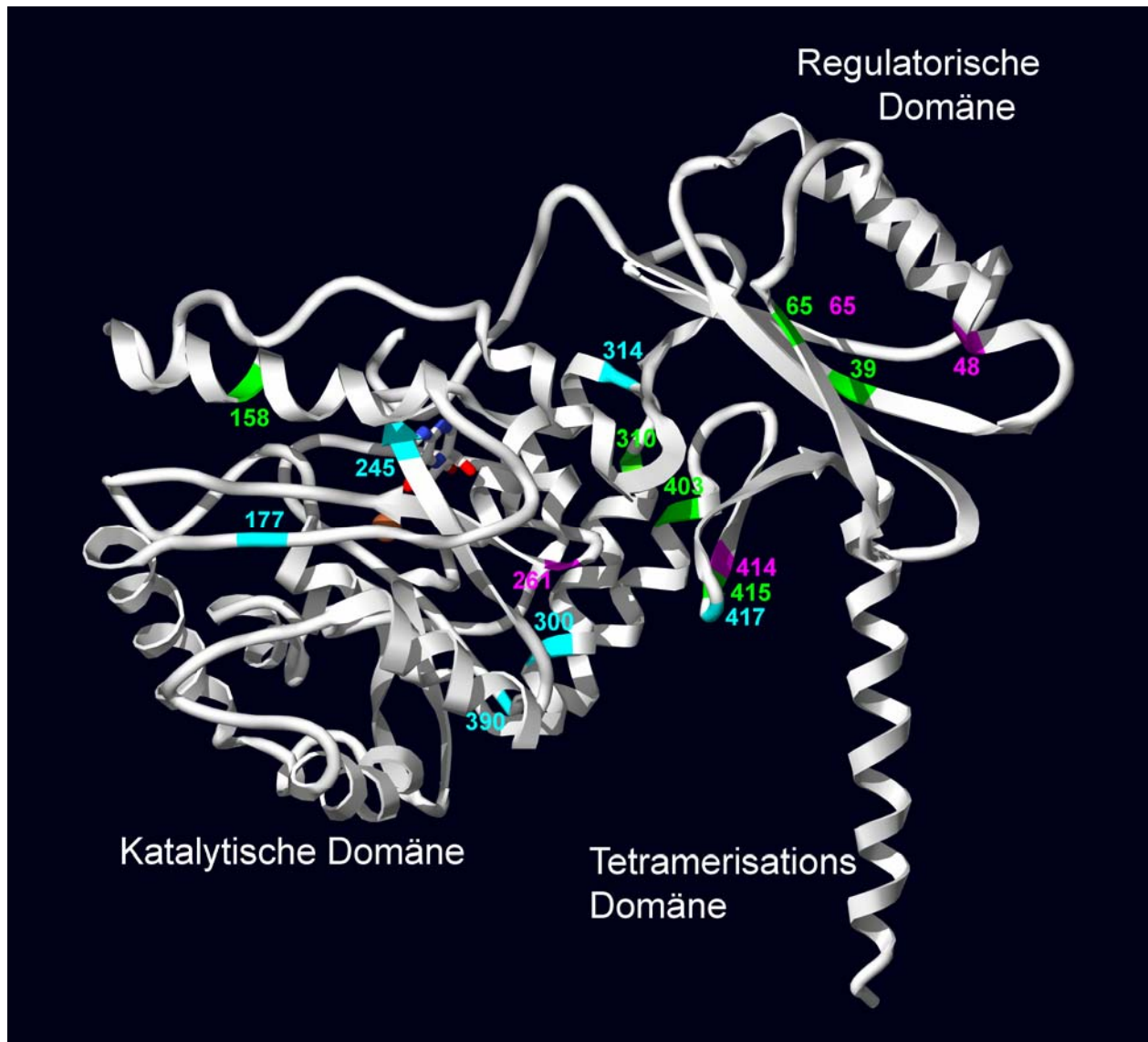


Abbildung 19: Strukturmodell eines PAH-Monomers und strukturelle Lokalisation der Missense-Mutationen. Das PAH-Monomer beinhaltet drei Domänen, die regulatorische Domäne (Aminosäuren 1-142), die katalytische Domäne (Aminosäuren 143-410) und die Tetramerisations-Domäne (Aminosäuren 411-452). Das aktive Zentrum, in dessen Mitte das Eisenatom liegt (braun dargestellt) sowie die Kofaktor-Bindungsstelle (stick model) liegen in der katalytischen Einheit. Die Mutationen, die sehr wahrscheinlich mit BH₄ Sensitivität assoziiert sind, sind blau dargestellt. Die Mutationen, bei denen möglicherweise ein Zusammenhang zur BH₄ Sensitivität besteht, sind grün markiert und die Mutationen, die keinen konsistenten Zusammenhang zur BH₄-Sensitivität aufweisen, sind rot dargestellt. Die Mutationen, die zu Proteinveränderungen im Bereich der Aminosäure 65 führen, konnten entweder als sehr wahrscheinlich mit BH₄-Sensitivität assoziiert werden oder als in keinem konsistenten Zusammenhang zur BH₄-Sensitivität klassifiziert werden.

4 Diskussion

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie haben wir uns um ein besseres Verständnis der biochemischen und molekularen Grundlagen der BH₄-sensitiven HPA bei Defekt der PAH bemüht. Bei 38 Patienten mit HPA haben wir den biochemischen Phänotyp charakterisiert und den Genotyp identifiziert. Hierzu wurden drei unabhängige Untersuchungsverfahren eingesetzt: Ein kombinierter Phenylalanin-BH₄-Belastungstest zur Untersuchung der Phenylalanin-Clearance, ein *in vivo* Phenylalaninoxidationstest als Maß der *in vivo* Enzymaktivität und die Mutationanalyse des PAH-Gens zur Erfassung des zugrundeliegenden Genotyps.

Wir konnten nach einigen kasuistischen Berichten (*Kure 1999; Spaapen 2001; Trefz 2001; Lindner 2001; Lässker 2002*) im Rahmen dieser systematischen klinischen Studie bei 27 von 31 Patienten (87%) mit milder HPA oder milder PKU einen therapeutischen Effekt pharmakologischer Dosen des natürlichen Kofaktors der PAH, BH₄, nachweisen. Ein Langzeittherapieversuch mit BH₄ bei fünf Patienten mit Defekt der PAH führte zu einem signifikanten Anstieg der diätetischen Phenylalanintoleranz. Während keiner der 7 Patienten mit einem schweren klinischen Phänotyp eines PAH-Mangels (klassische PKU) im Kurzzeittherapieversuch die Kriterien für eine BH₄-Sensitivität erfüllte, konnten wir im Rahmen eines längerfristigen Therapieversuches bei einem Patienten mit klassischer PKU zeigen, dass auch Patienten mit schweren klinischen Phänotypen von einer Therapie mit BH₄ profitieren können.

Die zentralen Ergebnisse dieser Arbeit sind:

- BH₄ senkt die Phenylalaninkonzentration im Vollblut, d.h., es eliminiert das toxische Agens.
- BH₄ steigert die ¹³C-Phenylalanin-Oxidationsrate *in vivo*, d.h., es verbessert die Aktivität des Apoenzyms PAH.
- BH₄ steigert im Langzeittherapieversuch die diätetische Phenylalanintoleranz.
- BH₄ wird im Langzeittherapieversuch gut vertragen.

Seit 50 Jahren wird zur Behandlung der PKU eine lebensbegleitend einzuhaltende streng phenylalaninarme Diät empfohlen. Diese Behandlungsform ist zwar erfolgreich, kann aber wegen der erheblichen Belastungen für die Patienten und ihre Familien nicht als zufriedenstellend beurteilt werden.

Liegt eine BH₄-Sensitivität vor, so bedeutet das für einen Patienten mit milder PKU, dass er sich unter BH₄-Substitution völlig frei ernähren darf. Bei Patienten mit klassischer PKU könnte die diätetische Zufuhr an Phenylalanin in vielen Fällen verdoppelt bis verdreifacht werden. Hiermit wäre nicht nur eine normale neurologische und intellektuelle Entwicklung, sondern auch ein erheblicher Gewinn an Lebensqualität verbunden.

Warum wurde das Phänomen der BH₄-Sensitivität erst jetzt erkannt?

Seit über 20 Jahren wird bei allen Patienten mit HPA routinemäßig ein BH₄-Belastungstest durchgeführt, um die sehr seltenen Fälle zu identifizieren, bei denen ein genetisch bedingter BH₄-Mangel vorliegt. Hierbei wird die Phenylalaninkonzentration im Plasma vor, sowie vier und acht Stunden nach BH₄-Gabe bestimmt. Bei Patienten mit einem BH₄-Mangel führt die Gabe von BH₄ zu einer sehr raschen Normalisierung der Phenylalaninkonzentration im Plasma. Bei Patienten mit Defekt der PAH führt die Gabe von BH₄ im Beobachtungszeitraum von acht Stunden in der Regel zu keinem signifikanten Abfall des Phenylalanins. Immer wieder wurde jedoch das Phänomen eines mäßiggradigen Abfalls der Phenylalaninkonzentration innerhalb dieses Zeitraums beobachtet. Diese Befunde wurden jedoch lange Zeit ignoriert, da sich bei der biochemischen Untersuchung (Bestimmung der Pterine im Urin, Bestimmung der Aktivität der DHPR der Erythrozyten) kein Hinweis auf einen Kofaktor-Mangel ergab. Die Existenz einer dritten Variante der HPA, nämlich eines BH₄-sensitiven Defektes der PAH ohne BH₄-Mangel, wurde nicht in Betracht gezogen.

Wir sind diesem Phänomen nachgegangen, indem wir den BH₄-Belastungstest modifiziert haben. Die Beobachtungsdauer wurde von acht auf 15 Stunden verlängert. Hierbei sahen wir, dass es bei Patienten mit BH₄-sensitivem Defekt der PAH zu einem weiteren Abfall der Phenylalaninkonzentration im Vollblut kam und der wesentliche Abfall bei den meisten der Patienten erst im Zeitfenster zwischen acht und 15 Stunden erfolgte. Das Endniveau der Phenylalaninkonzentration im Vollblut war bei dieser Gruppe ähnlich, die Kinetik war jedoch vollkommen unterschiedlich.

Da bei den einen Fällen ein Kofaktor-Mangel vorlag und bei den anderen nicht, ist von völlig verschiedenen Mechanismen der Phenylalaninsenkung auszugehen. Für Patienten mit BH₄-sensitivem Defekt der PAH konnten wir mittels Durchführung von *in vivo* Phenylalaninoxidationstesten einen direkten Effekt von BH₄ auf die Aktivität der PAH nachweisen.

Das Phänomen der BH₄-Sensitivität wurde nicht nur klinisch übersehen, sondern auch laborchemisch nicht erkannt. Über viele Jahre wurde die PAH *in vitro* exprimiert, um die Restaktivität des mutierten Enzyms zu bestimmen. Die Abhängigkeit der PAH-Aktivität von der Konzentration des Kofaktors wurde jedoch nicht untersucht. Die Experimente wurden stets mit BH₄ im Überschuß durchgeführt und wahrscheinlich wurde deshalb das Phänomen der BH₄-Sensitivität übersehen.

BH₄ senkt die Phenylalaninkonzentration im Vollblut und steigert die Oxidationskapazität der PAH.

Neben der Untersuchung der Phenylalaninkonzentration im Vollblut im Rahmen eines kombinierten Phenylalanin-BH₄-Belastungstests wurde in dieser Studie die *in vivo* Phenylalanin-Oxidationsrate (¹³C-Phenylalanin-Oxidationstest) vor und nach Kurzzeittherapie mit BH₄ (30 Stunden) bestimmt. Dabei sollte durch Atemteste *in vivo* untersucht werden, ob BH₄ in der Lage ist, die noch vorhandene Oxidationskapazität zu steigern. Die kumulative ¹³CO₂-Wiederfindungsrate nach 180 Minuten in % der Tracermenge diente als Maß für die *in vivo* Phenylalanin-Oxidationsrate.

Bei 27 (87%) der 31 Patienten mit milder HPA (10 Patienten) oder milder PKU (21 Patienten) führte BH₄ im kombinierten Phenylalanin-BH₄-Belastungstest 15 Stunden nach der Belastung mit BH₄ zu einer signifikanten Abnahme der Phenylalaninkonzentration im Vollblut. Die *in vivo* Phenylalanin-Oxidationsrate konnte bei 23 dieser 31 Patienten (74%) durch eine Kurzzeittherapie mit BH₄ signifikant angehoben werden. Nur vier Patienten mit einer milden PKU und alle sieben Patienten mit klassischer PKU erfüllten das in dieser Studie festgelegte Kriterium des Ansprechens auf BH₄ nicht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch den ¹³C-Phe-Oxidationstest Patienten mit einer klassischen PKU von Patienten mit milderer Varianten, milder PKU und milder HPA, unterschieden werden können. Übereinstimmend mit Literaturdaten (Treacy 1997) zeigte sich, dass die

Auswirkungen der Mutationen des *PAH*-Gens sich in der *in vivo* Phenylalanin-Oxidationsrate widerspiegeln.

Aufgrund der multifaktoriellen Entstehung der HPA ist die ^{13}C -Phenylalanin-Oxidationsrate zwar ein Maß für die Aktivität der PAH, jedoch kann dabei nur begrenzt eine Aussage über den Gesamtstoffwechsel von Phenylalanin im Organismus getroffen werden. So entsprachen die fraktionellen Veränderungen des Phenylalaninumsatzes nicht immer der Veränderung der *in vivo* Phenylalanin-Oxidationsrate. Dabei handelt es sich um eine Beobachtung, die generell bei genetisch bedingten Enzymdefekten (*Kacser 1973*) und ganz besonders bei einem Defekt der PAH (*Scriver 1998*) nicht unerwartet ist. Die PAH ist Teil eines komplexen Systems bestehend aus zahlreichen Enzymen, die z.B. zur Synthese und Regulierung von BH_4 , dem Kofaktor der PAH, benötigt werden. Dabei arbeiten die Enzyme nicht isoliert voneinander, sondern sind in Kaskaden hintereinandergeschaltet, in denen das Produkt eines Enzyms für nachgeschaltete Enzyme als Substrat dient und somit eine direkte Abhängigkeit untereinander besteht. Selbst innerhalb eines einzelnen Enzyms handelt es sich um ein komplexes System. So dient z.B. Phenylalanin bei der Oxidation durch die PAH nicht nur als Substrat durch Bindung in der katalytischen Region, sondern auch als Aktivator in der regulatorischen Domäne (*Kaufman 1999; Scriver 1998*). Darüber hinaus wird der Hauptteil des Phenylalanins zwar über die PAH verstoffwechselt, daneben kann Phenylalanin aber auch transaminiert oder decarboxyliert und z.B. im Eiweißaufbau umgesetzt werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei der Mehrzahl der Patienten, bei denen die periphere Phenylalaninkonzentration im Vollblut abfiel, die *in vivo* Phenylalanin-Oxidationsrate anstieg. Damit bestätigen die Ergebnisse dieser Studie die Hypothese, dass eine verminderte Aktivität der PAH durch die verabreichten pharmakologischen Dosen des natürlichen Kofaktors der PAH, BH_4 , verbessert wird und das toxische Agens hierdurch eliminiert werden kann.

Wirkung einer Therapie mit BH_4 bei Patienten mit schwerem klinischem Phänotyp

Sieben Patienten mit klassischer PKU haben das in dieser Studie definierte Kriterium für BH_4 -Sensitivität nicht erfüllt (ID 28 und ID 33-38). Bei genauer Analyse der Daten ließ sich jedoch in einigen Fällen ein Teilansprechen erkennen. Bei zwei Patienten (ID 35 und ID 36) sank die Phenylalaninkonzentration im Vollblut nach 15 Stunden

um 20% bzw. um 28% des Ausgangswertes. Darüber hinaus konnte bei vier (ID 28, ID 33, ID 35 und ID 37) der sieben Patienten mit klassischer PKU die Phenylalanin-Oxidationsrate nach Kurzzeittherapie mit BH_4 um 3,6%-24% gesteigert werden.

Um dieses Teilansprechen weiter zu untersuchen, wurde bei einem Patienten (ID 28) ein Langzeittherapieversuch unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Wir erhöhten zunächst schrittweise die Phenylalaninzufuhr auf 1200 mg/d, unter der die Phenylalaninkonzentration im Vollblut kontinuierlich anstieg. Unter Verabreichung von BH_4 sank die Phenylalaninkonzentration im Vollblut auf die Hälfte des Ausgangswertes ab. Dieser Befund spricht für das Vorliegen eines Defektes der PAH, der zwar im Kurzzeitbelastungstest das Kriterium für BH_4 -Sensitivität nicht erfüllt, aber bei hochdosierter Langzeittherapie auf eine pharmakologische Kofaktortherapie anspricht.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine medikamentöse Therapie nicht nur bei Patienten mit milden klinischen Phänotypen durchgeführt werden kann, sondern auch im Rahmen einer Kombinationstherapie (weniger strenge Diät bei gleichzeitiger Einnahme von BH_4) bei einem Teil der Patienten mit klassischer PKU eingesetzt werden kann. Die Lockerung der strengen Diät durch eine Kombinationstherapie könnte bei einer grossen Anzahl von Patienten mit PKU zu einem erheblichen Gewinn an Lebensqualität führen.

Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Die PKU, eine der häufigsten monogenetischen Erkrankungen, ist eine autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselstörung durch Mutationen im *PAH*-Gen. In dieser Studie konnten wir bei 37 der 38 Patienten jeweils zwei pathogene Mutationen im *PAH*-Gen, darunter 6 bisher nicht beschriebene Missense-Mutationen, nachweisen. Dabei identifizierten wir bei Patienten, die auf BH_4 ansprachen, überwiegend sogenannte „milde“ Mutationen, während bei den nicht BH_4 -sensitiven Patienten hauptsächlich Genotypen nachgewiesen wurden, die bei Patienten mit schwerer PKU vorkommen (*Scriver 2000*).

Möchte man allerdings einen generellen Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der phänotypischen Ausprägung aufzeigen, müssen die dabei zugrundeliegenden komplexen molekularen, biochemischen und klinischen Gegebenheiten berücksichtigt werden (*Scriver 2002; Scriver 1999*). Darüber hinaus erschwert die multifaktorielle Entstehung der PKU und die Tatsache, dass bei der überwiegenden

Mehrzahl der Patienten eine Compound-Heterozygotie vorliegt, eine zuverlässige Vorhersage des klinischen Phänotyps auf der Basis des Genotyps (*Guldberg 1998*). Dies lässt sich anhand der Mutation Y414C erläutern. Es handelt sich dabei um die am häufigsten auftretende milde PKU-Mutation in Nord- und Westeuropa (*Okano 1991*). Sie tritt bei Patienten mit verschiedenen klinischen Phänotypen auf (*Guldberg 1998; Kayaalp 1997*). Wir identifizierten übereinstimmend mit anderen Autoren (*Lindner 2001*) bei zwei Patienten (ID 18 und ID 28) die Mutation Y414C in funktionell hemizygotem Zustand in Kombination mit der Mutation IVS12+1G>A bei Patienten, die bei Vorliegen identischer Genotypen unterschiedlich auf BH₄ ansprachen. Ein funktionell hemizygoter Zustand beschreibt eine heterozygote Mutationskonstellation, in der es sich bei einer der beiden Mutationen um eine putative Nullmutation handelt. So wies der eine Patient (ID 18) phänotypisch eine milde PKU mit BH₄-Sensitivität auf, während bei dem anderen Patienten (ID 28) eine klassische PKU vorlag, die nicht auf die Gabe von BH₄ ansprach. In homozygotem Zustand und bei der damit verbundenen homopolymeren Tertiärstruktur wurde die Mutation Y414C mit BH₄-Sensitivität assoziiert (*Steinfeld 2002; Blau 2002*). Ein weiteres Beispiel lässt sich an der Mutation L48S aufzeigen, die an gleicher Stelle in homozygotem Zustand als BH₄-sensitiv klassifiziert wurde. In funktionell hemizygoter Konstellation (Allel 1: L48S, Allel 2: P281L) identifizierten wir diese Mutation jedoch bei einer Patientin (ID 36) mit dem klinischen Phänotyp einer klassischen PKU ohne Ansprechen auf die Gabe von BH₄.

Strukturelle Lokalisation der Missense-Mutationen auf dem PAH-Protein

Die identifizierten *PAH*-Mutationen wurden *in silico* in die verfügbare Kristallstruktur der PAH modelliert, um erste strukturelle Informationen zum Zusammenhang zwischen Mutation und BH₄-Sensitivität zu erarbeiten. Wir konnten zeigen, dass 8 der 12 Missense-Mutationen, die einen Zusammenhang mit dem Ansprechen auf BH₄ zeigten, in Genbereichen lagen, die für die katalytische Domäne des Proteins kodieren, während jeweils 2 in Regionen lagen, die für die regulatorische oder die Tetramerisierungs-Domäne kodieren. Übereinstimmend mit Literaturdaten (*Erlandsen 2001*) konnten wir somit für eine größere Anzahl von Mutationen nachweisen, dass die meisten Missense-Mutationen, die mit BH₄-Sensitivität assoziiert werden konnten, in der katalytischen Domäne des Proteins lokalisiert sind,

aber nicht direkt das aktive Zentrum betreffen und nicht direkt in die Kofaktorbindung involviert sind.

Wirkmechanismen von BH₄ bei Defekt der PAH

Die Beobachtung, dass manche Patienten schnell und andere langsam auf BH₄ ansprachen, sowie Unterschiede im zeitlichen Verlauf und der relativen Zunahme der ¹³CO₂-Wiederfindungsrate, führten zu der Annahme, dass der therapeutische Effekt von BH₄ durch verschiedene Wirkungsmechanismen und in unterschiedlichem Ausmaß erzielt wird. Die molekularen Mechanismen, die der BH₄-Sensitivität zugrunde liegen, sind bisher jedoch experimentell nicht belegt.

BH₄ könnte als allosterischer Effektor die Aktivität der PAH erhöhen. Oligomere Enzyme werden häufig durch Liganden beeinflusst, die fernab vom aktiven Zentrum binden und trotzdem die Konformation des aktiven Zentrums beeinflussen. Bei allosterischen Enzymen des K-Typs wird durch Bindung des Liganden die Affinität zum Substrat verändert, bei solchen des V-Typs hingegen die Maximalgeschwindigkeit.

Darüber hinaus wird eine Steigerung der Affinität des mutierten Enzyms gegenüber dem Kofaktor (*Erlandsen 2001*), eine Expressionszunahme des PAH-Gens (*Blau 2002*), sowie eine Stabilisierung der PAH-mRNA (*Linscheid 1998*) durch BH₄ diskutiert.

Einige experimentelle Untersuchungen zu den molekularen Konsequenzen von PAH-Mutationen führten zur Hypothese, dass BH₄ die Konformation der funktionellen PAH-Tetramerstruktur erleichtert oder das fehlgefaltete Enzym vor frühzeitigem proteolytischen Abbau schützt (*Fisher 1973; Waters 2001*).

62% der Mutationen des PAH-Gens sind Missense-Mutationen, bei denen es als Folge einer Punkt- oder Codonmutation zum Austausch einer Aminosäure kommt. In der hier vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass der Anteil dieser Mutationen in der Untergruppe der BH₄-sensitiven HPA 79% beträgt (*Muntau 2002*). Es besteht die Hypothese, dass diese Missense-Mutationen Faltungsanomalien und einen fehlerhaften Aufbau des PAH-Proteins bewirken (*Waters 2003*). Dabei kommt es durch die Substitution einer Aminosäure zu einem fehlerhaft gefalteten Monomer der PAH, dessen freiliegende hydrophobe Oberfläche zu Abweichungen in der letztendlich irreversiblen Oligomerstruktur führt. Die resultierenden strukturellen Abweichungen triggern die zelluläre Abwehr, so dass es zu einem beschleunigten

Abbau der abnormen Proteine kommt. Die dadurch verminderte Anzahl funktioneller PAH-Enzyme führt schließlich innerhalb der Zelle zu einer Abnahme der Phenylalaninhydroxylierungsrate und damit zu einer erhöhten Phenylalaninkonzentration in Zellen und Körperflüssigkeiten.

Diese Faltungsprozesse der durch Mutation varianten PAH-Proteine unterliegen zahlreichen Einflüssen. In vielen Fällen muss die Faltung von einer Proteinmaschinerie, den sogenannten "molekularen Chaperonen" (Faltungshelferproteinen) vermittelt werden. Die molekularen Chaperone haben dabei die Aufgabe, die Fehlfaltung und irreversible Verklumpung (Aggregation) ungefalteter Proteinketten zu verhindern und ihre korrekte und effiziente Faltung zu fördern, um so die strukturelle Integrität von Proteinen aufrecht zu erhalten. Die Rolle natürlich vorkommender Chaperone bei der Faltung des PAH-Wildtyp-Proteins bzw. bei der Rückfaltung varianter PAH-Proteine ist bisher ungeklärt. Die Aufklärung dieser Faltungsprozesse ist Bestandteil zukünftiger Forschung (*Waters 2000; Slavotinek 2001*). Bisher konnte gezeigt werden, dass eine Koexpression von PAH-Mutationen mit den natürlichen Chaperonen GroEL und GroESL *in vitro* in *E. coli* zu einer Zunahme der Expression des varianten Proteins führt (*Gamez 2000; Pey 2003*).

Darüber hinaus konnten *in vivo* Faltungsprozesse durch die exogene Zugabe niedermolekularer Verbindungen, sogenannter „chemischer Chaperone“ wie z.B. Polyole (z.B. Glycerol) oder bestimmte Aminosäurederivate (z.B. Taurine), verbessert werden (*Welch 1996; Waters 2001*). Beispiele für Proteinfaltungserkrankungen, bei denen durch den Einsatz chemischer Chaperone experimentelle Erfolge erzielt werden konnten, sind neurodegenerative Erkrankungen wie der Morbus Alzheimer oder die Prionenkrankheiten, sowie die Cystische Fibrose. Bei der Cystischen Fibrose ist das *CFTR*-Gen defekt. Das bedeutet, dass der Chloridionenkanal, für den dieses Gen kodiert, nicht oder nur unzureichend gebildet werden kann. Durch den gestörten Salztransport (Chlorid) kommt es zur Verstopfung von Drüsen in verschiedenen Organen wie zum Beispiel Lunge und Bauchspeicheldrüse, was letztlich zu den komplexen Folgeerscheinungen der Mukoviszidose führt. Der Gendefekt $\Delta F508$ -*CFTR* ist die häufigste Form der Mutation des *CFTR*-Gens; bei ca. 70 Prozent aller Mukoviszidose Patienten Nord- und Mitteleuropas tritt diese Mutation auf. Bei dieser Mutation konnten Forscher durch Potentialdifferenzmessungen nachweisen, dass die Funktion des CFTR-Kanals durch Behandlung mit Kurkumin als chemisches Chaperone bei Mäusen und in einer Hamster-Zellkultur

nahezu normalisiert wird. Zur Erklärung des Wirkmechanismus von Kurkumin stellten die Wissenschaftler unter anderem die Hypothese auf, dass Kurkumin direkt an den defekten CFTR-Kanal bindet und dessen Eigenschaften in der Tertiärstruktur so verändert, dass die normale Funktion wieder gewährleistet ist (*Egan 2004*). Diese Forschungsergebnisse eröffnen neue Perspektiven für die therapeutische Anwendung solcher niedermolekularer Wirkstoffe bei primär genetisch verursachten Krankheiten, deren Funktionsverlust auf mutationsbedingte fehlgefaltete Enzyme zurückzuführen ist (*Morello 2000*).

Der wahrscheinlichste Wirkmechanismus, der der BH₄-Sensitivität zugrunde liegt, liegt aus unserer Sicht in der Rolle von BH₄ als chemisches Chaperone, d.h., dass der Kofaktor mutationsbedingte Faltungsanomalien des PAH-Proteins verbessert, soweit die zugrundeliegende Mutation eine Korrektur zulässt. Dabei nimmt man an, dass therapeutisch verabreichtes BH₄ mit hoher Affinität seine Wirkung an der BH₄-Kofaktorbindungsstelle des mutationsbedingten abnormen PAH-Enzyms erzielt. BH₄ würde somit in den meisten Fällen als spezielles exogenes Chaperone eingesetzt werden und dabei einen positiven Effekt auf den Faltungsprozeß im Aufbau und/oder auf die thermodynamische Stabilität des mutationsbedingten PAH-Proteins ausüben und folglich den intrazellulären Abbau verlangsamen.

Weitere klinische Studien bestätigen die Ergebnisse dieser Studie

Seit Abschluß und Veröffentlichung unserer Untersuchungen wurden unsere Studienergebnisse in mehreren Studien weltweit bestätigt (*Cerone 2004; Desviat 2004; Lucke 2003; Matalon 2004; Shintaku 2004; Spaapen 2003; Steinfeld 2004; Trefz 2003; Weglage 2002*). Übereinstimmend mit der hier vorliegenden Arbeit profitierten dabei insbesondere Patienten mit mildem klinischem Phänotyp (HPA und milde PKU) von einer pharmakologischen Therapie mit BH₄, wodurch bei 80% der Patienten eine Lockerung der diätetischen Maßnahmen erzielt werden konnte. Neuere Studien bestätigen darüber hinaus die von uns vermutete Langzeitwirksamkeit von BH₄ bei Patienten mit schwerem klinischem Phänotyp (*Hennermann 2002; Matalon 2004*). Bei diesen Patienten, bei denen in der Regel nur ein partielles Ansprechen auf BH₄ erreicht werden kann, könnte die zukünftige Therapieoption aus einer Kombinationstherapie (weniger strenge Diät bei gleichzeitiger Einnahme von BH₄) bestehen. Allerdings kann bei Patienten mit

Nullmutationen auf beiden Allelen ohne Enzymrestaktivität kein pharmakologischer Therapieerfolg erwartet werden.

Inzwischen wurde weltweit bei 135 Patienten mit HPA bei Defekt der PAH und unterschiedlichem Schweregrad eine Langzeitbehandlung mit BH₄ durchgeführt. Dabei wurde BH₄ in einer Dosierung von 0,7 bis 20 mg/kg KG pro Tag über einen Zeitraum von bis zu 62 Monaten verabreicht. Die BH₄-Behandlung führte bei allen Patienten zu einer Erhöhung der diätetischen Phenylalanintoleranz, unerwünschte Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet (*Lässker 2002; Spaapen 2001; Lindner 2001; Steinfeld 2002; Bonafé 2001; Cerone 2004; Koch 2002; Lucke 2003; Nuoffer 2001; Shintaku 2004; Trefz 2003; Baldellou 2004; Campistol 2004; Moats 2004; Vilaseca 2004 ; Lambruschini 2005; Koch 2005; Matalon 2005; Hennermann 2005; Belanger-Quintana 2005; Mitchell 2005*).

5 Ausblick

Die hier vorliegende Studie hat wichtige Implikationen für das diagnostische und therapeutische Vorgehen bei Patienten mit HPA. 50 Jahre nach Einführung der diätetischen Therapie für die Behandlung der PKU eröffnet sich nun die Möglichkeit einer medikamentösen Therapie, die bei einer grossen Anzahl von Patienten zu einem erheblichen Gewinn an Lebensqualität führen könnte. Gleichzeitig schlagen wir eine neue Klassifikation für Patienten mit HPA vor. Diese orientiert sich nicht mehr an der prätherapeutischen Phenylalaninkonzentration, sondern am phänotypischen Merkmal der BH₄-Sensitivität:

- Nicht BH₄-sensitive HPA
- BH₄-sensitive HPA
 - BH₄-sensitive Defekte der PAH
 - BH₄-sensitive Enzymdefekte bei primären Störungen der BH₄-Synthese oder der BH₄-Regeneration

Es muß dringend empfohlen werden, dass bei allen Patienten mit HPA ein verlängerter BH₄-Belastungstest durchgeführt wird, um die Identifikation aller Patienten sicherzustellen, die von einer Behandlung mit BH₄ profitieren könnten.

BH₄ könnte nicht nur zur lebensbegleitenden Behandlung bei Patienten mit Defekt der Phenylalaninhydroxylase eingesetzt werden, sondern könnte auch im Bereich der maternalen PKU eine besonders wertvolle Rolle spielen. Dabei handelt es sich um eine Embryofetopathie bei PKU der Schwangeren. Die intrauterine Schädigung des genetisch u.U. stoffwechselgesunden Feten erfolgt durch hohe mütterliche Plasma-Phenylalaninkonzentrationen und manifestiert sich mit Dystrophie, Mikrozephalie mit mentaler Retardierung und kongenitalen Herzfehlern. Die Schädigung des ungeborenen Kindes kann bisher nur durch eine bereits präkonzeptionell begonnene und über den gesamten Schwangerschaftsverlauf konsequent beibehaltene, strikt phenylalaninarme Diät verhindert werden und bereitet den Patientinnen in der Regel größte Schwierigkeiten (*Smith 1990*). Es ist davon auszugehen, daß sich durch eine Therapie mit BH₄ die hohen mütterlichen

Plasma-Phenylalaninkonzentrationen senken und damit die negativen Einflüsse auf das Neugeborene verhindern ließen. Gleichzeitig könnte die während der Schwangerschaft notwendige strenge Diät gelockert oder beendet werden. Bisher liegen zur Behandlung mit BH₄ in der Schwangerschaft jedoch nur erste rudimentäre klinische Daten vor (*Koch 2005*).

Nicht nur bei Schwangeren, sondern bei allen Patienten mit Defekt der Phenylalaninhydroxylase, ist eine medikamentöse Therapie mit BH₄ bisher noch nicht zur klinischen Routine geworden, da die Substanz noch nicht zur Behandlung der Hyperphenylalaninämie durch Defekt der Phenylalaninhydroxylase zugelassen ist. Die vorliegende Studie führte zur Erteilung einer „orphan drug designation“ durch die Europäische Kommission an die verantwortlichen Studienleiter am Dr. von Haunerschen Kinderspital an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Hierdurch werden die nun anstehenden Aufgaben auf dem Weg zur Marktzulassung des Präparates als „orphan drug“ erheblich erleichtert. Im Rahmen von Industriekooperationen werden derzeit Untersuchungen zu Bioverfügbarkeit, Pharmakokinetik, Toxizität und Teratogenität im Tiermodell, sowie eine multizentrische doppelblinde placebokontrollierte klinische Phase III Studie zu Wirksamkeit und Verträglichkeit von BH₄ durchgeführt. Begleitend soll ein experimentelles Grundlagenprojekt, das im Rahmen des Bayerischen Genomforschungsnetzwerkes gefördert wird, molekulare Daten zum Wirkmechanismus von BH₄ bei Defekt der PAH liefern.

Es besteht die Hypothese, dass es sich bei der Phenylketonurie um eine geeignete Modellerkrankung für die Entwicklung pharmakotherapeutischer Strategien bei genetisch bedingten Defekten der Proteinfaltung handelt. Idealerweise ließen sich die hierbei gewonnenen Erkenntnisse auf eine oder mehrere der zahlreichen weiteren Erkrankungen, die durch Proteinfehlfaltungen verursacht werden, übertragen.

Zusammenfassend ist daher davon auszugehen, dass BH₄ in wenigen Jahren als „orphan drug“ für die Indikation der HPA durch Defekt der PAH zugelassen wird. Hiermit beginnt für die Mehrzahl der Patienten mit Phenylketonurie nach 50 Jahren Diättherapie eine neue Ära, die der medikamentösen Therapie, die vielen Betroffenen ungeahnte Freiheiten eröffnen wird.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Die bisherige Klassifikation von Patienten mit HPA unterscheidet nicht BH₄-sensitive Defekte der PAH und BH₄-sensitive Enzymdefekte bei primären Störungen der BH₄-Synthese. Sie wurde kürzlich durch die Beobachtung von BH₄-Sensitivität bei Patienten mit Mutationen im *PAH*-Gen ohne Nachweis eines BH₄-Mangels in Frage gestellt.

Patienten und Methoden: Bei 38 Patienten mit HPA durch Mutationen im *PAH*-Gen wurden zur systematischen Erfassung von BH₄-Sensitivität der biochemische Phänotyp (kombinierter Phenylalanin-BH₄-Belastungstest) und die *in vivo* Phenylalanin-Oxidationsrate (¹³C-Phe-Oxidationstest) vor und nach Gabe von BH₄ untersucht.

Phe-BH₄-Belastungstest: Die Phenylalaninkonzentration im Vollblut 15 Stunden nach Gabe von BH₄ (20 mg/kg) lag signifikant unter dem Ausgangswert bei 10/10 der Patienten mit milder HPA (Phenylalaninkonzentration im Vollblut ohne Diät < 600 µmol/l; Median 363 µmol/l → 90 µmol/l, p<0,01) und bei 17/21 der Patienten mit milder PKU (Phenylalaninkonzentration im Vollblut ohne Diät 600-1200 µmol/l; Median 583 µmol/l → 168 µmol/l, p<0,0001). In der Gruppe der Patienten mit klassischer PKU (Phenylalaninkonzentration im Vollblut ohne Diät > 1200 µmol/l, n=7) kam es nach Gabe von BH₄ in keinem Fall zu einem signifikanten Absinken der Phenylalaninkonzentration im Vollblut (Median 732 µmol/l → 683 µmol/l, p=0,74).

¹³C-Phenylalanin-Oxidation: Die kumulative ¹³CO₂-Bildung nach 180 Minuten in % der verabreichten Tracermenge diente als Maß für die *in vivo* Phenylalanin-Oxidationsrate. Nach Gabe von BH₄ (10 mg/kg x 30 Std.) kam es in der Gruppe der milden HPA in 10/10 Fällen (Median 5,6% → 7,35%, p<0,01) und in der Gruppe der milden PKU in 17/21 Fällen (Median 3,5% → 6,8%, p<0,0001) zu einem signifikanten Anstieg der Phenylalanin-Oxidationsrate, während dies in der Gruppe der klassischen PKU nicht der Fall war (Median 1,7% → 1,9%, p=0,46).

PAH-Mutationsanalyse: Bei 37/38 Patienten wurden jeweils zwei pathogene Mutationen im *PAH*-Gen, darunter 6 bisher nicht beschriebene Missense-Mutationen, nachgewiesen. Die Mutationen wurden *in silico* in die Kristallstruktur der PAH

modelliert, um die zugrundeliegenden strukturellen Mechanismen der Entstehung der BH₄-Sensitivität zu untersuchen.

Schlußfolgerungen:

- 1) Eine BH₄-Sensitivität konnte bei 27 von 31 Patienten mit mildem Phänotyp eines PAH-Defektes nachgewiesen werden und ist daher als charakteristisches Merkmal und nicht als sporadisch auftretendes Einzelphänomen bei dieser Erkrankungsgruppe anzusehen.
- 2) Die bisherige Klassifikation der HPA sollte durch eine Einteilung in BH₄-sensitive und BH₄-nicht-sensitive Formen der HPA abgelöst werden, die durch die Durchführung eines Phenylalanin-BH₄-Belastungstestes mit längerer Untersuchungszeit klar voneinander abgegrenzt werden können.
- 3) Die Beobachtungen haben erhebliche therapeutische Implikationen und legen den Schluß nahe, dass über 80% der Patienten mit milder PKU von einer Behandlung mit BH₄ profitieren könnten.
- 4) Der Ersatz der Diät durch eine Kofaktorthherapie wird in Zukunft bei einer grossen Anzahl von Patienten zu einem erheblichen Gewinn an Lebensqualität führen.

7 Literaturverzeichnis

- Awiszus D., Unger I. (1990). "Coping with PKU: results of narrative interviews with parents." Eur J Pediatr 149: 45-51.
- Baldellou A., Campos C., Navarro H., Ruiz-Echarri M., Salazar I., Ugarte M., Pèrez B., Desiviat L. (2004). "Maximum levels of phenylalanine at diagnosis and the response to BH4 in hyperphenylalaninemia." J. Inherit. Metab. Dis. 27: 26.
- Beasley M.G., Costello P.M., Smith I. (1971). "Outcome of treatment in young adults with phenylketonuria detected by routine neonatal screening between 1964 and 1971." Q J Med 87: 155-60.
- Belanger-Quintana A., Garcia M., Castro M., Desviat L., Perez B., Mejia B., Ugarte M., Matinez-Pardo M. (2005). "Spanish BH(4)-responsive phenylalanine hydroxylase-deficient patients: Evolution of seven patients on long-term treatment with tetrahydrobiopterin". Mol Genet Metab 86 (1): 61-66.
- Bickel H., Gerrard J., Hickmans EM. (1953). "Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria." Lancet 2: 812.
- Blaskovics M.E., Schaeffler G.E., Hack S. (1974). "Phenylalaninaemia. Differential diagnosis." Arch Dis Child 49(11): 835-43.
- Blau N. (1994). "Differentialdiagnose der Hyperphenylalaninämie." Schweizerische Gesellschaft für klinische Chemie Labo life 5.
- Blau N., Thöny B., Renneberg A., Penzien J. M., Hyland K., Hoffmann G. F. (1999). "Variant of dihydropteridine reductase deficiency without hyperphenylalaninaemia: effect of oral phenylalanine loading." J Inherit Metab Dis 22(3): 216-20.
- Blau N., Trefz F.K. (2002). "Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency: Possible regulation of gene expression in a patient with the homozygous L48S mutation." Mol Genet Metab 75(2): 186-7.
- Bonafé L.B., Romstad A., Guttler F., Burlina A. B. (2001). "Treatable neurotransmitter deficiency in mild phenylketonuria." Neurology 57(5): 908-11.
- Bremer H.J., Burgard P., Clemens P.C., Leupold D., Mönch E., Przyrembel H., Trefz F.K., Ullrich K. (1997). "Empfehlung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen: Therapie von Patienten mit Phenylketonurie." Monatsschrift Kinderheilkunde 145: 961-962.
- Burgard P., Schmidt E., Rupp A., Schneider W., Bremer H.J. (1996) Intellectual development of the patients of the German Collaborative Study of children treated for phenylketonuria. Eur J Pediatr 155, S33-8 (1996). "Intellectual development of the patients of the German Collaborative Study of children treated for phenylketonuria." Eur J Pediatr 155: 33-8.
- Campistol J., Gassió R., Fusté E., Lambruschini N., Vilaseca M.A. (2004). "Global cognitive performance in PKU patients treated with BH4." J. Metab. Dis. 27: 27.
- Cerone R., Schiaffino M.C., Fantasia A.R., Birk Moller L., Blau N. (2004). "Long-term follow-up of a patient with mild tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria." Mol Genet Metab. 81(2): 137-9.
- Chace D. H., Millington D.S., Terada N., Kahler S.G., Roe C.R., Hofman L.F. (1993). "Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry." Clin Chem 39(1): 66-71.

- Cristiano R., Smith L.C., Woo S.L. (1993). "Hepatic gene therapy: adenovirus enhancement of receptor-mediated gene delivery and expression in primary hepatocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 90(6): 2122-6.
- Danks D. M., Cotton R. G., Schlesinger P. (1975). "Letter: Tetrahydrobiopterin treatment of variant form of phenylketonuria." Lancet 2(7943): 1043.
- Desviat L. R., Perez B., Belanger-Quintana A., Castro M., Aguado C., Sanchez A., Garcia M.J., Martinez-Pardo M., Ugarte M. (2004). "Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype." Mol Genet Metab. 83(1-2): 157-62.
- Egan M. E., Pearson M., Weiner S.A., Rajendran V., Rubin D., Glöckner-Pagel J., Canny S., Du K., Lukacs G.L., Caplan M.J. (2004). "Kurkumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects." Science 304: 600-602.
- Eisensmith R., Woo S.L. (1996). "Gene therapy for phenylketonuria." Eur J Pediatr. 155 Suppl 1: 16-9.
- Erlandsen H., Fusetti F., Martinez A., Hough E., Flatmark T., Stevens R. C. (1997). "Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria." Nat Struct Biol 4(12): 995-1000.
- Erlandsen H., Martinez A., Knappskog P.M., Haavik J., Hough E., Flatmark T. (1997). "Crystallization and preliminary diffraction analysis of a truncated homodimer of human phenylalanine hydroxylase." FEBS Letter 406: 171-174.
- Erlandsen H., Stevens, R. C. (1999). "The structural basis of phenylketonuria." Mol Genet Metab 68(2): 103-25.
- Erlandsen H., Stevens R.C. (2001). "A structural hypothesis for BH4 responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninemia and phenylketonuria." J Inher Metab Dis 24: 213-230.
- Fang B., Eisensmith R.C., Li X.H., Finegold M.J., Shedlovsky A., Dove W., Woo S.L. (1994). "Gene therapy for phenylketonuria: phenotypic correction in a genetically deficient mouse model by adenovirus-mediated hepatic gene transfer." Gene Ther. 1(4): 247-54.
- Fisher D. B., Kaufman S. (1973). "The stimulation of rat liver phenylalanine hydroxylase by lysolecithin and -chymotrypsin." J Biol Chem 248(12): 4345-4353.
- Fölling A. (1934). "Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität." Hoppe-Seylers Z Physiol. Chem. 277: 169-176.
- Fukushima T., Nixon J.C. (1980). "Chromatographic analysis of pteridines." Methods Enzymol 66: 429-36.
- Fusetti F., Erlandsen H., Flatmark T., Stevens R. C. (1998). "Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria." J Biol Chem 273(27): 16962-7.
- Gamez A., Perez B., Ugarte M., Desviat L. R. (2000). "Expression analysis of phenylketonuria mutations. Effect on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein." J Biol Chem 275(38): 29737-42.
- Ghoos Y., Geypens B., Maes B., Hiele M., Vantrappen G., Rutgeerts P. (1993). "Breath tests in gastric emptying and transit studies: technical aspects of ¹³CO₂-breath tests. University hospital, Leuven."
- Giovannini M., Agostoni C., Biasucci G., Rottoli A., Luotti D., Trojan S., Riva E. (1996). "Fatty acid metabolism in phenylketonuria." Eur J Pediatr 155: 132-5.

- Griffiths P., Tarrini M., Robinson P. (1997). "Executive function and psychosocial adjustment in children with early treated phenylketonuria: correlation with historical and concurrent phenylalanine levels." J Intellect Disabil Res 41: 317-23.
- Griffiths W.J., Liu S., Rai D.K., Wang Y. (2001). "Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry." Biochem J 355(Pt 3): 545-61.
- Guex N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." Electrophoresis 18(15): 2714-23.
- Guldberg P., Rey F., Zschocke J., Romano V., Francois B., Michiels L., Ullrich K., Hoffmann G. F., Burgard P., Schmidt H., Meli C., Riva E., Dianzani I., Ponzzone A., Rey J., Güttler F. (1998). "A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype." Am J Hum Genet 63(1): 71-9.
- Guldberg P., Romano V., Ceratto N., Bosco P., Ciuna M., Indelicato A., Mollica F., Meli C., Giovannini M., Riva E. (1993). "Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in southern Europe." Hum Mol Genet 2(10): 1703-7.
- Guthrie R. and A. Susi (1963). Pediatrics 32: 338-343.
- Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., Mc Cormack M.P., Wulffraat N., Leboulch P., Lim A., Osborne C.S., Pawliuk R., Morillon E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J.I., de Saint Basile G., Alexander I., Wintergerst U., Frebourg T., Aurias A., Stoppa-Lyonnet D., Romana S., Radford-Weiss I., Gross F., Valensi F., Delabesse E., Macintyre E., Sigaux F., Soulier J., Leiva L.E., Wissler M., Prinz C., Rabbitts T.H., Le Deist F., Fischer A., Cavazzana-Calvo M. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science 302(5644): 415-9.
- Hanley W., Koch R., Levy H.L., Matalon R., Rouse B., Azen C., de la Cruz F. (1996). "The North American Maternal Phenylketonuria Collaborative Study, developmental assessment of the offspring: preliminary report." Eur J Pediatr 155 Suppl 1: 169-72.
- Haycock G. B., Schwartz G. J., Wisotsky D. H. (1978). "Geometric method for measuring body surface area: a height-weight formula validated in infants, children, and adults." J Pediatr 93(1): 62-6.
- Hennermann J., Vetter B., Kulozik A., Mönch E. (2002). "Partial and total tetrahydrobiopterin-responsiveness in classical and mild phenylketonuria (PKU)." Inherit. Metab. Dis. 25: 21.
- Hennermann J., Bührer C., Blau N., Vetter B., Mönch E. (2005). "Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria". Mol Genet Metab 86 (1): 86-90.
- Holtzman N. A., Kronmal R.A., van Doorninck W., Azen C., Koch R. (1986). "Effect of age at loss of dietary control on intellectual performance and behavior of children with phenylketonuria." N Engl J Med 314: 593-8.
- Jervis G. A. (1937). Arch. Neurol. Psychiatry 38: 944-963.
- Jochum F., Terwolbeck K., Meinhold H., Behne D., Menzel H., Lombeck I. (1997). "Effects of a low selenium state in patients with phenylketonuria." Acta Paediatr Suppl 86: 775-7.
- Kacser H., Burns J. A. (1973). "The control of flux." Symp Soc Exp Biol 27: 65-104.

- Kaufman S. (1999). "A model of human phenylalanine metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients." Proc Natl Acad Sci U S A 96(6): 3160-4.
- Kay M., Nakai H. (2003). "Looking into the safety of AAV vectors." Nature 424(6946): 251.
- Kayaalp E., Treacy E., Waters P. J., Byck S., Nowacki P., Scriver C. R. (1997). "Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations." Am J Hum Genet 61(6): 1309-17.
- Kobe B., Jennings I.G., House C.M., Michell B.J., Goodwill K.E., Santarsiero B.D., Stevens R.C., Cotton R.G., Kemp B.E. (1999). "Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase." Nat Struct Biol 6(5): 442-8
- Koch R., Güttler F., Blau N. (2002). "Mental illness in mild PKU responds to bioppterin." Mol Genet Metab 75(3): 284-6.
- Koch R., Moseley K., Guttler F. (2005). "Tetrahydrobiopterin and maternal PKU". Mol Genet Metab 85: 139-141.
- Kure S., Hou D. C., Ohura T., Iwamoto H., Suzuki S., Sugiyama N., Sakamoto O., Fujii K., Matsubara Y., Narisawa K. (1999). "Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency." J Pediatr 135(3): 375-8.
- Lässker U., Zschocke J., Blau N., Santer R. (2002). "Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria. Two new cases and a review of molecular genetics." J Inherit Metab Dis 25: 65-70.
- Lambruschini N., Perez-Duenas B., Vilaseca M., Mas A., Artuch R., Gassio R., Gomez L., Gutierrez A., Campistol J.(2005). "Clinical and nutritional evaluation of phenylketonuria patients on tetrahydrobiopterin monotherapy". Mol Genet Metab 86(1): 54-60.
- Lee P., Smith I., Piesowicz A., Brenton D. (1999). "Spastic paraparesis after anaesthesia." Lancet 353: 554.
- Lindner M., Haas D., Zschocke J., Burgard P. (2001). "Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria differs between patients with the same genotype." Mol Genet Metab 73(1): 104-6.
- Linscheid P., Schaffner A., Schoedon G. (1998). "Modulation of inducible nitric oxide synthase mRNA stability by tetrahydrobiopterin in vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun 243(1): 137-41.
- Liu T., Kay M.A., Darlington G.J, Woo S.L. (1992). "Reconstitution of enzymatic activity in hepatocytes of phenylalaninehydroxylase-deficient mice.
- Liu T.J., Kay M.A., Darlington G.J., Woo S.L." Somat Cell Mol Genet 18(1): 89-96.
- Lou H. C., Toft P.B., Andresen J., Mikkelsen I., Olsen B., Guttler F., Wieslander S., Henriksen O. (1992). "An occipito-temporal syndrome in adolescents with optimally controlled hyperphenylalaninaemia." J Inherit Metab Dis 15: 687-95.
- Lucke T., Illsinger S., Aulehla-Scholz C., Sander J., Das A.M. (2003). "BH4-sensitive hyperphenylalaninemia: new case and review of literature." Pediatr Neurol. 28(3): 228-30.
- Mac Donald A., Harris G., Rylance G., Asplin D.A., Booth I.W. (1997). "Abnormal feeding behaviours in phenylketonuria." Journal of Human Nutrition and Dietetics 10: 163-170.
- Matalon R., Koch R., Michals-Matalon K., Moseley K., Surendran S., Tying S., Erlandsen H., Gamez A., Stevens R.C., Romstad A., Moller L.B., Guttler F. (2004). "Biopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency." Genet Med. 6(1): 27-32.

- Matalon R., Michals-Matalon K., Koch R., Grady J., Tying S., Stevens R.C.(2005). "Response of patients with phenylketonuria in the US to tetrahydrobiopterin". Mol Genet Metab 86(1): 17-21.
- Matsuo K., Hommes F. (1987). "Regional distribution of the phenylalanine-sensitive ATP-sulphurylase in brain." J Inherit Metab Dis 10: 62-5.
- Mc Combe P. A., Mc Laughlin D.B., Chalk J.B., Brown N.N., McGill J.J., Pender M.P. (1992). "Spasticity and white matter abnormalities in adult phenylketonuria." J Neurol Neurosurg Psychiatry 55: 359-61.
- Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria (1993). "Phenylketonuria due to phenylalanine hydroxylase deficiency: an unfolding story." Bmj 306,: 115-9.
- Millington D. S., Kodo N., Norwood D. L., Roe C. R. (1990). "Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism." J Inherit Metab Dis 13(3): 321-4.
- Mitchell J.J., Wilcken B., Alexander I., Ellaway C., O'Grady H., Wiley V., Earl J., Christodoulou J. (2005). Mol Genet Metab 86 (1): 81-85.
- Moats R., Moseley K., Yano S., Nelson M., Bluml S., Koch R. (2004). "Treatment of adults with hyperphenylalaninemia with tetrahydrobiopterin." J. Metab. dis. 27: 27.
- Moen J. L., Wilcox R.D., Burns J.K. (1977). "PKU as a factor in the development of self-esteem." J Pediatr 90: 1027-9.
- Möller H. E., Vermathen P., Ullrich K., Weglage J., Koch H.G., Peters P.E. (1995). "In-vivo NMR spectroscopy in patients with phenylketonuria: changes of cerebral phenylalanine levels under dietary treatment." Neuropediatrics 26: 199-202.
- Morello J. P., Petaja-Repo U.E., Bichet D.G., Bouvier M. (2000). "Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding." Trends Pharmacol Sci. 21(12): 466-9.
- Muntau A. C., Röschinger W, Habich M., Demmelmair H., Hoffmann B., Sommerhoff C.P., Roscher A.A. (2002). "Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria." N Engl J Med. 347(26): 2122-32.
- Muntau A. C., Beblo S., Koletzko B. (2000). "Phenylketonurie und Hyperphenylalaninämie." Monatsschrift Kinderheilkunde 148: 179-193.
- Muntau A. C., Streiter M., Kappler M., Röschinger W., Schmid I., Rehnert A., Schramel P., Roscher A.A. (2002). "Age-related reference values for serum selenium concentrations in infants and children." Clin Chem 48: 555-60.
- NIH (2001). "National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: phenylketonuria: screening and management, October 16-18, 2000." Pediatrics 108(4): 972-82.
- Nixon J., Lee C.L., Milstien S., Kaufman S., Bartholome K. (1980). "Neopterin and biopterin levels in patients with atypical forms of phenylketonuria." J Neurochem 35: 898-904.
- Nuoffer J. M., Thöny B., Romstad A., Blau N. (2001). "A patient with phenylketonuria successfully treated with tetrahydrobiopterin." J Inherit Metab Dis 24 (Suppl 1): 29.
- Okano Y., Eisensmith R. C., Dasovich M., Wang T., Guttler F., Woo S. L. (1991). "A prevalent missense mutation in Northern Europe associated with hyperphenylalaninaemia." Eur J Pediatr 150(5): 347-52.

- Pearson K. D., Gean-Marton A.D., Levy H.L., Davis K.R. (1990). "Phenylketonuria: MR imaging of the brain with clinical correlation." Radiology 177: 437-40.
- Pey A. L., Desviat L.R., Gamez A., Ugarte M., Perez B. (2003). "Phenylketonuria: genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH." Hum Mutat. 21(4): 370-8.
- Preston T., Mc Millan D.C. (1988). "Rapid sample throughput for biomedical stable isotope tracer studies." Biomed Environ Mass Spectrom 16: 229-35.
- Realmuto G. M., Garfinkel B.D., Tuchman M., Tsai M.Y., Chang P.N., Fisch R.O., Shapiro S. (1986). "Psychiatric diagnosis and behavioral characteristics of phenylketonuric children." J Nerv Ment Dis 174: 536-40.
- Reber M., Kazak A.E., Himmelberg P. (1987). "Phenylalanine control and family functioning in early-treated phenylketonuria." J Dev Behav Pediatr 8: 311-7.
- Sachs (1984). "Angewandte Statistik." 6. Auflage Springer Verlag Berlin.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). "DNA sequencing with chain-termination inhibitors." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.
- Sanjurjo P., Perteagudo L., Rodriguez Soriano J., Vilaseca A., Campistol J. (1994). "Polyunsaturated fatty acid status in patients with phenylketonuria." J Inherit Metab Dis 17: 704-9.
- Sarkissian N. C., Shao , Françoise Blain , Rosalie Peevers , Hongsheng Su , Robert Heft , Thomas M., Chang, Scriver S.R. (1999). "A different approach to treatment of phenylketonuria: Phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase." Medical Sciences 96(5): 2339-2344.
- Schwahn B., Mokov E., Scheidhauer K., Lettgen B., Schonau E. (1998) Decreased trabecular bone mineral density in patients with phenylketonuria measured by peripheral quantitative computed tomography. Acta Paediatr 87, 61-3 (1998). "Decreased trabecular bone mineral density in patients with phenylketonuria measured by peripheral quantitative computed tomography." Acta Paediatr Suppl 87: 61-3.
- Scriver C. R. (1998). "An ongoing debate over phenylalanine hydroxylase deficiency in phenylketonuria." J Clin Invest 101(12): 2613-4.
- Scriver C. R. (2002). "Why mutation analysis does not always predict clinical consequences: Explanations in the era of genomics." J Pediatr 140(5): 502-6.
- Scriver C. R. and Kaufman S. (2001). Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. B. Vogelstein. New York, McGraw-Hill. II: 1667-1724.
- Scriver C. R., Waters P. J. (1999). "Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria." Trends Genet 15(7): 267-72.
- Scriver C. R., Waters P. J., Sarkissian C., Ryan S., Prevost L., Cote D., Novak J., Teebi S., Nowacki P. M. (2000). "PAHdb: a locus-specific knowledgebase." Hum Mutat 15(1): 99-104.
- Shaw D. W., Weinberger E., Maravilla K.R. (1990). "Cranial MR in phenylketonuria." J Comput Assist Tomogr 14: 458-60.
- Shintaku H., Kure S., Ohura T., Okano Y., Ohwada M., Sugiyama N., Sakura N., Yoshida I., Yoshino M., Matsubara Y., Suzuki K., Aoki K., Kitagawa T. (2004). "Long-term treatment and diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia with a mutant phenylalanine hydroxylase gene." Pediatr Res. 55(3): 425-30.
- Slavotinek A. M., Biesecker L.G. (2001). "Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease." Trends Genet. 17(9): 528-35.

- Smith I., Beasley M.G., Ades A.E. (1991). "Effect on intelligence of relaxing the low phenylalanine diet in phenylketonuria." Arch Dis Child 66: 311-6.
- Smith I., J. Glossop (1990). "Fetal damage due to maternal phenylketonuria: effects of dietary treatment and maternal phenylalanine concentrations around the time of conception (an interim report from the UK Phenylketonuria Register)." J Inherit Metab Dis 13(4): 651-7.
- Smith I., Hyland K., Kendall B. (1985). "Clinical role of pteridine therapy in tetrahydrobiopterin deficiency." J Inherit Metab Dis 8 Suppl 1: 39-45.
- Smith I., Knowles J. (2000). "Behaviour in early treated phenylketonuria: a systematic review." Eur J Pediatr 159: 89-93.
- Smith R., Loo J.A, Edmonds C.G, Barinaga C.J, Udseth H.R. (1990). "New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization." Anal Chem 62(9): 882-99.
- Spaapen L. J., Bakker, J. A., Velter, C., Loots, W., Rubio-Gonzalbo, M. E., Forget, P. P., Dorland, L., De Koning, T. J., Poll-The, B. T., Ploos van Amstel, H. K., Bekhof, J., Blau, N., Duran, M. (2001). "Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in dutch neonates." J Inherit Metab Dis 24(3): 352-8.
- Spaapen L. J., Rubio-Gozalbo M.E. (2003). "Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art." Mol Genet Metab. 78(2): 93-9.
- Steinfeld R., Kohlschütter A., Ullrich K., Lukacs Z. (2004). "Efficiency of long-term tetrahydrobiopterin monotherapy in phenylketonuria." J Inherit Metab Dis. 27(4): 449-53.
- Steinfeld R., Kohlschütter A., Zschocke J., Lindner M., Ullrich K., Lukacs Z. (2002). "Tetrahydrobiopterin monotherapy for phenylketonuria patients with common mild mutations." Eur J Ped 161: 403-405.
- Stevenson J. E., Hawcroft J., Lobascher M., Smith I., Wolff O.H., Graham P.J. (1979). "Behavioural deviance in children with early treated phenylketonuria." Arch Dis Child 54: 14-8.
- Surplice I., Griffiths P.D., Green A., Leeming R.J. (1990). "Dihydropteridine reductase activity in eluates from dried blood spots: automation of an assay for a national screening service." 13: 169-77.
- Surtees R. and N. Blau (2000). "The neurochemistry of phenylketonuria." Eur J Pediatr 159 Suppl 2: 109-13.
- Thompson A. J., Smith I., Brenton D., Youl B.D., Rylance G., Davidson D.C., Kendall B., Lees A.J. (1990). "Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria." Lancet 336: 602-5.
- Thompson A. J., Smith I., Kendall B.E., Youl B.D., Brenton D. (1991) Magnetic resonance imaging changes in early treated patients with phenylketonuria. Lancet 337, 1224 (1991). "Magnetic resonance imaging changes in early treated patients with phenylketonuria." Lancet 337: 1224.
- Thöny B., Auerbach G., Blau N. (2000). "Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions." Biochem J 347 Pt 1: 1-16.
- Treacy E. P., Delente J. J., Elkas G., Carter K., Lambert M., Waters P. J., Scriver C. R. (1997). "Analysis of phenylalanine hydroxylase genotypes and hyperphenylalaninemia phenotypes using L-[1-13C]phenylalanine oxidation rates in vivo: a pilot study." Pediatr Res 42(4): 430-5.
- Trefz F. K., Aulela-Scholz C., Blau N. (2001). "Successful treatment of phenylketonuria with tetrahydrobiopterin." Eur J Pediatr 160(5): 315.

- Trefz F. K., Blau N. (2003). "Potential role of tetrahydrobiopterin in the treatment of maternal phenylketonuria." Pediatrics 112(6 Pt 2): 1566-9.
- Van Spronsen F. J., Reijngoud D. J., Smit G. P., Nagel G. T., Stellaard F., Berger R., Heymans H. S. (1998). "Phenylketonuria. The in vivo hydroxylation rate of phenylalanine into tyrosine is decreased." J Clin Invest 101(12): 2875-80.
- Vantrappen G. R., Rutgeerts P. J., Ghos Y. F., Hiele M. I. (1989). "Mixed triglyceride breath test: a noninvasive test of pancreatic lipase activity in the duodenum." Gastroenterology 96(4): 1126-34.
- Vilaseca M. A., Lambruschini N., Mas A., Ormazábal A., Gómez L., Gutiérrez A., Artuch R., Pérez-Duenas B., Campistol J. (2004). "Tetrahydrobiopterin monotherapy in ten patients with mild/ moderate PKU." J. Inherit. Metab. Dis. 27: 29.
- Villasana D., Butler I.J., Williams J.C., Roongta S.M. (1989). "Neurological deterioration in adult phenylketonuria." J Inherit Metab Dis 12: 451-7.
- Walter J. H., Tyfield L.A., Holton J.B., Johnson C. (1993). "Biochemical control, genetic analysis and magnetic resonance imaging in patients with phenylketonuria." Eur J Pediatr 152: 822-7.
- Walter J. H., White F.J., Hall S.K., MacDonald A., Rylance G., Boneh A., Francis D.E., Shortland G.J., Schmidt M., Vail A. (2002). "How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria?" Lancet 360: 55-7.
- Waters P. J. (2003). "How PAH gene mutations cause hyper-phenylalaninemia and why mechanism matters: Insights from in vitro expression." Hum Mutat 21: 357-69.
- Waters P. J., Parniak M.A., Akerman B.R., Scriver C.R. (2000). "Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype." Mol Genet Metab. 69(2): 101-10.
- Waters P. J., Scriver C. R., Parniak M. A. (2001). "Homomeric and heteromeric interactions between wild-type and mutant phenylalanine hydroxylase subunits: evaluation of two-hybrid approaches for functional analysis of mutations causing hyperphenylalaninemia." Mol Genet Metab 73(3): 230-8.
- Weglage J., Funders B., Ullrich K., Rupp A., Schmidt E. (1996). "Psychosocial aspects in phenylketonuria." Eur J Pediatr 155 Suppl 1: S101-4.
- Weglage J., Funders B., Wilken B., Schubert D., Schmidt E., Burgard P., Ullrich K. (1992). "Psychological and social findings in adolescents with phenylketonuria." Eur J Pediatr 151: 522-5.
- Weglage J., Grenzebach M., von Teeffelen-Heithoff A., Marquardt T., Feldmann R., Denecke J., Godde D., Koch H.G. (2002). "Tetrahydrobiopterin responsiveness in a large series of phenylketonuria patients." J Inherit Metab Dis. 25(4): 321-2.
- Welch W. J., Brown C.R. (1996). "Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding." Cell Stress Chaperones. 1(2): 109-15.
- Wu G., Chowdhury J.R., Bommineni V.R., Basu S.K., Wu C.H., Chowdhury N.R. (1995). "Fate of DNA targeted to hepatocytes by asialoglycoprotein polylysine conjugates." Proc Assoc Am Physicians 107(2): 211-7.
- Zielke H., Zielke C.L, Baab P.J, Collins R.M. (2002). "Large neutral amino acids auto exchange when infused by microdialysis into the rat brain: implication for maple syrup urine disease and phenylketonuria." Neurochem Int 40: 347-54.

8 Danksagung

Frau Prof. Dr. Ania Muntau danke ich für die Überlassung des Themas und die ausgezeichneten Möglichkeiten, dieses bearbeiten zu können. Ganz besonders danke ich ihr für die engagierte Betreuung und den unermüdlichen Einsatz, welcher auch über die Promotionsarbeit hinaus währte.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Stoffwechsel und Molekularbiologie. Hier danke ich vor allem Herrn PD Dr. Wulf Röschinger, der bei allen Mitarbeitern für seine stetige engagierte Arbeitsweise und auch persönliche Hilfsbereitschaft bekannt ist und Dr. Esther Maier und Dr. Florian Lagler für die organisatorische Unterstützung und ihren persönlichen Einsatz. Des weiteren danke ich Frau Dr. Katharina Dokoupil für ihre Unterstützung bei der Ernährungsberatung und Schwester Birgit Haas für ihre pflegerische und organisatorische Unterstützung.

Mein persönlicher Dank gilt Herrn Dr. Hans Demmelmair für die Analyse der Atemgasproben, sowie die zahlreichen inspirierenden und lehrreichen Diskussionen und seine konstruktive Kritik, was zu meinem Verständnis der methodischen Probleme maßgeblich beigetragen hat.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Sommerhoff für die Hilfe bei der Bearbeitung der *in silico* Struktur, Herrn Dr. Ralph Fingerhut und Herrn Prof. Dr. Bernhard Olgemöller für die Bestimmung der Phenylalaninkonzentrationen im Vollblut und Frau Dr. Claudia Nevinny-Stickel und Prof. Dr. E. Albert für die Hilfe bei der Genotypisierung.

Dr. Markus Phirrmann danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Patienten und deren Eltern, die trotz hohem Zeitaufwand und nicht unerheblichen Belastungen bereitwillig und engagiert an den Untersuchungen teilnahmen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau und meinen Eltern danken, ohne deren Unterstützung mir die Durchführung dieser Arbeit nur schwer möglich gewesen wäre.

9 Veröffentlichung

Muntau A. C., Röschinger W., Habich M., Demmelmair H., Hoffmann B., Sommerhoff C.P., Roscher A.A. (2002). "Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria." N Engl J Med. 347(26): 2122-32.

10 Lebenslauf

Name:	Matthias Stefan Habich
Adresse:	Untere Str. 20; 87700 Memmingen
Telefon:	08331/9849051
E-mail:	habichmatthias@gmx.de
Geburtstag:	02.09.1974
Geburtsort:	Baden-Baden
Familienstand:	verheiratet
Ehefrau:	Susanne Habich, geb. Eder
Kinder:	Franziska und Anne Habich
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbildung	
1981 - 1994	Grundschule/ Gymnasium Gernsbach Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst	
1994 - 1995	Altenwohnstift Parkstift Hahnhof Baden-Baden
Berufsausbildung	
1995 - 1998	Ganzheitliche Krankenpflege Garmisch-Partenkirchen Abschluss: Krankenpfleger
Universität	
1998 - 2000	Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg Vorklinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin
2000 – 2004	Ludwig-Maximilians Universität München Klinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin
15.11.2004	Approbation als Arzt
Seit 01.01.2005	Assistenzarzt Kreisklinik Ottobeuren