

Genetske in klinične značilnosti bolnikov s fenilketonurijo v Sloveniji

Genetic and clinical characteristics of patients with phenylketonuria in Slovenia

Urh Grošelj,¹ Mojca Žerjav Tanšek,² Katarina Trebušak Podkrajšek,³ Tadej Battelino^{4,5}

¹ Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana, Bohoričeva 20, 1000 Ljubljana; urh.groselj@kclj.si

² Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana, Bohoričeva 20, 1000 Ljubljana

³ Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana, Bohoričeva 20, 1000 Ljubljana

⁴ Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana, Bohoričeva 20, 1000 Ljubljana

⁵ Katedra za pediatrijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

prof. dr. Tadej Battelino, dr. med.; Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana, Bohoričeva 20, 1000 Ljubljana; tadej.battelino@mfmf.uni-lj.si; tel: 01 522 9235

Izvilleček

Fenilketonurija (PKU) je avtosomnorecesivno dedna bolezen zaradi nezadostne aktivnosti encima fenilalaninska hidroksilaza (PAH), ki katalizira pretvorbo fenilalanina (Phe) v tirozin, pri čemer kot kofaktor uporablja tetrahidrobiopterin (BH₄). Pojavnost PKU v populacijah kavkajske rase je okrog 1/10.000. Gen *PAH* se nahaja na 12. kromosomu in ga sestavlja 13 eksonov. Opisanih je nad 600 mutacij gena *PAH*, ki povzročajo različne stopnje pomanjkanja katalitske aktivnosti PAH. Zaradi tega je povišana vrednost Phe v krvi (hiperfenilalaninemija – HFA) povezana, če se ne zdravi, s poškodbo osrednjega živčevja, ki se kaže z duševno zaostalostjo. Klasifikacija PKU temelji na presnovnem fenotipu bolnika (glede na stopnjo HFA); razlikujemo tri podvrste PKU (klasična, zmerna in blaga) ter blago HFA, ki je ločena klinična entiteta.

Pojavnost klasične PKU v Sloveniji smo ocenili na približno 1/10.000, pogostost prenašalcev klasične PKU v splošni populaciji pa na 1/50. Kumulativna pojavnost vseh oblik PKU (klasična, zmerna, blaga PKU) je približno 1/6.000; pojavnost blage HFA pa približno 1/3.500. V preglednem članku smo zajeli tudi prej objavljene rezultate raziskav značilnosti slovenskih bolnikov s PKU, ki so bile na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni Pediatrične klinike Ljubljana opravljene v letih 2008–2012. Naša populacija bolnikov s PKU je po genetskih značilnostih primerljiva z opisanimi okoliškimi populacijami, vključuje pa pet novih, doslej neopisanih mutacij gena *PAH*.

Presejanje vseh novorojencev na PKU se v Sloveniji izvaja od leta 1979. Vzročnega zdravljenja PKU ne poznamo, potrebna pa je čimprejšnja uvedba dietnega zdravljenja z omejitvijo vnosa Phe; zdravljenje s BH₄ pri odzivnih bolnikih poveča toleranco za Phe.

Abstract

Phenylketonuria (PKU), an autosomal recessive disease, is the most common inborn error of amino acid metabolism in Caucasians, affecting 1/10,000 individuals. PKU is caused by the deficiency of hepatic phenylalanine hydroxylase (PAH), which catalyzes the hydroxylation of phenylalanine (Phe) to tyrosine, using tetrahydrobiopterin (BH₄) as a cofactor. The *PAH* gene is located on the chromosome 12 and consists of 13 exons. Over 600 different mutations of the *PAH* gene have been identified to date, which result in a broad spectrum of PAH deficiency. The resulting elevation of Phe in the blood (hyperphenylalaninemia – HPA) could cause mental retardation if left untreated. The classification of PKU is based on the metabolic phenotype of a patient (according to HPA level); discerned could be three subclasses of PKU (classic, moderate, mild) and mild HPA, which is a separate clinical entity.

The incidence of classical PKU in the Slovene population was estimated to be 1/10,000, corresponding to a carrier frequency of about 1/50. The cumulative incidence of all subtypes of PKU (classic, moderate, mild) is around 1/6,000; the incidence of mild HPA is around 1/3,500. The article also reviews the previously published studies on the genetic and phenotypic characteristics of Slovenian PKU patients, performed at the Department of Pediatric Endocrinology, Diabetes and Metabolism, University Children's Hospital Ljubljana, in years 2008–2012. The genetic characteristics of the Slovenian PKU population were concordant with other neighbouring populations; five novel mutations of *PAH* gene were detected in the population.

The mandatory neonatal PKU screening in Slovenia was implemented in 1979. The dietary therapy based on a restricted Phe intake should be introduced as soon as possible after birth; in

Ključne besede:

fenilketonurija, genotip, fenotip, pojavnost PKU, Slovenija

responders, BH₄ treatment increases the dietary Phe tolerance.**Key words:**

phenylketonuria, genotype, phenotype, the PKU incidence, Slovenia

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2013; 82: page 767–77

Prispelo: 4. mar. 2013,
Sprejeto: 29. maj 2013**Seznam okrajšav**

BH₄ – tetrahidrobiopterin
 HFA – hiperfenilalaninemija
 IQ – inteligenčni kvocient
 PAH – fenilalaninska hidroksilaza
 PAHdb – okr. angl. *The Human PAH Mutation Knowledgebase*
 Phe – fenilalanin
 PKU – fenilketonurija
 Tyr – tirozin
 ZDA – Združene države Amerike

1 Uvod

Fenilketonurija (PKU; MIM# 261600) je avtosomno recesivno dedna bolezen, ki je posledica prirojene motnje v presnovi aminokislina fenilalanin (Phe). PKU povzroči mutacija gena za encim Phe hidroksilazo (PAH). To vodi v pomanjkanje aktivnosti encima PAH, ki katalizira pretvorbo Phe v tirozin (Tyr), pri čemer kot kofaktor upoablja tetrahidrobiopterin (BH₄). Zato se povišajo vrednosti Phe v krvi. Hiperfenilalaninemija (HFA) je glavna presnovna pojavnost PKU.¹⁻³ Vrednosti Phe v krvi, ki so vsaj 5-krat večje od zgornje meje normalnega območja, so povezane z napredujočo poškodbo osrednjega živčevja. Najpomembnejša dolgoročna klinična posledica nezdravljene PKU je huda duševna zaostalost.⁴ V državah s presejanjem novorojencev je zaradi zgodnjega zdravljenja PKU duševna zaostalost izjemno redka.² Glede na stopnjo HFA ločimo tri podvrste PKU (klasična, zmerna in blaga) ter blago HFA, ki je sicer ločena klinična entiteta, jo pa vključujemo v PKU v širšem smislu.¹⁻³ Vzročnega zdravljenja PKU ne poznamo. Bolnikom se čim prej po rojstvu predpiše dietno zdravljenje z omejitvijo vnosa Phe.⁵

PKU ima posebno mesto med prirojenimi boleznimi presnove. Bila je prva, pri kateri je bil pojasnjen vzrok duševne zaostalosti (Følling, 1934),⁶ prva, pri kateri je bilo uvedeno učinkovito (dietno) zdravljenje (Bickel, 1953),⁷ in prva, pri kateri je bilo

uvedeno presejanje novorojencev. V letu 2013 beležimo 50-letnico prve uvedbe presejanja v posameznih zveznih državah ZDA (Guthrie, 1963).⁸ Pri nas je večina otrok s PKU, rojenih do 70. let prejšnjega stoletja, še razvila hudo duševno zaostalost.⁹ Presejanje vseh novorojencev na PKU se na celotnem območju Slovenije izvaja od leta 1979.¹⁰ Do leta 1992 je presejanje potekalo s pomočjo Guthriejevega testa, nato pa s fluorometrično metodo.^{11,12}

Vse slovenske bolnike s PKU spremljamo na Pediatrični kliniki v Ljubljani. V nacionalnem registru PKU je trenutno zajetih okrog 120 družin s PKU, ob tem pa še prek 150 bolnikov z blago HFA; slednji večinoma ne potrebujejo dietnega zdravljenja in spremljanja. Pri slovenski populaciji bolnikov s PKU je bilo genetsko ozadje raziskano šele v zadnjih letih.¹³⁻¹⁶

2 Epidemiologija

Pojavnost PKU se zelo razlikuje med različnimi predeli sveta. V večini evropskih držav je pojavnost klasične PKU okrog 1/10.000 živorojenih otrok, kar ustreza pogostosti prenašalcev bolezni v splošni populaciji, ki je okrog 1/50.^{17,18} Višja pojavnost klasične PKU je na splošno značilna za bolj konsangvine populacije. Najvišja je v Turčiji in na Severnem Irskem, kjer znaša okrog 1/4.000.^{19,20} Najnižja pojavnost klasične PKU v Evropi pa je na Finskem, 1/100.000.²¹ V ZDA je pojavnost klasične PKU okrog 1/15.000.⁵ Za Azijo in Južno Ameriko je značilna nekoliko nižja pojavnost klasične PKU, okrog 1/15.000–200.000,²²⁻²⁵ v podsaharski Afriki pa naj bi bila PKU glede na ocene še precej redkejša.^{1,2,5}

Pojavnost klasične PKU v Sloveniji je približno 1/10.000. Izračun temelji na podatku, da se je med letoma 2001 in 2010 v Sloveniji rodilo 193.188 otrok, med njimi jih je 19 razvilo klasično PKU. Kumulativna pojavnost vseh oblik PKU (klasična, zmerna,

Tabela 1: Primerjava pojavnosti prenašalstva za klasično fenilketonurijo, blage hiperfenilalaninemije, vseh vrst fenilketonurije skupaj in klasične fenilketonurije posebej, v Sloveniji v letih 2001–2010. (Podatek o številu živorojenih otrok smo dobili na spletni strani Statističnega urada Republike Slovenije, <http://www.stat.si>).

Vrsta	Pojavnost ^a
Prenašalec klasične PKU	1/50
Blaga HFA	1/3.500
Vse oblike PKU (blaga, zmerna, klasična)	1/6.000
Klasična PKU	1/10.000

PKU – fenilketonurija; HFA – hiperfenilalaninemija.

^aPojavnosti blage HFA in PKU smo izračunali kot razmerje med skupnim številom novoodkritih bolnikov s posamezno vrsto bolezni in številom vseh živorojenih otrok v Sloveniji v obdobju od 1. 1. 2001 do 31. 12. 2010. Pojavnost prenašalcev smo izračunali s pomočjo Hardy-Weinbergovega načela, z izpeljavo enačbe $p^2 + 2pq + 2q^2 = 1$ (p – pojavnost homozigotov za nemutirane alele; q – pojavnost homozigotov za vse mutacije PKU kumulativno (ustreza pojavnosti klasične PKU); pq – pojavnost heterozigotov za klasično PKU (ustreza pojavnosti prenašalcev PKU)). Pri izračunu smo izhajali iz pojavnosti klasične PKU v Sloveniji 1/10.000.

blaga PKU) v istem obdobju je približno 1/6.000; pojavnost blage HFA pa približno 1/3.500 (Tabela 1).¹³

V skladu s Hardy-Weinbergovim načelom smo izračunali, da je pri nas v splošni populaciji heterozigotov za vse mutacije, ki povzročajo klasično PKU 2,0 % (Tabela 1).¹³

3 Genetske značilnosti

Gen *PAH* se nahaja na dolgem kraku 12. kromosoma (12q23.2). Sestavljen je iz 13 eksonov, dolgih od 57 (ekson 9) do 892 baznih parov (bp) (ekson 13). Povprečna dolžina eksonov znaša 170 bp, intronov pa 6.390 bp. V bazi podatkov *PAHdb* (okr. *angl.* The Human *PAH* Mutation Knowledgebase) je opisanih nad 600 mutacij gena *PAH*, ki povzročajo različne stopnje pomanjkanja katalitske aktivnosti encima *PAH* in s tem različne fenotipske značilnosti bolnikov s PKU.²⁶ Dolej je bilo na genu *PAH* opisanih tudi okrog 30 velikih delecij, ki v večini populacij predstavljajo manj kot 3 % vseh mutacij.^{27–31} Opisi novonastalih mutacij v genu *PAH* so zelo redki (skupaj 4 drugačnosmiselne mutacije ter 1 velika delecija več genov), verjetno tudi na račun pomanjkljivega izvajanja genetskih analiz pri starših bolnikov.²⁶

Glede na bazo *PAHdb* je večina mutacij gena *PAH* drugačnosmiselnih (63 %). Po pogostosti jim sledijo: manjše delecije (13 %),

mutacije, ki vplivajo na pripajanje eksonov (*angl.* splicing) (11 %), tihe mutacije (7 %), nesmiselne mutacije (5 %), velike delecije in duplikacije (do 3 %), manjše insercije (1 %).²⁶ Nekatere mutacije povzročijo popolno izgubo aktivnosti encima *PAH*, pri večini ostalih pa ima ta od 1–70 % encimske aktivnosti *in vitro* glede na pričakovano. Popolno izgubo encimske aktivnosti povzročajo: nesmiselne mutacije; mutacije, ki spremenijo bralni okvir (*angl.* frameshift); velike delecije in duplikacije; mutacije, ki vplivajo na pripajanje; nekatere drugačnosmiselne mutacije. Mutacije, ki delno ohranijo aktivnost encima *PAH*, so večinoma drugačnosmiselne.²⁶

V 1–2 % povzročajo HFA mutacije genov za encime, ki sodelujejo v tvorbi ali regeneraciji BH₄, kofaktorja encima *PAH*. Te povzročajo t. i. maligno PKU, ki jo je treba izključiti pri vseh novo odkritih bolnikih s HFA.³²

Za vsako populacijo in geografsko regijo je značilen specifičen nabor mutacij, pri čemer se ta v populacijah kavkaške (bele) rase močno razlikuje od nabora pri azijskih populacijah; vse ostale populacije se zelo razlikujejo od afriških populacij, ki se zelo razlikujejo tudi med seboj.³³ Genetske značilnosti različnih populacij PKU po svetu so dokaz za izvor in ekspanzijo vseh človeških populacij iz Afrike.³⁴ S pregledno raziskavo nabora mutacij v opisanih evropskih populacijah je bilo opredeljenih 29 mutacij, ki imajo v vsaj dveh populacijah relativno pogostost nad 3 %. Za severno Evropo je značilna mutacija c.1315+1G>A; za severozahodno Evropo mutacija p.R408W-H1; za Skandinavijo mutacija p.Y414C; za vzhodno Evropo mutacija p.R408W-H2; za južno in jugovzhodno Evropo ter Malo Azijo mutacija c.1066–11G>A; za Iberski polotok, zahodno Evropo in Irsko pa mutacija p.I65T.³⁵ V večini opisanih populacij se pojavlja manjše število (1 do 5) za posamezno populacijo značilnih mutacij ter večje število redkih (relativna pogostost pod 3 %) in posamičnih mutacij; manj kot 10 najpogostejših mutacij skoraj v vseh opisanih populacijah je nad 75 % vseh mutacij.^{26,35} Okrog 75 % bolnikov s PKU je sestavljenih heterozigotov, kar vpliva tudi na heterogenost presnovnih fenotipov teh bolnikov.³⁶ Blažje oblike HFA so

povezane z drugim naborom mutacij gena *PAH*, kot jih imajo težje oblike.²⁶

V Sloveniji smo pri 107 družinah bolnikov s PKU (85 % slovenske populacije) našli mutacije na 209 alelih (stopnja detekcije 97,7 %). Našli smo nabor 36 različnih mutacij: 20 drugačnosmiselnih mutacij (80 % vseh alelov), osem mutacij, povezanih s pripajanjem (13 %), eno nesmiselno mutacijo (0,5 %), štiri manjše delecije s spremembo bralnega okvirja (6 %), eno manjšo insercijo s spremembo bralnega okvirja (0,5 %) in dve veliki deleciji (2 %). Našli smo pet novih, doslej neopisanih mutacij: p.V45A, p.L62P, p.R157S, c.43_44insAG in c.56_59+1delACAGG. Našli smo tudi dve veliki deleciji: EX5del955 in EX3del4765.¹³⁻¹⁶

Najpogostejša je bila mutacija p.R408W v eksonu 12, ki je predstavljala 29 % vseh in je zelo pogosta tudi v drugih slovanskih populacijah in tudi v nekaterih sosednjih neslovanskih populacijah (Tabela 2).³⁷⁻⁴² Mutacija p.R408W ima pri vzhodnoevropskih populacijah oz. slovanskih populacijah najverjetneje drug izvor kot tista pri severno- in zahodnoevropskih populacijah (npr. Irska).³⁷ Slovenska populacija bolnikov s PKU je tudi glede na nabor ostalih pogostih mutacij dobro primerljiva s sosednjimi populacijami (primerjave sicer niso povsem

zanesljive zaradi slabe reprezentativnosti večine sosednjih populacij; Tabela 2).^{13-16,37-42}

Ugotovili smo nabor 64 različnih genotipov, od tega sedem najpogostejših, ki smo jih našli pri več kot tretjini vseh družin. V trinajstih družinah (13 % populacije) so bile mutacije prisotne v homozigotni obliki: 10 družin za mutacijo p.R408W, dve za p.R158Q in ena za p.E390G.¹³⁻¹⁶

4 Fenotipske značilnosti in njihova povezava z genotipom

Vpliv mutacij gena *PAH* je mogoče ugotovljati na treh fenotipskih ravneh, značilnih za PKU:¹⁻³

- na ravni zgradbe in delovanja encima *PAH* (proksimalni nivo);
- na ravni presnovnega fenotipa, ki se izraža v obliki homeostaze Phe, ki je opisana kot vrednost Phe v krvi v odvisnosti od vnosa Phe s hrano (vmesna raven) (na ravni presnovnega fenotipa temelji klinična klasifikacija PKU in blage HFA);
- na ravni kliničnega fenotipa, ki je opisan kot stopnja kognitivnega razvoja in ocena delovanja osrednjega živčevja, npr. s pomočjo inteligenčnega količnika (IQ) (distalna raven).

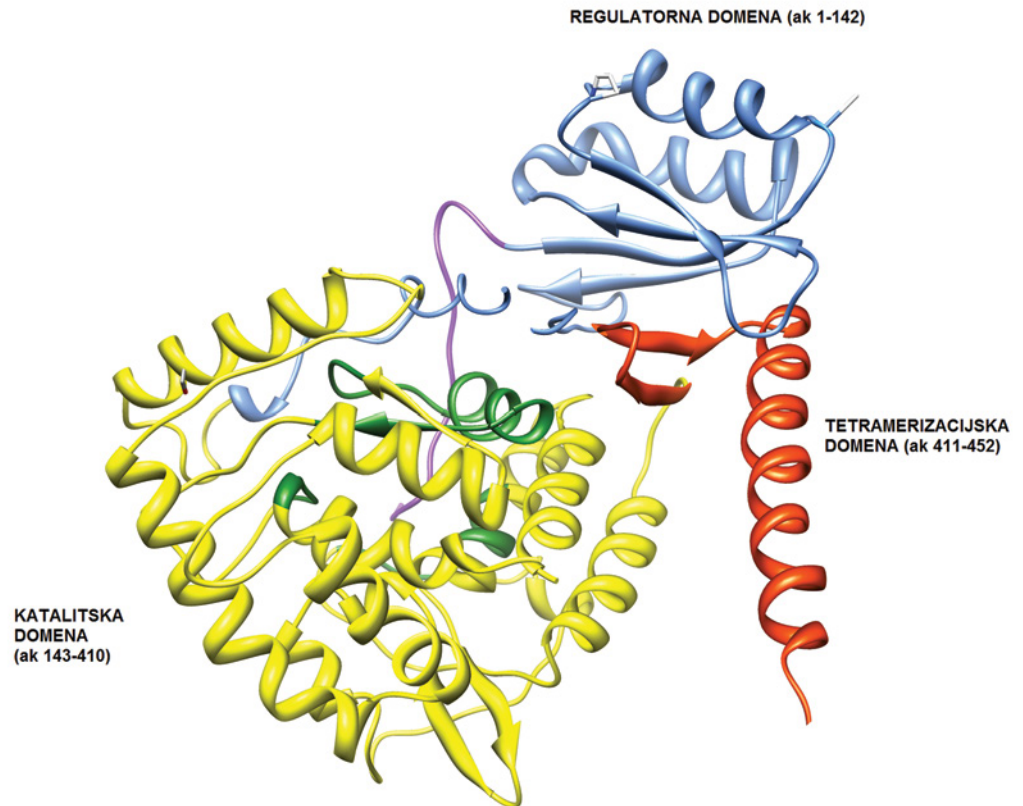
Tabela 2: Primerjava nabora najpogostejših mutacij gena *PAH* v slovenski populaciji s sosednjimi in/ali sorodnimi populacijami (mutacije so predstavljene v obliki deležev (v %) glede na vse alele prisotne v posamezni populaciji).

	Mutacija	Slovenija ^a (N=107)	Avstrija ^b (N=147)	SV Italija ^c (N=18)	J Nemčija ^d (N=226)	Hrvaška ^e (N=127)	Madžarska ^f (N=35)	Srbija ^g (N=34)
1	p.R408W	29 %	23 %	11 %	23 %	36 %	49 %	18 %
2	p.R158Q	9 %	4 %	8 %	5 %	6 %	7 %	4 %
3	p.A403V	7 %	2 %	8 %	8 %	?	?	?
4	p.P281L	7 %	3 %	11 %	4 %	8 %	?	9 %
5	p.E390G	7 %	3 %	?	2 %	7 %	?	7 %
6	p.R261Q	4 %	7 %	6 %	3 %	6 %	?	6 %
7	c.1315+1G>A	3 %	12 %	17 %	10 %	1 %	4 %	4 %
8	p.F55>Lfs	3 %	2 %	0 %	2 %	0 %	?	0 %
9	p.L48S	2 %	2 %	11 %	1 %	10 %	?	21 %
10	c.1066-11G>A	2 %	4 %	3 %	3 %	3 %	3 %	2 %

SV – severovzhodna; J – južna; ? – mutacija (morda) ni bila ugotovljena.

^aGroelj et al 2012;¹⁴ ^bSterl et al. 2012;⁴² ^cZaffanello et al. 2005;³⁸ ^dAulehla-Scholz et al. 2003;⁴¹ ^eKaracic et al. 2007;³⁹ ^fEisensmith et al. 1992;³⁷ ^gStojiljkovic et al. 2006.⁴⁰

Slika 1: Strukturni model monomera PAH z označenimi tremi domenami: regulacijsko (v modri; aminokislinski ostanki 1–142), katalitsko (v rumeni; 143–410) in tetramerizacijsko (v rdeči; 411–452).



Pri nezdravljenih bolnikih s PKU je bil v več raziskavah dokazan obstoj povezave med genotipom *PAH* ter presnovnim fenotipom; med presnovnim fenotipom in kliničnim (kognitivnim) fenotipom; ter med genotipom *PAH* in kliničnim (kognitivnim) fenotipom.^{1-3,36,43,44} Na kompleksnost povezave med genotipom in vsemi tremi fenotipskimi ravnmi dodatno vplivajo predvsem: visoka stopnja heterogenosti mutacij gena *PAH*, vpliv velikega števila drugih genov na presnovno homeostazo Phe, izjemna kompleksnost značilnosti razvoja in delovanja osrednjega živčevja ter krvno-možganske pregrade.^{3,45-50} Pri zdravljenih bolnikih s PKU pa na povezavo genotipa s presnovnim in kliničnim fenotipom ključno vpliva čim hitrejša uvedba ustreznega dietnega zdravljenja čim prej po rojstvu, ki prepreči razvoj pričakovanega kliničnega (kognitivnega) fenotipa. Hitra uvedba dietnega zdravljenja lahko zabriše tudi povezavo genotipa s presnovnim fenotipom, ker do uvedbe dietnega zdravljenja vrednost fenilalanina v krvi še ni dosegla najvišje vrednosti, zato presnovni fenotip lahko še ni polno izražen.^{1-3,36}

4.1 Fenilalaninska hidroksilaza

Gen *PAH* se izraža v jetrih in ledvicah kot monomer iz 452 aminokislin, ki ima tri domene: na N-koncu regulatorno (aminokislinski ostanki 1–142), katalitsko (143–410), na C-koncu pa tetramerizacijsko (411–452) (Slika 1).⁵¹ Monomeri se sestavijo v funkcionalen encim PAH, ki se nahaja v pH-odvisnem ravnotežju med dimerno in tetramerno obliko. Poznan je strukturni model celotne dolžine encima PAH v tetramerni obliki, na podlagi katerega je mogoče napovedati predviden vpliv nekaterih drugačnosmiselnih mutacij na delovanje encima PAH.^{49,50}

Drugačnosmiselne mutacije gena *PAH* najpogosteje povzročijo napačno zvitje (*angl.* misfolding) monomerov encima PAH, kar vodi v njihovo nestabilnost in/ali moteno oligomerizacijo ter zato v kopičenje in hitrejšo proteolitsko razgradnjo.⁵² Mutacije ne vplivajo samo na primarno proteinsko strukturo monomerov encima PAH, pač pa tudi na terciarno strukturo monomerov in kvartatno strukturo funkcionalnega proteina.⁵³ Zaradi hitrejše proteolitske razgradnje

napačno zvitih monomerov encima PAH je v celicah v povprečju prisotna manjša količina tega encima, kar je tudi glavni mehanizem pomanjkanja njegove aktivnosti.⁵⁴ Le manjši del drugačnosmiselnih mutacij vpliva na kinetske lastnosti encima PAH, ne da bi znižale njegove količine v celici.⁵⁵

4.2 Presnovni fenotip

Encim PAH katalizira pretvorbo Phe v Tyr, ki poteka v citosolu ledvičnih in jeter-nih celic in je glavna determinanta presnove Phe v telesu.^{3,51,52} Pomanjkanje aktivnosti encima PAH se zaradi heterogenosti mutacij gena PAH kaže s širokim spektrom presnovnih fenotipov. Klasifikacija blage HFA in PKU temelji na podlagi presnovnega fenotipa, ki je opredeljen s pomočjo vrednosti Phe v krvi (v $\mu\text{mol/L}$).¹⁻³ Predlagane so bile tri ali štiri različne podskupine PKU, ki temelje na dveh merilih. Prvo je najvišja vrednost Phe v krvi ob postavitvi diagnoze ali nasploh, pomožno pa je količina Phe v prehrani (v mg ali mg/kg), pri kateri vrednost Phe v krvi še ostaja v ciljnem območju (pod $360 \mu\text{mol/L}$) (Tabela 3).^{1-3,56} Normalno območje vrednosti Phe v krvi znaša $50-120 \mu\text{mol/L}$. Presnovni fenotip pri bolnikih z največjimi izmerjenimi vrednostmi Phe v krvi med $120-600 \mu\text{mol/L}$ je opredeljen kot blaga HFA, pri vrednostih Phe med $600-900 \mu\text{mol/L}$ kot blaga PKU, pri vrednostih Phe med $900-1200 \mu\text{mol/L}$ kot zmerna PKU in pri vrednostih Phe nad $1200 \mu\text{mol/L}$ kot

klasična PKU (Tabela 3).^{1-3,56,57} Meja med blago HFA in PKU temelji na pomanjkanju dokazov, da bi pri vrednostih Phe v krvi pod $600 \mu\text{mol/L}$ pri nezdravljenih bolnikih prišlo do razvoja značilnega kliničnega (kognitivnega) fenotipa.⁴ Nekatere klasifikacije ne razlikujejo med zmerno in blago PKU, zato so sestavljene le iz treh podskupin.^{36,57} Kot PKU v najožjem smislu je mišljena klasična PKU. Pri heterozigotih za PKU je vrednost Phe v krvi v normalnem območju.⁵⁸

Presnovni fenotip bolnika s PKU je med vsemi možnimi vplivi v največji meri določen s specifičnim genotipom PAH. Pri sestavljenih heterozigotih, ki so hkrati funkcionalni hemizigoti, presnovni fenotip določa preostala aktivnosti encima PAH ene od mutacij gena PAH. Pri dveh mutacijah gena PAH, ki imata podobno pričakovano preostalo encimsko aktivnost, ali pa sta homozigotni, ima bolnik lahko blažji presnovni fenotip od pričakovanega glede na posamezno mutacijo.^{36,57} Napoved presnovnega fenotipa na podlagi genotipa PAH je klinično pomembna ne samo za načrtovanje ustreznega dietnega režima pri novo odkritih bolnikih s PKU, ampak tudi za ugotavljanje njihove odzivnosti na zdravljenje s BH_4 .^{59,60} Več raziskav, v katerih so ugotavljali značilnosti povezave med genotipom in presnovnim fenotipom pri bolnikih s PKU, je v večini primerov pokazalo dobro ujemanje genotipov PAH s presnovnimi fenotipi bolnikov.^{36,57,61}

Tabela 3: Merila za ugotavljanje presnovnega fenotipa pri bolnikih s PKU ali blago HFA.

Presnovni fenotip	Phe v krvi ($\mu\text{mol/L}$) ^a	Vnos Phe (mg/dan) ^b	Vnos Phe/TT (mg/kg/dan) ^c
Normalen	50–120	750–2500 (gs)	35–50 (gs)
Blaga HFA	120–600	600–2500 (gs)	35–50 (gs)
Blaga PKU	600–900	400–600	25–35
Zmerna PKU	900–1200	350–400	20–25
Klasična PKU	> 1200	250–350	< 20

Phe – fenilalanin; HFA – hiperfenilalaninemija; PKU – fenilketonurija.

^aNajvišja vrednost Phe pred uvedbo diete ali kasneje ob normalni dieti ali ob obremenitvi s Phe.

^bVnos Phe je največja količina Phe v hrani, pri kateri vrednost Phe v krvi še ostaja v ciljnem območju (pod $360 \mu\text{mol/L}$); vnos Phe v normalni dieti – prilagojeno po *The Dietary Reference Intakes, National Academy of Sciences, Washington, DC, 2002*; vnos Phe pri dietnem zdravljenju PKU – glede na reference št. 2, 69, 70; gs – glede na starost otroka.

^cPri 5 letih starosti; TT – telesna teža.

V raziskavi slovenske populacije bolnikov s PKU je bil presnovni fenotip opredeljen kot klasična PKU pri 54,2 % družinah, kot zmerna in blaga PKU pri 26,1 % družinah ter kot blaga HFA pri 19,6 % družinah (pri slednjih gre za bolnike, ki potrebujejo dietno zdravljenje, ostali bolniki z blago HFA pa niso bili vključeni v raziskavo). Pri večini družin se je presnovni fenotip ujemal z genotipsko napovedanim. Pri 32 genotipih (od 64) je šlo za funkcionalne hemizigote, kar je omogočilo funkcijsko napoved za 16 mutacij (od 36), med njimi tudi za vseh pet novih mutacij.¹⁴⁻¹⁶

4.3 Klinični fenotip

Nezdravljena PKU vodi v napredujočo nevrološko okvaro, ki se kaže kot huda duševna zaostalost. Temu so pridruženi še različni drugi simptomi in znaki: mikrocefalija, nizka rast, ekscemasti izpuščaji, hipopigmentacija, epilepsija, avtizem in različni psihiatrični simptomi.^{2,62} V razvitih državah s presejanjem novorojencev na PKU je polno izraženi klinični fenotip mogoče najti skoraj izključno pri bolnikih, rojenih pred začetkom presejanja. Dietno zdravljenje PKU z uravnoteženim prehranskim vnosom in z ustreznim nadzorom vrednosti Phe v krvi je namreč učinkovito pri preprečevanju težjih okvar osrednjega živčevja in drugih značilnosti klinično izražene PKU. Raziskave kažejo, da je nevrološki izid pri bolnikih s PKU tesno povezan s starostjo ob začetku zdravljenja in kasnejšo presnovno urejenostjo.⁶³ Pri bolnikih z uvedenim zdravljenjem v neonatalnem obdobju je bil za vsakih 100 $\mu\text{mol/L}$ višjo povprečno vrednostjo vseh do tedanjih meritev Phe v krvi, njihov IQ nižji za 1,9–4,1 točke.⁶⁴ Poleg nižjega inteligencnega količnika je bil v več raziskavah dokazan vpliv slabše presnovne urejenosti PKU na večjo pogostost motenj izvršnih sposobnosti (načrtovanje, reševanje problemov, predelava podatkov, pozornost) in pojavnost različnih duševnih težav. Tudi bolniki z dietnim zdravljenjem uvedenim takoj po rojstvu in z dobro presnovno urejenostjo imajo v povprečju izmerjeno slabšo kognitivno sposobnost kot njihovi zdravi sorodniki ali zdravi vrstniki.⁶⁵⁻⁶⁷

Raziskava nevropsiholoških značilnosti slovenskih bolnikov s PKU doslej še ni bila opravljena.

5 Zdravljenje fenilketonurije

Vzročnega zdravljenja PKU ne poznamo, obstajajo pa načini zdravljenja, ki preprečujejo razvoj kliničnega (kognitivnega) fenotipa PKU. Najpomembnejše je dietno zdravljenje z nadzorovanim znižanim vnosom Phe.⁶⁸ Zadnje desetletje se uveljavlja še zdravljenje s BH₄, na katerega se odziva velika večina bolnikov z blago HFA, vendar pa manj kot 10 % vseh bolnikov s klasično PKU.⁶⁹ Razvijajo tudi nekatere nove načine zdravljenja PKU, ki pa se še ne uporabljajo v klinični praksi. To sta encimsko in gensko zdravljenje, medtem ko je dietno zdravljenje z dolgotrajnimi nevtralnimi aminokisljinami z omejeno učinkovitostjo in se uporablja predvsem pri odraslih bolnikih.⁷⁰⁻⁷³

5.1 Dieta

Uvedba dietnega zdravljenja PKU velja za prvo uspešno zdravljenje prirojene bolezni presnove in s tem za veliko prelomnico, ki je kmalu sprožila tudi razvoj presejalnega programa za PKU.^{1,7,8} Odtlej se je zvrstilo veliko dokazov, da uvedba ustreznega dietnega zdravljenja čim prej po rojstvu omogoča normalen ali vsaj skoraj normalen razvoj otroka in mladostnika s PKU.² Dietno zdravljenje temelji na strogo načrtovani omejitvi prehranskega vnosa naravnih beljakovin in s tem Phe, obenem pa z zagotavljanjem zadostnega vnosa vseh ostalih aminokislin z uživanjem pripravka aminokislinske mešanice brez vsebnosti Phe. Primeren kalorični vnos zagotavljajo naravna živila z nizko vsebnostjo Phe (npr. določeno sadje in zelenjava) ter posebna dietna nizkobeljakovinska živila, pri katerih se industrijsko zmanjša vsebnost beljakovin (npr. nizkobeljakovinski kruh).² Glede na novejša smernice naj bi bilo dietno zdravljenje PKU dolgoročno, celo doživljenjsko, saj tudi povišane vrednosti Phe v odrasli negativno vplivajo na izvršne sposobnosti, lahko povzročajo različno, večinoma bolj subtilno nevrološko simptomatiko, višjo raven oksidativnega stresa idr.^{74,75} Pri

nas je pri bolnikih s PKU v odrasli dobi priporočeno vzdrževanje vrednosti Phe v krvi pod 700 $\mu\text{mol/L}$. Še zlasti pa je pomembno dosledno dietno zdravljenje otrok in mladostnikov v obdobju rasti in razvoja (pri nas so priporočene vrednosti Phe pod 360 $\mu\text{mol/L}$) ter nosečnic s PKU (pri nas so priporočene vrednosti Phe pod 260 $\mu\text{mol/L}$).^{2,12} Pogost problem je slabo sodelovanje bolnikov pri zdravljenju, saj predvsem pri adolescentih in odraslih bolnikih dietno zdravljenje terja precejšnjo prilagoditev načina življenja, pa tudi redno uživanje pripravka z aminokislinsko mešanico je zaradi slabega okusa nepriljubljeno in moteče v vsakdanjem ritmu dnevnih obveznosti.⁷⁶

5.2 Tetrahydrobiopterin

Po tem ko so Kure s sod. leta 1999 dokazali, da zdravljenje s BH_4 pri nekaterih bolnikih s PKU ali blago HFA znižuje vrednosti Phe v krvi, se je to zdravljenje v naslednjih nekaj letih uveljavilo v klinični praksi.⁷⁷ V več raziskavah je bilo dokazano, da kontinuirano zdravljenje s BH_4 pri odzivnih bolnikih poveča toleranco za Phe, zmanjša ali odpravi potrebo po aminokislinskih prehranskih preparatih brez vsebnosti Phe ali celo omogoči opustitev dietnega zdravljenja PKU.^{78,79} Na zdravljenje s BH_4 so odzivni bolniki z mutacijami gena *PAH*, ki ohranjajo vsaj delno aktivnost encima *PAH*.^{60,80} Kot molekularni mehanizem odzivnosti na zdravljenje s BH_4 je kot kaže najbolj pomembna stabilizacija encima *PAH* v tetramerni obliki s preprečevanjem napačnega zvižanja monomerov, njihove agregacije in proteolitske razgradnje in inaktivirajo s toploto.^{60,81} Ni pa še povsem znana povezava med genotipom *PAH* in odzivnostjo na BH_4 ; lahko pa jo z veliko gotovostjo napovemo pri bolniki s kombinacijo dveh mutacij, od katerih nobena ne omogoča aktivnosti encimske *PAH* (odzivnosti se ne pričakuje) ali vsaj eno mutacijo, ki je značilna za blago HFA (odzivnost je pričakovana).^{73,82} Bolniki, ki so na podlagi genotipa opredeljeni kot potencialno odzivni, ali pa potencialne odzivnosti pri njih ni mogoče napovedati, morajo biti glede na priporočila pred uvedbo zdravljenja obremenitveno testirani s BH_4 . Protokol

testiranja predvideva nekajdnevno uživanje diete z normalno vsebnostjo beljakovin (npr. 2 g/kg teže) ter nato peroralni odmerek BH_4 (20 mg/kg teže). Kot merilo odzivnosti se v večini centrov upošteva padec vrednosti Phe za vsaj 30 % glede na izhodiščno vrednost po 24 h.⁸³

Pri nas smo kot potencialno odzivne na zdravljenje s BH_4 opredelili 38 družin (35,5 % vseh) s 26 različnimi genotipi (40,6 % vseh). Doslej smo obremenitveno testirali 36 bolnikov, od katerih jih je bilo 18 odzivnih. Pri 12 smo doslej že uvedli zdravljenje s tetrahydrobiopterinom (Kuvan®).^{13,14}

5.3 Maternalni PKU sindrom

V primeru povišanih vrednosti Phe med nosečnostjo lahko pride do razvoja maternalnega sindroma PKU pri otroku, ker so visoke vrednosti Phe v krvi teratogene. Zato je potrebno skrbno in natančno vodenje bolezni v obdobju nosečnosti; nosečnice s PKU opravljajo redne tedenske ambulantne kontrolne preglede, priporočene vrednosti Phe pa so pod 260 $\mu\text{mol/L}$.^{2,12} Pri otrocih nosečnic z nezdravljeno zmerno in klasično PKU se v skoraj vseh primerih razvije maternalni sindrom PKU. Zanj je značilna mikrocefalija, huda duševna zaostalost otroka, pogosto pa tudi prirojeno bolezen srca, zastoj rasti ploda in razvoj dizmorfnihih znakov.⁸⁴ Doslej je bilo po naših podatkih nosečnicam s PKU, ki se vodijo na Pediatrični kliniki, rojenih 13 otrok, pri 11 od teh ni bilo znakov za maternalni sindrom PKU.

6 Zaključek

Obravnava bolnikov s PKU je ena od uspešnejših zgodb sodobne medicine, obenem pa tudi pomemben dokaz, da uspešno presejanje s pravočasno diagnozo in ustreznim zdravljenjem povsem spremeni potek bolezni. S tem je PKU model tudi za druge prirojene bolezni presnove. Možnost genotipizacije je ob poznavanju fenotipa omogočila dodatno razlago izvora mutacij in raznolikosti kliničnega poteka bolezni ter pomaga pri zdravljenju. Raziskovanje genotipskih in fenotipskih značilnosti slovenskih bolnikov dopolnjuje obširno mednarodno strokovno

znanje o PKU in zaokrožuje desetletja uspešnega presejanja novorojencev in zdravljenja slovenskih bolnikov s PKU.⁹⁻¹⁶

Zahvala

Zahvala gre Jerneju Kovaču, univ. dipl. biokem., za pomoč pri izdelavi v članku predstavljenega strukturnega modela monomera PAH.

Literatura

1. Scriver CR. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutat* 2007; 28: 831-45.
2. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet* 2010; 376: 1417-27.
3. Scriver CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 1999; 15: 267-72.
4. Weglage J, Pietsch M, Feldmann R, Koch HG, Zschocke J, Hoffmann G, et al. Normal clinical outcome in untreated subjects with mild hyperphenylalaninemia. *Pediatr Res* 2001; 49: 532-6.
5. National Institutes of Health Consensus Development Panel. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: phenylketonuria: screening and management. *Pediatrics* 2001; 108: 972-82.
6. Fölling A. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Inbicillität. *Ztschr Physiol Chem* 1934; 227: 169.
7. Bickel H, Gerrard JW, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 1953; 2: 812-9.
8. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32: 338-43.
9. Jeras J, Lužnik M. Oligophrenia phenylpyruvica. *Zdrav Vestn* 1956; 25: 460-3.
10. Pintar L. Rezultati zgodnjega odkrivanja bolnikov s fenilketonurijo. *Zdrav Vestn* 1983; 559-62.
11. Battelino T, Kržišnik C, Pavlin K. Early detection and follow up of children with phenylketonuria in Slovenia. *Zdrav Vestn* 1994; 63: 25-8.
12. Žerjav Tanšek M. Fenilketonurija – zgodba o uspešnem zdravljenju presnovne bolezni. *Slov Pediatr* 2003; 10: 225-35.
13. Grošelj U. Analiza gena za fenilalaninsko hidrokisilazo in ugotavljanje povezave s fenotipom [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2012.
14. Grošelj U, Tanšek MZ, Kovac J, Hovnik T, Podkrajsek KT, Battelino T. Five novel mutations and two large deletions in a population analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol Genet Metab* 2012; 106: 142-8.
15. Tanšek MZ, Grošelj U, Murko S, Kobe H, Lampret BR, Battelino T. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH(4))-responsiveness and spontaneous phenylalanine reduction in a phenylalanine hydroxylase deficiency population. *Mol Genet Metab* 2012; 107: 37-42.
16. Grošelj U, Tanšek MZ, Podkrajsek KT, Battelino T. The IVS8-2A>G (c.913-2A>G) mutation and the PAH deficiency populations of Central Europe. *J Inherit Metab Dis* 2013; 36: 157.
17. Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 430-8.
18. Mathias D, Bickel H. Follow-up study of 16 years neonatal screening for inborn errors of metabolism in West Germany. *Eur J Pediatr* 1986; 45: 310-2.
19. Ozalp I, Coskun T, Tokatli A, Kalkanoglu HS, Dursun A, Tokol S et al. Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future. *Turk J Pediatr* 2001; 43: 97-101.
20. Zschocke J, Mallory JP, Eiken HG, Nevin NC. Phenylketonuria and the peoples of Northern Ireland. *Hum Genet* 1997; 100: 189-94.
21. Guldberg P, Henriksen KF, Sipila I, Guttler F, de la Chapelle A. Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland. *J Med Genet* 1995; 32: 976-8.
22. Zhan JY, Qin YF, Zhao ZY. Neonatal screening for congenital hypothyroidism and phenylketonuria in China. *World J Pediatr* 2009; 5: 136-9.
23. Song F, Qu YJ, Zhang T, Jin YW, Wang H, Zheng XY. Phenylketonuria mutations in Northern China. *Mol Genet Metab* 2005; 86: 107-18.
24. Pangkanon S, Charoensiriwatana W, Janejai N, Boonwanich W, Chaisomchit S. Detection of phenylketonuria by the newborn screening program in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40: 525-9.
25. Aoki K, Ohwada M, Kitagawa T. Long-term follow-up study of patients with phenylketonuria detected by the newborn screening programme in Japan. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 608.
26. Scriver CR, Hurtubise M, Konecki D, Phommarrinh M, Prevost L, Erlandsen H et al. PAHdb 2003: what a locus-specific knowledgebase can do. *Hum Mutat* 2003; 21: 333-44.
27. Avigad S, Cohen BE, Bauer S, Schwartz G, Frydman M, Woo SL, et al. A single origin of phenylketonuria in Yemenite Jews. *Nature* 1990; 344: 168-70.
28. Cali F, Ruggeri G, Vinci M, Meli C, Carducci C, Leuzzi V, et al. Exon deletions of the phenylalanine hydroxylase gene in Italian hyperphenylalaninemics. *Exp Mol Med* 2010; 42: 81-6.
29. Kozak L, Hrabincova E, Kintz J, Horoky O, Zapletalova P, Blahakova I, et al. Identification and characterization of large deletions in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by MLPA: evidence for both homologous and non-homologous mechanisms of rearrangement. *Mol Genet Metab* 2006; 89: 300-9.
30. Gable M, Williams M, Stephenson A, Okano Y, Ring S, Hurtubise M, et al. Comparative multiplex dosage analysis detects whole exon deletions at the phenylalanine hydroxylase locus. *Hum Mutat* 2003; 21: 379-86.

31. Desviat LR, Pérez B, Ugarte M. Identification of exonic deletions in the PAH gene causing phenylketonuria by MLPA analysis. *Clin Chim Acta* 2006; 373:164–7.
32. Thöny B, Blau N. Mutations in the BH₄-metabolizing genes GTP cyclohydroalase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase genes. *Hum Mutat* 2006; 27: 870–8.
33. Nowacki PM, Byck S, Prevost L, Scriver CR. PAH Mutation Analysis Consortium Database: 1997. Prototype for relational locusspecific mutation databases. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 220–5.
34. Barbujani G, Goldstein DB. Africans and Asian abroad: genetic diversity in Europe. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004; 5: 119–50.
35. Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat* 2003; 21: 345–56.
36. Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR, et al. Human hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a meta-analysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1309–17.
37. Eisensmith RC, Okano Y, Dasovich M, Wang T, Guttler F, Lou H, et al. Multiple Origins for Phenylketonuria in Europe. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1355–65.
38. Zaffanello M, Zamboni G, Maselli M, Gandini A, Camilot M, Maffeis C et al. Genetic analysis carried out on blood-spots of phenylalanine hydroxylase-deficient newborns detected by northeastern Italian neonatal screening. *Genet Test* 2005; 9: 133–7.
39. Karacic I, Meili D, Sarnavka V, Heintz C, Thöny B, Ramadza DP, et al. Genotype-predicted tetrahydrobiopterin (BH₄)-responsiveness and molecular genetics in Croatian patients with phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency. *Mol Genet Metab* 2009; 97: 165–71.
40. Stojiljkovic M, Jovanovic J, Djordjevic M, Grkovic S, Cvorkov Drazic M, Petrucev B, et al. Molecular and phenotypic characteristics of patients with phenylketonuria in Serbia and Montenegro. *Clin Genet* 2006; 70: 151–5.
41. Aulehla-Scholz C, Heilbronner H. Mutational spectrum in German patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 2003; 21: 399–400.
42. Sterl E, Paul K, Paschke E, Zschocke J, Brunner-Krainz M, Windisch E, et al. Prevalence of tetrahydrobiopterin (BH₄)-responsive alleles among Austrian patients with PAH deficiency: comprehensive results from molecular analysis in 147 patients. *J Inherit Metab Dis* 2013; 36: 7–13.
43. Guttler F, Guldberg P, Henriksen KF. Mutation genotype of mentally retarded patients with phenylketonuria. *Dev Brain Dysfunct* 1993; 6: 92–6.
44. Scriver CR. Phenylketonuria—genotypes and phenotypes. *N Engl J Med* 1991; 324: 1280–1.
45. Dipple KM, McCabe ERB. Modifier genes convert “simple” Mendelian disorders to complex traits. *Mol Genet Metab* 2000; 71: 43–50.
46. Scriver CR. Why mutation analysis does not always predict clinical consequences: explanations in the era of genomics. *J Pediatr* 2002; 140: 502–6.
47. Scriver CR. After the genome—the phenome? *J Inher Metab Dis* 2004; 27: 305–17.
48. Weglage J, Moller HE, Wiedermann D, Cipic-Schmidt S, Zschocke J, Ullrich K. In vivo NMR spectroscopy in patients with phenylketonuria. Clinical significance of interindividual differences in brain phenylalanine concentrations. *J Inherit Metab Dis* 1998; 21: 81–3.
49. Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 1999; 68: 103–25.
50. Jennings IG, Cotton RGH, Kobe B. Structural interpretation of mutations in phenylalanine hydroxylase protein aids in identifying genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 683–96.
51. Lichter-Konecki U, Hipke CM, Konecki D. Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol Genet Metab* 1999; 67: 308–16.
52. Waters PJ. How PAH gene mutations cause hyperphenylalaninemia and why mechanism matters: insights from in vitro expression. *Hum Mutat* 2003; 21: 357–69.
53. Gersting SW, Kemter KE, Staudigl M, Messing DD, Danecka MK, Lagler FB, et al. Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability. *Am J Hum Genet* 2008; 83: 5–17.
54. Muntau AC, Gersting SW. Phenylketonuria as a model for protein misfolding diseases and for the development of next generation orphan drugs for patients with inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33: 649–58.
55. Knappskog PM, Eiken HG, Martinez A, Bruland O, Apold J, Flatmark T. A PKU mutation (D143G) associated with an apparent high residual enzyme activity: expression of a kinetic variant form of phenylalanine hydroxylase in three different systems. *Hum Mutat* 1996; 8: 236–46.
56. Guttler F. Hyperphenylalaninemia diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. *Acta Paediatr Scand* 1980; 280: 1–80.
57. Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, François B, Michiels L, et al. 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* 1998; 63: 71–9.
58. Rosenblatt D, Scriver CR. Heterogeneity in genetic control of phenylalanine metabolism in man. *Nature* 1968; 218: 677–8.
59. Guttler F, Guldberg P. Mutation analysis anticipates dietary requirements in phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 2000; 159: 150–3.
60. Blau N., Erlandsen H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 2004; 82: 101–11.
61. Desviat LR, Perez B, Gamez A, Sánchez A, García MJ, Martínez-Pardo M, et al. Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur J Hum Gen* 1999; 7: 386–92.
62. Mazur A, Jarocho-wicz S, Sykut-Cegielska J, Gradowska W, Kwolek A, Oltarzewski M. Evaluation of somatic development in adult patients with pre-

- viously undiagnosed and/or untreated phenylketonuria. *Med Princ Pract* 2010; 19: 46–50.
63. Smith I, Beasley MG, Ades AE. Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1990; 65: 472–8.
 64. Waisbren SE, Noel K, Fahrback K, Cella C, Frame D, Dorenbaum A, et al. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis. *Mol Genet Metab* 2007; 92: 63–70.
 65. Leuzzi V, Pansini M, Sechi E, Chiarotti F, Carducci C, Levi G, et al. Executive function impairment in early-treated PKU subjects with normal mental development. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27: 115–25.
 66. Albrecht J, Garbade SF, Burgard P. Neuropsychological speed tests and blood phenylalanine levels in patients with phenylketonuria: a meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 2009; 33: 414–21.
 67. Weglage J, Funders B, Wilken B, Schubert D, Schmidt E, Burgard P, et al. Psychological and social findings in adolescents with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1992; 151: 522–5.
 68. Blau N, Belanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, et al. Management of phenylketonuria in Europe: survey results from 19 countries. *Mol Genet Metab* 2010; 99: 109–15.
 69. Fiege B, Blau N. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH₄)-responsiveness in phenylketonuria. *J Pediatr* 2007; 150: 627–30.
 70. Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, Grechanina E, Novikov P, McDonald JD, et al. Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria (PKU). *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 732–8.
 71. MacDonald MJ, D'Cunha GB. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem Cell Biol* 2007; 85: 273–82.
 72. Sarkissian CN, Gamez A. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? *Mol Genet Metab* 2005; 86: 22–6.
 73. Harding CO. Progress toward cell-directed therapy for phenylketonuria. *Clin Genet* 2008; 74: 97–104.
 74. Channon S, Goodman G, Zlotowitz S, Mockler C, Lee PJ. Effects of dietary management of phenylketonuria on long-term cognitive outcome. *Arch Dis Child* 2007; 92: 213–8.
 75. Rocha JC, Martins MJ. Oxidative stress in Phenylketonuria: future directions. *J Inherit Metab Dis* 2012; 35: 381–98.
 76. Walter JH, White FJ, Hall SK, MacDonald A, Rylance G, Boneh A, et al. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet* 2002; 360: 55–7.
 77. Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999; 135: 375–8.
 78. Trefz FK, Burton BK, Longo N, Casanova MM, Gruskin DJ, Dorenbaum A, et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Pediatr* 2009; 154: 700–7.
 79. Burton BK, Grange DK, Milanowski A, Vockley G, Feillet F, Crombez EA, et al. The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 700–7.
 80. Zurflüh MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet F, Chery C, Burlina A, et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 2008; 29: 167–75.
 81. Erlandsen H, Pey AL, Gamez A, Perez B, Desviat LR, Aguado C, et al. Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 16903
 82. Trefz FK, Scheible D, Götz H, Frauendienst-Egger G. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32: 22–6.
 83. Blau N, Belanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, et al. Optimizing the use of sapropterin (BH₄) in the management of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2009; 96: 158–63.
 84. Koch R, Hanley W, Levy H, Matalon K, Matalon R, Rouse B, et al. The maternal phenylketonuria international study: 1984–2002. *Pediatrics* 2003; 112: 1523–9.